

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290413** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2022.04.12

(22) Дата подачи заявки  
2020.07.23

(51) Int. Cl. *C07K 16/30* (2006.01)  
*C07K 16/40* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*C07K 14/725* (2006.01)

---

(54) **ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР АНТИТЕЛ К hK2 (CAR)**

---

(31) 62/878,958; 62/898,635; 62/910,645;  
63/030,522

(32) 2019.07.26; 2019.09.11; 2019.10.04;  
2020.05.27

(33) US

(86) PCT/IB2020/056966

(87) WO 2021/019386 2021.02.04

(71) Заявитель:  
**ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Бриттингэм Рэймонд, Ганезан  
Раджкumar, Ла Порте Шерри, Ли  
Джон, Ло Цзиньцюань, Макдевитт  
Тереза, Шэнь Фэй, Сингх Санджайа,  
Сун Дэган, Венкатарамани Сатядеви,  
И Фан, Чжао Юнхун (US)**

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

---

(57) Изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), которые специфически нацелены на человеческий калликреин-2 (hK2), и к иммунореактивным клеткам, содержащим такие CAR, для лечения рака.

**202290413**  
**A1**

**202290413**

**A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-572446EA/032

### **ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР АНТИТЕЛ К hK2 (CAR) ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 30 июня 2020 г., называется JBI6124WOPCT1\_SL.txt и имеет размер 562 160 байт.

### **ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Изобретение относится к нацеленным на hK2 химерным антигенным рецепторам (CAR), содержащим одноцепочечные переменные нацеленные на hK2 фрагменты, и сконструированным нацеленным на hK2 иммунным клеткам, экспрессирующим CAR. Также предложены нуклеиновые кислоты и экспрессионные векторы, кодирующие CAR, рекомбинантные клетки, содержащие векторы, и композиции, содержащие сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие CAR, нацеленные на hK2. Также предложены способы получения CAR и сконструированных иммунных клеток и способы применения сконструированных иммунных клеток для лечения патологических состояний, включая рак.

### **ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Рак предстательной железы занимает второе место среди наиболее часто диагностируемых видов рака и шестое среди основных причин смерти от рака у мужчин; на него приходится 14% (903 500) от общего числа новых случаев рака и 6% (258 400) от общего числа случаев смерти от рака у мужчин во всем мире. Течение рака предстательной железы от постановки диагноза до смерти лучше всего классифицировать как ряд клинических стадий на основании степени заболевания, гормонального статуса и наличия или отсутствия обнаружимых метастазов: локализованное заболевание, повышение уровней простатспецифического антигена (ПСА) после лучевой терапии или хирургического вмешательства без обнаружимых метастазов и клинические метастазы в состоянии до или после кастрации. Несмотря на то что проведение операции, лучевой терапии или комбинация обоих способов лечения может оказывать лечебный эффект на пациентов с локализованным заболеванием, у значительной части этих пациентов происходит рецидив заболевания, о чем свидетельствует повышающийся уровень ПСА, что может привести к развитию метастазов, особенно в группе высокого риска - переход к смертельной стадии заболевания.

Андроген-депривационная терапия представляет собой стандартное лечение, по существу с прогнозируемым исходом: снижение уровня ПСА, период стабильности, в течение которого опухоль не пролиферирует, с последующим возрастанием уровня ПСА и рецидивом в форме кастрационно-резистентного заболевания. Исторически антиандрогенную терапию (терапию ADT) стали использовать в качестве стандарта для

лечения пациентов с метастатическим раком предстательной железы.

Родственная калликреину пептидаза 2 (hK2, HK2) представляет собой трипсиноподобный фермент с экспрессией, регулируемой андрогенным рецептором (AR), специфичный для ткани простаты и рака предстательной железы. hK2 активируется трансмембранной протеазой серина 2 (TMPRSS2) и секретируется в протоки предстательной железы, где инициирует каскад, который расщепляет семеногелин (внеклеточную матрицу в эякуляте) для повышения подвижности сперматозоидов. Экспрессия hK2 ограничена тканями предстательной железы и ее рака, однако недавно hK2 обнаружена в клеточной линии рака молочной железы и первичных образцах от пациента после соответствующей активации AR-пути стероидными гормонами (U.S. Pat. Publ. №2018/0326102). Подобно ПСА, ретроградное высвобождение каталитически неактивного hK2 в кровь происходит, когда сложная структурная организация предстательной железы нарушается из-за гипертрофии или злокачественной трансформации.

В терапии Т-клетками используются выделенные Т-клетки, которые были генетически модифицированы для усиления их специфичности к специфическому опухолеассоциированному антигену. Генетическая модификация может включать экспрессию химерного антигенного рецептора (CAR) или экзогенного Т-клеточного рецептора для обеспечения новой антигенной специфичности Т-клетки. Т-клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы (CAR-Т-клетки), могут индуцировать иммунореактивность опухоли. Существует потребность в лучших видах противоопухолевой терапии с использованием CAR-Т-клеток.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе описаны химерные антигенные рецепторы (CAR), например, CAR, которые нацелены на человеческий калликреин-2 (hK2), клетки, содержащие CAR, векторы, кодирующие CAR, например, рекомбинантные векторы экспрессии, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR, способы получения CAR, композиции, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева, популяции клеток и способы лечения расстройств, например рака, с использованием описанных CAR.

В одном аспекте предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

(а) внеклеточный домен, содержащий scFv, который специфически связывается с антигеном человеческого калликреина-2 (hK2);

(b) трансмембранный домен; и

(c) внутриклеточный сигнальный домен, необязательно содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит

(d) шарнирную область CD8a,

где трансмембранный домен включает полипептид CD8a трансмембранной области (CD8a-TM); и

где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен,

содержащий компонент члена 9 суперсемейства TNF-рецепторов (CD137) и первичный сигнальный домен, содержащий компонент дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Cd8a содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 25, 269, 270, 271 или 272;

трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 26; и/или

внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий

трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:

NO: 27, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая

по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 28.

В другом аспекте предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 315, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 311;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 309, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 311;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую



аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; или

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122,

где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

В другом аспекте предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 313, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129, и CDR3 легкой цепи, имеющую



определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138; или

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139.

В другом аспекте предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельный домен (VL) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 74, 75, 147, 148, 149, 150, 151, 152 и 318; и/или

вариабельный домен (VH) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, 5, 6, 76, 77, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146 и 317;

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген человеческого калликреина-2 (hK2).

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен



вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 318, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 317.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерный полипептид между вариабельной областью легкой цепи (VL) и вариабельной областью тяжелой цепи (VH). В некоторых вариантах осуществления линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-23, 169-184 и 340-343. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит сигнальный полипептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента члена 9 суперсемейства рецепторов ФНО (CD137), компонента дзета-цепи CD3 (CD3z)

поверхностного гликопротеина Т-клеток, компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента члена суперсемейства дифференцировки и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM). В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

В различных вариантах осуществления CAR дополнительно содержит шарнирную область, связывающую трансмембранный домен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8a. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, 269, 270, 271 или 272. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-44, 78-81, 221-236 и 273-308. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-61, 82-85 и 205-220.

В другом аспекте предложен выделенный лимфоцит, экспрессирующий любой из описанных выше CAR. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой клетку-натуральный киллер (NK).

Также предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая любой из описанных выше CAR. Также предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты. Кроме того, предложена клетка, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты.

Дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество любого из указанных выше лимфоцитов, а также фармацевтически приемлемый эксципиент.

а) В одном аспекте в настоящем изобретении предложен CAR в соответствии с настоящим изобретением для применения в способе терапии.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен лимфоцит в соответствии с настоящим изобретением для применения в способе терапии.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, например, фармацевтическая композиция, в соответствии с настоящим изобретением для применения в способе терапии.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен CAR в соответствии с настоящим изобретением для применения в способе лечения рака.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен лимфоцит в соответствии с настоящим изобретением для применения в способе лечения рака.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, например, фармацевтическая композиция, в соответствии с настоящим изобретением для применения в способе лечения рака.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак предстательной железы.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак молочной железы, экспрессирующий андрогенный рецептор (AR).

В другом аспекте предложен способ лечения субъекта, имеющего рак. Способ включает введение терапевтически эффективного количества указанных выше лимфоцитов нуждающемуся в этом субъекту, посредством чего лимфоциты индуцируют уничтожение раковых клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы, экспрессирующий андрогенный рецептор (AR).

В другом аспекте предложен способ направленного уничтожения раковой клетки, включающий приведение раковой клетки в контакт с любым из указанных выше лимфоцитов, посредством чего лимфоцит индуцирует уничтожение раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой клетку рака предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы, экспрессирующий андрогенный рецептор (AR).

В другом аспекте предложен способ обнаружения наличия рака у субъекта, включающий:

(а) приведение образца клеток, полученного от субъекта, в контакт с любым из указанных выше CAR, тем самым формируя комплекс CAR-клетка, и

(б) обнаружение комплекса, причем обнаружение комплекса указывает на наличие рака у субъекта.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Вышеизложенное станет очевидным из представленного ниже более подробного описания примера вариантов осуществления изобретения, которые проиллюстрированы на прилагаемых графических материалах.

Данный комплект материалов заявки на патент содержит по меньшей мере один цветной рисунок. Копии данной заявки на патент с цветным(-и) рисунком(-ами) будут предоставлены патентным офисом по запросу и после оплаты необходимой пошлины.

На **Фиг. 1А-1С** показано конструирование и экспрессия hK2 CAR на человеческих Т-клетках. На **Фиг. 1А** показана схематическая иллюстрация конструирования hK2 CAR; TM: трансмембранный. На **Фиг. 1В** и **1С** показана экспрессия hK2 CAR на поверхности Т-клеток. Первичные человеческие Т-клетки подвергали электропорации без мРНК (контроль) или в присутствии 10 мкг мРНК для экспрессии или scFv CAR к hK2, или

нерелевантного контрольного CAR. Через сутки после электропорации экспрессию CAR на поверхности клеток измеряли с помощью проточной цитометрии после окрашивания с помощью 2 мкг/мл биотинилированного L-белка и конъюгированного со стрептавидином PE (**Фиг. 1В**) или 1 мкг/мл биотинилированного hK2 и конъюгированного со стрептавидином PE (**Фиг. 1С**).

На **Фиг. 2** показана цитотоксичность опухолевых клеток, экспрессирующих hK2, с использованием CAR-T-клеток во время 20-часового проточного анализа при указанном соотношении эффектор-мишень (Е/Т). Через сутки после временной трансфекции клетки-мишени (Vcar и DU145) метили флуоресцентным красителем Cell Trace Violet (CTV) и затем совместно культивировали с hK2 CAR-T-клетками. Контрольные Т-клетки служили отрицательным контролем эффектора. Процент уничтожения представляет собой отношение абсолютного числа живых (отрицательных по окрашиванию для оценки жизнеспособности клеток) (CTV-положительных) клеток-мишеней, оставшихся в совместной культуре, к числу живых мишеней, культивированных без CAR-T-клеток.

На **Фиг. 3А-3В** показана цитотоксичность hK2-специфических CAR-T-клеток в реальном времени. График нормализованного клеточного индекса (CI) для клеток-мишеней (**Фиг. 3А**) Vcar (5E4) и (**Фиг. 3В**) DU145 (5E3), инкубированных с контролем, hK2 11B6 CAR LH, подвергнутым электропорации с 10 мкг мРНК (через 24 часа после трансфекции), или Т-клетками с контрольным CAR при различных соотношениях Е/Т в течение приблизительно 72 часов. При засеивании отдельно клетки-мишени, прикрепленные к планшету и пролиферируемые, увеличивали показание CI. Когда Т-клетки добавляли к клеткам-мишеням, hK2 CAR и контрольные CAR-T-клетки вызвали hK2-положительный цитолиз VCar клеток и последующее постепенное снижение CI при соотношении Е/Т от 5 : 1 до 0,156 : 1. Снижение значения CI после добавления эффекторных клеток отражает потерю жизнеспособности клеток-мишеней. Также проводили параллельный эксперимент с использованием клеток-мишеней hK2(-) DU145, как показано на **Фиг. 3В**); при соотношениях Е/Т, протестированных в этом эксперименте, hK2 и контрольные CAR-T-клетки не снижали показатель CI после добавления, что демонстрировало отсутствие цитолитической активности. Ось Y представляет собой нормализованный CI, полученный с помощью программного обеспечения RTCA и отображаемый в режиме реального времени. Ось X представляет собой время культивирования клеток и время обработки в часах. Средние значения CI наносили на график с учетом  $\pm$  стандартного отклонения.

На **Фиг. 4** показана продукция интерферона- $\gamma$  цитокина Th1 (IFN- $\gamma$ ) антиген-стимулированными CAR-T-клетками. Супернатант собирали из анализа уничтожения клеток на клеточном анализаторе xCELLigence (см. **Фиг. 3А-3В**) через приблизительно 70 часов совместного культивирования (VCar#5E4, DU145#5E3). hK2 CAR LH и контрольные CAR-модифицированные Т-клетки секретировали IFN- $\gamma$  при совместном культивировании с VCar-клетками, экспрессирующими hK2, чего не отмечалось при совместном культивировании с hK2-отрицательными клетками DU145. Показана средняя

концентрация IFN- $\gamma$  с учетом  $\pm$  стандартного отклонения (пг/мл) в культурах в двух повторностях.

На **Фиг. 5А-5В** показано, что оценку термически стабилизированных 11В6 клонов scFvs CAR проводили по гену-репортеру на предмет антигензависимой активности. На **Фиг. 5А** показано, что клетки Jurkat, содержащие ген люциферазы, регулируемый с помощью отвечающего на сигнал NFAT-промотора (называемые клетками JNL), трансдуцировали с использованием различных конструкторов hK2 CAR. Экспрессию определяли с помощью биотинилированного hK2, а затем - конъюгированного со стрептавидином PE. На **Фиг. 5В** показано, что связывание между конструктором CAR и его распознанным клеточным антигеном (hK2 на клетках-мишенях) приводит к экспрессии люциферазы в клетках JNL. Клетки JNL, содержащие указанные клоны CAR и нетрансдуцированные клетки JNL (UTD), совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (VCaP или DU145 клетки), а активность люциферазы измеряли как интенсивность люминесценции. Клоны считали активными, когда интенсивность люминесценции в присутствии антиген-экспрессирующих клеток превышала уровень UTD-клеток в 1,5 раза.

На **Фиг. 6** показана экспрессия hK2 CAR на поверхности Т-клеток. Первичные Т-клетки человека трансдуцировали термически стабилизированным 11В6 и родительским лентивирусом CAR на основании scFvs (множественность инфекции (MOI): 3), и экспрессию CAR определяли с помощью биотинилированного hK2 (1 мкг/мл), а затем конъюгированного со стрептавидином PE через 14 дней после трансдукции.

На **Фиг. 7А-7В** показано, что оценку термически стабилизированных 11В6 scFv CAR-Т-клеток на предмет антигензависимой цитотоксичности проводили во время анализа уничтожения клеток в клеточном анализаторе IncuCyte в режиме реального времени. Термически стабилизированные hK2 CAR-Т-клетки и родительские CAR-Т-клетки 11В6 совместно инкубировали с клетками VCaP (**Фиг. 7А**) и клетками РС3 (**Фиг. 7В**) в течение 88 часов. Соотношение эффектор/мишень (Е/Т) рассчитывали на основе данных экспрессии CAR (см. **Фиг. 6**). Клетки-мишени стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, который измеряют с помощью системы визуализации IncuCyte в режиме реального времени. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток\*100 (%).

На **Фиг. 7С** показан процент ингибирования роста опухолевых hK2-положительных VCaP клеток при соотношении эффектор/мишень от 1 : 1 или 0,5 : 1 под действием Т-клеток, трансдуцированных CAR 1-10, или родительских 11В6\_HL или 11В6\_LH во время анализа уничтожения клеток на клеточном анализаторе IncuCyte в режиме реального времени, оценивавшим антигензависимую цитотоксичность. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток\*100 (%).

На **Фиг. 7D** показан процент ингибирования роста опухолевых PC3-клеток при соотношении эффектор/мишень 1 : 1 под действием Т-клеток, трансдуцированных CAR 1-10, или родительских 11B6\_HL или 11B6\_LH во время анализа уничтожения клеток на клеточном анализаторе IncuCyte в режиме реального времени, оценивавшим антиген-зависимую цитотоксичность. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток\*100 (%).

На **Фиг. 7E** показан процент ингибирования роста опухолевых клеток, hK2-положительных VCaP клеток, CAR-Т-клетками, трансдуцированными CAR17 (B413LH на фигуре), CAR18 (B413LH на фигуре), CAR19 (B359HL на фигуре) и CAR20 (B359LH на фигуре) во время анализа уничтожения клеток на клеточном анализаторе IncuCyte в режиме реального времени, оценивавшего антиген-зависимую цитотоксичность. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток\*100 (%).

На **Фиг. 7F** показан процент ингибирования роста опухолевых клеток, hK2-отрицательных DU145 клеток, CAR-Т-клетками, трансдуцированными CAR17 (B413HL на фигуре), CAR18 (B413LH на фигуре), CAR19 (B359HL на фигуре) и CAR20 (B359LH на фигуре) во время анализа уничтожения клеток на клеточном анализаторе IncuCyte в режиме реального времени, который оценивал антиген-зависимую цитотоксичность. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток\*100 (%).

На **Фиг. 8** показано высвобождение цитокинов hK2 ленти-CAR-Т-клетками. Супернатант собирали после совместного культивирования в течение ночи (приблизительно 20 часов) hK2 CAR-Т-клеток с VCaP клетками при соотношении Е/Т, равном 1 : 1, анализировали с использованием набора 13-plex Milliplex Human High Sensitivity T cell (HSTCMAG28SPMX13). hK2 CAR модифицированные Т-клетки секретировали цитокины во время совместного культивирования с VCaP клетками, экспрессирующими hK2, но секреция была минимальной при использовании нетрансдуцированных Т-клеток (UTD). Показана средняя концентрация цитокинов с учетом ± стандартного отклонения (пг/мл) для культур в двух повторностях.

На **Фиг. 9** показано высвобождение IFN-γ hK2 ленти-CAR-Т-клетками. Супернатант, собранный после совместного культивирования в течение ночи (приблизительно 20 часов) hK2 CAR-Т-клеток с VCaP клетками, DU145 клетками (5E4) при соотношении Е/Т, равном 1 : 1. Модифицированные hK2 CAR Т-клетки секретируют IFN-γ во время совместного культивирования с клетками VCaP, экспрессирующими hK2, чего не отмечается с hK2-отрицательными DU145 клетками. Показана средняя концентрация IFN-γ с учетом ± стандартного отклонения (пг/мл) в культурах в двух повторностях. В качестве положительного и отрицательного контролей использовались Т-

клетки, стимулированные микроносителями CD3/CD28, и только Т-клетки, соответственно.

На **Фиг. 10А-10Е** показаны результаты анализа пролиферации hK2 CAR-T-клеток. (**Фиг. 10А, 10С**) hK2 CAR-T-клетки и нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки метили с помощью красителя CellTrace Violet (CTV; 5 мкм) и совместно культивировали с hK2-положительными клетками VCar и hK2-отрицательными клетками DU145. Через пять дней после совместного культивирования клетки собирали и окрашивали с помощью CD3, CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток в ближней ИК-области (NearIR live/dead Dye) и hK2 CAR. Анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением FlowJo. Лимфоциты идентифицировали с помощью живых CD3 и определяли частоты CAR+ Т-клеток с помощью разведения красителя CTV и маркера активации CD25. (**Фиг. 10В, 10D**) В качестве положительного и отрицательного контролей использовались Т-клетки, стимулированные микроносителями CD3/CD28, и только Т-клетки, соответственно. Данные на **Фиг. 10Е** демонстрируют, что после 5 дней совместного культивирования с VCar клетками hK2 CAR+ Т-клетки пролиферируют более устойчиво, чем положительный контроль с микроносителями CD3/28. Т-клетки, сконструированные с помощью различных конструктов CAR, имеют другую активность пролиферации и демонстрировали различные количества CAR+ Т-клеток. Количество CAR+ Т-клеток получают на основании среднего значения абсолютного количества клеток +/- SEM из трех технических повторов.

На **Фиг. 11А-11В** показаны результаты анализов для определения уровня экспрессии hK2 CAR на первичных Т-клетках с использованием меченого биотином белка hK2. **Фиг. 11А** представляет собой схематическую иллюстрацию конструкта hK2 CAR; TM: трансмембранный. На **Фиг. 11В** первичные человеческие Т-клетки трансдуцировали с использованием новых scFv hK2 на основе KL2B413 HL и LH и регуманизированного лентивируса 11B6 KL2B359 HL и LH CAR (MOI 3), а экспрессию CAR определяли с помощью биотинилированного hK2 (1 мкг/мл) и затем конъюгированного со стрептавидином PE через 14 дней после трансдукции. На **Фиг. 11В** представлены краткие сведения о процентном содержании hK2 CAR+ Т-клеток (% положительных), обнаруженном с помощью проанализированных нового KL2B413 HL и LH и регуманизированных 11B6 KL2B359 HL и LH CAR. Как показано, различные клоны имеют разные уровни экспрессии CAR, которые находятся в диапазоне от 45,1% до 59,9%. Все CAR-T-клетки были нормализованы к равным CAR+ Т-клеткам для последующих функциональных анализов.

На **Фиг. 12А-12В** показаны результаты оценки новых клонов hK2 KL2B413 и регуманизированных клонов 11B6 CAR в анализе JNL-репортера на предмет антигензависимой активности. На **Фиг. 12А** показано, что клетки Jurkat, содержащие ген люциферазы, регулируемый отвечающим на сигнал NFAT-промотором (называемые клетками JNL), трансдуцировали с использованием различных конструктов hK2 CAR.

Экспрессию определяли с помощью биотинилированного hK2, а затем - конъюгированного со стрептавидином PE. Экспрессия CAR в трансдуцированных клетках JNL была подтверждена для выбранных клонов с 46-50% клеток, экспрессирующих регуманизированные 11B6 KL2B359 CAR, и 73,7-96% клеток, экспрессирующих KL2B413 CAR. Данные на **Фиг. 12В** указывают на то, что связывание между конструктором hK2 CAR и распознаваемым им клеточным антигеном (hK2 на клетках-мишенях) приводит к экспрессии люциферазы в клетках JNL. Клетки JNL, содержащие указанные CAR клоны и клетки JNL (UTD), совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (клетками VCaP, LNCaP/hK2, LNCaP, C4-2B, 22Rv1 или DU145), а активность люциферазы измеряли как интенсивность люминесценции. Клоны считали активными, когда интенсивность люминесценции в присутствии антиген-экспрессирующих клеток превышала уровень UTD-клеток в 1,5 раза. Для нового KL2B413 и регуманизированных 11B6 HL и LH CAR не было обнаружено антигензависимой активации.

На **Фиг. 13А-13В** показаны результаты оценки hK2 CAR-T-клеток во время анализа уничтожения клеток в клеточном анализаторе IncuCyte на предмет антигензависимой цитотоксичности. hK2 CAR-T-клетки совместно инкубировали с клетками VCaP hK2+ (**Фиг. 13А**) и клетками DU145 hK2- (**Фиг. 13В**) в течение 96 часов. Соотношение эффектор/мишень (E/T) рассчитывали на основе данных экспрессии CAR (**Фиг. 11В**). Клетки-мишени стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, который измеряют с помощью системы визуализации IncuCyte в режиме реального времени. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток\*100 (%).

**Фиг. 14** иллюстрирует данные, показывающие продукцию IFN-гамма цитокина Th1 антиген-стимулированными CAR-T-клетками. IFN- $\gamma$ , продуцируемый цитотоксическими Т-клетками, имеет решающее значение для обеспечения иммунного надзора над опухолями, что может непосредственно ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз некоторых злокачественных новообразований *in vivo* и *in vitro*. Для определения способности hK2 CAR-модифицированных человеческих Т-клеток распознавать и активироваться с помощью hK2(+) опухолевых клеток, первичные Т-клетки, содержащие указанные клоны CAR, совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (LNCaP/hK2, LNCaP, C4-2B, 22Rv1 или DU145 клетки), а супернатант собирали для измерения концентрации IFN-g. Как показано, модифицированные hK2 CAR-T-клетки секретируют IFN-гамма во время совместного культивирования с клетками LNCaP/hK2, экспрессирующими hK2, клетками C4-2B даже с очень низкой экспрессией hK2 и клетками LNCaP, чего не отмечалось с hK2-отрицательными клетками DU145. Неописанный контрольный CAR секретировал гораздо большее количество IFN- $\gamma$  из-за гораздо более высокого уровня экспрессии антигена, чем у hK2. Показана средняя концентрация IFN- $\gamma \pm SD$  (пг/мл) для культур при повторных измерениях.

На **Фиг. 15** показаны результаты анализа дегрануляции CD107a для оценки

противоопухолевой активности hK2 CAR-T-клеток. Клетки-мишени ( $5 \times 10^4$ ) совместно культивировали с равным количеством эффекторных клеток в 0,1 мл на лунку в 96-луночном планшете. Контрольные лунки содержали только Т-клетки. Антитела к CD107a (5 мкл на лунку) добавляли в дополнение к 1 мкл/образец монензина (BD Biosciences) и инкубировали в течение 4 часов при 37 °С. Клетки дважды промывали PBS, окрашивали для экспрессии CAR, CD3 и CD8 hK2 и анализировали на проточном цитометре BD Fortessa. Как показано, присутствие антигена hK2 на клетках Vcar приводит к увеличению CAR(+) Т-клеток CD107A+ hK2, но не клеток CAR(-) hK2 и UTD-T, измеренных методом проточной цитометрии, тогда как в CAR-T-клетках наблюдали только фоновое окрашивание (<2%) без стимуляции опухолевых клеток. Форбол 12-миристат 13-ацетат (PMA) в комбинации с иономицином (eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail; 500X) был постоянным индуктором поверхностной экспрессии клеток CD107a в данной 4-часовой модели культивирования клеток, которую использовали в качестве положительного контроля. Результаты показаны для репрезентативных донорских Т-клеток и воспроизводятся с разными донорами.

На **Фиг. 16А-16D** показаны результаты анализа пролиферации hK2 CAR-T-клеток. hK2 CAR-T-клетки и нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки метили с помощью красителя CellTrace Violet (CTV; 5 мкм) и совместно культивировали с hK2-положительными клетками Vcar и hK2-отрицательными клетками DU145. Через пять дней после совместного культивирования клетки собирали и окрашивали с помощью CD3, CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток (NearIR live/dead Dye) и hK2 CAR. Анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением FlowJo. Лимфоциты идентифицировали с помощью живых CD3 и определяли частоты CAR+ Т-клеток с помощью разведения красителя CTV и маркера активации CD25. Путем гейтирования на CD3+ Т-клетках, как показано на **Фиг. 16А-16В**, клетки hK2(+) Vcar, но не hK2(-) клетки DU145, стимулировали пролиферацию всех Т-клеток, созданных с конструктами CAR, и повышали активацию маркера CD25, как показано на **Фиг. 16С-16D**. В качестве положительного и отрицательного контролей использовались Т-клетки, стимулированные микроносителями CD3/CD28, и только Т-клетки, соответственно. Т-клетки без какой-либо стимуляции не пролиферируют, и стимулированные микроносители CD3/CD28 Т-клетки демонстрировали эквивалентную картину пролиферации. Как показано, hK2 CAR-T-клетки пролиферируют более устойчиво, чем положительный контроль с микроносителями CD3/CD28 после 5 дней совместного культивирования с Vcar клетками. Т-клетки, сконструированные с помощью различных конструктов CAR, имеют другую активность пролиферации и демонстрировали различные количества CAR+ Т-клеток. Сводные данные о процентной доле пролиферирующих Т-клеток и Т-клеток, экспрессирующих CD25, на основе средних значений абсолютного числа клеток +/- SEM после двух повторений показаны на **Фиг. 16В и 16D**.

На **Фиг. 17А** показано выравнивание последовательностей доменов VH mu11B6,

hu11B6, KL2B357, KL2B358, KL2B359, KL2B360, HC3 и HCG5. На Фиг. 17А раскрыты SEQ ID NO 317, 5, 140, 141, 77, 140, 6, 4 и 345, соответственно, по порядку. На Фиг. 17В показаны защищенные сегменты, сопоставленные с последовательностью антигена hK2, для визуализации связывающих эпитопов антител hK2, идентифицированных с помощью HDX-MS. На Фиг. 17В раскрыты SEQ ID NOS 351, 351, 351, 351, 351 и 351, соответственно, по порядку.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Ниже приведено описание примеров осуществления.

Настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), нацеленным на человеческий калликреин-2 (hK2), клеткам, содержащим такие CAR, и способам лечения рака (например, рака предстательной железы или рака молочной железы, экспрессирующего AR) с использованием CAR, описанных в настоящем документе.

CAR по настоящему изобретению имеют антигенную специфичность в отношении hK2. В контексте настоящего документе фразы «имеет антигенную специфичность» и «вызывают антигенспецифический ответ» означает, что CAR может специфически связываться с антигеном и иммунологически распознавать его, так что связывание CAR с антигеном hK2 вызывает иммунный ответ. Способы тестирования CAR на антигенную специфичность и на способность распознавать клетки-мишени известны в данной области техники.

В изобретении также предложены родственные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева, популяции клеток, антитела или их антигенсвязывающие участки, и фармацевтические композиции, относящиеся к CAR согласно изобретению.

Ниже описаны несколько аспектов изобретения со ссылкой на примеры только в иллюстративных целях. Следует понимать, что изложены многочисленные конкретные детали, взаимосвязи и способы, чтобы обеспечить полное понимание изобретения. Однако среднему специалисту в соответствующей области техники будет понятно, что изобретение можно реализовать на практике без одной или более конкретных деталей или применять на практике другие способы, протоколы, реагенты, линии клеток и животных. Настоящее изобретение не ограничено показанным порядком действий или событий, так как некоторые действия могут происходить в другом порядке и/или одновременно с другими действиями или событиями. Более того, не все проиллюстрированные действия, стадии или события необходимы для реализации методологии в соответствии с настоящим изобретением. Многие из методик и процедур, описанных или упоминаемых в данном документе, хорошо понятны и широко применяются с использованием традиционной методологии специалистами в данной области техники.

Если не указано иное, все термины в данной области техники, обозначения и другие научные термины или терминология, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в области техники, к которой относится

настоящее изобретение. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в данном документе для ясности и/или для удобства ссылки, и включение таких определений в данный документ не обязательно должно толковаться как представляющее существенное отличие от того, что обычно учитывается в данной области техники. Кроме того, следует понимать, что термины, такие как термины, определенные в широко используемых словарях, следует интерпретировать как имеющие значение, соответствующее их значению в контексте соответствующей области техники и/или как определено в данном документе иным образом.

В случае представления списка, если не указано иное, следует понимать, что каждый отдельный элемент этого списка и каждая комбинация из этого списка является отдельным вариантом осуществления. Например, список вариантов осуществления, представленный в виде «А, В или С», следует интерпретировать как список, включающий варианты осуществления «А», «В», «С», «А или В», «А или С», «В или С» или «А, В или С».

### **Определения**

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на «клетку» включает комбинацию двух или более клеток и т. п.

Переходные термины «содержащий», «состоящий по существу из» и «состоящий из» предназначены для обозначения их по существу общепринятых патентных значений; т. е. (i) термин «содержащий», который является синонимом терминам «включающий», «содержащий» или «характеризующийся», является включающим или неограниченным и не исключает дополнительные, неуказанные элементы или стадии способа; (ii) «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в формуле изобретения; и (iii) «состоящий по существу из» ограничивает объем формулы изобретения конкретными материалами или стадиями «и тем, что не оказывает существенного влияния на основную (-ые) и новую (-ые) характеристику (-и)» заявленного изобретения. Варианты осуществления, описанные в отношении фразы «содержащий» (или его эквивалентов), обеспечивают такое же значение, как варианты осуществления, описанные независимо друг от друга в отношении фразы «состоящий из» и «состоящий по существу из».

Термин «активация» или «стимуляция» или «активированный(-ая, -ые)» или «стимулированный(-ая, -ые)» относится к индукции изменения биологического состояния клетки, что приводит к экспрессии маркеров активации, продукции цитокинов, пролиферации или опосредованной цитотоксичности клеток-мишеней. Клетки могут активироваться первичными стимулирующими сигналами. Костимулирующие сигналы могут усиливать величину первичных сигналов и подавлять гибель клеток после начальной стимуляции, что приводит к более продолжительному состоянию активации и, таким образом, более высокой цитотоксической способности. Термин «костимулирующий

сигнал» относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации и/или активации Т-клеток и/или NK-клеток и/или повышению или понижению экспрессии ключевых молекул.

«Антигенсвязывающий фрагмент» или «антигенсвязывающий домен» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают части иммуноглобулина, которые связывают антиген, такие как VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, переменные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, VHH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, альтернативные каркасы, которые связывают антиген, и мультиспецифические белки, содержащие антигенсвязывающие фрагменты. Антигенсвязывающие фрагменты (такие как VH и VL) могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одиночных антител, в которых домены VH/VL можно объединять в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными цепями с образованием моновалентного антигенсвязывающего домена, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело. Антигенсвязывающие фрагменты также могут конъюгироваться с другими антителами, белками, антигенсвязывающими фрагментами или альтернативными каркасом, которые могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими, с конструированием биспецифических и мультиспецифических белков.

Термин «рак» обозначает широкую группу различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом ненормальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводят к образованию злокачественных опухолей, которые прорастают в соседние ткани и также могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровоток. «Рак» или «раковая ткань» может включать в себя опухоль.

«Полноразмерное антитело» состоит из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из переменного домена тяжелой цепи (VH) и константного домена тяжелой цепи, состоящей из субдоменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменного домена легкой цепи (VL) и константного домена легкой цепи (CL). VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), между которыми располагаются каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от амино- к карбокси-концу в следующем порядке:

FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Термин «человеческое антитело» относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Вариабельные области человеческого антитела получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Если антитело содержит константную область или часть константной области, константную область также получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области человеческие антитела получены из системы, в которой используют иммуноглобулин зародышевой линии человека или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. «Человеческое антитело», как правило, содержит аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у людей, из-за различий между системами, используемыми для получения человеческих антител и локусов человеческих иммуноглобулинов, внедрения соматических мутаций, намеренного введения замен в каркасные участки и/или CDR, или и то и другое. Как правило, «человеческое антитело» по аминокислотной последовательности на по меньшей мере около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой генами иммуноглобулина зародышевой линии человека или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях «человеческое антитело» может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik et al., (2000) *J Mol Biol* 296:57-86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., (2010) *J Mol Biol* 397:385-96 и международной публ. пат. №WO2009/085462. Антитела, в которых по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, не подходят под определение антитела человека.

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а по меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не быть точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

Термин «выделенный» относится к однородной популяции молекул (таких как синтетические полинуклеотиды или полипептиды), которые были по существу отделены

и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные молекулы формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин «выделенное» относится к антителу, которое по существу не содержит иных клеточных материалов и/или химических веществ, и охватывает молекулы, которые выделены с большей чистотой, такой как 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% чистотой.

Термин «модулятор» относится к повышенной или пониженной способности тестируемой молекулы опосредовать усиленный или ослабленный ответ (*m. e.*, эффект на последующих стадиях) по сравнению с ответом, который опосредован контролем или носителем.

Термины «клетка-натуральный киллер» и «NK-клетка» используются взаимозаменяемо и являются синонимами в настоящем документе. Термин «NK-клетка» относится к дифференцированному лимфоциту с фенотипом CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> и/или CD57<sup>+</sup> TCR<sup>-</sup>. NK-клетки характеризуются способностью связываться с клетками, которые не экспрессируют «собственные» антигены MHC/HLA, и уничтожать их путем активации специфических цитолитических ферментов, способностью уничтожать опухолевые клетки или другие пораженные клетки, которые экспрессируют лиганд для рецепторов, активирующих NK-клетки, а также способностью высвободить молекулы белка, называемые цитокинами, которые стимулируют или ингибируют иммунный ответ.

Термины «специфически связывается», «специфическое связывание», «специфически связывает» или «связывает» относятся к связыванию белковой молекулы с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем у других антигенов. Как правило, белковая молекула связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $1 \times 10^{-7}$  М или менее, например около  $5 \times 10^{-8}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее или около  $1 \times 10^{-12}$  М или менее, как правило, со значением  $K_D$ , которое по меньшей мере в сто раз ниже его значения  $K_D$  связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). В контексте неоантигенов предстательной железы, описанных в настоящем документе, термин «специфическое связывание» относится к связыванию белковой молекулы с неоантигеном предстательной железы без обнаружимого связывания с белком дикого типа, вариантом которого является неоантиген.

Термин «опухолевая клетка» или «раковая клетка» относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке, либо *in vivo*, *ex vivo*, либо в культуре тканей, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно затрагивают поступление нового генетического материала. Хотя трансформация может быть вызвана инфекцией трансформирующим вирусом и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты, поглощением экзогенной нуклеиновой кислоты или она также может возникать спонтанно или после воздействия

канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Трансформация/рак проявляются в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, модулировании уровней маркера, специфичных для опухоли, инвазивности, росте опухоли у приемлемых животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т. п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*.

Термин «химерный антигенный рецептор» (CAR), используемый в настоящем документе, определяется как клеточный рецептор, содержащий внеклеточный мишень-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, образующие комбинацию, которая в природе не встречается на одном белке. В частности, сюда относятся рецепторы, в которых внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен в природе не встречаются на белке одного рецептора. Химерные антигенные рецепторы настоящего изобретения предназначены главным образом для применения с лимфоцитами, такими как Т-клетки и натуральные киллеры (NK).

Термины «Т-клетка» и «Т-лимфоцит» являются взаимозаменяемыми и используются в настоящем документе как синонимы. В настоящем документе Т-клетка включает тимоциты, наивные Т-лимфоциты, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты, покоящиеся Т-лимфоциты или активированные Т-лимфоциты. Т-клетка может представлять собой клетку Т-хелпер (Th), например Т-хелпер 1 (Th1) или Т-хелпер 2 (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; CD4+ Т-клетка), CD4+ Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (CTL; CD8+ Т-клетка), инфильтрирующую опухоль цитотоксическую Т-клетку (TIL; CD8+ Т-клетка), CD4+CD8+ Т-клетку или любую другую подгруппу Т-клеток. Другие иллюстративные популяции Т-клеток, подходящих для применения в конкретных вариантах осуществления, включают наивные Т-клетки и Т-клетки памяти. Также включены «NKT-клетки», относящиеся к специализированной популяции Т-клеток, которые экспрессируют полуинвариантный  $\alpha\beta$  Т-клеточный рецептор, но также экспрессируют различные молекулярные маркеры, которые, как правило, ассоциированы с Nk-клетками, такими как NK1.1. NKT-клетки включают NK1.1+ и NK1.1-, а также CD4+, CD4-, CD8+ и CD8- клетки. TCR на NKT-клетках уникален тем, что он распознает гликолипидные антигены, презентированные подобной ГКГС I молекулой CD Id. NKT-клетки могут иметь как защитные, так и вредные эффекты из-за их способности продуцировать цитокины, которые способствуют воспалению или иммунной толерантности. Также включены «гамма-дельта Т-клетки ( $\gamma\delta$  Т-клетки)», которые относятся к специализированной популяции, то есть к небольшой субпопуляции Т-клеток, обладающих отличным TCR на своей поверхности, и в отличие от большинства Т-клеток, в которых TCR состоит из двух гликопротеиновых цепей, обозначенных как цепи  $\alpha$ - и  $\beta$ -TCR, TCR в  $\gamma\delta$  Т-клетках состоит из  $\gamma$ -цепи и  $\delta$ -цепи.  $\gamma\delta$  Т-клетки могут играть роль в иммунном надзоре и иммунорегуляции, и было обнаружено, что они являются важным источником IL-17 и индуцируют устойчивый CD8+ цитотоксический Т-клеточный ответ. Также включены «регуляторные Т-клетки» или «Treg», которые относятся к Т-клеткам, которые подавляют аномальный или избыточный

иммунный ответ и играют роль в иммунной толерантности. Treg обычно представляют собой Foxp3-положительные CD4+T-клетки и могут также включать Foxp3-отрицательные регуляторные T-клетки, которые представляют собой IL-10-продуцирующие CD4+T-клетки.

Термины «клетка-натуральный киллер» и «NK-клетка» являются взаимозаменяемыми и используются в данном документе как синонимы. В настоящем документе термин «NK-клетка» относится к дифференцированному лимфоциту с фенотипом CD 16+ CD56+ и/или CD57+ TCR-. NK-клетки характеризуются способностью связываться с клетками, которые не экспрессируют «собственные» антигены MHC/HLA, и уничтожать их путем активации специфических цитолитических ферментов, способностью уничтожать опухолевые клетки или другие пораженные клетки, которые экспрессируют лиганд для рецепторов, активирующих NK-клетки, а также способностью высвобождать молекулы белка, называемые цитокинами, которые стимулируют или ингибируют иммунный ответ.

В настоящем документе термин «антиген» относится к любой молекуле агента (например, белку, пептиду, полисахариду, гликопротеину, гликолипиду, нуклеиновой кислоте, их частям или их комбинациям), способной связываться с T-клеточным рецептором. Антиген также способен вызывать иммунный ответ. Пример такого иммунного ответа может предполагать, без ограничений, или выработку антител, или активацию специфичных иммунокомпетентных клеток, или и то, и другое. Специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген вообще не должен кодироваться «геном». Очевидно, что антиген может быть сгенерирован синтезированным, может быть получен из биологического образца или может представлять собой макромолекулу, помимо полипептида. Такой биологический образец может представлять собой, в том числе, образец ткани, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами, организмами, субъединицами белков/антигенов, убитых или инактивированных цельных клеток или лизатов.

Термины «антитело» и «антитела» относятся к моноклональным антителам, мультиспецифическим антителам, человеческим антителам, гуманизированным антителам, химерным антителам, одноцепочечным Fv (scFv), одноцепочечным антителам, Fab-фрагментам, F(ab')-фрагментам, дисульфид-связанным Fv (sdFv), интрателам, минителам, диателам и антиидиотипическим (анти-Id) антителам (включая, например, анти-Id антитела к антиген-специфическим TCR), а также эпитоп-связывающим фрагментам любого из вышеперечисленных. Термины «антитело» и «антитела» также относятся к ковалентным диателам, таким как описанные в заявке на патент США на патент США 2007/0004909, и Ig-Dags, таким как описанные в заявке на патент США на патент США 2009/0060910. Антитела, пригодные в качестве TCR-связывающей молекулы, включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулина, т. е. молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт. Молекулы иммуноглобулина могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA

и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1, IgM2, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Термин «клетка-хозяин» обозначает любую клетку, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. Гетерологичная нуклеиновая кислота может представлять собой вектор (*например*, вектор экспрессии). Клеткой-хозяином может быть клетка из любого организма, который отбирается, модифицируется, трансформируется, выращивается, используется или подвергается каким-либо манипуляциям для продуцирования клеткой вещества, например экспрессии клеткой гена, последовательности ДНК или РНК, белка или фермента. Может быть определен подходящий хозяин. Например, клетка-хозяин может быть выбрана на основе векторной основы и желаемого результата. Например, плазида или космида может быть введена в прокариотную клетку-хозяина для репликации нескольких типов векторов. Бактериальные клетки, такие как, в частности, DH5 $\alpha$ , JM109 и KCB, SURE $^{\circledR}$  Competent Cells и SOLOPACK Gold Cells, можно использовать в качестве клеток-хозяев для репликации и/или экспрессии вектора. Кроме того, бактериальные клетки, такие как E. coli LE392, могут быть использованы в качестве клеток-хозяев для фаговых вирусов. Эукариотические клетки, которые можно использовать в качестве клеток-хозяев, включают, в частности, дрожжи (*например*, YPH499, YPH500 и YPH501), клетки насекомых и млекопитающих. Примеры эукариотических клеток-хозяев млекопитающих для репликации и/или экспрессии вектора включают, в частности, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, CHO, Saos и PC12.

Клетки-хозяева по настоящему изобретению включают Т-клетки и клетки-натуральные киллеры, которые содержат последовательности ДНК или РНК, кодирующие CAR, и которые экспрессируют CAR на клеточной поверхности. Клетки-хозяева можно использовать для повышения активности Т-клеток, активности клеток-натуральных киллеров, лечения рака и лечения аутоиммунных заболеваний.

«Активация» или «стимуляция» означает индукцию изменения биологического состояния клеток, посредством которого клетки (*например*, Т-клетки и НК-клетки) экспрессируют маркеры активации, продуцируют цитокины, пролиферируют и/или становятся цитотоксическими по отношению к клеткам-мишеням. Все эти изменения могут быть вызваны первичными стимулирующими сигналами. Костимулирующие сигналы могут усиливать величину первичных сигналов и подавлять гибель клеток после начальной стимуляции, что приводит к более продолжительному состоянию активации и, таким образом, более высокой цитотоксической способности. Термин «костимулирующий сигнал» относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации и/или активации Т-клеток и/или НК-клеток и/или повышению или понижению экспрессии ключевых молекул.

Термин «пролиферация» относится к увеличению деления клеток, симметричному или асимметричному разделению клеток. Термин «рост» обозначает результат деления и гибели клеток.

Термин «дифференциация» относится к способу уменьшения потенциала или

пролиферации клетки или перемещения клетки в состояние, более ограниченное с точки зрения развития.

Термины «экспрессировать» и «экспрессия» означают разрешение или обеспечение образования информации в гене или последовательности ДНК, например, получение белка путем активации клеточных функций, участвующих в транскрипции и трансляции соответствующего гена или последовательности ДНК. Последовательность ДНК экспрессируется в клетке или с помощью клетки с образованием «продукта экспрессии», такого как белок. Сам продукт экспрессии, например полученный белок, также может быть «экспрессирован» клеткой. Продукт экспрессии можно охарактеризовать как внутриклеточный, внеклеточный или трансмембранный.

Термин «трансфекция» означает введение «чужеродной» (*т. е.* внешней или внеклеточной) нуклеиновой кислоты в клетку с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Термин «генетическая модификация» обозначает внедрение «чужеродного» (*т. е.*, внешнего или внеклеточного) гена, последовательности ДНК или РНК в клетку-хозяина таким образом, чтобы клетка-хозяин экспрессировала введенный ген или последовательность для получения желаемого вещества, обычно белка или фермента, кодируемого введенным геном или последовательностью. Введенный ген или последовательность также можно назвать «клонированным» или «чужеродным» геном или последовательностью, которые могут включать регуляторные или контрольные последовательности, функционально связанные с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор, такие как последовательность запуска, последовательность остановки, промотор, сигнальная последовательность, секреторная последовательность или другие последовательности, используемые генетическим механизмом клетки. Ген или последовательность могут включать нефункциональные последовательности или последовательности без известной функции. Клетка-хозяин, принимающая и экспрессирующая указанную ДНК или РНК, является «генетически сконструированной». ДНК или РНК, введенная в клетку-хозяин, может поступать из любого источника, включая клетки одного рода или вида, выступающего в качестве клетки-хозяина, или разных родов или видов.

Термин «трансдукция» обозначает введение чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку с использованием вирусного вектора.

Термин «регуляторный элемент» относится к любому генетическому элементу, действующему в цис-положении, который контролирует некоторые аспекты экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления термин «промотор» включает по существу минимальные последовательности, необходимые для инициации транскрипции. В некоторых вариантах осуществления термин «промотор» включает последовательности для начала транскрипции и, кроме того, также включает последовательности, которые могут усиливать или подавлять транскрипцию, обычно называемые «энхансерными элементами» и «репрессорными элементами», соответственно.

В настоящем документе термин «функционально связанный» и аналогичные фразы, при их использовании в отношении нуклеиновых кислот или аминокислот, относятся к фактической связи последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотной последовательности, соответственно, в функциональных отношениях друг с другом. Например, функционально связанный промотор, энхансерные элементы, открытая рамка считывания, 5-штрих и 3-штрих нетранслируемая область (UTR) и последовательности терминации приводят к точной продукции молекулы нуклеиновой кислоты (например, РНК). В некоторых вариантах осуществления функционально связанные элементы нуклеиновой кислоты приводят к транскрипции открытой рамки считывания и, в конечном итоге, к получению полипептида (т. е. экспрессии открытой рамки считывания). В качестве другого примера, функционально связанный пептид представляет собой один пептид, в котором функциональные домены размещены на соответствующем расстоянии друг от друга для того, чтобы наделить каждый домен предполагаемой функцией.

Под «усилением», «стимулированием», «увеличением», «расширением» или «улучшением» обычно подразумевается способность композиции, рассматриваемой в настоящем документе, продуцировать, воздействовать или вызывать более сильный физиологический ответ (т. е. эффекты на последующих стадиях) по сравнению с ответом, вызванным либо носителем, либо контрольной молекулой/композицией. Поддающийся измерению физиологический ответ может включать увеличение размножения Т-клеток, их активацию, эффекторную функцию, устойчивость и/или увеличение способности уничтожать раковые клетки, среди прочего, очевидного из понимания в данной области техники и описания в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления «увеличенное» или «повышенное» количество может быть «статистически значимым» количеством и может включать увеличение, которое составляет в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз высокий (например, 500, 1000 раз) (включая все целые и десятичные числа между и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) ответ, полученный носителем или контрольной композицией.

Под «уменьшать» или «снижать», или «сокращать», или «убавлять», или «ослаблять» обычно понимают способность композиции, рассматриваемой в настоящем документе, продуцировать, воздействовать или вызывать менее сильный физиологический ответ (т. е. эффекты на последующих стадиях) по сравнению с ответом, вызванным либо носителем, либо контрольной молекулой/композицией. В некоторых вариантах осуществления «уменьшенное» или «сокращенное» количество может быть «статистически значимым» количеством и может включать понижение, которое составляет в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз низкий (например, 500, 1000 раз) (включая все целые и десятичные числа между и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) ответ (контрольный ответ), полученный носителем, контрольной композицией, или ответ в конкретной клеточной линии.

Термин «эффективный», применяемый к дозе или количеству, относится к такому

количеству соединения или фармацевтической композиции, которое достаточно для достижения желаемой активности при введении субъекту, нуждающемуся в этом. Следует отметить, что при введении комбинации активных ингредиентов эффективное количество комбинации может включать или не включать количества каждого ингредиента, которые были бы эффективны при введении по отдельности. Точное необходимое количество будет варьироваться от субъекта в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, тяжести подлежащего лечению состояния, конкретного лекарственного средства или лекарственных средств, способа введения и т. п.

Фраза «фармацевтически приемлемый», используемая в связи с композициями, описанными в настоящем документе, относится к молекулярным единицам и другим ингредиентам таких композиций, которые являются физиологически переносимыми и обычно не продуцируют нежелательные реакции при введении млекопитающему (*например*, человеку). Предпочтительно, термин «фармацевтически приемлемый» обозначает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства или правительством штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у млекопитающих, более конкретно, у человека.

Используемый в данном документе термин «белок» охватывает все виды встречающихся в природе и синтетических белков, включая белковые фрагменты всех длин, слитых белков и модифицированных белков, включая, без ограничения, гликопротеины, а также все другие типы модифицированных белков (*например*, белки, полученные в результате фосфорилирования, ацетилирования, миристотилирования, пальмитоилирования, гликозилирования, окисления, формования, амидирования, полиглутамилирования, АДФ-рибозилирования, пегилирования, биотинилирования и т. д.).

Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеотид» и «полинуклеотид» охватывают как ДНК, так и РНК, если не указано иное. Под «последовательностью нуклеиновой кислоты» или «нуклеотидной последовательностью» подразумевается нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоту; Эти термины также могут относиться к последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей участок, кодирующий любые аминокислоты, добавляемые в качестве артефактов клонирования, включая любые аминокислоты, кодируемые линкерами.

Термин «носитель» относится к разбавителю, вспомогательному веществу, эксципиенту или несущей среде, вместе с которыми вводят соединение. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как, *например*, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, *например* арахисовое, соевое, минеральное, кунжутное масло и т. п. Вода или водные солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина предпочтительно используются в качестве носителей, особенно для растворов для инъекций. В альтернативном варианте осуществления

носитель может представлять собой твердую дозированную лекарственную форму, включая, без ограничений, одно или более связующих веществ (для прессованных таблеток), глидант, инкапсулирующий агент, ароматизатор и краситель. Подходящие фармацевтические носители описаны в работе «Remington's Pharmaceutical Sciences», автор - E. W. Martin.

Термин «примерно» или «приблизительно» включает в себя статистически значимый диапазон значения. Такой диапазон может находиться в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 50%, более предпочтительно в пределах 20%, еще более предпочтительно в пределах 10% и еще более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Допустимое изменение, охватываемое термином «примерно» или «приблизительно», зависит от конкретной изучаемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники.

Термин «родственная калликреину пептидаза 2», «hK2» или «klk2» относится к изученному белку, который также называется калликреином-2, эндокринным калликреином-2 или hK2. hK2 получают в виде препропротеина и расщепляют во время протеолиза для получения активной протеазы. Все изоформы и варианты hK2 включены в термин «hK2». Аминокислотные последовательности различных изоформ извлекают из номеров доступа в GenBank NP\_005542.1, NP\_001002231.1 и NP\_001243009. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого hK2 приведена в SEQ ID NO: 62. Последовательность включает сигнальный пептид (остатки 1-18) и пропептидную область (остатки 19-24).

Применяемые в настоящем документе термины используются только в целях описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не являются ограничивающими. При использовании в данном документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

### **Химерные антигенные рецепторы**

Настоящее изобретение относится по существу к применению Т-клеток, генетически модифицированных для стабильной экспрессии желаемого химерного антигенного рецептора. Химерный антигенный рецептор (CAR) представляет собой искусственно сконструированный гибридный белок или полипептид, содержащий антигенсвязывающие домены антитела (scFv), связанные с сигнальными доменами Т-клеток. Характеристики CAR могут включать в себя их способность перенаправлять Т-клеточную специфичность и реактивность к выбранной мишени не рестриктированным по ГКГС образом с использованием антигенсвязывающих свойств моноклональных антител. Не рестриктированное по ГКГС распознавание антигена дает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антигены независимо от процессинга антигена, таким образом обходя основной механизм ускользания опухоли от иммунологического ответа. Более того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с эндогенными альфа- и бета-цепями Т-клеточного рецептора (TCR).

CAR, описанные в данном документе, обеспечивают рекомбинантные полипептидные конструкции, содержащие по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен (также называемый в данном документе «цитоплазматическим сигнальным доменом»), содержащие функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, как определено ниже. Т-клетки, экспрессирующие CAR, называются в данном документе CAR Т-клетками, CAR-Т-клетками или CAR-модифицированными Т-клетками, и эти термины используются взаимозаменяемо в данном документе. Клетка может быть генетически модифицирована таким образом, чтобы стабильно экспрессировать на своей поверхности связывающий домен антитела, придавая новую антигенную специфичность, которая не зависит от ГКГС.

В некоторых случаях Т-клетку генетически модифицируют для стабильной экспрессии CAR, который объединяет домен распознавания антигена специфического антитела с внутриклеточным доменом дзета-цепи CD3 или белка FcγRI в один химерный белок. В одном варианте осуществления стимулирующая молекула представляет собой дзета-цепь, ассоциированную с Т-клеточным рецепторным комплексом.

Используемый в настоящем документе термин «внутриклеточный сигнальный домен» или «цитоплазматический сигнальный домен» относится к внутриклеточному участку молекулы. Именно функциональный участок белка действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности через определенные сигнальные пути, генерируя вторичные мессенджеры или действуя как эффекторы, отвечая на такие мессенджеры. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который вызывает иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей CAR, например, CAR-Т-клетки. К примерам иммунной эффекторной функции, например, в CAR-Т-клетке, относится цитолитическая активность и хелперная активность, включая секрецию цитокинов.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. К примерам первичных внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные от молекул, которые отвечают за первичную стимуляцию или стимуляцию, зависящую от антигена. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. К примерам костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные из молекул, которые отвечают за костимулирующие сигналы или антиген-независимую стимуляцию. Например, в случае CAR-Т первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность Т-клеточного рецептора, а костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность корецептора или костимулирующей молекулы.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или

ITAM. К примерам последовательностей первичной цитоплазматической сигнализации, содержащих ITAM, относятся, помимо прочего, производные CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d DAP10 и DAP12.

Термин «дзета» или альтернативно «дзета-цепь», «CD3-дзета» или «TCR-дзета» определяется как белок, представленный по номеру доступа GenBank BAG36664.1, или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши, кролика, примата, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., и «стимулирующий домен дзета», или альтернативно «стимулирующий домен CD3-дзета», или «стимулирующий домен TCR-дзета» определяется как аминокислотные остатки из цитоплазматического домена дзета-цепи, которые достаточны для функциональной передачи исходного сигнала, необходимого для активации Т-клетки. Иногда, например, в аспектах и/или вариантах осуществления изобретения «стимулирующий домен дзета» или «стимулирующий домен CD3-дзета» также упоминается как «первичный сигнальный домен». В одном аспекте цитоплазматический домен стимулирующего домена CD3-дзета содержит остатки от 52 до 164 согласно номеру доступа в GenBank BAG36664.1 или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., которые представляют собой их функциональные ортологи. В предпочтительном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит стимулирующий домен CD3-дзета. В одном аспекте «стимулирующий домен дзета» или «стимулирующий домен CD3-дзета» представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 28.

Термин «костимулирующая молекула» относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, опосредуя, таким образом, костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, помимо прочего, пролиферация. Костимулирующие молекулы являются молекулами клеточной поверхности, отличными от рецепторов антигенов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включают, без ограничений, молекулу МНС класса 1, BTLA и Toll-подобный рецептор, а также OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) и 4-1BB (CD137).

Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточный участок костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена в следующих семействах белков: Белки рецептора ФНО, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные

молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. К примерам подобных молекул относятся CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, MyD88, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83 и т. п.

Внутриклеточный сигнальный домен может содержать весь внутриклеточный участок или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он был получен, или его функциональный фрагмент.

Термин «4-1BB» или альтернативно «CD137» относится к члену суперсемейства РФНО с аминокислотной последовательностью, представленной по номеру доступа GenBank AAA62478.2, или эквивалентными остатками, полученными от видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.; и «костимулирующий домен 4-1BB» определяется как аминокислотные остатки 214-255 с номером доступа в GenBank: AAA62478.2 или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п. Иногда, например, в аспектах и/или вариантах осуществления настоящего изобретения «костимулирующий домен 4-1BB» также упоминается как «костимулирующий домен».

В предпочтительном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен, причем костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен представляет собой костимулирующий домен 4-1BB или «костимулирующий домен CD137». В одном аспекте «костимулирующий домен 4-1BB» или «костимулирующий домен CD137» представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., или последовательность, имеющая по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 27. В предпочтительном варианте осуществления костимулирующий домен 4-1BB представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27.

В одном варианте осуществления используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В еще одном варианте осуществления трансмембранный домен может быть выбран из или модифицирован посредством аминокислотного замещения во избежание связывания таких доменов с их трансмембранными доменами или различными белками поверхностной мембраны для сведения к минимуму взаимодействий с другими членами комплекса рецепторов. В одном примере осуществления трансмембранный домен содержит шарнирный домен CD8 $\alpha$ . В

одном варианте осуществления CAR содержит шарнирный домен CD8 $\alpha$  и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ .

В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или более функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, как определено в данном документе. В одном варианте осуществления костимулирующая молекула выбрана из 4-1BB (т. е., CD137), CD27, CD3-дзета и/или CD28. CD28 является Т-клеточным маркером, важным для Т-клеточной костимуляции. CD27 является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли и выступает в качестве костимулирующей молекулы иммунной контрольной точки. 4-1BB передает мощный костимулирующий сигнал на Т-клетки, стимулируя дифференцировку и повышая долгосрочную выживаемость Т-лимфоцитов. CD3-дзета связывается с TCR для генерации сигнала и содержит иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM). В другом варианте осуществления костимулирующая молекула представляет собой MyD88 или CD40.

В одном варианте осуществления CAR содержит внутриклеточный шарнирный домен, включающий CD8 $\alpha$ , и внутриклеточный сигнальный домен рецептора Т-клеток, содержащий CD28, 4-1BB и CD3-дзета. В другом варианте осуществления CAR содержит внутриклеточный шарнирный домен и внутриклеточный сигнальный домен рецептора Т-клеток, содержащий CD28, 4-1BB и CD3-дзета, причем шарнирный домен содержит всю внеклеточную область CD8, CD4 или CD28 или ее часть; всю константную область антитела или ее часть; весь Fc $\gamma$ RIIIa рецептор или его часть, всю шарнирную область IgG, шарнирную область IgM, шарнирную область IgA, шарнирную область IgD, шарнирную область IgE или шарнирную область Ig или части этих областей. Шарнирная область IgG может быть получена из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1, IgM2, IgA1, IgA2, IgD, IgE или их химеры.

CAR, описанные в данном документе, обеспечивают рекомбинантные полипептидные конструкции, содержащие по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен (также называемый в данном документе «цитоплазматическим сигнальным доменом»), например, содержащие функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, как определено ниже В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном варианте осуществления CAR содержит химерный

слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или более костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы.

CAR по настоящему изобретению могут быть сконструированы так, чтобы содержать сигнальный домен CD28 и/или 4-1BB по отдельности или быть объединенными с любым другим желаемым цитоплазматическим доменом(-ами), пригодным в контексте CAR по изобретению. В одном варианте осуществления цитоплазматический домен CAR может дополнительно содержать сигнальный домен CD3-дзета. Например, цитоплазматический домен CAR может включать, без ограничений, сигнальные модули CD3-дзета, 4-1BB и CD28 и их комбинации.

В одном варианте осуществления CAR содержит шарнирный домен, включающий шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$  и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий 4-1BB и CD3-дзета. В другом варианте осуществления CAR содержит шарнирный домен, включающий шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$  и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий CD28, 4-1BB и CD3-дзета.

В другом варианте осуществления CAR содержит шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$  и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный домен CD3-дзета и костимулирующий домен 4-1BB.

В другом варианте осуществления CAR содержит шарнирную область CD8 $\alpha$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; трансмембранный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и первичный сигнальный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

Соответственно, в изобретении предложены CAR Т-клетки и способы их применения в адоптивной терапии.

В изобретении дополнительно предложены варианты, например, функциональные варианты, для CAR, нуклеиновых кислот, полипептидов и белков, описанных в данном документе. Термин «вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификаций, например замен, вставок или делеций. Используемый в данном документе термин «функциональный вариант» относится к CAR, полипептиду или белку, имеющему существенную или значительную идентичность последовательности или сходство с исходным CAR, полипептидом или белком, причем функциональный вариант сохраняет биологическую активность CAR, полипептида или белка, для которого он является вариантом. Функциональные варианты включают, например, те варианты CAR, полипептида или белка, которые описаны в данном документе (исходный CAR, полипептид или белок), которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени в

аналогичной степени, в той же степени или в большей степени, как и исходный CAR, полипептид или белок. По отношению к исходному CAR, полипептиду или белку функциональный вариант может быть, например, на по меньшей мере около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более идентичен по аминокислотной последовательности исходному CAR, полипептиду или белку.

В данном документе структура полипептидов в местах определяется на основе % идентичности последовательности с указанной эталонной последовательностью (с заданной SEQ ID NO). В данном контексте % идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями можно определить путем сравнения этих двух последовательностей, выровненных оптимальным образом, и при этом аминокислотная последовательность, подлежащая сравнению, может содержать добавления или делеции относительно эталонной последовательности для оптимального выравнивания между этими двумя последовательностями. Процент идентичности рассчитывают путем определения числа идентичных положений, для которых аминокислотный остаток является идентичным в двух последовательностях, деления этого числа идентичных положений на общее число положений в окне сравнения и умножения полученного результата на 100, чтобы получить процент идентичности между этими двумя последовательностями. Как правило, окно сравнения соответствует полной длине сравниваемой последовательности. Например, можно использовать программу BLAST с «последовательностями BLAST 2» (Tatusova et al, «Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences», FEMS Microbiol Lett. 174:247-250), доступны на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, при этом используемыми параметрами являются параметры, заданные по умолчанию (в частности, для параметров «штраф за внесение гэпа»: 5, и «штраф за продолжение гэпа»: 2; выбранная матрица представляет собой, например, матрицу BLOSUM 62, предложенную программой), причем процент идентичности между двумя последовательностями, подлежащими сравнению, рассчитывают непосредственно с помощью программы. Определение идентичности последовательности искомой последовательности с эталонной последовательностью находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники и может быть выполнено с использованием доступного в продаже аналитического программного обеспечения, такого как BLAST™.

Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность исходного CAR, полипептида или белка с по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой. В другом варианте осуществления функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность исходного CAR, полипептида или белка с по меньшей мере одной неконсервативной аминокислотной заменой. В данном случае неконсервативная аминокислотная замена может не препятствовать или не ингибировать биологическую активность

функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может усиливать биологическую активность функционального варианта таким образом, что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с исходным CAR, полипептидом или белком.

Аминокислотные замены в обладающих признаками изобретения CAR могут быть консервативными аминокислотными заменами. Консервативные аминокислотные замены известны в данной области техники и включают аминокислотные замены, при которых одну аминокислоту, имеющую определенные физические и/или химические свойства, заменяют на другую аминокислоту, обладающую такими же или аналогичными химическими или физическими свойствами. Например, консервативная аминокислотная замена может быть кислой аминокислотой, замещенной другой кислой аминокислотой (например, Asp или Glu), аминокислотой с неполярной боковой цепью, замещенной другой аминокислотой с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val и т. д.), основной аминокислотой, замещенной другой основной аминокислотой (Lys, Arg и т. д.), аминокислотой с полярной боковой цепью, замещенной другой аминокислотой с полярной боковой цепью (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr и т. д.), и т. д.

CAR, полипептид или белок могут состоять по существу из указанной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в данном документе, так что другие компоненты, например, другие аминокислоты, существенно не изменяют биологическую активность функционального варианта.

CAR, полипептиды и белки вариантов осуществления изобретения (включая функциональные участки функциональные варианты) могут иметь любую длину, т. е. могут содержать любое количество аминокислот, при условии что CAR, полипептиды или белки (или их функциональные участки, или их функциональные варианты) сохраняют свою биологическую активность, например, способность специфически связываться с антигеном, обнаруживать пораженные клетки (например, раковые клетки) в организме-хозяине, или лечить или предотвращать заболевание в организме-хозяине и т. д. Например, полипептид может иметь длину от около 50 до около 5000 аминокислот, например, около 50, около 70, около 75, около 100, около 125, около 150, около 175, около 200, около 225, около 250, около 275, около 300, около 325, около 350, около 375, около 400, около 425, около 450, около 475, около 500, около 525, около 550, около 575, около 600, около 625, около 650, около 675, около 700, около 725, около 750, около 775, около 800, около 825, около 850, около 875, около 900, около 925, около 950, около 975, около 1000 или более аминокислот. Полипептиды по изобретению также включают олигопептиды.

CAR, полипептиды и белки по вариантам осуществления изобретения (включая функциональные участки и функциональные варианты по изобретению) могут содержать синтетические аминокислоты вместо одной или более природных аминокислот. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области техники и включают, например,

аминоциклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин,  $\alpha$ -амино-н-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометилцистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин,  $\alpha$ -(2-амино-2-норборнан)-карбоновую кислоту,  $\alpha,\gamma$ -диаминомасляную кислоту,  $\alpha,\beta$ -диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин,  $\beta$ -фенилсерин  $\beta$ -гидроксифенилаланин, фенилглицин,  $\alpha$ -нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, N'-бензил-N'-метил-лизин, N',N'-дибензил-лизин, 6-гидроксилизин, орнитин,  $\alpha$ -аминоциклопентанкарбоновую кислоту,  $\alpha$ -аминоциклогексанкарбоновую кислоту,  $\alpha$ -аминоциклогептанкарбоновую кислоту, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты и  $\alpha$ -трет-бутилглицин.

CAR, полипептиды и белки согласно вариантам осуществления изобретения (включая функциональные участки и функциональные варианты) могут подвергаться посттрансляционным модификациям. Они могут быть гликозилированными, этерифицированными, N-ацилированными, амидированными, карбоксилированными, фосфорилированными, этерифицированными, циклизированными посредством, например, дисульфидного мостика или превращены в кислотно-аддитивную соль. В некоторых вариантах осуществления они димеризованы, или полимеризованы, или конъюгированы.

CAR, полипептиды и/или белки согласно вариантам осуществления изобретения (включая функциональные участки и их функциональные варианты) могут быть получены способами, известными в данной области техники. Подходящие способы синтеза *de novo* полипептидов и белков описаны в публикациях, таких как Chan et al., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; *Peptide and Protein Drug Analysis*, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; и *Epitope Mapping*, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001. Кроме того, полипептиды и белки могут быть получены рекомбинантным способом с использованием нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, с использованием стандартных рекомбинантных способов. См., например, публикацию Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994. Кроме того, некоторые из CAR, полипептидов и белков согласно изобретению (включая их функциональные участки и их функциональные варианты) могут быть выделены и/или очищены из источника, такого как растение, бактерия, насекомое, млекопитающее и т. д. Способы выделения и очистки известны в данной области техники. Альтернативно CAR, полипептиды и/или белки, описанные в данном документе (включая их функциональные участки и их функциональные варианты), могут быть синтезированы на коммерческой основе. В этом отношении CAR, полипептиды и белки могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

Примеры модифицированных нуклеотидов, которые могут быть использованы для получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, используемых для получения

полипептидов, описанных в данном документе, включают, без ограничений, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксихидроксиметил) урацил, карбоксиметиламинометил-2-тиоурин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, N<sup>6</sup>-замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеозин, 5''-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N<sup>6</sup>-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксизин, псевдоурацил, квеозин, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N<sup>6</sup>-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метиозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксихпропил) урацил и 2,6-диаминопурин.

Нуклеиновая кислота может содержать любую выделенную или очищенную нуклеотидную последовательность, которая кодирует любой из CAR, полипептидов, или белков, или их функциональных участков, или их функциональных вариантов. В альтернативном варианте осуществления нуклеотидная последовательность может содержать последовательность, вырожденную в любую из последовательностей, или комбинацию вырожденных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложена выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, или нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Нуклеотидная последовательность, которая гибридизируется в жестких условиях, может гибридизироваться в условиях высокой жесткости. Под «условиями высокой жесткости» понимается, что нуклеотидная последовательность специфически гибридизируется с целевой последовательностью (нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе) в степени, обнаружимой сильнее, чем неспецифическая гибридизация. Условия высокой жесткости включают условия, которые позволяют различить полинуклеотид с точно комплементарной последовательностью или полинуклеотид, содержащий только несколько разбросанных несовпадений из случайной последовательности, которая имеет несколько небольших областей (например, 3-12 оснований), которые соответствуют нуклеотидной последовательности. Такие небольшие области комплементарности легче расплавляются, чем полноразмерный комплемент из 14-17 или более оснований, и гибридизация с высокой жесткостью делает их легко различимыми. Условия относительно высокой жесткости будут включать, например, условия с низким содержанием соли и/или высокой температурой, такие как обеспечиваемые около 0,02-0,1 М NaCl или его эквивалентом, при температурах примерно 50-70 °C. Такие условия высокой жесткости допускают

небольшое несоответствие между нуклеотидной последовательностью и матрицей или целевой цепью, если таковое имеется, или особенно подходят для обнаружения экспрессии любого из CAR, описанных в данном документе. Как правило, считается, что условия можно сделать более жесткими путем добавления возрастающих количеств формамида.

В одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты по изобретению можно встраивать в рекомбинантный экспрессионный вектор. В настоящем изобретении предложены рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие любую из нуклеиновых кислот по изобретению. Используемый в данном документе термин «рекомбинантный экспрессионный вектор» означает генетически модифицированную олигонуклеотидную или полинуклеотидную конструкцию, которая обеспечивает экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида клеткой-хозяином, когда конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мРНК, белок, полипептид или пептид, а вектор приводят в контакт с клеткой в условиях, достаточных для экспрессии мРНК, белка, полипептида или пептида внутри клетки. Описанные в данном документе векторы не встречаются в природе в целом; однако части векторов могут быть природного происхождения. Описанные рекомбинантные экспрессионные векторы могут содержать нуклеотиды любого типа, включая, без ограничений, ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, синтезированными или частично полученными из природных источников и которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды. Рекомбинантные экспрессионные векторы могут содержать межнуклеотидные связи природного происхождения или неприродного происхождения или оба типа связей. Неприродные или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или репликации вектора.

В одном варианте осуществления рекомбинантный экспрессионный вектор по изобретению может быть любым подходящим рекомбинантным экспрессионным вектором и может использоваться для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают векторы, предназначенные для размножения и экспансии или для экспрессии, или и того, и другого, такие как плазмиды и вирусы. Вектор можно выбрать из группы, состоящей из серии pUC (Fermentas Life Sciences, Глен Берни, штат Мэриленд, США), серии pBluescript (Stratagene, г. Ла-Холья, штат Калифорния, США), серии pET (Novagen, г. Мэдисон, штат Висконсин, США), серии pGEX (Pharmacia Biotech, г. Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США). Можно использовать векторы бактериофагов, такие как  $\lambda$ GT10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ EMBL4 и  $\lambda$ NM1149,  $\lambda$ ZapII (Stratagene). Примеры векторов экспрессии растений включают pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии на животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech). Рекомбинантный экспрессионный вектор может быть вирусным вектором, например, ретровирусным вектором, например, гамма-ретровирусным вектором.

В одном варианте осуществления рекомбинантные экспрессионные векторы по

изобретению получают с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК, описанных, например, в Sambrook et al., выше, и Ausubel et al., выше. Могут быть приготовлены конструкции экспрессионных векторов, которые являются кольцевыми или линейными, чтобы они содержали систему репликации, функционирующую в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColE1, SV40, 2 $\mu$  плазмиды,  $\lambda$ , вируса бычьей папилломы и т. п.

Рекомбинантный экспрессионный вектор может содержать регуляторные последовательности, такие как иницирующие и терминирующие кодоны транскрипции и трансляции, которые специфичны для типа хозяина (например, бактерии, растения, гриба или животного), в который должен быть введен вектор, при необходимости, с учетом того, основан ли вектор на ДНК или РНК.

Рекомбинантный экспрессионный вектор может включать один или более маркерных генов, которые позволяют отобрать трансформированных или трансфицированных хозяев. Маркерные гены включают гены резистентности к биоцидам, например, гены резистентности к антибиотикам, тяжелым металлам и т.д., комплементации в ауксотрофном хозяине для обеспечения прототрофности и т.п. Подходящие маркерные гены для описанных экспрессионных векторов включают, например, гены резистентности к неомицину/G418, гены резистентности к гистидинолу X, гены резистентности к гистидинолу, гены резистентности к тетрациклину и гены резистентности к ампициллину.

Рекомбинантный экспрессионный вектор может содержать нативный или нормальный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR, полипептид или белок (включая их функциональные участки и их функциональные варианты), или с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна или которая гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR, полипептид или белок. Выбор промоторов, например, сильных, слабых, тканеспецифичных, индуцируемых и специфичных для развития промоторов находится в рамках квалификации обычного специалиста в данной области техники. Аналогичным образом, комбинирование нуклеотидной последовательности с промотором также находится в рамках квалификации специалиста в данной области техники. Промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, например, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор RSV, промотор SV40 или промотор, присутствующий в длинном концевом повторе вируса мышинных стволовых клеток.

Рекомбинантные векторы экспрессии могут быть разработаны либо для транзientной экспрессии, либо для стабильной экспрессии, либо для обоих типов. Кроме того, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии.

Дополнительно могут быть созданы рекомбинантные векторы экспрессии, включающие суицидальный ген. Используемый в данном документе термин

«суицидальный ген» относится к гену, который заставляет клетку, экспрессирующую суицидальный ген, погибать. Суицидальный ген может быть геном, который придает чувствительность к агенту, например, лекарственному средству, клетке, в которой экспрессируется ген, и заставляет клетку погибать, когда клетку приводят в контакт с агентом или она подвергается его воздействию. Гены-самоубийцы известны в данной области и включают, например, ген тимидинкиназы (ТК) вируса простого герпеса (HSV), цитозиндезаминазу, пурин-нуклеозидфосфоорилазу и нитроредуктазу.

В объем изобретения входят конъюгаты, например, биоконъюгаты, содержащие любые CAR, полипептиды или белки (включая любые их функциональные участки или варианты), клетки-хозяева, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, популяции клеток-хозяев или антитела, или их антигенсвязывающие участки. Конъюгаты, а также способы синтеза конъюгатов в целом известны в данной области техники (см., например, Hudez, F., *Methods Mol. Biol.* 298: 209-223 (2005) и Kirin et al., *Inorg Chem.* 44(15): 5405-5415 (2005)).

В варианте осуществления изобретения дополнительно предложено антитело или его антигенсвязывающий участок, которое связывается, например, специфически связывается с эпитопом CAR согласно изобретению.

Антитело может представлять собой любой тип иммуноглобулина, известный в данной области техники. Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам - IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяют на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител у позвоночных можно отнести к одному из двух типов, каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Антитело может относиться к любому классу или изотипу.

Антитела включают молекулы иммуноглобулина, включая моноклональные антитела, включая мышинные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, поликлональные, антигенсвязывающие фрагменты, биспецифические или полиспецифические антитела, мономерные, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт необходимой специфичности. Антитело может быть природным антителом, например, антителом, выделенным и/или очищенным от млекопитающего, например, приматов, мышей, кроликов, коз, лошадей, кур, хомяков, людей и т. д. Альтернативно, антитело может быть сконструированным (например, генетически сконструированным) антителом.

Гуманизированные антитела имеют антигенсвязывающие сайты, полученные от видов, отличных от человека, а каркасные области переменной области получены из последовательностей иммуноглобулинов человека. Термин «антитела человека» относится к антителам, имеющим переменные области тяжелой и легкой цепей, в которых как каркасные области, так и антигенсвязывающие сайты получены из последовательностей человеческого происхождения.

Кроме того, антитело может иметь любой уровень аффинности или авидности к функционального участка CAR. В некоторых вариантах осуществления антитело может связывать антиген hK2 в диапазоне аффинностей ( $K_D$ ). В одном варианте осуществления согласно изобретению и в некоторых вариантах осуществления каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитело связывается с антигеном hK2 с высокой аффинностью, например, с значением  $K_D$ , равным или менее около  $10^{-7}$  М, например, но не ограничиваясь этим, 1-9,9 (или в любом входящем в него диапазоне или значении, таком как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, или 9) $\times 10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М,  $10^{-10}$  М,  $10^{-11}$  М,  $10^{-12}$  М,  $10^{-13}$  М,  $10^{-14}$  М,  $10^{-15}$  М или соответствующим любому входящему в данный интервал диапазону или значению, определяемым методом поверхностного плазмонного резонанса или методом Кинеха, как практикуется специалистами в данной области техники. В одном примере аффинность равна или менее  $1 \times 10^{-8}$  М. В другом примере аффинность равна или менее  $1 \times 10^{-9}$  М.

Способы тестирования антител на способность связываться с любым функциональным участком CAR известны в данной области техники и включают любой анализ связывания антитело-антиген, такой как, например, радиоиммуноанализ (РИА), вестерн-блоттинг, иммуноферментный анализ (ИФА), иммунопреципитация и анализы конкурентного ингибирования.

Подходящие способы получения антител известны в данной области техники. Например, стандартные способы гибридомы описаны в публикациях, например, Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), и C. A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, N.Y. (2001)). Альтернативно другие способы, такие как способы гибридомы EBV (Haskard and Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2), 361-67 (1984), и Roder et al., *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), и экспрессионные системы векторов на основе бактериофага (см., например, Huse et al., *Science*, 246, 1275-81 (1989)) известны в данной области техники. Кроме того, способы получения антител у животных, кроме человека, описаны, например, в патентах США №№ 5545806, 5569825 и 5714352 и публикации заявки на патент США № 2002/0197266 A1).

Для создания антитела также можно использовать фаговый дисплей. В этом отношении фаговые библиотеки, кодирующие антигенсвязывающие переменные (V) домены антител, могут быть созданы с использованием стандартных методов молекулярной биологии и рекомбинантных ДНК (см., например, Sambrook et al., *Выше*, и Ausubel et al., *выше*). Фаг, кодирующий переменную область с желаемой специфичностью, выбирают для специфического связывания с желаемым антигеном (т.е. hK2), и восстанавливают полное или частичное антитело, содержащее выбранный переменный домен. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие восстановленное антитело, вводятся в подходящую линию клеток, такую как миеломная клетка, которая используется для получения гибридомы, так что антитела, имеющие характеристики моноклональных антител, секретируются этой клеткой (см., например,

Janeway et al., выше, Huse et al., выше и в патенте США № 6265150).

Антитела могут быть получены с помощью трансгенных мышей, которые являются трансгенными по конкретным генам тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. Такие способы известны в данной области техники и описаны, например, в патентах США №№ 5545806 и 5569825 и Janeway et al. выше.

Способы создания гуманизированных антител известны в данной области техники и описаны, например, в Janeway et al., выше, патенте США №№ 5225539, 5585089 и 5693761, европейском патенте № 0239400 В1 и патенте Великобритании № 2188638. Гуманизированные антитела также могут быть получены с использованием технологии изменения поверхности антител, описанной в патентах США № 5639641 и Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235, 959-973 (1994).

Используемые в данном документе антитела могут быть многоцепочечными или одноцепочечными или интактными иммуноглобулинами и могут быть получены из природных источников или из рекомбинантных источников. Антитела могут быть тетрамерами молекул иммуноглобулина.

Термин «фрагмент антитела» относится по меньшей мере к одному участку интактного антитела или его рекомбинантных вариантов, которые сохраняют антигенсвязывающие свойства исходного полноразмерного антитела. Он относится, например, к антигенсвязывающему домену, например, к антигенной определяющей переменной области интактного антитела, которая достаточна для распознавания и связывания, например, специфического связывания фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части молекулы иммуноглобулина. Примеры фрагментов антитела включают, без ограничений, фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, и Fv, одноцепочечные антитела (scFv), линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (VL или VH), домены VHH верблюдовых и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин scFv относится к белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменные области легкой и тяжелой цепей непрерывно связаны посредством короткого гибкого полипептидного линкера и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида, и причем scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. Если не указано иное, в контексте данного документа scFv может иметь переменные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-терминального и C-терминального концов полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

В варианте осуществления изобретения также предложены антигенсвязывающие участки любого из антител, описанных в данном документе. Антигенсвязывающая часть может представлять собой любой участок, который имеет по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, например, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, dsFv, sFv, диатела и триатела.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие фрагменты представляют собой определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и/или 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и/или 3, переменную область тяжелой цепи (VH), или переменную область легкой цепи (VL), фрагменты Fab, F (ab')<sub>2</sub>, Fd и Fv и доменные антитела (dAb), содержащие (например, состоящие из) либо один домен VH, либо один домен VL. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством линкера, например, синтетического линкера.

«Определяющие комплементарность области (CDR)» представляют собой «антигенсвязывающие сайты» в антителе. CDR можно определять с помощью различных терминов: (i) определяющие комплементарность области (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), основаны на изменчивости последовательности (Wu and Kabat, *J Exp Med* 132:211-50, 1970; Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) «гиперпеременные участки», HVR или HV, три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относятся к областям переменных доменов антитела, являющихся по своей структуре гиперпеременными, согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, *Mol. Biol* 196:901-17, 1987). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) ([http://www\\_imgt\\_org](http://www_imgt_org)) представлены стандартизированная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между разграничениями CDR, HV и IMGT описано в Lefranc et al., *Dev Comparat Immunol* 27:55-77, 2003. Термины «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» в настоящем документе включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Kabat, Chothia или IMGT, если в описании явным образом не указано иное.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий участок могут быть модифицированы, чтобы содержать детектируемую метку, такую как, например, радиоизотоп, флуорофор (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE)), фермент (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена) и частицы элементов (например, частицы золота).

Также в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из CAR, полипептидов или белков, описанных в данном документе (включая их функциональные участки и их функциональные варианты).

Часть CAR, содержащая антитело или его фрагмент антитела, может существовать в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется как участок непрерывной полипептидной цепи, включая, например, однодоменный фрагмент антитела (sdAb), scFv и химерное или гуманизованное антитело человека (Harlow et al., 1999, In: *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.; Harlow et al., 1989, In: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426). В одном

аспекте антигенсвязывающий домен состав CAR по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В одном аспекте CAR содержит фрагмент антитела, который содержит scFv.

Термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое получают с применением технологии рекомбинантной ДНК, такому как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом или системой экспрессии дрожжей. Термин также следует воспринимать как обозначающий антитело, которое было получено путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и которая экспрессирует белок антитела, или аминокислотной последовательности, определяющей антитело, причем ДНК или аминокислотная последовательность были получены с применением технологии рекомбинантной ДНК или аминокислотной последовательности, которая является доступной и известной в данной области техники.

Термин «антиген» относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может предполагать или выработку антител, или активацию специфичных иммунокомпетентных клеток, или и то, и другое. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Более того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или часть нуклеотидной последовательности, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, таким образом кодирует «антиген» в том значении, в котором этот термин используется в данном документе. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген не обязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает в себя, помимо прочего, использование частей нуклеотидных последовательностей более одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности располагаются в различных комбинациях для того, чтобы кодировать полипептиды, которые вызывают желаемый иммунный ответ.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, при этом внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи из вариабельной области, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи из вариабельной области, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи из вариабельной области, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи









В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи из вариабельной области, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, и CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи из вариабельной области, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи из вариабельной области, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152, и CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи из вариабельной области, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи из вариабельной области, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 318, и CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи из вариабельной области, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 317.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 309 и SEQ ID NO: 314, и его консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 310 и SEQ ID NO: 315, и его консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 122 и SEQ ID NO: 311, и его консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен

связывает антиген hK2.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 315, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 311;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 309, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 311;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104;







домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 136 и SEQ ID NO: 312, и его консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 137 и SEQ ID NO: 313, и его консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 138 и SEQ ID NO: 139, и его консервативные модификации, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;





аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;



определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138; или

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138;

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и определяющую





















последовательность SEQ ID NO: 139.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, или вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6, или комбинацию LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, и HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;



































меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 152, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 146.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 318, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 317.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерный полипептид между вариабельной областью легкой цепи и вариабельной областью тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-23, 169-184 и 340-343, и специфически связывается с полипептидом hK2 (например, полипептидом hK2 человека, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, или его фрагментами).

В рекомбинантных системах экспрессии линкер представляет собой пептидный линкер и может включать любую природную аминокислоту. Иллюстративные аминокислоты, которые могут быть включены в линкер, представляют собой Gly, Ser Pro, Thr, Glu, Lys, Arg, Ile, Leu, His и The. Линкер должен иметь длину, достаточную для связывания VH и VL таким образом, чтобы они формировали правильную конформацию относительно друг друга, чтобы они сохраняли желаемую активность, такую как связывание с hK2.

Линкер может иметь длину около 5-50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10-40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину около 10-35 аминокислот. В некоторых вариантах















NO: 340, или последовательность SEQ ID NO: 340. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 341, или последовательность SEQ ID NO: 341. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 342, или последовательность SEQ ID NO: 342. В одном варианте осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 343, или последовательность SEQ ID NO: 343.

В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит сигнальный полипептид. Сигнальный полипептид может быть расположен на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена, который связывается с hK2. Сигнальный полипептид может быть дополнительно отщеплен от внеклеточного антигенсвязывающего домена во время клеточного процессинга и локализации CAR на клеточной мембране. Любой из различных сигнальных полипептидов, известных специалисту в данной области техники, может быть использован в качестве сигнального полипептида. Не имеющие ограничительного характера примеры пептидов, из которых могут быть получены сигнальные полипептиды, включают FcεR, переменную область тяжелой цепи (HC) иммуноглобулина человека (IgG), CD8α или любой из различных других белков, секретируемых Т-клетками. В различных вариантах осуществления сигнальный полипептид совместим с секреторным путем Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В одном варианте осуществления сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по

меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24.

В одном аспекте в изобретении предложен CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-44, 78-81, 221-236 и 273-308. Другой признак CAR, имеющего внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-44, 78-81, 221-236 и 273-308, заключается в том, что внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента члена 9 суперсемейства рецепторов ФНО (CD137), компонента дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток, компонента кластера дифференцировки (CD27), члена суперсемейства дифференцировки (такого как, например, CD28 или компонента индуцируемого Т-клеточного костимулятора (ICOS)) и их комбинации.

В одном варианте осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В одном варианте осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 27.

В одном варианте осуществления компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В одном варианте осуществления компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 45.

В одном варианте осуществления трансмембранный домен включает полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM). В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 26.

В одном варианте осуществления трансмембранный домен включает по меньшей мере трансмембранную(-ые) область(-и)  $\alpha$ -,  $\beta$ - или  $\zeta$ -цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD8 $\alpha$ , CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD40, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В другом варианте осуществления трансмембранный домен содержит по меньшей мере трансмембранный домен из  $\zeta$ ,  $\eta$  или Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  и - $\beta$ , MB1 (Ig $\alpha$ .), B29 или CD3- $\gamma$ ,  $\zeta$  или  $\eta$ . В еще одном варианте осуществления трансмембранный домен является синтетическим, например, содержащим преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин, триплет фенилаланина или триптофана.

В одном варианте осуществления CAR дополнительно содержит шарнирную область, связывающую трансмембранный домен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8a. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 269) или содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 269). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ERKCCVECPCP (SEQ ID NO: 270) или содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере

мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ERKCCVECPCPCP (SEQ ID NO: 270). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ELKTPLGDTTHTCPCPCP(EPKSCDTPPPCPCPCP)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 271) или содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ELKTPLGDTTHTCPCPCP(EPKSCDTPPPCPCPCP)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 271). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ESKYGPPCPCPCP (SEQ ID NO: 272) или содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ESKYGPPCPCPCP (SEQ ID NO: 272).

g) В одном варианте осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирную область, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В одном таком варианте осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен представляет собой домен CD8 $\alpha$ -TM, а внутриклеточный сигнальный домен содержит домен CD3-дзета и домен 4-1BB/CD137.

h) В одном таком варианте осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8 $\alpha$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, трансмембранный домен представляет собой домен CD8 $\alpha$ -TM, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и внутриклеточный сигнальный домен содержит домен CD3-дзета и домен 4-1BB/CD137, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

i) В другом варианте осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8 $\alpha$ , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, трансмембранный домен представляет собой домен CD8 $\alpha$ -TM, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и внутриклеточный сигнальный домен содержит домен 4-1BB/CD137, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 27, и домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.













меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 234, или последовательность SEQ ID NO: 234. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 235, или последовательность SEQ ID NO: 235. В одном варианте осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 236, или последовательность SEQ ID NO: 236.

#### **Конструкции CAR и иммунореактивные клетки, экспрессирующие CAR**

Термин «кодирующий» относится к свойству, присущему конкретным последовательностям нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК), или определенной последовательности аминокислот, а также к биологическим свойствам, полученным в результате этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодируют белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, вырабатывается белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут называться кодирующими белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность», включает в себя все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК», также может включать в себя интроны в той мере, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых версиях содержать интрон(-ы).

Термин «экспрессионный вектор» относится к вектору, содержащему

рекомбинантный полинуклеотид, который содержит регулирующие экспрессию последовательности, функционально соединенные с нуклеотидной последовательностью, которая подлежит экспрессии. Экспрессионный вектор содержит достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут обеспечиваться клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Экспрессионные векторы включают все известные в данной области техники векторы, включая космиды, плазмиды (например, «голые» или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена клетка, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR. В одном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-61, 82-85 и 205-220. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 46, или последовательность SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 47, или последовательность SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 48, или последовательность SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99%











мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 217, или последовательность SEQ ID NO: 217. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 218, или последовательность SEQ ID NO: 218. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 219, или последовательность SEQ ID NO: 219. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 220, или последовательность SEQ ID NO: 220.

В определенных вариантах осуществления CAR может содержать сигнальный полипептид. В определенных вариантах осуществления сигнальный пептид находится на N-конце последовательности CAR. В определенных вариантах осуществления сигнальный пептид находится на C-конце последовательности CAR. В определенных вариантах осуществления сигнальный пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24.

В данном документе структура молекулы нуклеиновой кислоты в местах определяется на основе % идентичности последовательности с указанной эталонной последовательностью (с заданной SEQ ID NO). В данном контексте % идентичности последовательности в отношении молекул нуклеиновых кислот означает сходство по меньшей мере двух различных нуклеотидных последовательностей. Когда положение в обеих из двух сравниваемых последовательностей занято одним и тем же основанием, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, тогда молекулы идентичны в этом положении, процент идентичности между двумя

последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух последовательностей, деленного на количество сравниваемых положений и умноженного на 100. Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или гомологичны, то две последовательности на 60% идентичны (или гомологичны). Например, последовательности ДНК АТТГСС и ТАТГГС обладают 50% идентичностью (или гомологией). Как правило, сравнение проводят, когда две последовательности выровнены для получения максимальной гомологии. Соответствующую процентную идентичность можно определить стандартными алгоритмами выравнивания, например, с помощью средства поиска основного локального выравнивания (BLAST), описанного Altshul et al. ((1990) J. Mol. Biol. 215:403-10); алгоритма, описанного в работе Needleman et al. ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-53); или алгоритма, описанного в работе Meyers et al. ((1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17). Набор параметров может представлять собой матрицу замен Blosum 62 со штрафом за открытие гэпа 12, штрафом за продолжение гэпа 4 и штрафом за сдвиг рамки гэпа 5. Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Meyers и Miller ((1989) CABIOS 4:11-17), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за продолжение гэпа 12, и штрафа за открытие гэпа 4. Процент идентичности, как правило, рассчитывают путем сравнения последовательностей аналогичной длины.

В различных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты любой из SEQ ID NO: 153-160. В различных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой SEQ ID NO: 153-160.

В различных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты любой из SEQ ID NO: 161-168. В различных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой SEQ ID NO: 161-168.

















последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 336, или последовательность SEQ ID NO: 336. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 337, или последовательность SEQ ID NO: 337. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 338, или последовательность SEQ ID NO: 338. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 339, или последовательность SEQ ID NO: 339.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложены выделенные иммунореактивные клетки, содержащие CAR, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка трансдуцируется CAR, например, CAR конститутивно экспрессируется на поверхности иммунореактивной клетки. В определенных вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка дополнительно трансдуцируется по меньшей мере одним костимулирующим лигандом, так что иммунореактивная клетка экспрессирует по меньшей мере один костимулирующий лиганд. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один костимулирующий лиганд выбран из группы, состоящей из 4-1BBL, CD48, CD70, CD80, CD86, OX40L, TNFRSF14 и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка дополнительно

трансдуцируется по меньшей мере одним цитокином, так что иммунореактивная клетка секретирует по меньшей мере один цитокин. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере цитокин выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-лимфоцита (Т-клетки), клетки-натурального киллера (NK), цитотоксического Т-лимфоцита (CTL), регуляторной Т-клетки, эмбриональной стволовой клетки человека, лимфоидной клетки-предшественника, клетки-предшественника Т-клетки и плюрипотентной стволовой клетки, из которой могут быть дифференцированы лимфоидные клетки.

В одном варианте осуществления CAR-Т-клетки по настоящему изобретению могут быть получены путем введения лентивирусного вектора, содержащего желаемый CAR, например, CAR, содержащий анти-hK2, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , а также сигнальные домены 4-1BB и CD3-дзета человека, в клетки. CAR Т-клетки по изобретению способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к длительной стойкости, что может привести к устойчивому контролю над опухолью.

В вариантах осуществления изобретения дополнительно предложены клетки-хозяева, содержащие любой из рекомбинантных векторов экспрессии, описанных в данном документе. Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» относится к любому типу клеток, которые могут содержать рекомбинантный экспрессионный вектор. Клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, например, растения, животного, водоросли или гриба, или может представлять собой прокариотическую клетку, например, бактерии или простейшего. Клетка-хозяин может представлять собой культивируемую клетку или первичную клетку, т. е. выделенную непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может представлять собой адгезивную клетку или суспендированную клетку, т. е. клетку, которая растет в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в данной области техники и включают, например, клетки *E. coli* DH5 $\alpha$ , клетки яичника китайского хомячка, клетки обезьяны, клетки COS, клетки HEK293 и т. п. Для целей амплификации или репликации рекомбинантного вектора экспрессии клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой, например, клеткой DH5 $\alpha$ . Для получения рекомбинантного CAR, полипептида или белка клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего. Клетка-хозяин может представлять собой человеческую клетку. Хотя клетка-хозяин может относиться к любому типу клеток, может происходить из ткани любого типа и может быть на любой стадии развития, клетка-хозяин может представлять собой лимфоцит периферической крови (PBL). Клетка-хозяин может представлять собой Т-клетку.

Для целей данного изобретения Т-клетка может быть любой Т-клеткой, такой как культивируемая Т-клетка, например, первичная Т-клетка, или Т-клетка из культивируемой линии Т-клеток, например, Jurkat, SupT1 и т. д., или Т-клетка, полученная от млекопитающего. Если Т-клетка получена от млекопитающего, она может быть получена из множества источников, включая, помимо прочего, костный мозг, кровь, лимфатический

узел, тимус или другие ткани или жидкости. Т-клетки также могут быть обогащенными или очищенными. Т-клетка может представлять собой Т-клетку человека. Т-клетка может представлять собой Т-клетку, выделенную из человека. Т-клетка может быть Т-клеткой любого типа и любой стадии развития, включая, помимо прочего, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> двойные положительные Т-клетки, CD8<sup>+</sup> Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), CD4<sup>+</sup> Т-хелперы, например, клетки Th1 и Th2, моноклеарные клетки периферической крови (МКПК), лейкоциты периферической крови (PBL), инфильтрирующие опухоль клетки, Т-клетки памяти, наивные Т-клетки и т. п. Т-клетка может представлять собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку или CD4<sup>+</sup> Т-клетку.

Также предложена популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в данном документе. Популяция клеток может представлять собой гетерогенную популяцию, включающую клетку-хозяина, содержащую любой из описанных рекомбинантных векторов экспрессии, в дополнение по меньшей мере к одной другой клетке, например, клетке-хозяину (например, Т-клетке), которая не содержит ни одного из рекомбинантных векторов экспрессии или клетки, отличной от Т-клетки, например, В-клетки, макрофага, эритроцита, нейтрофила, гепатоцита, эндотелиальной клетки, эпителиальной клетки, мышечной клетки, клетки мозга и т. д. Альтернативно, популяция клеток может быть по существу гомогенной популяцией, в которой популяция в основном содержит клетки-хозяева (например, состоящие в основном из), содержащие рекомбинантный экспрессионный вектор. Популяция также может быть клональной популяцией клеток, в которой все клетки популяции являются клонами одной клетки-хозяина, содержащей рекомбинантный экспрессионный вектор, так что все клетки популяции содержат рекомбинантный экспрессионный вектор. В одном варианте осуществления популяция клеток представляет собой клональную популяцию, содержащую клетки-хозяева, содержащие рекомбинантный экспрессионный вектор, как описано в данном документе.

#### **Фармацевтические композиции/введение**

В вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, экспрессирующие CAR, могут быть представлены в композициях, например, подходящей фармацевтической композиции(-ях), содержащей клетки, экспрессирующие CAR, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие эффективное количество лимфоцитов, экспрессирующих один или более из описанных CAR, и фармацевтически приемлемый эксципиент. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать экспрессирующую CAR клетку, например, множество экспрессирующих CAR клеток, как описано в данном документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или разбавителями. В настоящем документе выражение «**в комбинации с**» означает, что два или более терапевтических агента вводят субъекту вместе в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

Фармацевтически приемлемый носитель может быть ингредиентом фармацевтической композиции, отличным от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта.

Фармацевтически приемлемый носитель может включать, но не ограничивается ими, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант. Примерами фармацевтически приемлемых носителей являются растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и т. п., которые обладают физиологической совместимостью, такие как соли, буферы, антиоксиданты, сахараиды, водные или неводные носители, консерванты, смачивающие агенты, поверхностно-активные вещества или эмульгирующие агенты или их комбинации. Количество фармацевтически приемлемого (-ых) носителя (-ей) в фармацевтических композициях могут быть определены экспериментально на основании активностей носителя (-ей) и желаемых характеристик состава, таких как стабильность и/или минимальное окисление.

Такие композиции могут содержать буферные растворы, такие как уксусная кислота, лимонная кислота, муравьиная кислота, янтарная кислота, фосфорная кислота, угольная кислота, яблочная кислота, аспарагиновая кислота, гистидин, борная кислота, трис-буферные растворы, HEPPSO, HEPES, нейтральный буферный раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстран, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); антибактериальные и противогрибковые агенты; и консерванты.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены для различных способов парентерального или непарентерального введения. В одном варианте осуществления композиции могут быть приготовлены для инфузии или внутривенного введения. Композиции, описанные в данном документе, могут быть представлены, например, в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, эмульсий, суспензий, дисперсий или вязких композиций, которые могут быть забуферены до желаемого pH. Составы, приемлемые для перорального введения, могут включать в себя жидкие растворы, капсулы, пакеты-саше, таблетки, пастилки для рассасывания и трoше, жидкие порошковые суспензии в соответствующих жидкостях и эмульсиях.

Термин «фармацевтически приемлемый», используемый в данном документе в отношении фармацевтических композиций, обозначает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства или правительством штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и/или людей.

В одном аспекте изобретение относится к введению генетически модифицированной Т-клетки, экспрессирующей CAR, для лечения субъекта, страдающего

раком или подверженного риску заболеть раком, с использованием инфузии лимфоцитов. По меньшей мере, в одном варианте осуществления в лечении используется инфузия аутологичных лимфоцитов. Аутологичные МКПК собирают у субъекта, нуждающегося в лечении, и Т-клетки активируют и размножают с использованием способов, описанных в данном документе и известных в данной области техники, а затем снова вводят субъекту.

В одном аспекте изобретение относится по существу к лечению субъекта, подверженного риску развития рака. Изобретение также включает лечение злокачественного образования или аутоиммунного заболевания, при котором химиотерапия и/или иммунотерапия у субъекта приводят к значительной иммуносупрессии, тем самым повышая риск развития у субъекта рака. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы предотвращения рака, причем способы включают введение количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более описанных CAR, нуждающимся в этом субъекту.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения субъекта, имеющего рак, включающие введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более описанных CAR, нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего лимфоциты индуцируют или модулируют уничтожение раковых клеток у субъекта.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы уменьшения опухолевой нагрузки у субъекта, страдающего раком, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более CAR, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего лимфоциты индуцируют уничтожение раковых клеток у субъекта. В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы увеличения выживаемости субъекта, страдающего раком, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих один или более описанных CAR, нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего выживаемость субъекта увеличивается. Как правило лимфоциты, экспрессирующие CAR, вызывают уничтожение раковых клеток у субъекта и приводят к уменьшению или уничтожению опухолей/раковых клеток у субъекта. Не имеющий ограничительного характера перечень видов рака, включая метастатические поражения, на который можно воздействовать направленно, включает рак предстательной железы и его производные. В одном варианте осуществления рак, подлежащий лечению у субъекта, представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы, экспрессирующий андрогенный рецептор (AR).

В одном аспекте способы, описанные в настоящем документе, применимы к лечению нераковых состояний, которые могут развиваться в раковые заболевания, таких как, например, увеличенная предстательная железа, доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ) и высокие уровни ПСА при отсутствии диагностированного рака предстательной железы.

В одном аспекте предложены способы лечения субъекта, страдающего раком, которые включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов, экспрессирующих CAR, CAR, имеющего внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает антиген hK2, нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего лимфоцит вызывает уничтожение раковых клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-61, 82-85 и 205-220. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 46, или последовательность SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 47, или последовательность SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 48, или последовательность SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 49, или последовательность SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по











мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 218, или последовательность SEQ ID NO: 218. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 219, или последовательность SEQ ID NO: 219. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 220, или последовательность SEQ ID NO: 220.

В одном аспекте описан способ направленного уничтожения раковой клетки, включающий приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом, экспрессирующим один или более из описанных CAR, при этом лимфоцит индуцирует уничтожение раковой клетки. Не имеющий ограничительного характера перечень раковых клеток, включающий метастатические раковые клетки, на которые можно воздействовать направленно, включают рак предстательной железы и его комбинации. В одном варианте осуществления раковая клетка представляет собой клетку рака предстательной железы.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться таким способом, который соответствует заболеванию, подлежащему лечению (или предотвращению). Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как патологическое состояние субъекта, а также типом и тяжестью заболевания субъекта, хотя соответствующие дозы могут определяться клиническими испытаниями.

Термины «лечить» или «лечение» относятся к терапевтическому лечению, при котором у объекта должно происходить замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или заболевания, или которое обеспечивает благоприятный или желаемый клинический результат во время лечения заболевания. Предпочтительные или желательные клинические результаты включают в себя ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию состояния заболевания (т. е. отсутствие ухудшения), задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное улучшение болезненного состояния и/или ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин «лечение» может также означать

продление времени жизни по сравнению с ожидаемым в отсутствие лечения пациента. К требующим лечения относятся субъекты, у которых уже отмечаются нежелательные физиологические изменения или заболевание, а также субъекты, склонные к физиологическим изменениям или заболеванию.

«Предотвращать», «предотвращение», «предупреждение» или «профилактика» заболевания или расстройства означает предотвращение возникновения расстройства у субъекта. Термины «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество», которые являются взаимозаменяемыми в настоящем документе, относятся к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желательного терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Пример показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают в себя, например, улучшение состояния здоровья пациента, сокращение размера опухоли, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие участки организма.

Используемый в настоящем документе термин «пациент» относится к животному. Термины «субъект» и «пациент» в настоящем документе могут использоваться взаимозаменяемо по отношению к субъекту. Таким образом, «субъект» включает человека, которого лечат от заболевания или у которого предупреждают заболевание, в качестве пациента. Описанные в данном документе способы можно использовать для лечения животного в рамках любой классификации. Примеры таких животных включают млекопитающих. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда Logomorpha, таких как кролики. Млекопитающие могут быть из отряда Carnivora, включая Felines (кошки) и Canines (собаки). Млекопитающие могут быть из отряда Artiodactyla, включая крупного рогатого скота (коровы) и свиней (свиньи), или отряда Perssodactyla, включая лошадиных (лошади). Млекопитающие могут относиться к отряду Primates, Ceboids, или Simoids (обезьяны) или отряду Anthropoids (люди и человекообразные обезьяны). В одном варианте осуществления млекопитающее представляет собой человека.

Когда указано терапевтически эффективное количество, точное количество композиций по настоящему изобретению для введения может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий по возрасту, весу, размеру опухоли, степени инфекции или метастазирования, а также состояния субъекта. В целом можно утверждать, что фармацевтическая композиция, содержащая описанные в данном документе Т-клетки, может вводиться в дозах от около  $10^4$  до около  $10^{10}$  клеток/кг массы тела, в некоторых случаях от около  $10^5$  до около  $10^6$  клеток/кг массы тела, включая все целые значения в этих диапазонах. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, описанные в данном документе, можно вводить в дозе около  $10^6$

клеток/кг массы тела. Композиции Т-клеток также могут вводиться несколько раз в этих дозах. Клетки могут вводиться с помощью методов инфузии, которые широко известны в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988).

Системы доставки, полезные в контексте вариантов осуществления изобретения, могут включать системы доставки с замедленным высвобождением, отсроченным высвобождением и пролонгированным высвобождением, так что доставка композиций Т-клеток происходит до и с достаточным временем, чтобы вызвать сенсбилизацию участка, подлежащего лечению. Композицию можно применять в сочетании с другими терапевтическими средствами или видами терапии. Такие системы позволяют избежать повторных введений композиции, тем самым повышая удобство для пациента и врача, и могут быть особенно подходящими для определенных вариантов осуществления композиции по изобретению.

Многие типы высвобождающих систем доставки доступны и известны специалистам в данной области. Они включают системы на основе полимеров, таких как поли(лактид-гликолид), сополиоксалаты, поликапролактоны, сложные полиэфирамиды, сложные полиортоэфиры, полигидроксимасляная кислота и полиангидриды. Микрокапсулы указанных выше полимеров, содержащие лекарственные средства, описаны, например, в патенте США №5075109. Системы доставки также включают неполимерные системы, которые представляют собой липиды, включая стерины, такие как холестерин, сложные эфиры холестерина и жирных кислот, или нейтральные жиры, такие как моно-, ди- и триглицериды; силистические системы; системы на основе пептидов; гидрогелевые системы высвобождения; восковые покрытия; прессованные таблетки с применением обычных связывающих веществ и наполнителей; частично сшитые импланты; и т. п. Инструменты включают, без ограничений, следующие: (а) эрозионные системы, в которых агент согласно изобретению содержится в форме внутри матрицы, такие как описаны в патентах США № 4,452,775; № 4,667,014; №4748034; и № 5,239,660 и (b) диффузионные системы, в которых активный компонент высвобождается с контролируемой скоростью из полимера, такие как описаны в патентах США № 3,854,480 и № 3,832,253. Кроме того, могут применяться аппаратные системы доставки на основе насоса, некоторые из которых адаптированы для имплантации.

В определенных аспектах может быть необходимым введение активированных Т-клеток субъекту и затем повторное взятие крови (или осуществление афереза), активация Т-клеток в соответствии с данным изобретением и повторная инфузия субъекту этих активированных и размноженных Т-клеток. Этот процесс может выполняться несколько раз каждые несколько недель. В некоторых аспектах Т-клетки могут быть активированы во взятой крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В некоторых аспектах Т-клетки активируют во взятой крови объемом 20 куб. см, 30 куб. см, 40 куб. см, 50 куб. см, 60 куб. см, 70 куб. см, 80 куб. см, 90 куб. см или 100 куб. см.

Введение CAR-T-клеток и композиций может осуществляться любым способом,

например, путем парентерального или непарентерального введения, в том числе ингаляции аэрозоля, инъекции, инфузии, перорального введения, трансфузии, имплантации или трансплантации. Например, CAR-T-клетки и композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту трансартериально, внутрикожно, подкожно, внутриопухолево, интрамедуллярно, интранодально, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутрибрюшинно. В одном аспекте составы, описанные в настоящем документе, вводят путем в/в инъекции. В одном аспекте композиции по настоящему изобретению вводят субъекту путем внутрикожной или подкожной инъекции. Композиции Т-клеток можно вводить, например, непосредственно в опухоль, лимфатический узел, ткань, орган или место инфекции.

Введение может быть аутологичным или неаутологичным. Например, иммунореактивные клетки, экспрессирующие CAR, специфичный к калликреину 2 (например, hK2) человека, могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Т-клетки, полученные из периферической крови по настоящему изобретению, или размноженные Т-клетки (например, полученные *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*), можно вводить, например, посредством внутривенной инъекции, локальной инъекции, системной инъекции, катетерного введения или парентерального введения.

В конкретном варианте осуществления субъект может подвергаться лейкаферезу, при этом лейкоциты собирают, обогащают или деплецируют *ex vivo*, чтобы отобрать и/или выделить представляющие интерес клетки, например, Т-клетки. Эти Т-клеточные изоляты могут быть размножены известными в данной области техники способами и обработаны таким образом, что может быть введена одна или более конструкций CAR по настоящему изобретению, и, таким образом, создана CAR-T-клетка. Нуждающиеся в этом субъекты могут впоследствии подвергаться стандартному лечению высокодозной химиотерапией с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых аспектах после трансплантации или одновременно с ней субъектам выполняют инфузию размноженных CAR-T-клеток. В одном аспекте размноженные клетки вводят до операции или после нее.

Доза, вводимая пациенту, имеющему злокачественные новообразования, является достаточной для ослабления или по меньшей мере частичной задержки заболевания, лечение которого осуществляется («терапевтически эффективное количество»). Дозировка вышеприведенных требующих введения субъекту препаратов будет варьироваться в зависимости от точной природы патологического состояния, подлежащего лечению, и пациента, получающего лечение. Масштабирование доз для введения человеку может быть выполнено в соответствии с общепринятыми в данной области техники практиками.

Т-клетки CAR по изобретению можно подвергать экспансии *in vivo* и возможно создавать hK2-специфические клетки памяти, которые сохраняются на высоких уровнях в течение продолжительного времени в крови и костном мозге. В некоторых случаях CAR-T-клетки по изобретению, введенные субъекту, могут уничтожать раковые клетки,

например, клетки рака предстательной железы или рака молочной железы, экспрессирующего AR, *in vivo* у субъектов с резистентным к химиотерапии прогрессирующим раком.

В одном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению вводят в Т-клетки, например, с использованием транскрипции *in vitro*, и субъект (например, человек) получает начальное введение CAR-Т-клеток по настоящему изобретению и одно или более последующих введений CAR-Т-клеток, при этом одно или более последующих введений проводят менее чем через 15 дней, например, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъекту (например, человеку) вводят CAR-Т-клетки более одного раза в неделю, например, 2, 3 или 4 введения CAR-Т-клеток в неделю. В одном варианте осуществления субъект получает более одного введения CAR-Т-клеток в неделю (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (что также называется в данном документе циклом), за которым следует перерыв введения CAR-Т-клеток на одну неделю, а затем одно или более дополнительных введений CAR-Т-клеток (например, более одного введения CAR-Т-клеток в неделю) субъекту. В еще одном варианте осуществления субъекту выполняют более одного цикла введения CAR-Т-клеток, а период времени между каждым циклом составляет менее чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, или 3 дня. В одном варианте осуществления CAR-Т-клетки вводят через день, 3 введения в неделю. В одном варианте осуществления CAR-Т-клетки по настоящему изобретению вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

В одном варианте осуществления введение можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Кроме того, возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. При повторном введении можно вводить такую же дозу или другую дозу.

CAR-Т-клетки можно вводить способами по настоящему изобретению с помощью поддерживающей терапии, такой как, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев или более.

В одном варианте осуществления CAR-Т-клетки генерируются с использованием лентивирусных векторов, таких как лентивирус. CAR-Т-клетки, полученные с помощью таких вирусных векторов, как правило, будут иметь стабильную экспрессию CAR.

В одном варианте осуществления CAR-Т-клетки транзистентно экспрессируют векторы CAR в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. На транзистентную экспрессию CAR может влиять доставка РНК-вектора CAR. В одном варианте осуществления РНК CAR трансдуцируют в Т-клетку путем электропорации.

Если пациент подвержен высокому риску развития ответа в форме выработки антител к CAR в ходе терапии с транзистентной экспрессией CAR (например, полученные путем трансдукции РНК), перерывы в инфузии CAR-Т не должны длиться более, чем от

десяти до четырнадцати дней.

Экспрессирующая CAR клетка, описанная в данном документе, может использоваться в комбинации с другими известными веществами и средствами лечения. Введение «в комбинации», как используется в настоящем документе, означает, что два (или более) различных средства лечения доставляют субъекту в течение курса лечения заболевания, например, два или более средств лечения доставляют после того, как у субъекта диагностировали рак, и перед тем, как рак был вылечен, или устранен, или лечение было прекращено по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще происходит, когда начинается доставка второго средства лечения, таким образом, существует перекрытие с точки зрения введения. Иногда в настоящем документе это называется как «одновременная» или «сопутствующая доставка». В других вариантах осуществления доставка одного средства лечения заканчивается до начала доставки другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшей дозе второго средства лечения, или же второе средство лечения снижает симптомы в большей степени, чем наблюдалось бы в том случае, если бы второе средство лечения вводили в отсутствие первого средства лечения, или же аналогичная ситуация наблюдается для первого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка осуществляется таким образом, что снижение симптома или другого параметра, связанного с заболеванием, является более значительным, чем наблюдалось бы в том случае, если бы одно средство лечения доставляли в отсутствие другого. Эффект двух средств лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или большим чем аддитивный. Доставка может осуществляться таким образом, что эффект первого вводимого средства лечения все еще будет определяться во время доставки второго средства.

В одном варианте осуществления другие терапевтические агенты, такие как факторы, можно вводить до, после или одновременно (параллельно с) с CAR-T-клетками, включая, без ограничений, интерлейкины, а также колониестимулирующие факторы, такие как G-, M- и GM-CSF, и интерфероны.

Экспрессирующая CAR клетка, описанная в данном документе, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент могут вводиться одновременно в одной или в отдельных композициях, либо вводиться последовательно. В случае последовательного введения экспрессирующая CAR клетка, описанная в данном документе, может вводиться первой, а дополнительный агент может вводиться вторым, либо же порядок введения может быть противоположным.

В дополнительных вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, описанные в настоящем документе, можно использовать в режиме лечения в комбинации с хирургическим вмешательством, лучевой или химиотерапией, иммуносупрессивным агентом, антителами или другими иммуноабляционными агентами. В другом варианте

осуществления клетку, экспрессирующую CAR, описанную в настоящем документе, можно использовать в комбинации с антиандрогенным лечением. В одном варианте осуществления субъекту могут вводить вещество, которое повышает активность экспрессирующей CAR клетки. Например, в одном варианте осуществления агент может быть таким, который ингибирует ингибирующую молекулу.

Ниже приведено описание примеров осуществления.

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

(a) внеклеточный домен, содержащий scFv, который специфически связывается с антигеном человеческого калликреина-2 (hK2);

(b) трансмембранный домен; и

(c) внутриклеточный сигнальный домен, необязательно содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

2. CAE по варианту осуществления 1, дополнительно включающий:

(d) шарнирную область CD8a,

где трансмембранный домен включает полипептид CD8a трансмембранной области (CD8a-TM); и

где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен, содержащий компонент члена 9 суперсемейства TNF-рецепторов (CD137) и первичный сигнальный домен, содержащий компонент дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток.

3. CAR по варианту осуществления 2, в котором

(b) шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере

на 90% идентична SEQ ID NO: 25, 269, 270, 271 или 272;

(c) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая

по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 26; и/или

(d) внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий

трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 27, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 28.

4. Химерный антигенный рецептор (CAR - англ.: chimeric antigen receptor), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;



определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; или

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122;

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

5. Химерный антигенный рецептор (CAR - англ.: chimeric antigen receptor), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и CDR3 легкой цепи, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 313, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138; или

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139,

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

6. CAR по варианту осуществления 4, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен дополнительно содержит:







последовательность SEQ ID NO: 134, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138; или

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.

8. CAR по варианту осуществления 6, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91.

9. Химерный антигенный рецептор (CAR - англ.: chimeric antigen receptor), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельный домен (VL) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 74, 75, 147, 148, 149, 150, 151, 152 и 318; и/или

вариабельный домен (VH) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, 5, 6, 76, 77, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146 и 317;

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген человеческого калликреина-2 (hK2).

10. CAR по варианту осуществления 9, в котором внеклеточный



вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 318, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 317.

11. CAR по любому из вариантов осуществления 1-10, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

12. CAR по варианту осуществления 11, в котором scFv содержит линкерный полипептид между вариабельной областью легкой цепи (VL) и вариабельной областью тяжелой цепи (VH).

13. CAR по варианту осуществления 12, в котором линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

14. CAR по любому из вариантов осуществления 11-12, в котором scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-23, 169-184 и 340-343.

15. CAR по любому из вариантов осуществления 1-14, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит сигнальный полипептид.

16. CAR по варианту осуществления 15, в котором сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

17. CAR по любому из вариантов осуществления 4-16, в котором внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента члена 9 суперсемейства рецепторов ФНО (CD137), компонента дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток, компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента члена суперсемейства дифференцировки и их

комбинации.

18. CAR по варианту осуществления 17, в котором компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

19. CAR по варианту осуществления 17 или варианту осуществления 18, в котором компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

20. CAR по любому из вариантов осуществления 17-19, причем внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

21. CAR по любому из вариантов осуществления 2-20, в котором трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM).

22. CAR по варианту осуществления 21, в котором полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

23. CAR по любому из вариантов осуществления 4-22, дополнительно содержащий шарнирную область, связывающую трансмембранный домен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом.

24. CAR по варианту осуществления 23, в котором шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8a.

25. CAR по варианту осуществления 24, в котором шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, 279, 280, 281 или 282.

26. CAR по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-44, 78-81, 221-236 и 273-308.

27. CAR по любому из вариантов осуществления 1-26, в котором CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-61, 82-85 и 205-220.

28. Выделенный лимфоцит, экспрессирующий CAR по любому из пп. 1-27.

29. Выделенный лимфоцит по варианту осуществления 28, в котором лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит.

30. Выделенный лимфоцит по варианту осуществления 28, причем Т-лимфоцит представляет собой клетку-натуральный киллер (NK).

31. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR по любому из вариантов осуществления 1-30.

32. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 31.

33. Клетка, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 31.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество лимфоцитов по любому из вариантов осуществления 28-30.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество лимфоцитов по любому из вариантов осуществления 28-30 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

36. CAR по любому из вариантов осуществления 1-27 или фармацевтическая композиция по вариантам осуществления 34 или 35 для применения в терапии.

37. CAR по любому из вариантов осуществления 1-27 или фармацевтическая композиция по вариантам осуществления 34 или 35 для применения в способе лечения субъекта, имеющего рак.

38. Способ лечения субъекта, имеющего рак, причем указанный способ включает: введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов по любому из вариантов осуществления 28-30 нуждающемуся в этом субъекту, в котором лимфоциты индуцируют уничтожение раковых клеток у субъекта.

39. Способ по варианту осуществления 38, или CAR, или фармацевтическая композиция для применения в способе по варианту осуществления 37, в котором рак представляет собой рак предстательной железы или рак молочной железы, экспрессирующий андрогенный рецептор.

40. Способ по варианту осуществления 38, или CAR, или фармацевтическая композиция для применения в способе по варианту осуществления 37, в котором рак представляет собой рак предстательной железы.

41. Способ по варианту осуществления 38, или CAR, или фармацевтическая композиция для применения в способе по варианту осуществления 37, в котором рак представляет собой рак молочной железы, экспрессирующий андрогенный рецептор.

42. Способ направленного уничтожения раковой клетки, включающий: приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом любого из вариантов осуществления 28-30, в результате чего лимфоцит индуцирует уничтожение раковой клетки.

43. Способ по варианту осуществления 42, причем раковая клетка представляет собой клетку рака предстательной железы или клетку рака молочной железы, экспрессирующего андрогенный рецептор.

44. Способ обнаружения наличия рака у субъекта, включающий:

(c) приведение образца клеток, полученного от субъекта, в контакт с CAR по вариантам осуществления 1-27, тем самым формируя комплекс CAR-клетка, и

(d) обнаружение комплекса, причем обнаружение комплекса указывает на наличие рака у субъекта.

Предпочтительно вариант осуществления реализуют *in vitro*.

45. CAR по варианту осуществления 1, в котором трансмембранный домен содержит полипептид CD8a-TM, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

46. CAR по варианту осуществления 2, в котором трансмембранный домен содержит полипептид CD8a-TM, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

47. CAR по варианту осуществления 2 или 46, в котором шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

48. CAR по варианту осуществления 2 или 47, в котором компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

49. CAR по варианту осуществления 2, 47 или 48, в котором компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

50. CAR по варианту осуществления 3, в котором:

(b) шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере

на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 25, 269, 270, 271, или 272, где предпочтительно шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 25;

(c) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая

по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 26; и/или

(d) внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий

домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 27, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 28.

51. CAR по варианту осуществления 3, в котором шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

52. CAR по варианту осуществления 3, в котором полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

53. CAR по варианту осуществления 3, в котором компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

54. CAR по варианту осуществления 3, в котором компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

55. CAR по варианту осуществления 3, в котором:

(b) шарнирная область Cd8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(c) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; и

(d) внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий

домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и первичный сигнальный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

56. CAR по вариантам осуществления 45-55, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-44, 78-81, 221-236 и 273-308.

57. CAR по любому из вариантов осуществления 45-55, в котором CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-61, 82-85 и 205-220.

58. Выделенный лимфоцит, экспрессирующий CAR по любому из пп. 45-55.

59. Выделенный лимфоцит по варианту осуществления 58, в котором лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит.

60. Выделенный лимфоцит по варианту осуществления 58, причем Т-лимфоцит представляет собой клетку-натуральный киллер (NK).

61. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR по любому из вариантов осуществления 45-55.

62. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 61.

63. Клетка, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 61.

64. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество лимфоцитов по любому из вариантов осуществления 58-60.

65. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество лимфоцитов по любому из вариантов осуществления 58-60 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

66. CAR по любому из вариантов осуществления 45-55 или фармацевтическая композиция по вариантам осуществления 64 или 65 для применения в терапии.

67. CAR по любому из вариантов осуществления 45-55 или фармацевтическая композиция по вариантам осуществления 64 или 65 для применения в способе лечения субъекта, имеющего рак.

68. Способ лечения субъекта, имеющего рак, причем указанный способ включает: введение терапевтически эффективного количества лимфоцитов по любому из вариантов осуществления 58-60 нуждающемуся в этом субъекту, в котором лимфоциты индуцируют уничтожение раковых клеток у субъекта.

69. Способ по варианту осуществления 68, или CAR, или фармацевтическая композиция для применения в способе по варианту осуществления 67, в котором рак представляет собой рак предстательной железы или рак молочной железы, экспрессирующий андрогенный рецептор.

70. Способ по варианту осуществления 68, или CAR, или фармацевтическая композиция для применения в способе по варианту осуществления 67, в котором рак представляет собой рак предстательной железы.

71. Способ по варианту осуществления 68, или CAR, или фармацевтическая композиция для применения в способе по варианту осуществления 67, в котором рак представляет собой рак молочной железы, экспрессирующий андрогенный рецептор.

72. Способ направленного уничтожения раковой клетки, включающий:

приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом любого из вариантов

осуществления 58-60, в результате чего лимфоцит индуцирует уничтожение раковой клетки.

73. Способ по варианту осуществления 72, причем раковая клетка представляет собой клетку рака предстательной железы или клетку рака молочной железы, экспрессирующего андрогенный рецептор.

74. Способ обнаружения наличия рака у субъекта, включающий:

(a) приведение образца клеток, полученного от субъекта, в контакт с CAR по вариантам осуществления 45-55, тем самым формируя комплекс CAR-клетка, и

(b) обнаружение комплекса, причем обнаружение комплекса указывает на наличие рака у субъекта.

Предпочтительно вариант осуществления реализуют *in vitro*.

#### ПРИМЕРЫ

Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из вариантов осуществления, раскрываемых в настоящем документе. Примеры призваны проиллюстрировать, но не ограничить, раскрываемые варианты осуществления.

#### **Пример 1: Конструирование и экспрессия scFv hK2 CAR с 11B6 scFv**

Конструкты hK2 CAR, содержащие scFv, полученные из антитела 11B6, нацеленного на hK2, конструировали, как показано на **Фиг. 1А**. Т-клетки CD3/CD28, стимулированные с помощью Dynabeads Human T-Expander, подвергали электропорации, затем три раза промывали средой OPTI-MEM (Invitrogen) и повторно суспендировали в OPTI-MEM в конечной концентрации 50Е6/мл. Затем 0,1 мл клеток (5Е6) смешивали с 10 мкг РНК, кодирующей IVT CAR, и подвергали электропорации в 2-мм кювете Gap (Harvard Apparatus ВТХ, Holliston, MA, США) с использованием ВТХ ЕСМ830 (Harvard Apparatus ВТХ, Holliston, MA, США) однократным нажатием кнопки импульса. (Настройки: 500 вольт, длина импульса 750 мкс и один (1) импульс, интервал 100 мс) После электропорации Т-клетки переносили в 6-луночный планшет и немедленно возвращали в инкубатор при 37 °С. Первичные человеческие Т-клетки подвергали электропорации без мРНК (контроль) или в присутствии 10 мкг мРНК для экспрессии или scFv CAR к hK2, или нерелевантного контрольного CAR. Через сутки после электропорации экспрессию CAR на поверхности клеток измеряли с помощью проточной цитометрии после окрашивания с помощью 2 мкг/мл биотинилированного L-белка и конъюгированного со стрептавидином PE (**Фиг. 1В**) или 1 мкг/мл биотинилированного hK2 и конъюгированного со стрептавидином PE (**Фиг. 1С**).

Через сутки после электропорации проводили подсчет Т-клеток. 1Е5Т-клетки собирали для каждого исследования. Клетки дважды промывали буфером FACS в количестве 200 мкл/лунка на микротитрационном планшете, причем супернатант отбрасывали. Все лунки окрашивали с помощью 100 мкл буфера для окрашивания, содержащего белок L (Genscript, кат. № M000971:500; 2 мкг/мл), инкубировали в течение по меньшей мере 30 минут при 4 °С в защищенном от света месте. Клетки промывали дважды путем добавления буферного раствора FACS, используя 150 мкл/лунка для

микротитрационного планшета с помощью буфера FACS. Центрифугирование при 400 x g проводили в течение 4 минут при комнатной температуре. Далее супернатанты выбрасывали. Все лунки окрашивали с помощью 100 мкл Streptavidin-R-Phycoerythrin (SA-PE; 1:25 0) и красителем для дифференциации живых/мертвых фиксированных клеток в ближнем ИК-диапазоне (1:10 00), инкубировали в течение по меньшей мере 30 минут при 4 °C при защите от света. После этого клетки были готовы для анализа методом проточной цитометрии.

Как показано на **Фиг. 1В**, в обоих hK2 HL и LH CAR (41,4% и 66,3% соответственно) наблюдали окрашивание белка L, тогда как в контрольных Т-клетках, которые представляли собой Т-клетки без электропорации с мРНК, наблюдали только фоновое окрашивание (~5,5%). Как показано на **Фиг. 1С**, экспрессию CAR на первичных Т-клетках человека также можно обнаружить посредством J&J внутреннего меченого биотином рекомбинантного белка hK2 (белок биотин-Hk2, партия: 20180810, CBIS ID:KL2W12.CB.003, 2,4 мг/мл, 1 mM бензамидина) с последующим SA-PE. Как показано, Т-клетки могут эффективно экспрессировать hK2 CAR LH (82,7%), как было измерено методом проточной цитометрии, тогда как в контрольных Т-клетках, которые были Т-клетками без электропорации с мРНК или неописанными контрольными CAR (не hK2), наблюдали только фоновое окрашивание (~1,73% или 1,19%). Результаты показаны для репрезентативных донорских Т-клеток и воспроизводились с разными донорами (по меньшей мере n=3). + биотиновая метка (EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin, Thermo Fisher Scientific, кат. №: 21327)

### **Пример 2: Уничтожение опухолевых клеток с помощью hK2 CAR-Т-клеток**

Совместное культивирование для CellTrace Violet (CTV, Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу: C34557); анализ цитотоксичности методом проточной цитометрии проводили следующим образом.

Т-клетки подготавливали следующим образом. Через двадцать четыре часа после ЭП Т-клетки подсчитывали и повторно суспендировали в концентрации, необходимой для наиболее концентрированного/желаемого соотношения Е : Т. Т-клетки добавляли в концентрации 100 мкл/лунку для анализа ( $2 \times 10^6$  клеток/мл; высевали 100 мкл с соотношением Е : Т 10 : 1, т. е.,  $2 \times 10^5$  Т-клеток на  $2 \times 10^4$  клеток-мишеней). Готовили маточный раствор с концентрацией Е : Т 10 : 1 и двукратные последовательные разведения в полной среде для Т-клеток (Optimizer w/CTS, 5% сыворотка человека, 1% GlutaMax) до 0,3125 : 1. Т-клетки высевали (100 мкл/лунка) в трех повторностях в обработанный 96-луночный круглодонный планшет для культур тканей.

Меченые CTV клетки-мишени получали следующим образом. 20 мкл DMSO добавляли во флакон с раствором для окрашивания CTV. Этот исходный раствор разводили 20 мл PBS (нагретым до 37 °C) для получения 5 мкМ окрашивающего раствора. Собирали  $10 \times 10^6$  опухолевых клеток, дважды промывали PBS и повторно суспендировали в количестве 4Е6/мл (2,5 мл). Добавляли равный объем (2,5 мл) раствора для окрашивания CTV. Клетки инкубировали в течение 20 минут в инкубаторе при 37 °C. В клетки

добавляли 40 мл RPMI+20% ФБС для абсорбции любого несвязанного красителя. Далее клетки инкубировали в течение 5 минут. Клетки центрифугировали в течение 5 минут при 400 x g. Клеточный осадок повторно суспендировали в предварительно нагретом RPMI+10% ФБС. Тем временем Т-клетки высевали при желаемом соотношении Е/Т, описанном выше. Линии опухолевых клеток VCaP (hK2+) и DU145 (hK2-) повторно подсчитывали, а затем клетки повторно суспендировали в количестве 2Е5/мл и в объеме 100 мкл в двух повторностях. Клетки совместно инкубировали с мечеными линиями опухолевых клеток в 96-луночном планшете с плоским дном.

Анализ цитотоксичности проводили методом проточной цитометрии следующим образом. Через 20 часов совместного культивирования все клетки переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном и промывали. Через 20 часов совместного культивирования все клетки собирали из 96-луночного планшета с плоским дном и переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном, а затем промывали. 30 мкл 0,25% трипсина добавляли во все лунки и инкубировали в течение 5 минут в инкубаторе при 37 °С. Через 5 минут все опухолевые клетки собирали в 96-луночный планшет с U-образным дном. Клетки дважды центрифугировали и промывали в течение 5 минут при 400 x g. Затем клеточный осадок повторно суспендировали в разбавленном (1 : 1000) красителе для дифференциации живых и мертвых клеток LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR (100 мкл). Клетки инкубировали в течение 30 мин при 4 °С и промывали буфером FACS дважды путем центрифугирования клеток в течение 5 минут при 400 x g. После промывки все клетки фиксировали в течение 10 минут с использованием 100 мкл фиксирующего буфера BD Cytotfix™ (50 мкл буфера FACS+50 мкл фиксирующего буфера). Клетки центрифугировали и промывали в течение 5 минут при 400 x g. Клеточный осадок повторно суспендировали в буфере FACS. Окрашенные образцы анализировали с помощью многоцветной проточной цитометрии после завершения периода инкубации.

Процент цитотоксической активности рассчитывали с использованием следующего уравнения:

$$\% \text{ удельной смерти} = \% \text{ окрашивания Near IR+CTV} + (\text{мертвые}) \text{ клетки} - \% \text{ спонтанного окрашивания Near IR+CTV} + / (100\% - \% \text{ спонтанного окрашивания Near IR+CTV} + (\text{мертвые}) \text{ клетки}) \times 100\%$$

Через сутки после временной трансфекции клетки-мишени (VCaP и DU145) метили флуоресцентным красителем Cell Trace Violet (CTV) и затем совместно культивировали с hK2 CAR-T-клетками. Контрольные Т-клетки служили отрицательным контролем эффектора. Клетки совместно культивировали в течение 20 часов при указанном соотношении эффектор/мишень (Е/Т) в диапазоне, как показано на **Фиг. 2**. Процент уничтожения представляет собой отношение абсолютного числа живых (отрицательных по окрашиванию для оценки жизнеспособности клеток) (CTV-положительных) клеток-мишеней, оставшихся в совместной культуре, к числу живых мишеней, культивированных без CAR-T-клеток. Как было показано, Т-клетки CAR LN hK2 специфически и эффективно лизируют клеточные линии VCaP hK2 (+) рака предстательной железы

человека, но не K2 (-) клетки DU145 при соотношении E/T от 10 : 1 до 0,3125 : 1, тогда как в T-клетках, которые представляли собой контроль CAR или hK2 HL, наблюдалась только фоновая цитотоксичность.

hK2 CAR-T-клетки также тестировали на цитотоксичность в реальном времени с использованием системы xCELLigence в качестве системы анализа клеток в реальном времени для оценки активности, опосредованной иммунными клетками цитолиза клеток-мишеней.

В каждую лунку 96-луночных планшетов E-plate (ACEA Biosciences) добавляли 50 мкл среды для культивирования клеток-мишеней (ACEA Biosciences), а фоновое значение импеданса измеряли и выражали как клеточный индекс. Затем прикрепленные клетки-мишени VCaP и DU145 диссоциировали и высевали с плотностью 5E4 (VCaP), 5E3 (DU145) клеток/лунку E-планшета в объеме 100 мкл и оставляли пассивно адгезироваться к поверхности электрода. После посева E-планшет выдерживали при температуре окружающей среды в ламинарном шкафу в течение 30 минут, а затем переносили в устройство RTCA MP внутри инкубатора для культивирования клеток. Запись данных начинали немедленно и вели ее на протяжении всего эксперимента (96 часов) с 15-минутными интервалами.

Во время обработки (в течение 24 ч после посева раковых клеток) сбор данных приостанавливали, 50 мкл среды удаляли из каждой лунки, а эффекторные CAR-T-клетки добавляли в различных соотношениях эффектор/мишень (E:T) в объеме 50 мкл. hK2 CAR-T-клетки и неописанные контрольные CAR (не hK2-специфические) T-клетки снова суспендировали. Затем готовили двукратные разведения в 96-луночном планшете в двух повторностях (соотношение E/T от 5 : 1 до 0,156 : 1). К клеткам-мишеням также добавляли контроли мишени плюс эффектора (T-клетки, не подвергавшиеся электропорации с РНК).

Клетки-мишени VCaP (5E4) и DU145 (5E3) инкубировали с контролем, hK2 11B6 CAR LN после электропорации с 10 мкг мРНК (через 24 часа после трансфекции) или с контрольными CAR-T-клетками при различных соотношениях E/T в течение приблизительно 72 часов. Для VCaP и DU145 показаны графики нормализованного клеточного индекса (CI) на **Фиг. 3А** и **Фиг. 3В**, соответственно. При засеивании отдельно клетки-мишени, прикрепленные к планшету и пролиферируемые, увеличивали показание CI. Когда T-клетки добавляли к клеткам-мишеням, hK2 CAR и контрольные CAR-T-клетки опосредовали цитолиз клеток и последующее постепенное снижение CI.

### **Пример 3: Продукция цитокинов hK2 CAR-T-клетками**

Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, IFN- $\gamma$ , продуцируемый цитотоксическими T-клетками, мог обеспечить иммунный надзор над опухолями, который может непосредственно ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз некоторых злокачественных новообразований *in vivo* и *in vitro*. Для определения способности hK2 CAR-модифицированных человеческих T-клеток распознавать и активировать опухолевые клетки hK2 (+) собирали супернатант из анализа уничтожения

клеток с использованием системы xCELLigence, как описано в примере 2 и на **Фиг. 3А-3В**. После около 70 часов совместного культивирования супернатант собирали и анализировали с помощью твердофазного ИФА в соответствии с указаниями к набору для ИФА (IFN- $\gamma$  ELISA MAX™ Deluxe, BioLegend, кат. № 430106).

Продукция цитокина интерферона- $\gamma$  Th1 (IFN- $\gamma$ ), стимулированная антигенами CAR-T-клеток, показана на **Фиг. 4**. hK2 CAR LH и контрольные модифицированные CAR-T-клетки секретировали IFN- $\gamma$  во время совместного культивирования с hK2-экспрессирующими клетками VCar в зависимости от соотношения E : T, но не с hK2-отрицательными клетками DU145. Неописанный контрольный CAR секретировал гораздо большее количество IFN- $\gamma$  из-за гораздо более высокого уровня экспрессии антигена, чем у hK2. Показана средняя концентрация IFN- $\gamma$   $\pm$  SD (пг/мл) для культур при повторных измерениях.

#### **Пример 4: Создание и определение характеристик термически стабилизированных конструкторов scFv CAR**

Клон антитела к hK2 11B6 был идентифицирован путем иммунизации мышей BALB/c рекомбинантным hK2 Väisänen et al (Clinical Chemistry 50:9, 1607-1617 (2004)). Гуманизация полученного мышинового клона 11B6 была выполнена способом, описанным у Singh et al., MAbs. 2015;7(4):778-91. Поскольку экзодомен 11B6 дикого типа в виде scFv не сохранял связывания при повышенной температуре (55 °C), гуманизацию проводили как scFv, а экспрессированные E. coli супернатанты гуманизированных вариантов инкубировали при 60 °C в течение 15 минут с последующим скринингом связывания с рекомбинантным hK2 с помощью твердофазного ИФА.

Получали десять нацеленных на hK2 CAR, содержащих термически стабилизированный scFv, полученный из антител 11B6.

Описание и SEQ ID NO: конструкторов CAR, содержащих термически стабилизированные scFv, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Конструкторы CAR с термически стабилизированными 11B6 scFv

<b>№ конструкторов</b>	<b>Описание</b>	<b>SEQ ID NO</b>
<b>1</b>	HL_HCG5_LCD6_20AA	46
<b>2</b>	HL_HCG5_LCHumanized_20AA	47
<b>3</b>	HL_HCF3_LCB7_20AA	48
<b>4</b>	HL_HCG5_LCB7_20AA	49
<b>5</b>	LH_LCD6_HCG5_20AA	50
<b>6</b>	LH_LCHumanized_HCF3_20AA	51
<b>7</b>	LH_LCHumanized_HCG5_20AA	52
<b>8</b>	LH_LCB7_HCF3_20AA	53
<b>9</b>	LH_LCB7_HCG5_20AA	54
<b>10</b>	LH_LCD6_HCF3_20AA	55

Для идентификации различных CAR на основании scFv проводили оценку их антиген-независимой активации посредством клеток Jurkat-Lucia™ NFAT (JNL). Ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) представляет собой семейство факторов транскрипции, впервые идентифицированных как регулятор иммунных клеток. Активация Т-клеток приводит к притоку кальция, тем самым активируя кальциневрин, который дефосфорилирует богатый серином клеточный сигнал внутриядерной локализации на N-конце NFAT, что приводит к ядерному импорту NFAT. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, впоследствии можно обнаружить тоническую передачу сигнала в связи с кластеризацией scFv с помощью люциферазы Firefly, управляемой промотором NFAT в репортерной клеточной линии JNL.

Клетки JNL, т. е. клетки Jurkat, содержащие ген люциферазы, регулируемый отвечающим на сигнал NFAT-промотором, трансдуцировали с использованием различных конструкторов CAR. Связывание между конструктором CAR и распознаваемым им клеточным антигеном (hK2 на клетках-мишенях) приводит к экспрессии люциферазы в клетках JNL.

Лентивирусная трансдукция проводилась следующим образом. Клетки JNL собирали и повторно суспендировали до  $1 \times 10^6$ /мл. Добавляли 500 мкл клеток JNL и лентивируса в MOI 3 и перемешивали с помощью пипетки в направлении вверх и вниз. Смесь инкубировали в инкубаторе при 37 °C в течение 24 часов. В каждую лунку добавляли 500 мкл среды JNL, при этом культивирование продолжали в инкубаторе при 37 °C. Клетки переносили в сосуд T25 на 4й день. На 5й-6й день проводили валидацию трансдукции. Собирали 150 мкл клеток для изучения экспрессии CAR посредством соответствующего реагента обнаружения для конкретного применяемого CAR (например, белок биотина-hk2 используется для обнаружения hK2 CAR). Клетки JNL сохраняли при  $5 \times 10^5$ /мл до тех пор, пока не было получено достаточного количества клеток для замораживания или использования в анализе.

Оценку термически стабилизированных scFv CAR проводили путем анализа по гену-репортеру на предмет антигензависимой активности. Клетки Jurkat, содержащие ген люциферазы, регулируемый отвечающим на сигнал NFAT-промотором (называемые клетками JNL), трансдуцировали с использованием различных конструкторов hK2 CAR. Исследование выполняли следующим образом. Проводили совместное культивирование с линиями клеток-мишеней, причем соотношение эффектора и клеток-мишеней составляло 2 : 1. Клетки JNL центрифугировали для удаления любой секретируемой люциферазы в среде; затем клетки JNL повторно суспендировали в свежей среде в концентрации  $4 \times 10^5$ /мл. Клетки собирали. Затем получали как антиген-положительные, так и антигенотрицательные линии клеток-мишеней при  $2 \times 10^5$ /мл. К 100 мкл клеток JNL добавляли 100 мкл клеток-мишеней. Для контроля присутствия только клеток JNL вместо клеток-мишеней добавляли 100 мкл среды. Для положительного контроля клетки JNL или клетки JNL CAR добавляли в 1 х коктейль для стимуляции клеток и инкубировали в инкубаторе при 37 °C в течение 24 часов. 150 мкл супернатанта собирали в 96-луночный планшет и центрифугировали для удаления клеток. 100 мкл супернатанта переносили из

планшета на черный планшет с твердым дном. Затем добавляли 100 мкл реагента обнаружения QUANTI-luc. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут перед считыванием результатов с помощью планшетного ридера Envision.

Экспрессию CAR определяли посредством биотинилированного hK2 и затем конъюгированного со стрептавидином PE; результаты показаны на **Фиг. 5А**. Экспрессия CAR в трансдуцированных клетках JNL была подтверждена для всех выбранных клонов с 60-75% клеток, демонстрирующих обнаруживаемую экспрессию в различных клонах и исходных CAR 11B6. Клетки JNL, содержащие указанные клоны CAR и нетрансдуцированные клетки JNL (UTD), совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (VCaP или DU145 клетки), а активность люциферазы измеряли как интенсивность люминесценции. Клоны считали активными, когда интенсивность люминесценции в присутствии антиген-экспрессирующих клеток превышала уровень UTD-клеток в 1,5 раза.

Связывание между конструктором CAR и его распознанным клеточным антигеном (hK2 на клетках-мишенях) приводит к экспрессии люциферазы в клетках JNL (**Фиг. 5В**). Клетки JNL, содержащие указанные клоны CAR и клетки JNL (нетрансдуцированные, далее UTD) совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (VCaP или DU145 клетки), а активность люциферазы измеряли как интенсивность люминесценции. Клоны считали активными, когда интенсивность люминесценции в присутствии антиген-экспрессирующих клеток превышала уровень UTD-клеток в 1,5 раза. Для всех 10 клонов и исходных HL и LH 11B6 антиген-зависимой активации обнаружено не было.

#### **Пример 5: Экспрессия термически стабилизированных scFv CAR на Т-клетках**

Для оценки функции термически стабилизированных 11B6 CAR-Т-клеток и выбора наилучшего конструктора получали термически стабилизированный 11B6 и исходные CAR-Т-клетки на основании scFv с использованием лентивирусной трансдукции. Первичные Т-клетки человека трансдуцировали лентивирусом с термически стабилизированным 11B6 и родительским CAR на основе scFv с множественностью инфекции (MOI), равной 3. Экспрессию CAR определяли с помощью биотинилированного hK2 (1 мкг/мл), а затем конъюгированного со стрептавидином PE через 14 дней после трансдукции.

Используют следующий экспериментальный протокол.

Была проведена лентивирусная упаковка. Т-клетки 14E6 Lenti-X™ 293 высевали на чашке для культивирования Corning™ BioCoat™ Collagen I с круглым дном диаметром 150 мм<sup>2</sup> и инкубировали при 37 °C в течение ночи с использованием DMEM и 10% ФБС.

С помощью Т-клеток Lenti-X™ 293 при идеальной конфлюентности 80-85% подготавливали следующее. Культуральную среду заменяли на 21 мл среды для выращивания 293Т. Липофектамин 2000 разводили при комнатной температуре и уравнивали средой OptiMEM. Разведенный липофектамин 2000 добавляли по каплям к смешанным плазмидам и хорошо перемешивали. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 25 минут. Смесь для трансфекции добавляли к Т-клеткам Lenti-X

293Т по каплям, причем планшет осторожно вращали для перемешивания. Смесь инкубировали в инкубаторе при 37 °С. Лентивирус собирали через 24 часа и 48 часов после трансфекции. Сводный обзор вышеуказанных реагентов приведен в таблице 2.

**Таблица 2**

<b>Реактив</b>	<b>Количество на чашку диаметром 15 см</b>
pMDLg/p	18 мкг
pRSV.Rev	18 мкг
pMD2.G	7 мкг
Плазмида для переноса (CAR)	15 мкг
OptiMEM	1500 мкл

Лентивирус концентрировали следующим образом. Супернатанты, содержащие лентивирус, собирали и центрифугировали при 500 x g в течение 10 мин. При наличии избыточного количества Т-клеток 293Т до фильтрации проводили фильтрацию через целлюлозно-ацетатный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Супернатант переносили в стерильный контейнер, смешивали с 1/3 объема реагента Lenti-X Concentrator (Clontech, кат. № 631232) и перемешивали посредством осторожного переворачивания. Смесь перемешивали при 4 °С в течение ночи. Образец центрифугировали при 1500 x g в течение 45 минут при 4 °С до появления белого плотного осадка, видимого после центрифугирования. Супернатант осторожно удаляли, не тревожа осадок. Остаточные супернатанты удаляли пипеткой после кратковременного центрифугирования при 1500 x g. Осадок осторожно повторно суспендировали в 1/10 исходного объема с использованием фактора роста Т-клеток. Вирус аликвотировали в 200 мкл и немедленно помещали на хранение при температуре -80 °С.

Вирусные титры устанавливали следующим образом. Лог-фаза роста клеток SupT1 проходила в полной среде RPMI. 100 мкл с концентрацией 20 000 клеток SupT1/мл высевали на лунку в плоском 96-луночном планшете. Затем проводили титрование вируса в 96-луночных круглодонных планшетах. Во все лунки планшета добавляли 100 мкл среды. Аликвоту вируса, хранящуюся в морозильном шкафу при -80 °С, размораживали. Аликвоту тщательно перемешивали с помощью пипетки в направлении вверх и вниз и добавляли 50 мкл вируса в первую лунку с последующим тщательным перемешиванием. Последовательное разведение в соотношении 1 : 3 проводили путем переноса 50 мкл вируса в следующую лунку с помощью пипетки. Затем 50 мкл среды добавляли только к первичному Ат, только вторичному Ат и не к нетрансдуцированным контрольным образцам. 50 мкл содержимого каждого соединения переносили с титровальной пластины к 100 мкл клеток SupT1 на аналитическом планшете для проведения анализа с помощью многоканальной пипетки и инкубировали при 37 °С в течение ночи. В каждый образец

добавляли 100 мкл предварительно нагретой среды и инкубировали еще два дня. Эффективность трансдукции определяли методом проточной цитометрии. Образцы переносили на круглодонный 96-луночный планшет и центрифугировали при 1400 об/мин в течение 3 минут. Супернатант быстро отбрасывали с последующим блоттингом для удаления избытков среды в вытяжном шкафу. Промывку повторяли с помощью 150 мкл буфера FACS. Затем приводили в действие протокол окрашивания, подходящий для конструкторов CAR. Образцы повторно суспендировали в 150 мкл буфера FACS до проведения анализа методом проточной цитометрии.

Расчет титра вируса:  $\text{Титр} = (\% \text{ положительных CAR}/100) \times 2 \times 10^4 \times 20 \times \text{коэффициент разведения}$

Для исключения интеграции множественных копий используют титры с ближайшим значением трансдукции до 20%.

Активацию Т-клеток, трансдукцию и размножение проводили следующим образом. Флакон наивных Т-клеток размораживали на водяной бане и добавляли по каплям в коническую пробирку емкостью 15 мл, содержащую 9 мл предварительно нагретой среды для Т-клеток (TCM CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM+5% человеческой сыворотки+100 МЕ/мл IL-2). Криофлакон промывали 1 мл среды для извлечения максимального количества и центрифугировали при 300 x g в течение 8 минут при комнатной температуре. Осадок повторно суспендировали в 10 мл свежей среды TCM, подсчитывали и повторно суспендировали до концентрации  $1 \times 10^6$  клеток на миллилитр.  $5 \times 10^5$  клеток на лунку высевали в 24-луночный планшет.  $1,5 \times 10^6$  микроносители CD3/CD28 добавляли на лунку в объеме 500 мкл таким образом, что общий объем составлял 1 мл на лунку. Через сутки после активации вирус размораживали при комнатной температуре. Вирус добавляли при множественности инфекций (MOI), равной 3, осторожно перемешивали и возвращали планшет в инкубатор. (Лентивирусный функциональный титр ранее определяли с помощью анализа титра SupT1). Одна лунка была зарезервирована для нетрансдуцированного (UTD) соединения, в которую вирус не добавляли.

Через сутки после трансдукции в каждую лунку добавляли 1 мл TCM. После этого добавляли пенициллин-стрептомицин (2-й день). На 3-й-5-й день добавляли 4 мл TCM в каждые 2 мл клеток и переносили в обработанную колбу для культур тканей T25. Колбы помещали горизонтально в инкубатор (3-й день). Равный объем TCM добавляли для культивирования Т-клеток (4-й день). В дни с 5 по 14 клетки проверяли через день, при этом регистрировали их жизнеспособность, размер и общее количество. Плотность клеток доводили до одного миллиона клеток на мл. Идеальное время сбора зависит от донора и определяется размером клеток и кратностью размножения. Клетки, как правило, замораживали, когда размер клеток составлял менее 8 мкм на основе проточного счетчика MOXI с 100-200-кратным размножением.

Эффективность лентивирусной трансдукции проверяли в день сбора клеток следующим образом. Культуры хорошо перемешивали. 100 мкл Т-клеток собирали в

соответствующую лунку в 96-луночном планшете со 100 мкл буфера FACS, смешивали и центрифугировали при 1300 об/мин в течение 3 минут при комнатной температуре. Клетки повторно суспендировали в 200 мкл буферного раствора FACS и повторно центрифугировали при 4 °С.

Клетки повторно суспендировали в 100 мкл биотина, меченного hK2 (1 мкг/мл, разбавленный буфером для FACS) и инкубировали на льду в течение 30 минут. Добавляли 100 мкл буфера FACS и промывали центрифугированием при 4 °С. Промывание центрифугированием повторяли после добавления еще 200 мкл буфера FACS. Окрашивание с использованием 100 мкл основного раствора, содержащего вторичное антитело SA-PE (1 : 25 0), красителя для дифференциации живых/мертвых клеток (1 : 500),  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD4 и  $\alpha$ CD8 антител проводили на льду в течение 30 минут. Добавляли 100 мкл буфера FACS и промывали центрифугированием при 4 °С, отбрасывали и повторно суспендировали в 200 мкл буфера FACS перед промывкой центрифугированием при 4 °С. Образцы повторно суспендировали в 100 мкл буфера FACS перед анализом методом проточной цитометрии.

Сбор клеток и замораживание проводили следующим образом. Определяли конечное количество клеток. Культуру собирали и центрифугировали при 300 x g в течение 10 минут при комнатной температуре. Культуру повторно суспендировали в меньшем объеме среды для внесения в коническую пробирку объемом 50 мл. Пробирки помещали в магниты при 4 °С в течение 10 минут до «отделения гранул». Клетки осторожно переносили из пробирки, чтобы свести к минимуму нарушения взаимосвязи микроноситель/магнит, а точный объем записывали. Подсчет повторяли. Центрифугирование проводили при 300 x g в течение 10 минут, при этом супернатант отбрасывали. Клетки замораживали в среде для криоконсервации клеток CS-10 CryoStor® в охлаждающем контейнере. Контейнеры немедленно переносили в условия температуры -80 °С на 24-48 часов перед отправкой на постоянное хранение в жидком азоте. Результаты показаны на **Фиг. 6** и подтверждают экспрессию hK2 CAR на поверхности трансдуцированных Т-клеток. Представлены краткие сведения о процентном содержании hK2 CAR+ Т-клеток (% положительных), обнаруженном с каждым из 10 термически стабилизированных клонов, и обзор анализа родительского HLH 11B6. Как показано, различные клоны имеют разные уровни экспрессии CAR, которые находятся в диапазоне от 17,9% до 42,7%. Все CAR-Т-клетки были нормализованы к равным CAR+ Т-клеткам для последующих функциональных анализов.

**Пример 6: Уничтожение опухолевых клеток с помощью термически стабилизированных 11B6 CAR-Т-клеток**

Подсчет термически стабилизированных 11B6 scFv CAR-Т-клеток проводили в анализе уничтожения опухолей в реальном времени с помощью системы визуализации IncuCyte на предмет антигензависимой цитотоксичности. Термически стабилизированные hK2 CAR-Т-клетки и родительские CAR-Т-клетки 11B6 совместно инкубировали с клетками VCaP (**Фиг. 7А**) и клетками PC3 (**Фиг. 7В**) в течение 88 часов. Соотношение

эффектор/мишень (Е/Т) рассчитывали на основе данных экспрессии CAR (**Фиг. 6**). Клетки-мишени стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, который измеряют с помощью системы визуализации IncuCyte в режиме реального времени. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток\*100 (%).

Подсчет scFv CAR-T-клеток также проводили в анализе уничтожения опухолей в реальном времени с помощью системы визуализации IncuCyte на предмет антигензависимой цитотоксичности. Термически стабилизированные hK2 CAR-T-клетки и родительские клетки 11B6 CAR-T-клетки совместно инкубировали с клетками VCaP (**Фиг. 7C**) или клетками PC3 (**Фиг. 7D**) в течение 88 часов при соотношении эффектор/мишень 1 : 1 или 0,5 : 1, которое рассчитывали на основании данных экспрессии CAR. CAR-T-клетки, трансдуцированные CAR17, CAR18, CAR19 и CAR20, совместно инкубировали с hK2-положительными клетками VCaP и hK2-отрицательными клетками DU145 в течение 96 часов при соотношении эффектор/мишень (Е : Т) 1 : 1 или 0,5 : 1, которое рассчитывали на основании экспрессии CAR на Т-клетках. Процент ингибирования роста опухолевых клеток с течением времени CAR-T-клетками, трансдуцированными CAR17, CAR18, CAR19 и CAR20, показан на **Фиг. 7E** для клеток VCaP и на **Фиг. 7F** для клеток DU145. Клетки-мишени стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, который измеряют с помощью системы визуализации IncuCyte в режиме реального времени. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток\*100 (%). Исследуемые CAR-T-клетки достигли приблизительно 100% ингибирования роста опухоли (TGI), тогда как нетрансдуцированный контроль не демонстрировал какого-либо TGI. В отношении исследуемых CAR-T-клеток в hK2-отрицательных DU145 клетках TGI не наблюдали.

#### **Пример 7: Получение цитокинов с помощью термически стабилизированных 11B6 scFv CAR-T-клеток**

Супернатант собирали после совместного культивирования в течение ночи (приблизительно 20 часов) hK2 CAR-T-клеток с VCaP клетками при соотношении Е/Т, равном 1 : 1, анализировали с использованием набора 13-plex Milliplex Human High Sensitivity T cell (HSTCMAG28SPMX13). hK2 CAR-модифицированные Т-клетки секретировали цитокины во время совместного культивирования с VCaP клетками, экспрессирующими hK2, но секреция была минимальной при использовании нетрансдуцированных Т-клеток (UTD). Результаты высвобождения цитокинов ленти-CAR-T-клетками hK2 показаны на **Фиг. 8**.

Супернатант собирали после совместного культивирования в течение ночи (приблизительно 20 часов) hK2 CAR-T-клеток с VCaP клетками, DU145 клетками (5E4) при соотношении Е/Т, равном 1 : 1. Модифицированные hK2 CAR Т-клетки секретируют IFN- $\gamma$  во время совместного культивирования с клетками VCaP, экспрессирующими hK2,

чего не отмечается с hK2-отрицательными DU145 клетками. В качестве положительного и отрицательного контролей использовались Т-клетки, стимулированные микроносителями CD3/CD28, и только Т-клетки, соответственно. Высвобождение IFN- $\gamma$  hK2 ленти-CAR-Т-клетками показано на **Фиг. 9**. (Использовали протокол примера 3.) Показана средняя концентрация IFN- $\gamma$   $\pm$  SD (пг/мл) для культур при повторных измерениях. В качестве положительного и отрицательного контролей использовались Т-клетки, стимулированные микроносителями CD3/CD28, и только Т-клетки, соответственно. Как показано, разные термически стабилизированные CAR-Т-клетки продуцируют разное количество IFN-гамма при совместном культивировании с клетками hK2(+)VCar, что связано с цитотоксической активностью при клеточно-опосредованном иммунном ответе.

#### **Пример 8: Пролиферация hK2 CAR-Т-клеток**

hK2 CAR-Т-клетки оценивали в анализе пролиферации. Пролиферация Т-клеток является важным *in vitro* параметром иммунной функции *in vivo*. Для дополнительной оценки функции термически стабилизированных 11B6 CAR-Т-клеток и выбора наилучшего конструкта термически стабилизированные 11B6 и исходные scFv CAR-Т-клетки метили CTV для оценки пролиферации Т-клеток.

hK2 CAR-Т-клетки и нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки метили с помощью красителя CellTrace Violet (CTV; 5 мкм) и совместно культивировали с hK2-положительными клетками VCar и hK2-отрицательными клетками DU145. Через пять дней после совместного культивирования клетки собирали и окрашивали с помощью CD3, CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток (NearIR live/dead Dye) и hK2 CAR. Анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением FlowJo. Лимфоциты идентифицировали с помощью живых CD3, и определяли частоты CAR-Т-клеток с помощью разведения красителя CTV и маркера активации CD25. Путем гейтирования на hK2 CAR+ Т-клетках показано, что клетки hK2 (+) Vcar, но не hK2 (-) клетки DU145, стимулировали пролиферацию всех Т-клеток, созданных с конструктами CAR, и повышали активацию маркера CD25 (**Фиг. 10А, 10С**). В качестве положительного и отрицательного контролей использовались Т-клетки, стимулированные микроносителями CD3/CD28, и только Т-клетки, соответственно. Т-клетки без какой-либо стимуляции не пролиферировали, и стимулированные микроносителями CD328 Т-клетки демонстрировали эквивалентную картину пролиферации (**Фиг. 10В, 10D**). Как показано на **Фиг. 10Е**, hK2 CAR-Т-клетки пролиферировали более устойчиво, чем положительный контроль с микроносителями CD3/CD28, после 5 дней совместного культивирования с VCaP клетками. Т-клетки, сконструированные с помощью различных конструктов CAR, имеют другую активность пролиферации и демонстрировали различные количества CAR+ Т-клеток. Количество CAR+ Т-клеток получают на основании среднего значения абсолютного количества клеток  $\pm$  SEM из трех технических повторов.

Используют следующий протокол. Опухолевые клетки VCar и DU145 собирали, дважды промывали PBS и повторно суспендировали в количестве  $10^6$ /мл в PBS,

содержащем 100 мкг/мл митомидина С (ММС), в течение 1,5 часов в инкубаторе при 37 °С, чтобы заблокировать пролиферацию опухолевых клеток. 20 мкл DMSO добавляли во флакон раствора для окрашивания CTV. 5 мкл раствора разводили 5 мл (1:1000) PBS (нагретым до 37 °С) для получения 5 мкМ раствора для окрашивания. 2Е6 Т-клетки подсчитывали, собирали, дважды промывали PBS и повторно суспендировали в 4Е6/мл (0,5 мл). Добавляли равный объем (0,5 мл) раствора для окрашивания CTV. Затем образцы инкубировали в течение 20 часов при 37 °С. Затем в клетки добавляли 4 мл RPMI+20% ФБС для абсорбции любого несвязанного красителя. Клетки инкубировали в течение 5 минут и центрифугировали 5 минут при 400 x g. Клеточный осадок повторно суспендировали в предварительно нагретом RPMI+10% ФБС. Проводили подсчет Т-клеток, а 1Е5 клеток (100 мкл) высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном.

В то же время опухолевые клетки hK2 (+) VCar и hK2(-) DU145, обработанные ММС, собирали и подсчитывали через 1,5 часа, а затем повторно суспендировали в количестве 1Е6/мл. 1Е5 клеток (100 мкл) культивировали с Т-клетками в 96-луночном планшете. В качестве отрицательных и положительных контролей использовали только Т-клетки и Т-клетки с добавленными микроносителями CD3/28 в соотношении микроносителей к клеткам 3 : 1.

Через 5 дней совместного культивирования собирали все клетки из каждой лунки. Клетки дважды центрифугировали и промывали в течение 5 минут при 400 x g, затем окрашивали с помощью hK2CAR, CD3, CD8 и CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток (ближний ИК) в 96-луночном планшете с U-образным дном. После промывки все клетки фиксировали в течение 10 минут буфером для фиксации BD Cytotfix™ (50 мкл буфера FACS+50 мкл буфера для фиксации). Окрашенные образцы анализировали с помощью многоцветной проточной цитометрии после завершения периода инкубации.

Анализ данных выполняли следующим образом. Получали гистограмму CTV. Неразбавленный гейт CTV был установлен таким образом, чтобы охватить крайний правый пик (CTV bright) Т-клеток, культивируемых отдельно, и разбавленный гейт CTV для захвата остальной части популяции. Это применяли ко всем образцам.

#### **Пример 9: Конструирование и экспрессия scFv hK2 CAR с анти-hK2-scFv**

Конструкты hK2 CAR, содержащие scFv, полученные из нового анти-hK2-scFv, конструировали, как показано на **Фиг. 11А**.

Для оценки функции этих новых анти-hK2 scFv CAR Т-клеток и выбора наилучшего конструкта получали hK2 HL и LH CAR-Т-клетки с использованием лентивирусной трансдукции. Первичные Т-клетки человека трансдуцировали hK2 CAR HL и LH, новым лентивирусом с CAR на основе scFv, с множественностью инфекции (MOI), равной 3. Экспрессию CAR определяли с помощью биотинилированного hK2 (1 мкг/мл), а затем конъюгированного со стрептавидином PE через 14 дней после трансдукции.

Используют следующий экспериментальный протокол.

Была проведена лентивирусная упаковка. Т-клетки 14E6 Lenti-X™ 293 высевали на чашке для культивирования Corning™ BioCoat™ Collagen I с круглым дном диаметром 150 мм<sup>2</sup> и инкубировали при 37 °С в течение ночи с использованием DMEM и 10% ФБС.

С помощью Т-клеток Lenti-X™ 293 при идеальной конfluenceности 80-85% подготавливали следующее. Культуральную среду заменяли на 21 мл среды для выращивания 293Т. Липофектамин 2000 разводили при комнатной температуре и уравнивали средой OptiMEM. Разведенный липофектамин 2000 добавляли по каплям к смешанным плазмидам и хорошо перемешивали. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 25 минут. Смесь для трансфекции добавляли к Т-клеткам Lenti-X 293Т по каплям, причем планшет осторожно вращали для перемешивания. Смесь инкубировали в инкубаторе при 37 °С. Лентивирус собирали через 24 часа и 48 часов после трансфекции. Сводный обзор вышеуказанных реагентов приведен в таблице 3.

**Таблица 3**

<b>Реактив</b>	<b>Количество на чашку диаметром 15 см</b>
pMDLg/p	18 мкг
pRSV.Rev	18 мкг
pMD2.G	7 мкг
Плазмида для переноса (CAR)	15 мкг
OptiMEM	1500 мкл

Лентивирус концентрировали следующим образом. Супернатанты, содержащие лентивирус, собирали и центрифугировали при 500 x g в течение 10 мин. При наличии избыточного количества Т-клеток 293Т до фильтрации проводили фильтрацию через целлюлозно-ацетатный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Супернатант переносили в стерильный контейнер, смешивали с 1/3 объема реагента Lenti-X Concentrator (Clontech, кат. № 631232) и перемешивали посредством осторожного переворачивания. Смесь перемешивали при 4 °С в течение ночи. Образец центрифугировали при 1500 x g в течение 45 минут при 4 °С до появления белого плотного осадка, видимого после центрифугирования. Супернатант осторожно удаляли, не тревожа осадок. Остаточные супернатанты удаляли пипеткой после кратковременного центрифугирования при 1500 x g. Осадок осторожно повторно суспендировали в 1/10 исходного объема с использованием фактора роста Т-клеток. Вирус аликвотировали в 200 мкл и немедленно помещали на хранение при температуре -80 °С.

Вирусные титры устанавливали следующим образом. Лог-фаза роста клеток SupT1 проходила в полной среде RPMI. 100 мкл с концентрацией 20 000 клеток SupT1/мл высевали на лунку в плоском 96-луночном планшете. Затем проводили титрование вируса в 96-луночных круглодонных планшетах. Во все лунки планшета добавляли 100 мкл

среды. Аликвоту вируса, хранящуюся в морозильном шкафу при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , размораживали. Аликвоту тщательно перемешивали с помощью пипетки в направлении вверх и вниз и добавляли 50 мкл вируса в первую лунку с последующим тщательным перемешиванием. Последовательное разведение в соотношении 1 : 3 проводили путем переноса 50 мкл вируса в следующую лунку с помощью пипетки. Затем 50 мкл среды добавляли только к первичному Ат, только вторичному Ат и не к нетрансдуцированным контрольным образцам. 50 мкл содержимого каждого соединения переносили с тировальной пластины к 100 мкл клеток SupT1 на аналитическом планшете для проведения анализа с помощью многоканальной пипетки и инкубировали при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. В каждый образец добавляли 100 мкл предварительно нагретой среды и инкубировали еще два дня. Эффективность трансдукции определяли методом проточной цитометрии. Образцы переносили на круглодонный 96-луночный планшет и центрифугировали при 1400 об/мин в течение 3 минут. Супернатант быстро отбрасывали с последующим блоттингом для удаления избытков среды в вытяжном шкафу. Промывку повторяли с помощью 150 мкл буфера FACS. Затем приводили в действие протокол окрашивания, подходящий для конструкторов CAR. Образцы повторно суспендировали в 150 мкл буфера FACS до проведения анализа методом проточной цитометрии.

Расчет титра вируса:  $\text{Титр} = (\% \text{ положительных CAR}/100) \times 2 \times 10^4 \times 20 \times \text{коэффициент разведения}$

Для исключения интеграции множественных копий используют титры с ближайшим значением трансдукции до 20%.

Активацию Т-клеток, трансдукцию и размножение проводили следующим образом. Флакон наивных Т-клеток размораживали на водяной бане и добавляли по каплям в коническую пробирку емкостью 15 мл, содержащую 9 мл предварительно нагретой среды для Т-клеток (TCM CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM+5% человеческой сыворотки+100 МЕ/мл IL-2). Криофлакон промывали 1 мл среды для извлечения максимального количества и центрифугировали при  $300 \times g$  в течение 8 минут при комнатной температуре. Осадок повторно суспендировали в 10 мл свежей среды TCM, подсчитывали и повторно суспендировали до концентрации  $1 \times 10^6$  клеток на миллилитр.  $5 \times 10^5$  клеток на лунку высевали в 24-луночный планшет.  $1,5 \times 10^6$  микроносители CD3/CD28 добавляли на лунку в объеме 500 мкл таким образом, что общий объем составлял 1 мл на лунку. Через сутки после активации вирус размораживали при комнатной температуре. Вирус добавляли при множественности инфекций (MOI), равной 3, осторожно перемешивали и возвращали планшет в инкубатор. (Лентивирусный функциональный титр ранее определяли с помощью анализа титра SupT1). Одна лунка была зарезервирована для нетрансдуцированного (UTD) соединения, в которую вирус не добавляли.

Через сутки после трансдукции в каждую лунку добавляли 1 мл TCM. После этого добавляли пенициллин-стрептомицин (2-й день). На 3-й-5-й день добавляли 4 мл TCM в каждые 2 мл клеток и переносили в обработанную колбу для культур тканей T25. Колбы

помещали горизонтально в инкубатор (3-й день). Равный объем ТСМ добавляли для культивирования Т-клеток (4-й день). В дни с 5 по 14 клетки проверяли через день, при этом регистрировали их жизнеспособность, размер и общее количество. Плотность клеток доводили до одного миллиона клеток на мл. Идеальное время сбора зависит от донора и определяется размером клеток и кратностью размножения. Клетки, как правило, замораживали, когда размер клеток составлял менее 8 мкм на основе проточного счетчика МОХІ с 100-200-кратным размножением.

Эффективность лентивирусной трансдукции проверяли в день сбора клеток следующим образом. Культуры хорошо перемешивали. 100 мкл Т-клеток собирали в соответствующую лунку в 96-луночной планшете со 100 мкл буфера FACS, смешивали и центрифугировали при 1300 об/мин в течение 3 минут при комнатной температуре. Клетки повторно суспендировали в 200 мкл буферного раствора FACS и повторно центрифугировали при 4 °С.

Клетки повторно суспендировали в 100 мкл биотина, меченного hK2 (1 мкг/мл, разбавленный буфером для FACS) и инкубировали на льду в течение 30 минут. Добавляли 100 мкл буфера FACS и промывали центрифугированием при 4 °С. Промывание центрифугированием повторяли после добавления еще 200 мкл буфера FACS. Окрашивание с использованием 100 мкл основного раствора, содержащего вторичное антитело SA-PE (1 : 25 0), красителя для дифференциации живых/мертвых клеток ( 1 : 500),  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD4 и  $\alpha$ CD8 антител проводили на льду в течение 30 минут. Добавляли 100 мкл буфера FACS и промывали центрифугированием при 4 °С, отбрасывали и повторно суспендировали в 200 мкл буфера FACS перед промывкой центрифугированием при 4 °С. Образцы повторно суспендировали в 100 мкл буфера FACS перед анализом методом проточной цитометрии.

Сбор клеток и замораживание проводили следующим образом. Определяли конечное количество клеток. Культуру собирали и центрифугировали при 300 x g в течение 10 минут при комнатной температуре. Культуру повторно суспендировали в меньшем объеме среды для внесения в коническую пробирку объемом 50 мл. Пробирки помещали в магниты при 4 °С в течение 10 минут до «отделения гранул». Клетки осторожно переносили из пробирки, чтобы свести к минимуму нарушения взаимосвязи микроноситель/магнит, а точный объем записывали. Подсчет повторяли. Центрифугирование проводили при 300 x g в течение 10 минут, при этом супернатант отбрасывали. Клетки замораживали в среде для криоконсервации клеток CS-10 CryoStor® в охлаждающем контейнере. Контейнеры немедленно переносили в условия температуры -80 °С на 24-48 часов перед отправкой на постоянное хранение в жидком азоте. Результаты показаны на **Фиг. 11В** и подтверждают экспрессию hK2 CAR на поверхности трансдуцированных Т-клеток. Представлены краткие сведения о процентном содержании CAR+ Т-клеток hK2 (% положительных), обнаруженном с помощью проанализированных нового KL2B413 HL и LH и регуманизированных 11B6 KL2B359 HL и LH CAR. Как показано, различные клоны имеют разные уровни экспрессии CAR, которые находятся в

диапазоне от 45,1% до 59,9%. Все CAR-T-клетки были нормализованы к равным CAR+ T-клеткам для последующих функциональных анализов.

#### **Пример 10: Получение антител к hK2 и scFvs**

##### **Получение антител посредством гуманизации исходного антитела m11B6.**

m11B6 (исходное мышинное антитело к hK2) описано в Väisänen et al (Clinical Chemistry 50:9,1607-1617 (2004)). Гуманизированный 11B6 (упоминаемый в настоящем документе как hu11B6) был получен и описан в патенте США № 9,345,782 и патенте США № 10,100,125.

Конструирование hu11B6 было инициировано для создания дополнительных антител к hK2 с улучшенными свойствами, такими как улучшенная термостабильность. Позиции остатков были идентифицированы в каркасах hu11B6, которые потенциально могут быть изменены для улучшения термостабильности hu11B6 с помощью моделирования. Идентифицированные позиции представляли собой остатки P41, I49, M70 и A88 в VH и S80, L82, A88 и Y91 в VL (нумерация остатков в соответствии с аминокислотными последовательностями hu11B6\_VH SEQ ID NO: 5 и hu11B6\_VL SEQ ID NO: 2).

В ориентации VH-линкер-VL были сформированы двоичные комбинаторные библиотеки scFv, в которых одна из переменных областей представляла собой комбинаторную библиотеку, а вторая - родительскую hu11B6 VH или VL. Линкерную последовательность **GGSEGKSSGSGSESKGGS (SEQ ID NO: 7)** использовали для конъюгации областей VH/VL. Сконструированные scFv экспрессировали в E coli, а полученные scFv в супернатантах тестировали на предмет связывания с hK2 человека методом твердофазного ИФА и сравнивали со связыванием hu11B6. Любые новые варианты, демонстрирующие связывание с hu11B6, консолидировали и дополнительно исследовали на предмет связывания с hK2 человека после инкубации супернатантов при 55 °C, 60 °C и 65 °C в течение 10 минут. Молекулы, сохраняющие сопоставимое связывание с hu11B6 после инкубации при 55 °C, 60 °C и 65 °C и улучшенную термостабильность помещали в матрицу в обеих ориентациях (VH-линкер-VL; VL-линкер-VH) и преобразовывали в scFv млекопитающих для дальнейшего определения характеристик. Помещенные в матрицу scFv также включали в конструкции CAR и дополнительно характеризовали, как дополнительно описано в примере 11.

Кроме того, другая гуманизация исходной мышинной 11B6 выполнялась в соответствии с подходом, описанным Singh et al (MAbs. 2015;7(4):778-91) с обширными вариациями зародышевой линии и тщательным скринингом вариантов для повышения термостабильности. На основании сохранения последовательностей для адаптации каркасной области выбрали зародышевую линию тяжелой цепи IGHV4-30 человека и зародышевую линию легкой цепи IGKV3D-11. Дифференцированная библиотека scFv конструировалась с остатками, содержащими выбранный набор соматических сайтов гипермутации и вариации мышинной/человеческой зародышевой линии. Варианты клонировали и экспрессировали в E. coli, как описано выше. Супернатанты подвергали

скринингу при различных температурах в единичных измерениях методом твердофазной ИФА для повышения термостабильности. В качестве родительского контроля использовали химерный Fab мышиног/человеческого 11B6. Клон KL2B359, который сохранил связывающую активность, аналогичную мышиному 11B6 и значение  $T_m$ , равное 67 °С, преобразовали в scFv-Fc и CAR-T для дополнительного профилирования. Аффинность ( $K_D$ ) KL2B359 к hK2, измеренная методом SPR, составляла ~ 0,7-1 нМ. HCF3-LCD6, HCG5-LCB7, KL2B357, KL2B358 и KL2B360 также получали в результате этой кампании и дополнительно характеризовали на основании функциональности.

**Получение антител с использованием трансгенных мышей (Ablexis®) и трансгенных крыс (OmniRat®), экспрессирующих локусы иммуноглобулина человека.**

Крысы OmniRat® содержат химерный человеческий/крысиный локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента  $V_{Hs}$ , все человеческие сегменты D и  $J_H$  в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом  $C_H$ ), а также полностью человеческие локусы IgL (12  $V_{Ks}$ , связанных с  $J_K$ - $C_K$ , и 16  $V_{Ls}$ , связанных с  $J_L$ - $C_L$ ). (см. например, Osborn, et al. (2013) J Immunol 190(4): 1481-1490). Соответственно, крысы демонстрируют сниженную экспрессию крысиного иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации для создания высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных антител IgG с полностью человеческими переменными областями. Получение и применение OmniRat® и геномные модификации в таких крысах описаны в WO14/093908.

Мыши линии Ablexis® производят антитела, имеющие переменные домены человека, связанные с доменами CH1 и CL человека, химерной человеческой/мышинной шарнирной областью и мышинными Fc-областями. Мыши линий Ablexis Карра и Lambda различаются тяжелыми цепями, которые являются человеческими или мышинными, как отмечено ниже. Антитела, продуцируемые мышами линии Карра, не имеют последовательности, полученной из мышинных экзонов  $V_H$ ,  $D_H$  и  $J_H$  и мышинных экзонов  $V_K$ ,  $J_K$  и  $C_K$ . Эндогенный мышинный IgL активен у мышей линии Карра. Цепи Igk человека содержат приблизительно 90-95% наивных репертуаров, а цепи Igλ мышей содержат приблизительно 5-10% наивных репертуаров в этой линии. Антитела, продуцируемые мышами линии Lambda, не имеют последовательности, полученной из мышинных экзонов  $V_H$ ,  $D_H$  и  $J_H$  и мышинных экзонов  $V_L$ ,  $J_L$  и  $C_L$ . Эндогенный мышинный Igk активен у мышей линии Lambda. Цепи Igλ человека содержат приблизительно 40% наивных репертуаров, а цепи Igk мыши, содержат приблизительно 60% наивных репертуаров. Получение и применение мышей линии Ablexis® и геномные модификации в таких мышах описаны в документе WO11/123708.

Мышей линии Ablexis и крыс линии OmniRats иммунизировали растворимым полноразмерным белком KLK2 (человеческий калликреин-2 6-His белок).

**человеческий калликреин-2 6-His белок**

VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHC GGVLVHPQWVLTAANCLKK  
 NSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDSSHDLMLLRLSE  
 PAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLRPRSLQCVSLHYSEKVFTEFMLC  
 AGLWTGGKDTCCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKD  
 TIAANPHNNNNH (SEQ ID NO: 319)

Лимфоциты от мышей линии Abblexis и крыс линии OniRats экстрагировали из лимфатических узлов и проводили слияния по когортам. Клетки объединяли и сортировали на основании экспрессии CD138. Скрининг гибридомы проводили в формате миниатюрного MSD с высокой пропускной способностью с использованием растворимого антигена к hK2. Было установлено, что приблизительно более 300 образцов способны связывать hK2. Связывание более 300 образцов супернатанта антител к hKLK2 с белком KLK2 человека измеряли методом оценки кинетики одиночного цикла с помощью чувствительного элемента Biacore 8K SPR. Кроме того, образцы супернатанта исследовали на связывание с белком KLK3 человека. Параллельно также тестировали супернатанты на связывание с клеточными линиями, экспрессирующими KLK2, линией VCar и отрицательной клеточной линией DU145 методом проточной цитометрии. Выбранные вещества, связывающие клетки, стимулировали для конверсии scFv как в ориентации VH-VL, так и в ориентации VL/VH, а также в тестах оценки термостабильности, как описано выше. KL2B413, KL2B30, KL2B53 и KL2B242 получали в результате иммунизации мышей линии Abblexis. KL2B467 и KL2B494 получали в результате иммунизации крыс линии OmniRat.

Антитела, полученные посредством различных кампаний иммунизации и гуманизации, описанных выше, экспрессировали в формате Fab, формате mAb, формате scFv в ориентации VH-линкер-VL или формате scFv в ориентации VL-линкер-VH и дополнительно анализировали, как описано ниже. Линкерную последовательность SEQ ID NO: 7, описанную выше, использовали для конъюгирования областей VH/VL.

#### **Пример 11. Определение структурных характеристик антител к KLK2**

В настоящем документе представлены переменные домены антитела и фрагменты антител scFv, которые демонстрировали наивысшую эффективность при внутриклеточном анализе. Переменные домены экспрессировали в формате Fab, формате scFv в ориентации VH-линкер-VL или формате scFv в ориентации VL-линкер-VH.

Переменные домены VH, VL и CDR

В **таблице 4** приведены аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к hK2. В **таблице 5** показаны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к hK2 по Кэботу. В **таблице 6** показаны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбранных антител к hK2 по Кэботу. В **таблице 7** показаны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к hK2 по AbM. В **таблице 8** показаны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антител к hK2 по AbM. В **таблице 9** обобщена последовательность переменного домена и SEQ ID NO выбранных антител к hK2. В **таблице 10** показан белок и ДНК SEQ ID NO для областей VH и VL.

Таблица 4. Аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к hK2.

Название mAb	Название VH	Аминокислотная последовательность VH	VH SEQ ID NO:	Название VL	Аминокислотная последовательность VL	VL SEQ ID NO:
m11B6	m11B6_VH	DVQLQESGPGLVK PSQSLSLTCTVTGN SITSDYAWNWI RQFPGNRLEW MGYISYSGST TYSPSLKSR FSITRDTSKN QFFLQLNSV TPEDTATYF CATGYYYGSG FWGQGTLV TVSS	317	m11B6_VL	DIVLTQSPASLAVS LGQRATISCRASES VEYFGTSLMHWYR QKPGQPPKLLIYAA SNVESGVPARFSGS GSGTDFSLNIQPVE EDDFSMYFCQQR KVPYTFGGGKLEIK	318
h11B6	hu11B6_VH	QVQLQESGPGLVK PSDTLSLTCAVSGN SITSDYAWNWI RQPPGKGLEW IGYISYSGST TYNPSLKSRV TMSRDTSKNQFSL KLSSVTAVD TAVYYCATG YYYGSGF WGQGTLV TVSS	5	hu11B6_VL	DIVLTQSPDSLAVS LGERATINCKASES VEYFGTSLMHWYQ QKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQQR KVPYTFGQGTKLEIK	2
HCF3-LCD6	HCF3_VH	QVQLQESGPGLVK PSDTLSLTCAVSGN SITSDYAWNWI RQFPGKGLEW IGYISYSGST TYNPSLKSRV TISRDTSKNQFSLK LSSVTPVD TAVYYCATG YYYGSGFW GQGTLV TVSS	6	LCD6_VL	DIVLTQSPDSLAVS LGERATINCKASES VEYFGTSLMHWYQ QKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGS GSGTDFTLTIQSVQ AEDVSVYFCQQR KVPYTFGQGTKLEIK	1

HCG5- LCB7	HCG5_V H	QVQLQESGPGGLVK PSDTLSLTCAVSGN SITSDYAWNWI RQ FPGKGLEWMGYIS YSGSTTYNPSL KSR VTISRDTSKNQF SL KLSSVTPVDTAV Y YCATGYYYGSGF WGQGLVTVSS	4	LCB7_VL	DIVLTQSPDSLAVS LGERATINCKASES VEYFGTSLMHWYQ QKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSVQ AEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEI K	3
KL2B35 7	KL2B357 _VH	QVQLQESGPGGLVK PSQTLTCTVSGN SITSDYAWNWI RQ FPGKLEWIGYISY SGSTTYNPSL KSRV TISRDTSKNQF SLK LSSVTAADTAVYY CATGYYYGSGFW GQGLVTVSS	140	KL2B357 _VL	DIVLTQSPDSLAVS LGERATINCRASES VEYFGTSLMHWYQ QKPGQPPKLLIYAA SNVESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQA EDVAVYFCQQTRK VPYTFGGGTKVEIK	147
KL2B35 8	KL2B358 _VH	QVQLQESGPGGLVK PSQTLTCTVSGN SITSDYAWNWI RQ PPGKLEWIGYISY SGSTTYNPSL KSRV TISRDTSKNQF SLK LSSVTAADTAVYY CATGYYYGSGFW GQGLVTVSS	141	KL2B358 _VL	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSCRASESV EYFGTSLMHWYQQ KPGQPPRLLIYAAS NVESGIPARFSGSG SGTDFTLTISSVEPE DFAVYFCQQTRKV PYTFGGGTKVEIK	75

KL2B35 9	KL2B359 _VH	QVQLQESGPGGLVK PSQTLSLTCTVSGN SITSDYAWNWRQ FPGKRLEWIGYISY SGSTTYNPSLKSRV TISRDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYY CATGYYYGSGFW GQGTLVTVSS	77	KL2B359 _VL	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSCRASESV EYFGTSLMHWYQQ KPGQPPRLLIYAAS NVESGIPARFSGSG SGTDFTLTISSVEPE DFAVYFCQQTRKV PYTFGGGKVEIK	75
KL2B36 0	KL2B360 _VH	QVQLQESGPGGLVK PSQTLSLTCTVSGN SITSDYAWNWRQ FPGKGLEWIGYISY SGSTTYNPSLKSRV TISRDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYY CATGYYYGSGFW GQGTLVTVSS	140	KL2B360 _VL	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSCRASESV EYFGTSLMHWYQQ KPGQPPRLLIYAAS NVESGIPARFSGSG SGTDFTLTISSVEPE DFAVYFCQQTRKV PYTFGGGKVEIK	75
KL2B41 3	KL2B413 _VH	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TFSSYWMTWVRQ APGKGLEWVANIK QDGSERYVDSVK GRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTA VYYCARDQNYDIL TGHYGMVWVGGQ TTVTVSS	76	KL2B413 _VL	EIVLTQSPSFLSASV GDRVTITCRASQGI SSYLSWYQQKPGK APKLLIYATSTLQS GVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFAT YYCQQLNSYPRTF GQGKVEIK	74

KL2B30	KL2B30_ VH	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGG SISSYYWSWIRQPP GKGLEWIGYIYYS GSTNYNPSLKSRVT ISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYC AGTTIFGVVTPNFY YGMDVWGQGTTV TVSS	142	KL2B30_ VL	DIQMTQSPSFLSAS VGDRVITICRASQG ISSYLAWYQQKPG KAPKFLIYAASLQ SGVPSRFSGSGSGT EFTLTISSLQPEDFA TYYCQQLNSYPLTF GGGTKVEIK	148
KL2B53	KL2B53_ VH	EVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCVASGF TFSSYDIHWVRQA PGKGLEWVAIISYD GSKKDYTDSVKGR FTISRDNSKNTLYL QMDSL RVED SAVYSCARESGWS HYYYYGMDVWGQ GTMVTVSS	143	KL2B53_ VL	DIVMTQSPSSLSAS VGDRVITICRASQD ISNYLAWYQQKPG KVPKFLIYAASLH SGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDVA TYYCQKYNSAPYT FGQGTRLEIK	149
KL2B24 2	KL2B242 _VH	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGG SISSYYWSWLRQP AGSGLEWIGRLYV SGFTNYNPSLKSRV TSLDPSRNQLSLK LSSVTAADTAVYY CAGDSGNYWGW DPWGQGTLVTVSS	144	KL2B242 _VL	SYELTQPPSVSVSP GETASITCSGDQLG ENYACWYQQKPG QSPVLVIYQDSKRP SGIPERFSGSNSGNT ATLTISGTQALDEA DYCYCQAWDNSIVV FGGGTKLTVL	150

KL2B46 7	KL2B467 _VH	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGF TFSYYGMHWVRQ APGKGLEWVAFIS YDGSNKYYADSVK GRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCAHLPYSGSY WAFDYWGQGTQV TVSS	145	KL2B467 _VL	QSVLTQPPSVSVAP GQTASITCGGDNIG SKSVHWYQQKPGQ APVLVVYDNSDRP SGIPERFSGSNSGTT ATLTISRVEAGDEA DYVCQVWDSSTDH PVVFGGGTKVTV	151
KL2B49 4	KL2B494 _VH	QVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TFSHYAMSWVRQ APGKGLEWVSTIG GSGGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCAKPHIVMVT ALLYDGMDVWGQ GTMVTVSS	146	KL2B494 _VL	SSELTQPPSVSVAP GQTARITCGGNNIG SKSVHWYQQKPGQ APVLVVYDDSDRP SGIPERFSGSNSGNT ATLTISRVEAGDEA DYVCQVWDSSTDH VVFGGGTKLTVL	152

Таблица 5. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 выбранных антител к KLK2 по Кэботу.

Название mAb	HCDR1 по Кэботу		HCDR2 по Кэботу		HCDR3 по Кэботу	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
m11B6	SDYAWN	63	YISYSGSTTYSP SLKS	64	GYYYGSGF	66
hu11B6	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNP SLKS	65	GYYYGSGF	66
HCF3-LCD6	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNP SLKS	65	GYYYGSGF	66
HCG5-LCB7	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNP SLKS	65	GYYYGSGF	66

KL2B357	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNP SLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B358	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNP SLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B359	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNP SLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B360	SDYAWN	63	YISYSGSTTYNP SLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B413	SYWMT	314	NIKQDGSERYY VDSVKG	315	DQNYDILTGHYG MDV	311
KL2B30	SYYWS	102	YIYYSGSTNYN PSLKS	103	TTIFGVVTPNFYYG MDV	104
KL2B53	SYDIH	107	IISYDGSKKDYT DSVKG	108	ESGWSHYYYYGM DV	109
KL2B242	SYYWS	102	RLYVSGFTNYN PSLKS	112	DSGNYWGWFDP	113
KL2B467	YYGMH	115	FISYDGSNKYY ADSVKG	116	LPYSGSYWAFDY	117
KL2B494	HYAMS	120	TIGGSGGSTYY ADSVKG	121	PHIVMVTALLYDG MDV	122

Таблица 6. Аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбранных антител к hK2 по Кэботу.

Название mAb	LCDR1 по Кэботу		LCDR2 по Кэботу		LCDR3 по Кэботу	
	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO
m11B6	RASESVEYFGT SLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
hu11B6	KASESVEYFGT SLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCF3- LCD6	KASESVEYFGT SLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCG5- LCB7	KASESVEYFGT SLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71

KL2B357	RASESVEYFGT SLMH	67	AASNVES	126	QQTRKVPYT	71
KL2B358	RASESVEYFGT SLMH	67	AASNVES	126	QQTRKVPYT	71
KL2B359	RASESVEYFGT SLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B360	RASESVEYFGT SLMH	67	AASNVES	126	QQTRKVPYT	71
KL2B413	RASQGISSYLS	312	ATSTLQS	313	QQLNSYPRT	91
KL2B30	RASQGISSYLA	128	AASTLQS	129	QQLNSYPLT	130
KL2B53	RASQDISNYLA	125	AASTLHS	131	QKYNSAPYT	132
KL2B242	SGDQLGENYA C	133	QDSKRPS	134	QAWDNSIVV	135
KL2B467	GGDNIGSKSVH	136	DNSDRPS	137	QVWDSSSDHP VV	138
KL2B494	GGNNIGSKSVH	97	DDSDRPS	127	QVWDSSSDHV V	139

Таблица 7. Аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 мАм выбранных антител к hK2 по АbM.

Название mAb	HCDR1 АbM		HCDR2 АbM		HCDR3 АbM	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO:
m11B6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
hu11B6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
HCF3- LCD6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
HCG5- LCB7	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B357	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B358	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B359	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B360	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B413	GFTFSSYWMT	309	NIKQDGSERY	310	DQNYDILTGHY	311

					GMDV	
KL2B30	GGSISSYYWS	105	YIYYSGSTN	106	TTIFGVVTPNFY YGMDV	104
KL2B53	GFTFSSYDIH	110	IISYDGSKKD	111	ESGWSHYYYYG MDV	109
KL2B242	GGSISSYYWS	105	RLYVSGFTN	114	DSGNYWGWFD P	113
KL2B467	GFTFSYY	118	FISYDGSNKY	119	LPYSGSYWAFD Y	117
KL2B494	GFTFSHYAMS	123	TIGGSGGSTYY	124	PHIVMVTALLY DGMDV	122

Таблица 8. Аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 мАм выбранных антител к hK2 по AbM.

Название mAb	LCDR1 AbM		LCDR2 AbM		LCDR3 AbM	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO:
m11B6	RASESVEYFGT SLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
hu11B6	KASESVEYFGT SLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCF3-LCD6	KASESVEYFGT SLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCG5-LCB7	KASESVEYFGT SLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
KL2B357	RASESVEYFGT SLMH	67	AASNVES	126	QQTRKVPYT	71
KL2B358	RASESVEYFGT SLMH	67	AASNVES	126	QQTRKVPYT	71
KL2B359	RASESVEYFGT SLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B360	RASESVEYFGT SLMH	67	AASNVES	126	QQTRKVPYT	71
KL2B413	RASQGISSYLS	312	ATSTLQS	313	QQLNSYPRT	91
KL2B30	RASQGISSYLA	128	AASTLQS	129	QQLNSYPLT	130

KL2B53	RASQDISNYLA	125	AASTLHS	131	QKYNSAPYT	132
KL2B242	SGDQLGENYA C	133	QDSKRPS	134	QAWDNSIVV	135
KL2B467	GGDNIGSKSVH	136	DNSDRPS	137	QVWDSSSDHPV V	138
KL2B494	GGNNIGSKSVH	97	DDSDRPS	127	QVWDSSSDHV V	139

Таблица 9. Аминокислотные последовательности и сводный обзор SEQ ID NO переменных доменов выбранных антител к hK2

Антитело	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
m11B6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYSPSLKS	64
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (m11B6_VH)	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDY AWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTTYSPSLK SRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYFCATG YYYGSGFWGQGLTVTVSS	317
VL (m11B6_VL)	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVEYFGT SLMHWYRQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARF SGSGSGTDFSLNIQPVEEDDFSMYFCQQTRKVP YTFGGGKLEIK	318	
h11B6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71

	VH (hu11B6_VH)	QVQLQESGPGGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDY AWNWRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCAT GYYYGSGFWGQGTLVTVSS	5
	VL (hu11B6_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVP YTFGQGTKLEIK	2
HCF3-LCD6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (HCF3_VH)	QVQLQESGPGGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDY AWNWRQFPKGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATG YYYGSGFWGQGTLVTVSS	6
VL (LCD6_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRF SGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVP YTFGQGTKLEIK	1	
HCG5-LCB7	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (HCG5_VH)	QVQLQESGPGGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDY AWNWRQFPKGKLEWMGYISYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCAT GYYYGSGFWGQGTLVTVSS	4

	VL (LCB7_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT SLMHYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRF SGSGSGTDFLTITSSVQAEDVAVYYCQQTRKVP YTFGQGTKLEIK	3
KL2B357	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	100 или 65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	126
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (KL2B357_V H)	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDY AWNWIRQFPKGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATG YYYGSGFWGQGLTVTVSS	140
VL (KL2B_357_V L)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGT SLMHYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRF SGSGSGTDFLTITSSLQAEDVAVYFCQQTRKVP YTFGGGTKVEIK	147	
KL2B358	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	126
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (KL2B358_V H)	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDY AWNWIRQPPGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATG YYYGSGFWGQGLTVTVSS	141
VL (KL2B_358_V L)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGT SLMHYQQKPGQPPRLIYAASNVESGIPARFS GSGSGTDFLTITSSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYT FGGGTKVEIK	75	
KL2B359	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65

	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (KL2B359_V H)	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDY AWNWRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATG YYYGSGFWGQGTLVTVSS	77
	VL (KL2B_359_V L)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFS GSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYT FGGGTKVEIK	75
KL2B360	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH (KL2B360_V H)	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDY AWNWRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATG YYYGSGFWGQGTLVTVSS	140
VL (KL2B_360_V L)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGT SLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFS GSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYT FGGGTKVEIK	75	
KL2B413	HCDR1	SYWMT	314
	HCDR2	NIKQDGSERYVDSVKG	315
	HCDR3	DQNYDILTGHYGM DV	311
	LICDR1	RASQGISSYLS	312
	LCDR2	ATSTLQS	313
	LCDR3	QQLNSYPRT	91

	VH (KL2B413_VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYVDSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDQNYDILTGHYGM DVWGQGTTVTVSS	76
	VL (KL2B_413_VL)	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLS WYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQG TKVEIK	74
KL2B30	HCDR1	SYYS	102
	HCDR2	YIYSGSTNYNPSLKS	103
	HCDR3	TIIFGVVTPNFYYGMDV	104
	LICDR1	RASQGISSYLA	128
	LCDR2	AASTLQS	129
	LCDR3	QQLNSYPLT	130
	VH (KL2B30_VH)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYY WSWIRQPPGKGLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSR VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTT IFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS	142
VL (KL2B30_VL)	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLA WYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGG TKVEIK	148	
KL2B53	HCDR1	SYDIH	107
	HCDR2	IISYDGSKKDYTDSVKG	108
	HCDR3	ESGWSHYYYYGMDV	109
	LICDR1	RASQDISNYLA	125
	LCDR2	AASTLHS	131
	LCDR3	QKYNAPYT	132
	VH (KL2B53_VH)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYD IHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRVED SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGMVT VSS	143

	VL (KL2B53_VL)	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLA WYQQKPGKVPKFLIYAASLHSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQ GTRLEIK	149
KL2B242	HCDR1	SYYS	102
	HCDR2	RLYVSGFTNYPNLSLKS	112
	HCDR3	DSGNYWGWFDL	113
	LICDR1	SGDQLGENYAC	133
	LCDR2	QDSKRPS	134
	LCDR3	QAWDNSIVV	135
	VH (KL2B242_VH)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYY WSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYPNLSLKS RVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAG DSGNYWGWFDLWGQGLTVTVSS	144
VL (KL2B242_VL)	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYAC WYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFG GGTKLTVL	150	
KL2B467	HCDR1	YYGMH	115
	HCDR2	FISYDGSNKYYADSVKG	116
	HCDR3	LPYSGSYWAFDY	117
	LICDR1	GGDNIGSKSVH	136
	LCDR2	DNSDRPS	137
	LCDR3	QVWDSSSDHPVV	138
	VH (KL2B467_VH)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYY GMHWVRQAPGKLEWVAFISYDGSNKYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS	145
VL (KL2B467_VL)	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGDNIGSKSVH WYQQKPGQAPVLLVYDNDSDRPSGIPERFSGSNS GTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPV VFGGGTKVTV	151	
KL2B494	HCDR1	HYAMS	120
	HCDR2	TIGSGGSTYYADSVKG	121

	HCDR3	PHIVMVTALLYDGMDV	122
	LICDR1	GGNNIGSKSVH	97
	LCDR2	DDSDRPS	127
	LCDR3	QVWDSSSDHVV	139
	VH (KL2B494_V H)	QVQLVESGGGLVQP GSLRLSCAASGFTFSHY AMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYY CAKPHIVMVTALLYDGMDV WGQGTMTVTVSS	146
	VL (KL2B494_VL )	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGNNIGSKSVH WYQQKPGQAPV L VVYDDSDRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVV FGGGTKLTVL	152

Таблица 10. SEQ ID NO: Последовательности ДНК доменов VH и VL выбранных антител hK2.

Антитело	Белок VH SEQ ID NO:	Белок VL, SEQ ID NO:	κДНК VH с SEQ ID NO:	κДНК VL с SEQ ID NO:
m11B6	317	318	320	326
hu11B6	5	2	321	327
HCF3-LCD6	6	1	322	328
HCG5-LCB7	4	3	323	329
KL2B357	140	147	153	161
KL2B358	141	75	154	162
KL2B359	77	75	324	330
KL2B360	140	75	155	163
KL2B413	76	74	325	331
KL2B30	142	148	156	164
KL2B53	143	149	157	165
KL2B242	144	150	158	166
KL2B467	145	151	159	167
KL2B494	146	152	160	168

Консенсусные последовательности VH и VL

На **Фиг. 17А** показано выравнивание последовательностей доменов VH m11B6, hu11B6, KL2B357, KL2B358, KL2B359, KL2B360, HCF3 и HCG5. На **ФИГ. 2** показано выравнивание последовательностей доменов VL m11B6, hu11B6, KL2B357, KL2B358, KL2B359, KL2B360, LD6 и LCB7. Консенсусную аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 344 и SEQ ID NO: 345 определяли для доменов VH и VL, соответственно. Остатки HCDR и LCDR выделены подчеркиванием.

**SEQ ID NO: 344**

QVQLQESGPGLVKPSX<sub>1</sub>TL<sub>2</sub>SLTCX<sub>2</sub>VSGNSITSDYAWNWIRQX<sub>3</sub>PGKGLEWX<sub>4</sub>GYI  
SYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>DTAVYYCATGYYYGSGFWGQ  
GTLVTVSS

Где

X1 представляет собой D или Q;

X2 представляет собой A или T;

X3 представляет собой P или F;

X4 представляет собой I или M;

X5 представляет собой A или P; или

X6 представляет собой V или A.

**SEQ ID NO: 345**

X<sub>1</sub>IVLTQSPX<sub>2×3</sub>LX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>SX<sub>6</sub>GERATX<sub>6</sub>X<sub>8</sub>CX<sub>9</sub>ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPX<sub>1</sub>  
0LLIYAASNX<sub>11</sub>ESGX<sub>12</sub>PX<sub>13</sub>RFSGSGSGTDFTLTIX<sub>14</sub>SLQX<sub>15</sub>EDX<sub>16</sub>AVYX<sub>17</sub>CQOTRKVPYT  
FG X<sub>18</sub>GTKX19EIK

X1 представляет собой D или E;

X2 представляет собой D или A;

X3 представляет собой S или T;

X4 представляет собой A или S;

X5 представляет собой V или L;

X6 представляет собой L или P;

X7 представляет собой I или L;

X8 представляет собой N или S;

X9 представляет собой R или K;

X10 представляет собой K или R;

X11 представляет собой V или R;

X12 представляет собой V или I;

X13 представляет собой A или D;

X14 представляет собой Q или S;

X15 представляет собой P или A;

X16 представляет собой F или V;

X17 представляет собой Y или F;

X18 представляет собой Q или G; и

X19 представляет собой L или V.

Fab-Fc и scFv

Специфические области VH/VL hK2 конструировали как VH-CH1-линкер-CH2-CH3 и VL-CL и экспрессировали как IgG2 или IgG4 или конструировали как scFv в ориентации VH-линкер-VL или VL-линкер-VH. Линкер, используемый в scFv,

представлял собой линкер **SEQ ID NO: 7**, описанный выше. ScFv использовали для получения биспецифических антител, как описано в примере 7, или с получением CAR, как описано в примере 11.

В **таблице 11** приведены аминокислотные последовательности выбранных антител к hK2 в формате МАТ. В **таблице 12** приведены аминокислотные последовательности LC выбранных антител к hK2 в формате МАТ. В **таблице 13** приведен сводный обзор HC и LC ДНК SEQ ID NO выбранных антител к hK2 в формате МАТ. В **таблице 14** показаны аминокислотные последовательности выбранных scFv в ориентациях VH-линкер-VL или VL-линкер-VH.

*Таблица 11. Аминокислотная последовательность HC (VH-CH1-линкер-CH2-CH3) выбранных антител к hK2 в формате МАТ.*

<b>KLK2 ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ</b>	<b>БЕЛОК HC, SEQ ID NO:</b>	<b>АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ HC</b>
m11B6_HC	332	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWI RQ FPGNRLEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFL QLNSVTPEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV AHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIF PPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVE VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKC KVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKK QVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLD SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK

h11B6_HC	334	<p>QVQLQESGPGPLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIR  QPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTMSRDTSKNQF  SLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS  ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT  YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA  LHNHYTQKSLSLSPGK</p>
KL2B30_HC	185	<p>QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQP  PGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSL  KLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQG  TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP  EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE  AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV  QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSSVM  HEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

K2B53_HC	187	<p>EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQ  APGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTL  YLQMDSLRVEDSAVYSCARESGWVSHYYYYGMDVWGQG  TMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF  PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE  AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV  QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY  TLPSSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM  HEALHNHYTQKSLSLGLGK</p>
KL2B242_HC	189	<p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQP  AGSGLEWIGRLYVSGFTNYPNPSLKSRVTLSLDPNRNQLSL  KLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGLTVTV  SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT  VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG  TKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP  SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWY  VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE  MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH  YTQKSLSLGLGK</p>

KL2B467_HC	191	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVR  QAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKN  TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQG  TQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF  PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP  APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHED  PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV  LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ  VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC  SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
KL2B494_HC	193	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVR  QAPGKGLEWVSTIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN  TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDV  WGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVS  VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

Таблица 12. Аминокислотные последовательности LC (VL-CL) выбранных антител к hK2 в формате МАm (Fab-Fc).

<b>KLK2 ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ</b>	<b>БЕЛОК LC SEQ ID NO:</b>	<b>АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ LC</b>
m11B6_LC	333	<p>DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHWY  RQKPGQPPKLLIYAASNVEGVPARFSGSGSGTDFSLNIQP  VEEDDFSMYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIKRADAAPT VSI  FPPSSEQLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDGSERQN  GVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEA  THKTSTSPIVKSFNRENC</p>

h11B6_LC	335	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWY QKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
KL2B30_LC	186	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKP GKAPKFLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPED FATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
KL2B53_LC	188	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKP GKVPKFLIYAASSTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
KL2B242_LC	190	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPG QSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALD EADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
KL2B467_LC	192	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKP GQAPVLVVDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEA GDEADYYCQVWDSSSDHPVVFVGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS
KL2B494_LC	194	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPG QAPVLVVDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAG DEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGTKLTVLGQPKAAPS V TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV

		THEGSTVEKTVAPTECS
--	--	-------------------

Таблица 13. SEQ ID NO последовательностей κДНК HC и LC выбранных антител к hK2

Антитело	Белок HC, SEQ ID NO:	Белок LC SEQ ID NO:	κДНК HC с SEQ ID NO:	κДНК LC с SEQ ID NO:
m11B6	332	333	336	337
hu11B6	334	335	338	339
KL2B30	185	186	195	196
KL2B53	187	188	197	198
KL2B242	189	190	199	200
KL2B467	191	192	201	202
KL2B494	193	194	203	204

Таблица 14. Аминокислотные последовательности переменного домена выбранных антител scFv к hK2 в формате VH-линкер-VL (HL) или VL-линкер-VH (LH).

Название scFv	Сокращение	Аминокислотная последовательность scFv	SEQ ID NO:
scFv1	HCG5_LDC6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPS LKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYY CATGYYYGSGFWGQGLTVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATIN CKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIY AASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLVQAE DVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	8
scFv2	HCG5_hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPS LKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYY CATGYYYGSGFWGQGLTVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATIN CKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIY AASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLVQAE VAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	9

scFv3	HCF3_hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYC ATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINC KASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYA ASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDV AVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	10
scFv4	HCG5_LCB7_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYY CATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATIN CKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIY AASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAED VAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	11
scFv5	LCD6_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTY NPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAV YYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	12
scFv6	hu11B6_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYN PSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVY YCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	13

scFv7	hu11B6_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTY NPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAV YYCATGYYYGSGFWGQGTLLVTVSS	14
scFv8	LCB7_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYN PSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVY YCATGYYYGSGFWGQGTLLVTVSS	15
scFv9	LCB7_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTY NPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAV YYCATGYYYGSGFWGQGTLLVTVSS	16
scFv10	LCD6_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYN PSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVY YCATGYYYGSGFWGQGTLLVTVSS	17

scFv11	hu11B6_LCB7_HL	QVQLQESGPGPLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYY CATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATIN CKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIY AASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAED VAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	18
scFv12	hu11B6_LCD6_HL	QVQLQESGPGPLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYY CATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATIN CKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIY AASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAE DVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	19
scFv13	hu11B6_HL	QVQLQESGPGPLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYY CATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSG SGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATIN CKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIY AASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	20
scFv14	LCD6_hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGPLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYN PSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAV YYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	21

scFv15	hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYN PSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTA VYCATGYYYGSGFWGQGTLLVTVSS	22
scFv16	LCB7_hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYN PSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTA VYCATGYYYGSGFWGQGTLLVTVSS	23
scFv17	KL2B413_HL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY WMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYYV DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDQNYDILTGHYGMVWGQGTTVTV SSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPSFLS ASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAP KLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK	340
scFv18	KL2B413_LH	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLS WYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFG QGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMT WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYYVDSVK GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDQNYDILTGHYGMVWGQGTTVTVSS	341

scFv19	KL2B359_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSITSDY AWNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA TGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAV YFCQQTRKVPYTFGGGGTKVEIK	342
scFv20	KL2B359_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKV PYTFGGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGG SQVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	343
scFv21	KL2B357_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSITSDY AWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA TGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCR ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA SNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYFCQQTRKVPYTFGGGGTKVEIK	169
scFv22	KL2B357_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTR KVPYTFGGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSIT SDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNP SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	170

scFv23	KL2B358_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSITSDY AWNWRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA TGYYYGSGFWGQGLTVTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAV YFCQQTRKVPYTFGGGGTKVEIK	171
scFv24	KL2B358_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKV PYTFGGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGG SQVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSITSD YAWNWRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ATGYYYGSGFWGQGLTVTVSS	172
scFv25	KL2B360_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSITSDY AWNWRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA TGYYYGSGFWGQGLTVTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAV YFCQQTRKVPYTFGGGGTKVEIK	173
scFv26	KL2B360_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKV PYTFGGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGG SQVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSITSD YAWNWRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ATGYYYGSGFWGQGLTVTVSS	174

scFv27	KL2B30_HL	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYY WSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAG TTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSSGGS EGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSFLSASVG DRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPE DFATYYCQQLNSYPLTFGGGKVEIK	175
scFv28	KL2B30_LH	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYL AWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGS GSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLTF GGGKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQ LQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWS WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRV TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTT IFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS	176
scFv29	KL2B53_HL	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSY DIHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRLVEDSAVYS CARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMTVTVSSG GSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPK FLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDVATYYCQKYNAPYTFGQGRLEIK	177
scFv30	KL2B53_LH	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYL AWYQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPYT FGQGRLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEV QLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDI HWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVK GRFTISRDNKNTLYLQMDSLRLVEDSAVYSCA RESGWSHYYYYGMDVWGQGTMTVTVSS	178

scFv31	KL2B242_HL	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYY WSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLK SRVTLSDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCA GDSGNYWGWFDPWGQGTLLTVSSGGSEGKS SGSGSESKSTGGSSYELTQPPSVSVSPGETASIT CSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSK RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADY YCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	179
scFv32	KL2B242_LH	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYAC WYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVV GGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQ LQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWS WLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSR VTLSDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAG DSGNYWGWFDPWGQGTLLTVSS	180
scFv33	KL2B467 HL	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYY GMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSSGG SEGKSSGSGSESKSTGGSQSVLTQPPSVSVAPG QTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEA GDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTV	181
scFv34	KL2B467 LH	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVH WYQQKPGQAPVLLVYDNSDRPSGIPERFSGS NSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HPVVFGGGTKVTVGGSEGKSSGSGSESKSTGG SQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSY YGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS	182

scFv35	KL2B494_HL	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHY AMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMTV VSS GGSEGKSSGSGSESKSTGGSSSELTQPPSVSVA PGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPV LVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISR V EAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGTKLTV L	183
scFv36	KL2B494_LH	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVH WYQQKPGQAPV LVVYDDSDRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HVVFVGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGG SQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSH YAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMTV TVSS	184

**Пример 12. Определение биофизических характеристик антител к hK2**

Аффинность и термостабильность антител к hK2.

Аффинность выбранных антител к hK2 к растворимому hK2 измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). SPR представляет собой способ изучения силы взаимодействия между двумя партнерами по связыванию без использования меток путем измерения изменения массы при формировании и диссоциации комплекса. Антитела захватывали на чипе датчика, покрытом антителом к Fc, с последующей инъекцией растворимого hK2 в различных концентрациях, и определяли время ассоциации и диссоциации. После диссоциации поверхность восстанавливали подходящим раствором для подготовки к следующему взаимодействию. Кинетическую информацию (константы скорости ассоциации и диссоциации) экстрагировали путем подбора сенсограмм к модели связывания Ленгмюра в соотношении 1 : 1. Аффинность связывания ( $K_D$ ) регистрировалась как отношение констант скорости ( $k_{диссоциации}/k_{ассоциации}$ ). Значения  $K_D$  выбранных антител hK2 перечислены в **таблице 15**.

Термостабильность определяли с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (NanoDSF) с использованием автоматического прибора Prometheus. NanoDSF использовали для измерения  $T_m$  молекул в концентрации 0,5 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7,4. Измерения проводили путем загрузки образцов в 24-

капиллярную матрицу из 384-луночного планшета для образцов. Для каждого образца выполняли повторные измерения. Термическое сканирование образцов охватывает диапазон от 20 °С до 95 °С со скоростью 1,0 °С/мин. Флуоресценцию интактного триптофана и тирозина мониторили при длинах волн излучения 330 нм и 350 нм, а соотношение F350/F330 нм наносили на график зависимости от температуры для создания кривых разворачивания белка. Измеренные значения  $T_m$  перечислены в **таблице 15**.

*Таблица 15.  $K_D$  и  $T_m$  выбранных молекул*

Молекула	$K_D$ (нМ)	$T_m$ (°С)
KL2B413 (scFv)	34,3	67
KL2B359 (scFv)	0,7-1	67
KL2B30 (Fab)	0,460	> 70
KL2B242 (Fab)	0,040	> 70
KL2B53 (Fab)	0,080	> 70
KL2B467 (Fab)	0,078	> 70
KL2B494 (Fab)	0,053	> 70

scFv KL2B413, полученный в результате кампании иммунизации мышей линии Abblexis, имел термостабильность ( $T_m$ ) 67 °С, измеренную с помощью Nano DSF, и аффинность связывания ( $K_D$ ) с hK2 человека около 34 нМ. Клон KL2B359, полученный для проведения повторной гуманизации и который сохранял аффинность связывания, аналогичную мышиному 11B6, преобразовали в scFv-Fc и CAR-T для дополнительного профилирования. ScFv KL2B359 показывает значения  $T_m$  67 °С и аффинности связывания ( $K_D$ ) с hK2 ~0,7 нМ-1 нМ. KL2B30, KL2B242, KL2B53, KL2B467 и KL2B494 Fab демонстрировали показатели аффинности связывания менее 0,5 нМ, а значения  $T_m$  выше 70 °С.

#### Картирование эпитопов

Эпитоп на выбранных антителах к KL2B определяли методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HX-MS). Для эксперимента по картированию эпитопа использовали антиген KLK2 человека.

Вкратце, очищенный антиген KLK2 инкубировали с антителами к KLK2 и без них в буфере для мечения оксидом дейтерия. Смесь, полученную в результате водородно-дейтериевого обмена (HDX), гасили в разные моменты времени путем добавления 8 М мочевины, 1М TCEP, pH 3,0. Гашенный образец пропускали через колонку с иммобилизованным пепсином/FPXIII при 600 мкл/мин, уравновешенную буфером А (1% ацетонитрил, 0,1% МК в H<sub>2</sub>O) при комнатной температуре. Пептические фрагменты загружали в обращенно-фазную предколонку при концентрации 600 мкл/мин с буфером А и обессоливали в течение 1 мин (600 мкл буфера А). Обессоленные фрагменты разделяли с помощью колонки C18 с линейным градиентом от 8% до 35% буфера В (95%

ацетонитрила, 5% H<sub>2</sub>O, 0,0025% TFA) при 100 мкл/мин в течение 20 мин и анализировали методом масс-спектрометрии. Анализы методом масс-спектрометрии проводили с использованием масс-спектрометра LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) с температурой капилляра 275 °С, разрешением 150 000 и диапазоном масс (масса/заряд) 300-1800. Приложение BioPharma Finder 3.0 (Thermo Fisher Scientific) использовали для идентификации пептидов недеитерированных образцов перед проведением экспериментов HDX. Для экстракции значений центроидов из MS файлов необработанных данных для проведения экспериментов HDX использовали программу HDXaminer версии 2.5 (Sierra Analytics, г. Модесто, штат Калифорния).

Инкубация антител hK2, hu11B6, KL2B494, KL2B467, KL2B30, KL2B413 и KL2B53 с растворимым белком hK2 приводила к различным паттернам водородного обмена и общего уровня защиты. Для визуализации связывающих эпитопов защищенные сегменты сопоставляли с последовательностью антигена hK2 (Фиг. 17B). KL2B494, KL2B467 и KL2B30, связанные с общими последовательностями, состоящими из остатков 173-178 (SEQ ID NO: 346, KVTEF) и остатка 230-234 (SEQ ID NO: 347, NYRKW). KL2B53 показал другой характер защиты и был связан с последовательностью, состоящей из остатков 27-32 (SEQ ID NO: 348, SHGWAH), 60-75 (SEQ ID NO: 349, RHNLFEPEDTGQRVP) и 138-147 (SEQ ID NO: 350, GWGSIEPEE).

### **Пример 13. Создание и определение характеристик дополнительных конструкторов scFv CAR**

Эктодомен, клонированный в качестве scFv 11B6, не сохранял связывание при повышенной температуре (55 °С), и, следовательно, были инициированы дополнительные кампании для создания новых гуманизированных антител от родительского 11B6.

Были созданы hK2 CAR, содержащие термически стабилизированные scFv, полученные из антитела 11B6. Описание и SEQ ID NO: конструкторов CAR, содержащих термически стабилизированные scFv, представлены в **таблице 16**. Названия в описании относятся к VH или VL цепям, идентифицированным выше, а 20AA относится к длинному линкеру из 20 аминокислот между парами VH/VL в scFv. ScFv в CAR клонировали в ориентации VH-L-VL или VL-L-VH.

Сгенерированные scFv KL2B413\_HL, KL2B413\_LH, KL2B359\_HL и KL2B359\_LH также были включены в конструкторы CAR и дополнительно охарактеризованы. В **таблице 16** показаны сгенерированные конструкторы CAR и их SEQ ID NO. Используемая последовательность сигналов представляла собой MAWVWTLFLMAAAQSIQA (SEQ ID NO: 24)

**Таблица 16.**

Название конструктора CAR	Описание scFv в CAR	SEQ ID NO: аминокислотная	SEQ ID NO: полный домен ECD CAR	SEQ ID NO: аминокислотная последовательность

		последова- тельность scFv CAR	(включая сигнальную последова- тельность)	тельность CAR
CAR1	HL_HCG5_LCD6_20AA (scFv1)	8	273	46
CAR2	HL_HCG5_LCh11B6_20AA (scFv2)	9	274	47
CAR3	HL_HCF3_LCB7_20AA (scFv3)	10	275	48
CAR4	HL_HCG5_LCB7_20AA (scFv4)	11	276	49
CAR5	LH_LCD6_HCG5_20AA (scFv5)	12	277	50
CAR6	LH_LCHumanized_HCF3_20AA (scFv6)	13	278	51
CAR7	LH_LCHumanized_HCG5_20AA (scFv7)	14	279	52
CAR8	LH_LCB7_HCF3_20AA (scFv8)	15	280	53
CAR9	LH_LCB7_HCG5_20AA (scFv9)	16	281	54
CAR10	LH_LCD6_HCF3_20AA (scFv10)	17	282	55
CAR11	HL_HCHumanized_LCB7_20AA (scFv11)	18	283	56
CAR12	HL_HCHumanized_LCD6_20AA (scFv12)	19	284	57
CAR13	HL_HCHumanized_LCHumanized_20AA (scFv13)	20	285	58
CAR14	LH_LCD6_HCHumanized_20AA (scFv14)	21	286	59
CAR15	LH_LCHumanized_HCHumanized_20AA (scFv15)	22	287	60
CAR16	LH_LCB7_HCHumanized_20AA (scFv16)	23	288	61
CAR17	KL2B413_HL (scFv17)	340	289	82
CAR18	KL2B413_LH (scFv18)	341	290	83
CAR19	KL2B359_HL (scFv19)	342	291	84
CAR20	KL2B359_LH (scFv20)	343	292	85
CAR21	scFv21 LC KL2B357	169	319	205
CAR22	KL2B357 LH (scFv22)	170	320	206
CAR23	KL2B358 HL (scFv23)	171	321	207
CAR24	KL2B358 LH (scFv24)	172	322	208
CAR25	KL2B360 HL (scFv25)	173	323	209
CAR26	KL2B360 LH (scFv26)	174	324	210
CAR27	KL2B30 HL (scFv27)	175	325	211
CAR28	KL2B30 LH (scFv28)	176	326	212

CAR29	KL2B53 HL (scFv29)	177	327	213
CAR30	KL2B53 LH (scFv30)	178	328	214
CAR31	KL2B242 HL (scFv31)	179	329	215
CAR32	KL2B242 LH (scFv32)	180	330	216
CAR33	KL2B467 HL (scFv33)	181	331	217
CAR34	KL2B467 LH (scFv34)	182	332	218
CAR35	KL2B494 HL (scFv35)	183	333	219
CAR36	KL2B494 LH (scFv36)	184	334	220
LCHumanized относится к hu11B6_VL				
HCHumanized относится к hu11B6_VH				

**Пример 14: Идентификация различных CAR на основе scFv с антиген-независимой активацией с помощью клеток Jurkat-Lucia™ NFAT.**

Ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) представляет собой семейство факторов транскрипции, впервые идентифицированных как регулятор иммунных клеток. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, активация Т-клеток приводит к притоку кальция, тем самым активируя кальциневрин, который дефосфорилирует богатый серином клеточный сигнал внутриядерной локализации на N-конце NFAT, что приводит к ядерному импорту NFAT. Впоследствии можно обнаружить тоническую передачу сигнала в связи с кластеризацией scFv с помощью люциферазы светлячков, управляемой промотором NFAT в репортерной клеточной линии JNL.

Клетки Jurkat, содержащие ген люциферазы, регулируемый отвечающим на сигнал NFAT-промотором (называемые клетками JNL), трансдуцировали с использованием различных конструкторов CAR. Связывание между конструктором CAR и распознаваемым им клеточным антигеном (hK2 на клетках-мишенях) приводит к экспрессии люциферазы в клетках JNL. Новые клоны hK2 KL2B413 и регуманизированные клоны 11B6 CAR оценивали в анализе JNL-репортера на антиген-зависимую активность в соответствии со следующим протоколом.

Лентивирусная трансдукция проводилась следующим образом. Клетки JNL собирали и повторно суспендировали в количестве 1Е6/мл. Добавляли 500 мкл клеток JNL и лентивируса в MOI 3 и перемешивали с помощью пипетки в направлении вверх и вниз. Смесь помещали в инкубатор при 37 °С на 24 часа. Затем в каждую лунку добавляли 500 мкл среды JNL. Культивирование продолжали в инкубаторе при 37 °С. Клетки переносили в сосуд T25 на 4й день. На 5-6 день проводили валидацию трансдукции. Собирали 150 мкл клеток для изучения экспрессии CAR посредством соответствующего реагента для обнаружения конкретного представляющего интерес CAR (например, белок биотина-hK2 используется для обнаружения hK2 CAR). Клетки JNL поддерживали при  $5 \times 10^5$ /мл до тех пор, пока не было получено достаточно клеток для замораживания или использования для анализа JNL, описанного ниже.

Анализ JNL выполняли следующим образом. Проводили совместное культивирование с линиями клеток-мишеней, причем соотношение эффектора и клеток-мишеней составляло 2 : 1. Клетки JNL центрифугировали для удаления любой секретируемой люциферазы в среде и повторно суспендировали в свежей среде при  $4 \times 10^5$ /мл. Клетки JNL собирали. Затем получали как антиген-положительные, так и антиген-отрицательные линии клеток-мишеней при  $2 \times 10^5$ /мл. Затем к 100 мкл клеток JNL добавляли 100 мкл клеток-мишеней. Для контроля присутствия только клеток JNL вместо клеток-мишеней добавляли 100 мкл среды. Для положительного контроля клетки JNL или клетки JNL CAR добавляли в 1 х коктейль для стимуляции клеток и инкубировали в инкубаторе при 37 °С в течение 24 часов. 150 мкл супернатанта собирали в 96-луночный планшет и центрифугировали для удаления клеток. 100 мкл супернатанта переносили из планшета в черный планшет с твердым дном, после чего добавляли 100 мкл реагента для обнаружения QUANTI-luc<sup>2</sup> и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут перед считыванием результатов с помощью планшетного ридера Envision.

Клетки Jurkat, содержащие ген люциферазы, регулируемый отвечающим на сигнал NFAT-промотором (называемые клетками JNL), трансдуцировали с использованием различных конструкторов hK2 CAR. Экспрессию определяли с помощью биотинилированного hK2, а затем - конъюгированного со стрептавидином PE. Данные показаны на **Фиг. 12А**. Экспрессия CAR в трансдуцированных клетках JNL была подтверждена для выбранных клонов с 46-50% клеток, экспрессирующих регуманизированные 11B6 KL2B359 CAR, и 73,7-96% клеток, экспрессирующих KL2B413 CAR.

Данные на **Фиг. 12В** указывают на то, что связывание между конструктором hK2 CAR и его распознанным клеточным антигеном (hK2 на клетках-мишенях) приводит к экспрессии люциферазы в клетках JNL. Клетки JNL, содержащие указанные CAR клоны и клетки JNL (UTD), совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (клетками VCaP, LNCaP/hK2, LNCaP, C4-2B, 22Rv1 или DU145), а активность люциферазы измеряли как интенсивность люминесценции. Клоны считали активными, когда интенсивность люминесценции в присутствии антиген-экспрессирующих клеток превышала уровень UTD-клеток в 1,5 раза. Для нового KL2B413 и регуманизированных 11B6 HL и LH CAR не было обнаружено антигензависимой активации.

**Пример 15: Подсчет hK2 CAR-T-клеток проводили при анализе уничтожения клеток в реальном времени с помощью системы визуализации IncuCyte на предмет антигензависимой цитотоксичности.**

hK2 CAR-T-клетки совместно инкубировали с клетками VCaP hK2<sup>+</sup> и клетками DU145 hK2<sup>-</sup> в течение 96 часов. Соотношение эффектор/мишень (Е/Т) рассчитывали на основе данных экспрессии CAR, показанных на **Фиг. 11А-11В**. Клетки-мишени стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, который измеряют с помощью системы визуализации IncuCyte в режиме реального времени. Данные показаны на **Фиг. 13А** для клеток CAR-T hK2, совместно инкубированных с клетками VCaP hK2<sup>+</sup>, и на **Фиг. 13В** для

CAR-T-клеток hK2, совместно инкубированных с клетками DU145 hK2-. На этих фигурах ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток\*100 (%).

**Пример 16. Определение характеристик CAR-T-клеток, трансдуцированных KL2B413\_HL, KL2B413\_LH, KL2B359\_HL или KL2B359\_LH.**

Активация CAR-T-клеток является антигензависимой

Полученные CAR-T-клетки оценивали в анализе JNL-репортера на предмет антигензависимой активности, как описано в примере 4. Вкратце, клетки Jurkat, содержащие ген люциферазы, активируемый сигнально-чувствительным промотором NFAT (называемые клетками JNL), были трансдуцированы конструктами CAR17 (KL2B413\_HL), CAR18 (KL2B413\_LH), CAR19 (KL2B359\_HL) или CAR20 (KL2B359\_LH). Экспрессию каждого CAR определяли с помощью биотинилированного hK2, затем конъюгированного с стрептавидином PE. Экспрессия CAR в трансдуцированных клетках JNL была подтверждена для выбранных клонов с 46-50% клеток, экспрессирующих CAR, на основании KL2B359, и 73,7-96% клеток, экспрессирующих CAR, на основании KL2B413, как показано на **Фиг. 6**. Процент клеток JNL, экспрессирующих каждый CAR, был следующим: KL2B413\_HL: 73,7%, KL2B413\_LH: 93,6%, KL2B359\_HL: 46%, KL2B359\_LH: 50,8%.

Связывание между конструктом hK2 CAR и распознаваемым им клеточным антигеном (hK2 на клетках-мишенях) приводит к экспрессии люциферазы в клетках JNL. С этой целью клетки JNL, трансдуцированные исследуемыми конструктами CAR или нетрансдуцированными клетками JNL (UTD), совместно культивировали с клетками-мишенями (VCaP, LNCaP/hK2 (клетки LNCaP, рекомбинантно экспрессирующие hK2), LNCaP, C 4-2B, 22Rv1 или DU145 клетки), а активность люциферазы измеряли как интенсивность люминесценции. Конструкты считали активными, когда интенсивность люминесценции в присутствии экспрессирующих антиген клеток превышала уровень UTD-клеток в 1,5 раза. Для исследуемых конструктов CAR не было обнаружено антигензависимой активации. На **Фиг. 13А** показаны RLU (относительные световые единицы), полученные в результате связывания CAR-T-клеток с исследуемыми клетками-мишенями, указанными на фигуре.

CAR-T-клетки продуцируют цитокины при антиген-зависимой стимуляции

IFN- $\gamma$ , продуцируемый цитотоксическими Т-клетками, имеет решающее значение для обеспечения иммунного надзора над опухолями, что может непосредственно ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз некоторых злокачественных новообразований *in vivo* и *in vitro*. Для определения способности hK2 CAR-модифицированных человеческих Т-клеток распознаваться и активироваться с помощью hK2-положительных опухолевых клеток, первичные Т-клетки, трансдуцированные указанными клонами CAR, совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (LNCaP/hK2, LNCaP, C 4-2B, 22Rv1 или DU145 клетки), а супернатант собирали для

измерения концентрации IFN- $\gamma$ . Как показано на **Фиг. 14**, CAR-T-клетки, трансдуцированные hK2 CAR, секретировали IFN- $\gamma$  во время совместного культивирования с клетками LNCap, рекомбинантно экспрессирующими hK2 (LNCap/hK2) клетками, а также во время совместного культивирования с клетками C 4-2B с очень низкой экспрессией hK2 и клетками LNCap, чего не отмечалось с hK2-отрицательными клетками DU145. На **Фиг. 14** показана средняя концентрация IFN- $\gamma$   $\pm$  SD (пг/мл) для культур в двух повторностях.

CAR T-клетки пролиферируют антигензависимым образом

CAR-T-клетки оценивали на предмет их пролиферации с использованием протокола анализа пролиферации Т-клеток, описанного в примере 4. hK2 CAR-T-клетки и нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки метили CellTrace Violet (CTV; 5 $\mu$ M) и совместно культивировали с hK2-положительными VCap и hK2-отрицательными DU145-клетками. Через пять дней после совместного культивирования клетки собирали и окрашивали с помощью CD3, CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток в ближней ИК-области (NearIR live/dead Dye) и hK2 CAR. Анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением FlowJo. Лимфоциты идентифицировали с помощью живых CD3, и определяли частоты CAR-T-клеток с помощью разведения красителя CTV и маркера активации CD25. Путем гейтирования на CD3<sup>+</sup> Т-клетках hK2-положительные клетки Vcap, в отличие от hK2-отрицательных клеток DU145, способствовали пролиферации каждой исследованной линии CAR-T-клеток, как показано на **ФИГ. 10С, 10D и 10Е**, и усилению активации маркера активации CD25, как показано на **Фиг. 11В и Фиг. 12А**. Т-клетки без какой-либо стимуляции не пролиферировали, и микроновители CD328 стимулировали Т-клетки, демонстрируя эквивалентную модель пролиферации. hK2 CAR<sup>+</sup> Т-клетки пролиферировали более устойчиво, чем положительный контроль с микроносителями CD328 после 5 дней совместного культивирования с клетками VCap. Различные исследованные CAR-T-клетки имели отличную активность пролиферации и демонстрировали различные количества CAR-T-клеток. Процент пролиферирующих Т-клеток и Т-клеток, экспрессирующих CD25, рассчитывают по среднему абсолютному числу клеток +/- SEM после двух повторений.

#### **Пример 17: Продукция цитокина IFN-гамма Th1 антиген-стимулированными CAR-T-клетками**

Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, IFN- $\gamma$ , продуцируемый цитотоксическими Т-клетками, имеет решающее значение для обеспечения иммунного надзора над опухолями, что может непосредственно ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз некоторых злокачественных новообразований *in vivo* и *in vitro*.

Для определения способности hK2 CAR-модифицированных человеческих Т-клеток распознавать и активироваться с помощью hK2(+) опухолевых клеток, первичные Т-клетки, содержащие указанные клоны CAR, совместно культивировали с линиями клеток-мишеней (LNCap/Hk2, LNCap, C4-2B, 22Rv1 или DU145 клетки), а супернатант

собирали для измерения концентрации IFN- $\gamma$ . Данные показаны на **Фиг. 14** в виде средней концентрации IFN- $\gamma \pm SD$  (пг/мл) для дублированных культур. Как показано, модифицированные hK2 CAR-T-клетки секретируют IFN-гамма во время совместного культивирования с клетками LNCap/hK2, экспрессирующими hK2, клетками C4-2B даже с очень низкой экспрессией hK2 и клетками LNCap, чего не отмечалось с hK2-отрицательными клетками DU145. Неописанный контрольный CAR секретировал гораздо большее количество IFN- $\gamma$  из-за гораздо более высокого уровня экспрессии антигена, чем у hK2.

**Пример 18: Анализ дегрануляции CD107a для оценки противоопухолевой активности CAR-T-клеток hK2.**

Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, опухолевые клетки могут быть распознаны и уничтожены цитотоксическими лимфоцитами, такими как CD8+ Т-лимфоциты и натуральные киллеры (NK), в основном посредством иммунной секреции литических гранул, которые уничтожают опухолевые клетки-мишени. Этот процесс включает в себя слияние мембраны гранул с цитоплазматической мембраной иммунной эффекторной клетки, что приводит к выходу на поверхность лисосомальных белков, которые обычно присутствуют на липидных бислоях, окружающих литические гранулы, такие как CD107a. Таким образом, экспрессия мембраны CD107a представляют собой маркер активации иммунных клеток и цитотоксической дегрануляции.

Анализ дегрануляции выполняли следующим образом. Клетки-мишени ( $5 \times 10^4$ ) совместно культивировали с равным количеством эффекторных клеток в 0,1 мл на лунку в 96-луночном планшете. Контрольные лунки содержали только Т-клетки. Антитела к CD107a (5 мкл на лунку) добавляли в дополнение к 1 мкл/образец монензина (BD Biosciences), а затем инкубировали в течение 4 часов при 37 °C. Клетки дважды промывали PBS, окрашивали для экспрессии CAR, CD3 и CD8 hK2 и анализировали на проточном цитометре BD Fortessa. Данные показаны на **Фиг. 15**.

Как показано, присутствие антигена hK2 на клетках Vcar приводит к увеличению количества Т-клеток CD107A+ hK2 CAR(+), но не Т-клеток hK2 CAR(-) и UTD, измеренных с помощью проточной цитометрии. Только фоновое окрашивание (<2%) наблюдалось в Т-клетках CAR без стимуляции опухолевых клеток. Форбол 12-миристанат 13-ацетат (PMA) в комбинации с иономицином (коктейль для стимуляции клеток eBioscience™; 500X) был постоянным индуктором поверхностной экспрессии клеток CD107a в данной 4-часовой модели культивирования клеток, которую использовали в качестве положительного контроля. Результаты на **Фиг. 15** представлены для репрезентативных донорских Т-клеток и воспроизводятся с разными донорами.

**Пример 19: Пролиферация Т-клеток является важным in vitro параметром иммунной функции in vivo.**

Для дополнительной оценки функции новых KL2B413 и регуманизированных 11B6 (KL2B359) CAR Т-клеток, а также помощи при выборе наилучшего конструкта CAR-T-клетки метили CellTrace™ Violet (CTV; 5 мкМ) для анализа пролиферации Т-клеток.

Следовали следующему протоколу, результаты показаны на **Фиг. 16А-16D**.

Опухолевые клетки Vcar и DU145 собирали и дважды промывали PBS. Клетки повторно суспендировали в количестве 10E6/мл в PBS, содержащем 100 мкг/мл митомидина С (ММС), в течение 1,5 часов в инкубаторе при 37 °С, чтобы заблокировать пролиферацию опухолевых клеток. 20 мкл DMSO добавляли во флакон с раствором для окрашивания СТВ. Затем 5 мкл раствора разводили 5 мл (1:1000) PBS (нагретым до 37 °С) для получения 5 мкМ раствора для окрашивания. 2Е6 Т-клетки подсчитывали, собирали, дважды промывали PBS и затем повторно суспендировали в количестве 4Е6/мл (0,5 мл). Добавляли равный объем (0,5 мл) раствора для окрашивания СТВ. Затем образцы инкубировали в течение 20 часов при 37 °С. Через 20 минут в клетки добавляли 4 мл RPMI 20% ФБС для поглощения любого несвязанного красителя, и клетки инкубировали в течение 5 минут. Клетки центрифугировали в течение 5 минут при 400 x g, после чего клеточный осадок повторно суспендировали в предварительно нагретом RPMI+10% ФБС. Проводили подсчет Т-клеток, а 1Е5 клеток (100 мкл) высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном.

В то же время опухолевые клетки hK2 (+) VCar и hK2(-) DU145, обработанные ММС, собирали и подсчитывали через 1,5 часа, а затем повторно суспендировали в количестве 1Е6/мл. 1Е5 клеток (100 мкл) совместно культивировали с Т-клетками в 96-луночной планшете. В качестве отрицательных и положительных контролей использовали только Т-клетки и Т-клетки с добавленными микроносителями CD3/28 с соотношением микроносителей к клеткам 3 : 1.

Через пять дней совместного культивирования собирали все клетки из каждой лунки. Клетки дважды центрифугировали и промывали в течение 5 минут при 400 x g, затем окрашивали с помощью hK2CAR, CD3, CD8 и CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток (ближний ИК) в 96-луночной планшете с U-образным дном. После промывки все клетки фиксировали в течение 10 минут с использованием 100 мкл буфера для фиксации BD Cytofix™ (50 мкл буфера FACS+50 мкл буфера для фиксации). Окрашенные образцы анализировали с помощью многоцветной проточной цитометрии после завершения периода инкубации.

Анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением Flowjo. Лимфоциты идентифицировали с помощью живых CD3 и определяли частоты CAR+ Т-клеток с помощью разведения красителя СТВ и маркера активации CD25.

Для получения гистограммы СТВ неразбавленный гейт СТВ был установлен таким образом, чтобы охватить крайний правый пик (СТV bright) Т-клеток, культивируемых отдельно, и разбавленный гейт СТВ для захвата остальной части популяции. Эту настройку применяли ко всем образцам. Добавляли статистику, чтобы включить абсолютное количество клеток в разбавленной популяции СТВ. Была создана таблица с этой статистикой, после чего данные (количество ячеек) были экспортированы в Excel для переформатирования перед передачей в Prism.

На **Фиг. 16А-16D** показаны результаты анализа пролиферации hK2 CAR-T-клеток. Путем гейтирования на CD3<sup>+</sup> Т-клетках, как показано на **Фиг. 16А-16В**, клетки hK2(+) Vcar, но не hK2(-) клетки DU145, стимулировали пролиферацию всех Т-клеток, созданных с конструктами CAR, и повышали активацию маркера CD25, как показано на **Фиг. 16С-16D**. Т-клетки, стимулированные гранулами CD3/28, использовали в качестве положительных контролей, и только Т-клетки использовали в качестве отрицательных контролей. Т-клетки без какой-либо стимуляции не пролиферируют, и Т-клетки, стимулированные микроносителями CD3/28, демонстрировали эквивалентную картину пролиферации. Как показано, hK2 CAR-T-клетки пролиферируют более устойчиво, чем положительный контроль с микроносителями CD3/CD28, после 5 дней совместного культивирования с VCar клетками. Т-клетки, сконструированные с помощью различных конструктов CAR, имеют другую активность пролиферации и демонстрировали различные количества CAR<sup>+</sup> Т-клеток. Сводные данные о процентной доле пролиферирующих Т-клеток и Т-клеток, экспрессирующих CD25, на основе средних значений абсолютного числа клеток +/- SEM после двух повторений показаны на **Фиг. 16В** и **16D**.

**Пример 20: Конструирование и экспрессия scFv hK2 CAR**

Конструируют конструкты hK2 CAR, содержащие следующие последовательности scFv:

**KL2B357 HL:**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISY  
SGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTL  
VTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTS  
LMHWYQQKPGQPPELLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQ  
QTRKVPYTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO: 221)

**KL2B357 LH:**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHYQQKPGQPPELLIYA  
ASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKG  
GSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIR  
QFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT  
GYYYGSGFWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 222)

**KL2B358 HL:**

QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISY  
 SGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTL  
 VTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTS  
 LMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQ  
 TRKVPYTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO: 223)

**KL2B358 LH:**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYA  
 ASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGG  
 SEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSITSDYAWNWRQP  
 PGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGY  
 YYGSGFWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 224)

**KL2B360 HL:**

QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSITSDYAWNWRQFPKGKLEWIGYISY  
 SGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTL  
 VTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTS  
 LMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQ  
 TRKVPYTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO: 225)

**KL2B360 LH:**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYA  
 ASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGG  
 SEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGNSITSDYAWNWRQP  
 PGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGY  
 YYGSGFWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 226)

**KL2B30 HL:**

QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSS  
 GSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGM  
 DVWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRA  
 SQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAT  
 YYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK

(SEQ ID NO: 227)

**KL2B30 LH:**

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASL  
 QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGKTKVEIK  
 GGSEKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQ  
 PPGKGLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAG  
 TTIFGVVTPNFYYGMDVWVGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO: 228)

**KL2B53 HL:**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAISY  
 DGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSL RVED  
 SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWVGQGTMTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGS  
 DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASLHSGVPSRF  
 SSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGRLEIK

(SEQ ID NO: 229)

**KL2B53 LH:**

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASL  
 HSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGRLEIKGGSEK  
 SSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGK  
 LEWVAISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSL RVED  
 SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWVGQGTMTVTVSS

(SEQ ID NO: 230)

**KL2B242 HL:**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYV  
 SGFTNYNPSLKSRTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPW  
 GQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSSYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGE  
 NYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYC  
 QAWDNSIVVFGGGTKLTVL

(SEQ ID NO: 231)

**KL2B242 LH:**

SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRP  
 SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGGSEGK  
 SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGL  
 EWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNY  
 WGWFDPWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 232)

**KL2B467 HL:**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIS  
 YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAF  
 DYWGQGTQVTVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSQSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGD  
 NIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEA  
 DYYCQVWDSSSDHPVVFVGGGTKVTV

(SEQ ID NO: 233)

**KL2B467 LH:**

QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDNSDR  
 PSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFVGGGTKVTVGGS  
 EGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQA  
 PGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA  
 HLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS

(SEQ ID NO: 234)

**KL2B494 HL:**

QVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSHYAMSVRQAPGGGLEWVSTGGS  
 GSTYYADSVKGGLEWVSTNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTSGGSGS  
 GSGSGSESKSGSSELTQPPSVSPARGQTARITCGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVVYD  
 DRSDRPSGIMYYYYYQVWDSSSDHVVFVGGGTKLTVL VL

(SEQ ID NO: 235)

**KL2B494 LH:**

SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDR  
 PSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGTKLTVLGGS  
 EGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSHYAMSVRQA  
 PGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA  
 KPHIVMTALLYDGMVWVGQTMVTVSS

(SEQ ID NO: 236)

Конструкты hK2 CAR содержали следующие последовательности:

**KL2B357 HL:**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWRQFPKGLEWIGYISY  
 SGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGT  
 VTVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTS  
 LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQ  
 QTRKVPYTFGGGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD  
 FACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR

FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM  
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT  
YDALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 205)

**KL2B357 LH:**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYA  
ASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKG  
GSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWR  
QFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT  
GYYYGSGFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG  
LDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  
CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE  
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD  
TYDALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 206)

**KL2B358 HL:**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISY  
SGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTL  
VTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGT  
LMHWYQQKPGQPPRLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQ  
TRKVPYTFGGGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF  
ACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG  
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  
DALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 207)

**KL2B358 LH:**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLIYA  
ASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGG  
SEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWRQP  
PGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGY  
YYGSGFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF  
ACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG  
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY

DALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 208)

**KL2B360 HL:**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIWIRQFPKGKLEWIGYISY  
 SGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTL  
 VTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTS  
 LMHWYQQKPGQPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQ  
 TRKVPYTFGGGKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF  
 ACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
 PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG  
 GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTY  
 DALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 209)

**KL2B360 LH:**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPRLLIYA  
 ASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGKVEIKGG  
 SEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIWIRQF  
 PKGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGY  
 YYGSGFWGQGTLVTVSSSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF  
 ACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
 PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMG  
 GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTY  
 DALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 210)

**KL2B30 HL:**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPKGKLEWIGYIYYYS  
 GSTNYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGM  
 DVWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRA  
 SQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFAT  
 YYCQQLNSYPLTFGGGKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT  
 RGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED  
 GCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR  
 DPENMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA  
 TKDTYDALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 211)

**KL2B30 LH:**

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASL  
 QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGKVEIK  
 GGSEKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQ  
 PPGKGLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAG  
 TTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA  
 AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ  
 TTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL  
 DKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLY  
 QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

(SEQ ID NO: 212)

**KL2B53 HL:**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAISY  
 DGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLVRVED  
 SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGS  
 DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASLHSGVPSRF  
 SSGSGGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGRLEIKTSTPAPRPPTPAPTI  
 ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR  
 KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQL  
 YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM  
 KGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

(SEQ ID NO: 213)

**KL2B53 LH:**

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASL  
 HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGRLEIKGGSEGK  
 SSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGK  
 LEWVAISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLVRVED  
 SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMTVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP  
 EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQ  
 PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR  
 REEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG  
 KGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

(SEQ ID NO: 214)

**KL2B242 HL:**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYV

SGFTNYNPSLKS RVTL SLDP SRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFD PW  
 GQGT LVT VSSGGSEGKSSSGSGSESKSTGGSSYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGE  
 NYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYC  
 QAWDNSIVVFGGGTKLTVLTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL  
 DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  
 CRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPE  
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD  
 TYDALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 215)

**KL2B242 LH:**

SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKR P  
 SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGGSEGK  
 SSGSGSESKSTGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGL  
 EWIGRLYVSGFTNYNPSLKS RVTL SLDP SRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNY  
 WGWFD PWGQGT LVT VSSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD  
 FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR  
 FPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEM  
 GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT  
 YDALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 216)

**KL2B467 HL:**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIS  
 YDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAF  
 DYWGQGTQVTVSSGGSEGKSSSGSGSESKSTGGSQSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGD  
 NIGSKSVHWYQQKPGQAPV LVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEA  
 DYYCQVWDSSSDHPV VFGGGTKVTVTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG  
 AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT  
 QEEDGCSCRFP EEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DK  
 RRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG  
 LSTATKDTYDALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 217)

**KL2B467 LH:**

QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPV LVVYDNSDR  
 PSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPV VFGGGTKVTVGG S  
 EGKSSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSYYGMHWVRQA

PGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA  
 HLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSSTSTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGA  
 VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQ  
 EEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR  
 RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGL  
 STATKDTYDALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 218)

**KL2B494 HL:**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIG  
 GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLY  
 DGMDVWGQGTMTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSSSEL TQPPSVSVAPGQTARITC  
 GGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISRVEAG  
 DEADYYCQVWDSSSDHV VFGGGTKLTVLTSTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPA  
 AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPV  
 QTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV  
 LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGL  
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 219)

**KL2B494 LH:**

SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDR  
 PSGIPERFSGS NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHV VFGGGTKLTVLGGS  
 EGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSHYAMSWVRQA  
 PGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA  
 KPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMTVTVSSTSTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPA  
 AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPV  
 QTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV  
 LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGL  
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 220)

T-клетки CD3/CD28, стимулированные с помощью Dynabeads Human T-Expander, подвергают электропорации, затем три раза промывают средой OPTI-MEM (Invitrogen) и повторно суспендируют в OPTI-MEM в конечной концентрации 50Е6/мл. Затем 0,1 мл клеток (5Е6) смешивали с 10 мкг РНК, кодирующей IVT CAR, и подвергали электропорации в 2-мм кювете Gap (Harvard Apparatus BTX, Holliston, MA, США) с использованием BTX ECM830 (Harvard Apparatus BTX, Holliston, MA, США) однократным нажатием кнопки импульса. (Настройки: 500 вольт, длина импульса 750 мкс

и один (1) импульс, интервал 100 мс). После электропорации Т-клетки переносят в 6-луночный планшет и немедленно возвращают в инкубатор при 37 °С. Первичные человеческие Т-клетки подвергали электропорации без мРНК (контроль) или в присутствии 10 мкг мРНК для экспрессии или scFv CAR к hK2, или нерелевантного контрольного CAR. Через сутки после электропорации экспрессию CAR на поверхности клеток измеряют с помощью проточной цитометрии после окрашивания с помощью 2 мкг/мл биотинилированного L-белка и конъюгированного со стрептавидином PE или 1 мкг/мл биотинилированного hK2 (1 мкг/мл) и конъюгированного со стрептавидином PE.

Через сутки после электропорации проводят подсчет Т-клеток. 1E5Т-клетки собирают для каждого исследования. Клетки дважды промывают буфером FACS в количестве 200 мкл/лунка на микротитрационном планшете, причем супернатант отбрасывают. Все лунки окрашивают с помощью 100 мкл буфера для окрашивания, содержащего белок L (Genscript, кат. № M000971:500; 2 мкг/мл), инкубируют в течение по меньшей мере 30 минут при 4 °С в защищенном от света месте. Клетки промывают дважды путем добавления буферного раствора FACS, используя 150 мкл/лунку для микротитрационного планшета с помощью буфера FACS. Центрифугирование при 400 x g проводят в течение 4 минут при комнатной температуре. Далее супернатанты выбрасывают. Все лунки окрашивают с помощью 100 мкл Streptavidin-R-Phycoerythrin (SA-PE; 1:25 0) и красителем для дифференциации живых/мертвых фиксированных клеток в ближнем ИК-диапазоне (1:10 00), инкубируют в течение по меньшей мере 30 минут при 4 °С при защите от света. После этого клетки готовы для анализа методом проточной цитометрии.

Окрашивание белка L наблюдается для hK2 CAR, тогда как только фоновое окрашивание (~ 5,5%) наблюдается в контрольных Т-клетках, которые были Т-клетками без электропорации мРНК. Экспрессия CAR на первичных человеческих Т-клетках также может быть обнаружена с помощью внутреннего рекомбинантного белка KLK2, меченного биотином J&J, с последующим SA-PE. Как показано, Т-клетки эффективно экспрессируют hK2 CAR, как было измерено методом проточной цитометрии, тогда как в контрольных Т-клетках, которые были Т-клетками без электропорации с мРНК или неописанными контрольными CAR (не hK2), наблюдали только фоновое окрашивание.

#### **Пример 21: Уничтожение опухолевых клеток с помощью hK2 CAR-Т-клеток**

Совместное культивирование для CellTrace Violet (CTV, Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу: C34557); анализ цитотоксичности методом проточной цитометрии проводится следующим образом.

Т-клетки подготавливают следующим образом. Через двадцать четыре часа после ЭП Т-клетки подсчитывают и повторно суспендируют в концентрации, необходимой для наиболее концентрированного/желаемого соотношения Е : Т. Т-клетки добавляют в концентрации 100 мкл/лунку для анализа ( $2 \times 10^6$  клеток/мл; высевали 100 мкл с соотношением Е : Т 10 : 1, т. е., 2E5 Т-клеток на 2E4 клеток-мишеней). Готовят маточный раствор с концентрацией Е : Т 10 : 1 и двукратные последовательные разведения в полной

среде для Т-клеток (Optimizer w/CTS, 5% сыворотка человека, 1% GlutaMax) до 0,3125 : 1. Т-клетки высевают (100 мкл/лунка) в трех повторностях в обработанный 96-луночный круглодонный планшет для культур тканей.

Меченые CTV клетки-мишени получают следующим образом. 20 мкл DMSO добавляют во флакон с раствором для окрашивания CTV. Этот исходный раствор разводят 20 мл PBS (нагретым до 37 °С) для получения 5 мкМ окрашивающего раствора. Собирают 10Е6 опухолевых клеток, дважды промывают PBS и повторно суспендируют в количестве 4Е6/мл (2,5 мл). Добавляют равный объем (2,5 мл) раствора для окрашивания CTV. Клетки инкубируют в течение 20 минут в инкубаторе при 37 °С. В клетки добавляют 40 мкл RPMI+20% ФБС для абсорбции любого несвязанного красителя. Далее клетки инкубируют в течение 5 минут. Клетки центрифугируют в течение 5 минут при 400 x g. Клеточный осадок повторно суспендируют в предварительно нагретом RPMI+10% ФБС. Тем временем Т-клетки высевают при желаемом соотношении Е/Т, описанном выше. Линии опухолевых клеток hK2+ и hK2- повторно подсчитывают, а затем клетки повторно суспендируют в количестве 2Е5/мл и в объеме 100 мкл в двух повторностях. Клетки совместно инкубируют с мечеными линиями опухолевых клеток в 96-луночном планшете с плоским дном.

Анализ цитотоксичности проводят методом проточной цитометрии следующим образом. Через 20 часов совместного культивирования все клетки переносят в 96-луночный планшет с U-образным дном и промывают. Через 20 часов совместного культивирования все клетки собирают из 96-луночного планшета с плоским дном и переносят в 96-луночный планшет с U-образным дном, а затем промывают. 30 мкл 0,25% трипсина добавляют во все лунки и инкубируют в течение 5 минут в инкубаторе при 37 °С. Через 5 минут все опухолевые клетки собирают в 96-луночный планшет с U-образным дном. Клетки дважды центрифугируют и промывают в течение 5 минут при 400 x g. Затем клеточный осадок повторно суспендируют в разбавленном (1 : 1000) красителе для дифференциации живых и мертвых клеток LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR (100 мкл). Клетки инкубируют в течение 30 мин при 4 °С и промывают буфером FACS дважды путем центрифугирования клеток в течение 5 минут при 400 x g. После промывки все клетки фиксируют в течение 10 минут с использованием 100 мкл фиксирующего буфера BD Cytotfix™ (50 мкл буфера FACS+50 мкл фиксирующего буфера). Клетки один раз центрифугируют и промывают в течение 5 минут при 400 x g. Клеточный осадок повторно суспендируют в буфере FACS. Окрашенные образцы анализируют с помощью многоцветной проточной цитометрии после завершения периода инкубации. Процент цитотоксической активности рассчитывают с использованием следующего уравнения:

$$\% \text{ удельной смерти} = \% \text{ окрашивания Near IR+CTV} + (\text{мертвые}) \text{ клетки} - \% \text{ спонтанного окрашивания Near IR+CTV} + / (100\% - \% \text{ спонтанного окрашивания Near IR+CTV} + (\text{мертвые}) \text{ клетки}) \times 100\%$$

Через сутки после временной трансфекции клетки-мишени (hK2-положительные VCar и hK2-отрицательные клетки DU145) метят флуоресцентным красителем Cell Trace

Violet (CTV) и затем совместно культивируют с CAR-T-клетками hK2. Контрольные T-клетки служат отрицательным контролем эффектора. Клетки совместно культивируют в течение 20 часов при соотношении эффектор/мишень (E/T) в диапазоне от 0,3125 до 10:1. Процент уничтожения измеряют как отношение абсолютного числа живых (отрицательных по окрашиванию для оценки жизнеспособности клеток) (CTV-положительных) клеток-мишеней, оставшихся в совместной культуре, к числу живых клеток-мишеней, культивированных без CAR-T-клеток. Как было показано, hK2 CAR-T-клетки специфически и эффективно лизируют клеточные линии hK2(+) рака человека, но не hK2(-) клетки при соотношении E/T от 10 : 1 до 0,3125 : 1, тогда как в T-клетках, которые представляли собой контроль CAR или hK2 CAR, наблюдается только фоновая цитотоксичность.

hK2 CAR-T-клетки также тестируют на цитотоксичность в реальном времени с использованием системы xCELLigence в качестве системы анализа клеток в реальном времени для оценки активности, опосредованной иммунными клетками цитолиза клеток-мишеней.

В каждую лунку 96-луночных планшетов E-plate (ACEA Biosciences) добавляют 50 мкл среды для культивирования клеток-мишеней (ACEA Biosciences), а фоновое значение импеданса измеряют и выражают как клеточный индекс. Затем прикрепленные клетки-мишени hK2(+) и hK2(-) диссоциируют и высевают с плотностью  $5 \times 10^4$  (VCap),  $5 \times 10^3$  клеток/лунку E-планшета в объеме 100 мкл и оставляли пассивно адгезироваться к поверхности электрода. После посева E-планшет выдерживают при температуре окружающей среды в ламинарном шкафу в течение 30 минут, а затем переносят в устройство RTCA MP внутри инкубатора для культивирования клеток. Запись данных начинают немедленно и ведут ее на протяжении всего эксперимента (96 часов) с 15-минутными интервалами.

Во время обработки (в течение 24 ч после посева раковых клеток) сбор данных приостанавливают, 50 мкл среды удаляют из каждой лунки, а эффекторные CAR-T-клетки добавляют в различных соотношениях эффектор/мишень (E:T) в объеме 50 мкл. CAR-T-клетки hK2(+) и неописанные контрольные CAR (не hK2-специфические) T-клетки снова суспендируют. Затем готовят двукратные разведения в 96-луночном планшете в двух повторностях (соотношение E/T от 5 : 1 до 0,156 : 1). К клеткам-мишеням также добавляют контроли мишени плюс эффектора (T-клетки, не подвергавшиеся электропорации с РНК).

Клетки-мишени hK2(+) и hK2(-) инкубировали с контролем, hK2(+) и hK2(-) CAR-T-клетки после электропорации с 10 мкг мРНК (через 24 часа после трансфекции) при различных соотношениях E/T в течение приблизительно 72 часов. Создают графики нормализованного клеточного индекса (CI) для hK2(+) и hK2(-). При засеивании отдельно клетки-мишени, прикрепленные к планшету и пролиферируемые, увеличивали показание CI.

#### **Пример 22: Продукция цитокинов hK2 CAR-T-клетками**

IFN- $\gamma$ , продуцируемый цитотоксическими Т-клетками, обеспечивает возможность применения иммунного надзора над опухолями, что позволяет непосредственно ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз некоторых злокачественных новообразований *in vivo* и *in vitro*. Для определения способности hK2 CAR-T-клеток распознавать и активировать опухолевые клетки hK2 (+) собирают супернатант анализа уничтожения клеток с использованием системы xCELLigence, как описано в примере 21. После около 70 часов совместного культивирования супернатант собирали и анализировали с помощью твердофазного ИФА в соответствии с указаниями к набору для ИФА (IFN- $\gamma$  ELISA MAX™ Deluxe, BioLegend, кат. № 430106).

Происходит продукция IFN- $\gamma$  антиген-стимулированными CAR-T-клетками. hK2 CAR и контрольные CAR-T клетки секретировали IFN- $\gamma$  во время совместного культивирования с клетками, экспрессирующими hK2, в зависимости от соотношения E:T, но не во время совместного культивирования с hK2-отрицательными клетками. Неописанный контрольный CAR секретировал гораздо большее количество IFN- $\gamma$  из-за гораздо более высокого уровня экспрессии антигена, чем у hK2.

#### **Пример 21: Уничтожение опухолевых клеток с помощью hK2 CAR-T-клеток**

Подсчет hK2 CAR-T-клеток проводят в анализе уничтожения опухолей в реальном времени с помощью системы визуализации IncuCyte на предмет антигензависимой цитотоксичности. CAR-T-клетки hK2 совместно инкубируют с клетками-мишенями в течение 88 часов при соотношении эффектор:мишень 1:1 или 0,5:1, которое рассчитывали на основе данных экспрессии CAR. Идентифицируют клетки-мишени, которые стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, что измеряется системой визуализации IncuCyte в режиме реального времени. Выполняют следующий расчет. Ингибирование роста опухолевых клеток (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток\*100 (%).

#### **Пример 22: Продукция цитокинов hK2 CAR-T-клетками**

Супернатант собирали после совместного культивирования в течение ночи (приблизительно 20 часов) hK2 CAR-T-клеток с клетками при соотношении E/T, равном 1 : 1, анализировали с использованием набора 13-plex Milliplex Human High Sensitivity T cell (HSTCMAG28SPMX13). hK2 CAR-модифицированные Т-клетки секретировали цитокины во время совместного культивирования с клетками, экспрессирующими hK2, но секреция была минимальной при использовании нетрансдуцированных Т-клеток (UTD). Результаты высвобождения цитокинов CAR-T-клетками hK2.

Супернатант собирали после совместного культивирования в течение ночи (приблизительно 20 часов) hK2 CAR-T-клеток с клетками при соотношении 1:1 E/T. hK2 CAR-T-клетки секретировали IFN- $\gamma$  во время совместного культивирования с клетками, экспрессирующими hK2, чего не происходило при совместном культивировании с hK2-отрицательными клетками. В качестве положительного и отрицательного контролей использовались Т-клетки, стимулированные микроносителями CD3/CD28, и только Т-

клетки, соответственно. Высвобождение IFN- $\gamma$  hK2 CAR-T-клетками. Показана средняя концентрация IFN- $\gamma$   $\pm$  SD (пг/мл) для культур при повторных измерениях. Различные термически стабилизированные CAR-T-клетки продуцировали разное количество IFN- $\gamma$  при совместном культивировании с клетками hK2 (+).

### **Пример 23: Пролиферация hK2 CAR-T-клеток**

hK2 CAR-T-клетки оценивают в анализе пролиферации. Пролиферация Т-клеток является важным *in vitro* параметром иммунной функции *in vivo*. Для дополнительной оценки функции hK2 CAR-T-клеток их метят CTV для оценки пролиферации Т-клеток.

hK2 CAR-T-клетки и нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки метят с помощью красителя CellTrace Violet (CTV; 5 мкМ) и совместно культивируют с hK2-положительными клетками и hK2-отрицательными клетками. Через пять дней после совместного культивирования клетки собирают и окрашивают с помощью CD3, CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток в ближней ИК-области (NearIR live/dead Dye) и hK2 CAR. Анализ методом проточной цитометрии проводят на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением FlowJo. Лимфоциты идентифицируют с помощью живых CD3, и определяют частоты CAR-T-клеток с помощью разведения красителя CTV и маркера активации CD25. Путем гейтирования на hK2 CAR+ Т-клетках показано, что клетки hK2 (+), но не клетки hK2 (-), стимулируют все конструкции CAR. В качестве положительного и отрицательного контролей используются Т-клетки, стимулированные микроносителями CD3/CD28, и только Т-клетки, соответственно. Т-клетки без какой-либо стимуляции не пролиферируют, и стимулированные микроносителями CD3/28 Т-клетки демонстрировали эквивалентную модель пролиферации. hK2 CAR-T-клетки пролиферировали более устойчиво, чем положительный контроль с микроносителями CD3/28, после 5 дней совместного культивирования с клетками. Т-клетки, сконструированные с помощью различных конструкций CAR, имеют другую активность пролиферации и демонстрировали различные количества CAR-положительных Т-клеток. Количество CAR-T-клеток получают на основании среднего значения абсолютного количества клеток  $\pm$  SEM из трех технических повторов.

Протокол выполняется следующим образом. Опухолевые клетки собирают, дважды промывают PBS и повторно суспендируют в количестве  $10E6$ /мл в PBS, содержащем 100 мкг/мл митомицина С (ММС), в течение 1,5 часов в инкубаторе при 37 °С, чтобы блокировать пролиферацию опухолевых клеток. 20 мкл DMSO добавляют во флакон раствора для окрашивания CTV. 5 мкл раствора разводят 5 мл (1:1000) PBS (нагретым до 37 °С) для получения 5 мкМ раствора для окрашивания.  $2E6$  Т-клетки подсчитывают, собирают, дважды промывают PBS и повторно суспендируют в количестве  $4E6$ /мл (0,5 мл). Добавляют равный объем (0,5 мл) раствора для окрашивания CTV. Клетки инкубируют в течение 20 минут при 37 °С. Затем в клетки добавляют 4 мл PRMI+20% ФБС для абсорбции любого несвязанного красителя. Клетки инкубируют в течение 5 минут и центрифугируют 5 минут при 400 x g. Клеточный осадок повторно

суспендируют в предварительно нагретом RPMI+10% ФБС. Проводят подсчет Т-клеток, а 1Е5 клетки (100 мкл) высевают в 96-луночные планшеты с плоским дном.

В то же время опухолевые клетки, обработанные ММС, собирают и подсчитывают через 1,5 часа, а затем повторно суспендируют при 1Е6/мл. 1Е5 клеток (100 мкл) культивируют с Т-клетками в 96-луночном планшете. В качестве отрицательных и положительных контролей используются только Т-клетки и Т-клетки с добавленными микроносителями CD3/28 при соотношении микроносителей к клеткам 3 : 1.

Через 5 дней совместного культивирования собирают все клетки из каждой лунки. Клетки дважды центрифугируют и промывают в течение 5 минут при 400 x g, затем окрашивают с помощью hK2, CD3, CD8 и CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток (ближний ИК) в 96-луночном планшете с U-образным дном. После промывки все клетки фиксируют в течение 10 минут с использованием 100 мкл буфера для фиксации BD Cytofix™ (50 мкл буфера FACS+50 мкл буфера для фиксации). Окрашенные образцы анализируют с помощью многоцветной проточной цитометрии после завершения периода инкубации.

Анализ данных выполняют следующим образом. Получают гистограмму CTV. Неразбавленный гейт CTV установлен таким образом, чтобы охватить крайний правый пик (CTV bright) Т-клеток, культивируемых отдельно, и разбавленный гейт CTV для захвата остальной части популяции. Это применяют ко всем образцам.

**Пример 24: Определение характеристик CAR-T-клеток, трансдуцированных различными конструктами, описанными в настоящем документе.**

Полученные CAR-T-клетки оценивают в анализе JNL-репортера на предмет антигензависимой активности. Вкратце, клетки Jurkat, содержащие ген люциферазы, активируемый сигнальным промотором NFAT (называемые клетками JNL), трансдуцируют любым конструктом, содержащим одну или несколько последовательностей нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 153-160, 161-168, 195-204, 320-325, 326-331 и 336-339.

В альтернативном варианте осуществления конструкт может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую



вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 318, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 317.

Экспрессию каждого CAR определяют с помощью биотинилированного hK2, а затем конъюгированного со стрептавидином PE.

Связывание между конструктором hK2 CAR и распознаваемым им клеточным антигеном (hK2 на клетках-мишенях) приводит к экспрессии люциферазы в клетках JNL. С этой целью клетки JNL, трансдуцированные тестируемыми конструкторами CAR, или нетрансдуцированные клетки JNL (UTD) совместно культивируют с линиями опухолевых клеток-мишеней, и определяют активность люциферазы по интенсивности люминесценции. Конструкторы считают активными, когда интенсивность люминесценции в присутствии экспрессирующих антиген клеток превышает уровень UTD-клеток в 1,5 раза.

#### **CAR-T-клетки опосредуют уничтожение опухолевых клеток антигензависимым образом**

CAR-T-клетки, трансдуцированные CAR17, CAR18, CAR19 и CAR20, совместно инкубируют с hK2-положительными клетками и hK2-отрицательными клетками в течение 96 часов при соотношении эффектор/мишень (E : T) 1 : 1 или 0,5 : 1, которое рассчитывают на основании экспрессии CAR на T-клетках. Клетки-мишени стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, который измеряют с помощью системы визуализации IncuCyte в режиме реального времени. Ингибирование роста опухолевых клеток (TGI) (%)=(исходное число жизнеспособных клеток-мишеней - текущее число жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное число жизнеспособных клеток\*100 (%). Исследуемые CAR-T-клетки достигают приблизительно 100% ингибирования роста опухоли (TGI), тогда как нетрансдуцированный контроль не демонстрирует какого-либо TGI. В отношении исследуемых CAR-T-клеток в hK2-отрицательных клетках TGI может не наблюдаться.

#### **CAR-T-клетки продуцируют цитокины при антиген-зависимой стимуляции**

IFN- $\gamma$ , продуцируемый цитотоксическими T-клетками, имеет решающее значение

для обеспечения иммунного надзора над опухолями, что может непосредственно ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз некоторых злокачественных новообразований *in vivo* и *in vitro*. Для определения способности hK2 CAR-модифицированных человеческих Т-клеток распознавать и активироваться с помощью hK2-положительных опухолевых клеток первичные Т-клетки, трансдуцированные указанными клонами CAR, совместно культивировали с линиями клеток-мишеней, а супернатант собирали для измерения концентрации IFN- $\gamma$ . CAR-Т-клетки, трансдуцированные клетками hK2 CAR, секретировали IFN- $\gamma$  во время совместного культивирования с клетками LNCap, рекомбинантно экспрессирующими hK2 клетками, а также во время совместного культивирования с клетками с очень низкой экспрессией hK2, чего не отмечалось с hK2-отрицательными клетками.

#### **CAR-Т-клетки активируют и повышают активность маркеров дегрануляции антигензависимым образом**

Опухолевые клетки могут быть распознаны и уничтожены цитотоксическими лимфоцитами, такими как CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты и натуральные киллеры(NK), в основном посредством иммунной секреции литических гранул, которые уничтожают опухолевые клетки-мишени. Этот процесс включает в себя слияние мембраны гранул с цитоплазматической мембраной иммунной эффекторной клетки, что приводит к выходу на поверхность лисосомальных белков, которые обычно присутствуют на липидных бислоях, окружающих литические гранулы, такие как CD107a. Таким образом, экспрессия мембраны CD107a представляют собой маркер активации иммунных клеток и цитотоксической дегрануляции.

Анализ дегрануляции проводят так, как описано ниже. Клетки-мишени ( $5 \times 10^4$ ) совместно культивируют с равным количеством эффекторных клеток в 0,1 мл на лунку в 96-луночном планшете. Контрольные лунки содержали только Т-клетки. Антитела к CD107a (5 мкл на лунку) добавляют в дополнение к 1 мкл/образец монензина (BD Biosciences) и инкубируют в течение 4 часов при 37 °С. Клетки дважды промывают PBS, окрашивают для экспрессии CAR, CD3 и CD8 hK2 и анализируют на проточном цитометре BD Fortessa.

#### **hK2 CAR-Т-клетки пролиферируют антигензависимым образом**

CAR-Т-клетки оценивают на предмет их пролиферации с использованием протокола анализа пролиферации Т-клеток, описанного в примере 23. hK2 CAR-Т-клетки и нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки метят CellTrace Violet (CTV; 5 $\mu$ M) и совместно культивируют с hK2-положительными и hK2-отрицательными клетками. Через пять дней после совместного культивирования клетки собирают и окрашивают с помощью CD3, CD25, красителя для дифференциации живых/мертвых клеток (NearIR live/dead Dye) и hK2 CAR. Анализ методом проточной цитометрии проводят на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением Flowjo. Лимфоциты идентифицируют с помощью живых CD3, и определяют частоты CAR-Т-клеток с помощью разведения красителя CTV и маркера активации CD25. Процент пролиферирующих Т-клеток и Т-клеток,

экспрессирующих CD25, рассчитывают по среднему абсолютному числу клеток +/- SEM после двух повторений.

Содержание всех патентов, опубликованных заявок и ссылок полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Хотя были показаны и описаны примеры осуществления, специалистам в данной области будет понятно, что возможно внесение различных изменений в форме и содержании без отступления от объема вариантов осуществления, включенных в прилагаемую формулу изобретения.

**ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

**SEQ ID NO: 1 - VL 1 (LCD6)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 2 - VL 2 (LCHumanized)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 3 - VL 3 (LCB7)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 4 - VH 1 (HCG5)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGKGLEWMGYISY  
SGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLV  
TVSS

**SEQ ID NO: 5 - VH 2 (HCHumanized)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYS  
GSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLV  
TVSS

**SEQ ID NO: 6 - VH 3 (HCF3)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGKGLEWIGYISYS  
GSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLV  
VSS

**SEQ ID NO: 7 - линкерная последовательность**

GGSEGKSSGSGSESKSTGGS

**SEQ ID NO: 8 - scFV 1 (HL HCG5 LCD6 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGKGLEWMGYISY  
SGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLV  
TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR  
KVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 9 - scFV 2 (HL HCG5 LCHumanized 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGKGLEWMGYISY

SGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYYGSGFWGQGLTV  
 TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
 HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTR  
 KVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 10 - scFV 3 (HL HCF3 LCB7 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGKGLEWIGYISYS  
 GSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYYGSGFWGQGLTV  
 VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMH  
 WYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRK  
 VPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 11 - scFV 4 (HL HCG5 LCB7 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGKGLEWMGYISY  
 SGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYYGSGFWGQGLTV  
 TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
 HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTR  
 KVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 12 - scFV 5 (LH LCD6 HCG5 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGK  
 GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYYG  
 SGFWGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 13 - scFV 6 (LH LCHumanized HCF3 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGK  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYYG  
 GFWGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 14 - scFV 7 (LH LCHumanized HCG5 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGK  
 GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYYG  
 SGFWGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 15 - scFV 8 (LH LCB7 HCF3 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGK  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYYG  
 GFWGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 16 - scFV 9 (LH LCB7 HCG5 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPKG  
 GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG  
 SGFWGQGTLLVTVSS

**SEQ ID NO: 17 - scFV 10 (LH LCD6 HCF3 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPKG  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGS  
 GFWGQGTLLVTVSS

**SEQ ID NO: 18 - scFV 11 (HL HCHumanized LCB7 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISY  
 GSTTYNPSLKSRTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDVAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLLV  
 TVSSGGSEGKSSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
 HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTR  
 KVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 19 - scFV 12 (HL HCHumanized LCD6 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISY  
 GSTTYNPSLKSRTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDVAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLLV  
 TVSSGGSEGKSSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
 HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR  
 KVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 20 - scFV 13 (HL HCHumanized LCHumanized 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISY  
 GSTTYNPSLKSRTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDVAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLLV  
 TVSSGGSEGKSSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
 HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTR  
 KVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 21 - scFV 14 (LH LCD6 HCHumanized 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGK  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDVAVYYCATGYYYG  
 SGFWGQGTLLVTVSS

**SEQ ID NO: 22 - scFV 15 (LH LCHumanized HCHumanized 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGK

GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RVVTMSRDT SKNQFSLKLSSVTA VDTAVYYCATGYYYG  
SGFWGQGTLVTVSS

**SEQ ID NO: 23 - scFV 16 (LH LCB7 HCHumanized 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQPPGK  
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RVVTMSRDT SKNQFSLKLSSVTA VDTAVYYCATGYYYG  
SGFWGQGTLVTVSS

**SEQ ID NO: 24 - Сигнальная последовательность**

MAWVWTLFLMAAAQSIQA

**SEQ ID NO: 25 - шарнир CD8a**

TSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

**SEQ ID NO: 26 - CD8a-TM**

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

**SEQ ID NO: 27 - CD137**

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

**SEQ ID NO: 28 - CD3zeta**

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRK  
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
LPPR

**SEQ ID NO: 29 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 1  
(HL HCG5 LCD6 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWMGYISY  
SGSTTYNPSLKS RVVTISRDT SKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGT  
LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGS DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT  
SLMHWYQQKPGQPPKLLIY AASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFC  
QQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 30 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 2  
(HL HCG5 LCHumanized 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWMGYISY  
SGSTTYNPSLKS RVVTISRDT SKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGT  
LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGS DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT  
SLMHWYQQKPGQPPKLLIY AASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYC  
QQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 31 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 3  
(HL HCF3 LCB7 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFPGKGLEWIGYISY  
GSTTYNPSLKS RVVTISRDT SKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGT  
LVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGS DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGT  
SLMHWYQQKPGQPPKLLIY AASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYC  
QQTRK

VPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 32 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 4**  
**(HL HCG5 LCB7 20AA)**

QVQLQESGPGGLVKPSDLSLTCVSGNSITSDYAWNWRQFPGKGLEWMGYISY  
 SGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGT  
 TVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGGLVKPSDLSLTCVSGNSITSDYAWNWRQFPGK  
 HWWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTR  
 KVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 33 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 5**  
**(LH LCD6 HCG5 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGGLVKPSDLSLTCVSGNSITSDYAWNWRQFPGK  
 GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG  
 SGFWGQGTSLTVSS

**SEQ ID NO: 34 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 6**  
**(LH LCHumanized HCF3 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGGLVKPSDLSLTCVSGNSITSDYAWNWRQFPGK  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG  
 GFWGQGTSLTVSS

**SEQ ID NO: 35 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 7**  
**(LH LCHumanized HCG5 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGGLVKPSDLSLTCVSGNSITSDYAWNWRQFPGK  
 GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG  
 SGFWGQGTSLTVSS

**SEQ ID NO: 36 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 8**  
**(LH LCB7 HCF3 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGGLVKPSDLSLTCVSGNSITSDYAWNWRQFPGK  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG  
 GFWGQGTSLTVSS

**SEQ ID NO: 37 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 9**  
**(LH LCB7 HCG5 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE

GKSSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFP GK  
GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG  
SGFWGQGTLVTVSS

**SEQ ID NO: 38 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 10**  
**(LH LCD6 HCF3 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
GKSSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFP GK  
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGS  
GFWGQGTLVTVSS

**SEQ ID NO: 39 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 11**  
**(HL HCHumanized LCB7 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYS  
GSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGT LV  
TVSSGGSEKSSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQQTR  
KVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 40 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 12**  
**(HL HCHumanized LCD6 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYS  
GSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGT LV  
TVSSGGSEKSSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR  
KVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 41 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 13**  
**(HL HCHumanized LCHumanized 20AA)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYS  
GSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGT LV  
TVSSGGSEKSSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTR  
KVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 42 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 14**  
**(LH LCD6 HCHumanized 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
GKSSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPP GK  
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYG  
SGFWGQGTLVTVSS

**SEQ ID NO: 43 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 15**  
**(LH LCHumanized HCHumanized 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRIRQPPGK  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYG  
 SGFWGQGTTLVTVSS

**SEQ ID NO: 44-Внеклеточный антигенсвязывающий домен 16  
 (LH LCB7 HСгуманиза 20AA)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRIRQPPGK  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYG  
 SGFWGQGTTLVTVSS

**SEQ ID NO: 45 - Внутриклеточный сигнальный домен**

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY  
 KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE  
 AYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

**SEQ ID NO: 46 - CAR 1 (HL HCG5 LCD6 20AA; pDR000083431)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRIRQFPGKGLEWMGYISY  
 SGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV  
 TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
 HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQR  
 KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE  
 GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRK  
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
 LPPR

**SEQ ID NO: 47 - CAR 2 (HL HCG5 LCHumanized 20AA; pDR000083432)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRIRQFPGKGLEWMGYISY  
 SGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV  
 TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
 HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTR  
 KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE  
 GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRK  
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
 LPPR

**SEQ ID NO: 48 - CAR 3 (HL HCF3 LCB7 20AA; pDR000083436)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRIRQFPGKGLEWIGYISY  
 GSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV  
 VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMH

WYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRK  
 VPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG  
 GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKN  
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP  
 PR

**SEQ ID NO: 49 - CAR 4 (HL HCG5 LCB7 20AA; pDR000083437)**

QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGKGLEWMGYISY  
 SGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV  
 TVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
 HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTR  
 KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG  
 GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRK  
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
 LPPR

**SEQ ID NO: 50 - CAR 5 (LH LCD6 HCG5 20AA; pDR000083438)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGK  
 GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG  
 SGFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG  
 GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRK  
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
 LPPR

**SEQ ID NO: 51 - CAR 6 (LH LCHumanized HCF3 20AA; pDR000083440)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGK  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGS  
 GFWGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG  
 GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKN  
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP  
 PR

**SEQ ID NO: 52 - CAR 7 (LH LCHumanized HCG5 20AA; pDR000083441)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQFPGK

GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKS RV TISRDT SKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG  
SGFWGQGT LVTVSSTSTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE  
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRK  
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
LPPR

**SEQ ID NO: 53 - CAR 8 (LH LCB7 HCF3 20AA; pDR000083443)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQRTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
GKSSSGSGSESKSTGGSQVQLQESG PGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFP GK  
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RV TISRDT SKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGS  
GFWGQGT LVTVSSTSTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG  
GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKN  
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP  
PR

**SEQ ID NO: 54 - CAR 9 (LH LCB7 HCG5 20AA; pDR000083444)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQRTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
GKSSSGSGSESKSTGGSQVQLQESG PGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFP GK  
GLEWMGYISYSGSTTYNPSLKS RV TISRDT SKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYG  
SGFWGQGT LVTVSSTSTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE  
GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRK  
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
LPPR

**SEQ ID NO: 55 - CAR 10 (LH LCD6 HCF3 20AA; pDR000083446)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT IQSVQAEDVSVYFCQQRTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
GKSSSGSGSESKSTGGSQVQLQESG PGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQFP GK  
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RV TISRDT SKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGS  
GFWGQGT LVTVSSTSTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG  
GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKN  
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP  
PR

**SEQ ID NO: 56 - CAR 11 (HL HCHumanized LCB7 20AA; pDR000083433)**

QVQLQESG PGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWN WIRQPPGK GLEWIGYISY  
GSTTYNPSLKS RV TMSRDT SKNQFSLKLSSVTA VDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGT L  
TVSSGGSEGKSSSGSGSESKSTGGS DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM

HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTR  
 KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE  
 GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRK  
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
 LPPR

**SEQ ID NO: 57 - CAR 12 (HL HCHumanized LCD6 20AA; pDR000083434)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYS  
 GSTTYNPSLKSrvTMSRDTsknQfSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV  
 TVSSGGSEgkSSGSGSESKSTGGSdivLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
 HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR  
 KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE  
 GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRK  
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
 LPPR

**SEQ ID NO: 58 - CAR 13 (HL HCHumanized LCHumanized 20AA; pDR000083435)**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYS  
 GSTTYNPSLKSrvTMSRDTsknQfSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLV  
 TVSSGGSEgkSSGSGSESKSTGGSdivLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLM  
 HWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTR  
 KVPYTFGQGTKLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE  
 GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRK  
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
 LPPR

**SEQ ID NO: 59 - CAR 14 (LH LCD6 HCHumanized 20AA; pDR000083439)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGK  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSrvTMSRDTsknQfSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYG  
 SGFWGQGTLVTVSSSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE  
 GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRK  
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
 LPPR

**SEQ ID NO: 60 - CAR 15 (LH LCHumanized HCHumanized 20AA; pDR000083442)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA

SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGK  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTVMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYG  
 SGFWGQGTLLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE  
 GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKPRRK  
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
 LPPR

**SEQ ID NO: 61 - CAR 16 (LH LCB7 HCHumanized 20AA; pDR000083445)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKGGSE  
 GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDLSLTCAVSGNSITSDYAWNWRQPPGK  
 GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTVMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYG  
 SGFWGQGTLLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE  
 GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKPRRK  
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
 LPPR

**SEQ ID NO: 62 - последовательность человеческого калликрина-2  
 (сигнальная последовательность: аминокислоты 1-18)**

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGG  
 VLVHPQWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRPVSHSFPHPLYNMSLLKHQ  
 SLRPDEDSSHDMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLRPRS  
 LQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCCGGDSGGPLVCNGVLQGIT  
 SWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKKWIKDTIAANP

**SEQ ID NO: 63 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

SDYAWN

**SEQ ID NO: 64 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

YISYSGSTTYSPSLKS

**SEQ ID NO: 65 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

YISYSGSTTYNPSLKS

**SEQ ID NO: 66 - последовательность CDR3 тяжелой цепи**

GYYYGSGF

**SEQ ID NO: 67 - последовательность CDR1 легкой цепи**

RASESVEYFGTSLMH

**SEQ ID NO: 68 - последовательность CDR1 легкой цепи**

KASESVEYFGTSLMH

**SEQ ID NO: 69 - последовательность CDR2 легкой цепи**

AASNVES

**SEQ ID NO: 70 - последовательность CDR2 легкой цепи**

AASNRES

**SEQ ID NO: 71 - последовательность CDR3 легкой цепи**

QQTRKVPYT

**SEQ ID NO: 72 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

GNSITSDYAWN

**SEQ ID NO: 73 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

YISYSGSTT

**SEQ ID NO: 74 - VL 4 (KL2B413)**

EIVLTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQS  
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK

**SEQ ID NO: 75 - VL 5 (KL2B359)**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPRLLIYAAS  
NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO: 76 - VH 4 (KL2B413)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQ  
DGSERYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTGHYG  
MDVWGQGTITVTVSS

**SEQ ID NO: 77 - VH 5 (KL2B359)**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWRQFPGKRLEWIGYISYS  
GSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTVT  
VSS

**SEQ ID NO: 78 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 17 (KL2B413 HL)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQ  
DGSERYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTGHYG  
MDVWGQGTITVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPSFLSASVGDRVITTCRAS  
QGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY  
CQQLNSYPRTFGQGTKVEIK

**SEQ ID NO: 79 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 18 (KL2B413 LH)**

EIVLTQSPSFLSASVGDRVITTCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQS  
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIKGGSEGKSSGS  
GSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWV  
ANIKQDGSERYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILT  
GHYGMVWGQGTITVTVSS

**SEQ ID NO: 80 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 19 (KL2B359-HL)**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWRQFPGKRLEWIGYISYS  
GSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTVT  
VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLM  
HWYQQKPGQPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYFCQQTRKVP  
YTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO: 81 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 20 (KL2B359-LH)**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS  
 NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGKVEIKGGSEGK  
 SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWRIRQFPGKRL  
 EWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGF  
 WGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 82 - CAR 17 (KL2B413 HL; pBD000091628)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQ  
 DGSERYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTGHYG  
 MDVWGQGTITVTVSSGGSEGKSSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPSFLSASVGDRTITCRAS  
 QGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYY  
 CQQLNSYPRTFGQGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD  
 FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
 PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPPEMGG  
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL  
 HMQALPPR

**SEQ ID NO: 83 - CAR 18 (KL2B413 LH; pBD000091623)**

EIVLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQS  
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIKGGSEGKSSGS  
 GSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWV  
 ANIKQDGSERYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILT  
 GHYGMVWGQGTITVTVSSSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD  
 FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
 PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPPEMGG  
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL  
 HMQALPPR

**SEQ ID NO: 84 - CAR 19 (KL2B359-HL; pBD000091576)**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWRIRQFPGKRLEWIGYISYS  
 GSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTVT  
 VSSGGSEGKSSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMH  
 WYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVP  
 YTFGGGKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW  
 APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGC  
 ELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPPEMGGKPRRKNPQ  
 EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

**SEQ ID NO: 85 - CAR 20 (KL2B359-LH; pBD000091577)**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS  
 NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGKVEIKGGSEGK  
 SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWRIRQFPGKRL  
 EWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGF  
 WGQGLTVTVSSSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW

APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC  
ELRVKFSRSADAPAYKQGQONQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKPRRKNPQ  
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

**SEQ ID NO: 86 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

GFTFSSYW

**SEQ ID NO: 87 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

IKQDGSER

**SEQ ID NO: 88 - последовательность CDR3 тяжелой цепи**

ARDQNYDILTGHYGMDV

**SEQ ID NO: 89 - последовательность CDR1 легкой цепи**

QGISSY

**SEQ ID NO: 90 - последовательность CDR2 легкой цепи**

ATS

**SEQ ID NO: 91 - последовательность CDR3 легкой цепи**

QQLNSYPRT

**SEQ ID NO: 92 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

GNSITSDYA

**SEQ ID NO: 93 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

ISYSGST

**SEQ ID NO: 94 - последовательность CDR3 тяжелой цепи**

ATGYYYGSGF

**SEQ ID NO: 95 - последовательность CDR1 легкой цепи**

ESVEYFGTSL

**SEQ ID NO: 96 - последовательность CDR2 легкой цепи**

AAS

**SEQ ID NO: 97 - последовательность CDR3 легкой цепи**

GGNNIGSKSVH

**SEQ ID NO: 98 - линкерная последовательность**

GTSGSSGSGSGGSGSGGGG

**SEQ ID NO: 99 - линкерная последовательность**

GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS

**SEQ ID NO: 100 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

YISYSGSTTYNPSLKS

**SEQ ID NO: 101 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

GNSITSDYAWN

**SEQ ID NO: 102 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

SYYS

**SEQ ID NO: 103 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

YIYYSGSTNYNPSLKS

**SEQ ID NO: 104 - последовательность CDR3 тяжелой цепи**

TTIFGVVTPNFYYGMDV

**SEQ ID NO: 105 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

GGSISSYYWS

**SEQ ID NO: 106 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

YIYYSGSTN

**SEQ ID NO: 107 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

SYDIH

**SEQ ID NO: 108 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

IISYDGSKKDYTDSVKG

**SEQ ID NO: 109 - последовательность CDR3 тяжелой цепи**

ESGWSHYYYGMDV

**SEQ ID NO: 110 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

GFTFSSYDIH

**SEQ ID NO: 111 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

IISYDGSKKD

**SEQ ID NO: 112 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

RLYVSGFTNYPNPSLKS

**SEQ ID NO: 113 - последовательность CDR3 тяжелой цепи**

DSGNYWGWFDP

**SEQ ID NO: 114 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

RLYVSGFTN

**SEQ ID NO: 115 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

YYGMH

**SEQ ID NO: 116 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

FISYDGSNKYYADSVKG

**SEQ ID NO: 117 - последовательность CDR3 тяжелой цепи**

LPYSGSYWAFDY

**SEQ ID NO: 118 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

GFTFSYY

**SEQ ID NO: 119 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

FISYDGSNKY

**SEQ ID NO: 120 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

HYAMS

**SEQ ID NO: 121 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

TIGGSGGSTYYADSVKG

**SEQ ID NO: 122 - последовательность CDR3 тяжелой цепи**

RHIVMVTALLYDGMDV

**SEQ ID NO: 123 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

GFTFSHYAMS

**SEQ ID NO: 124 - последовательность CDR3 тяжелой цепи**

TIGGSGGSTYY

**SEQ ID NO: 125 - последовательность CDR1 легкой цепи**

RASQDISNYLA

**SEQ ID NO: 126 - последовательность CDR2 легкой цепи**

AASNVES

**SEQ ID NO: 127 - последовательность CDR3 легкой цепи**

DDSDRPS

**SEQ ID NO: 128 - последовательность CDR1 легкой цепи**

RASQGISSYLA

**SEQ ID NO: 129 - последовательность CDR2 легкой цепи**

AATLQS

**SEQ ID NO: 130 - последовательность CDR3 легкой цепи**

QQLNSYPLT

**SEQ ID NO: 131 - последовательность CDR2 легкой цепи**

AATLHS

**SEQ ID NO: 132 - последовательность CDR3 легкой цепи**

QKYNAPYT

**SEQ ID NO: 133 - последовательность CDR1 легкой цепи**

SGDQLGENYAC

**SEQ ID NO: 134 - последовательность CDR2 легкой цепи**

QDSKRPS

**SEQ ID NO: 135 - последовательность CDR3 легкой цепи**

QAWDNSIVV

**SEQ ID NO: 136 - последовательность CDR1 легкой цепи**

GGDNIGSKSVH

**SEQ ID NO: 137 - последовательность CDR2 легкой цепи**

DNSDRPS

**SEQ ID NO: 138 - последовательность CDR3 легкой цепи**

QVWDSSSDHPVV

**SEQ ID NO: 139 - последовательность CDR3 легкой цепи**

QVWDSSSDHVV

**SEQ ID NO: 140 - VH (KL2B357, KL2B357 и KL2B360))**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYS  
GSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTVT  
VSS

**SEQ ID NO: 142 - VH (KL2B30)**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGS  
TNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVW  
GQGTTVTVSS

**SEQ ID NO: 143 - VH (KL2B53)**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYD  
GSKKDYTDVSKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSL RVED  
SAVYSCARESGW SHYYYYGMDVWGQGTMTVTVSS

**SEQ ID NO: 144 - VH (KL2B242)**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSG  
FTNYNPSLKS RVTLSDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGW FDPWGQG  
TLVTVSS

**SEQ ID NO: 145 - VH (KL2B467)**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISY  
DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDY  
WGQGTQVTVSS

**SEQ ID NO: 146 - VH (KL2B494)**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMS WVRQAPGKGLEWVSTIGG  
SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDG  
MDVWGQGTMTVTVSS

**SEQ ID NO: 147 - VL (KL2B357)**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK

**SEQ ID NO: 148 - VL (KL2B30)**

DIQMTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQS  
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK

**SEQ ID NO: 149 - VL (KL2B53)**

DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASTLH  
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYN SAPYTFGQGTREIK

**SEQ ID NO: 150 - VL (KL2B242)**

SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPS  
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL

**SEQ ID NO: 151 - VL (KL2B467)**

QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDNSDRP  
SGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFVFGGGTKVTV

**SEQ ID NO: 152 - VL (KL2B494)**

SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDSDSRP  
SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVFGGGTKLTVL

**SEQ ID NO: 153 - VH (KL2B357)**

CAGGTTCAAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGACCC  
TGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGA  
ACTGGATTCCGCAGTTCCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTACTCCG  
GTTCCACCACCTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGGTCACCATCTCCCGCGACACCT  
CCAAGAACCAGTCTCCCTGAAGCTGTCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGT  
ACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACAGGGCACACTGG

TTACCGTGTCTAGT

**SEQ ID NO: 154 - VH (KL2B358)**

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGACCC  
TGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGA  
GGATTTCGGCAGCCACCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTACTCCG  
GTTCCACCACCTACAACCCAGCCTGAAGTCCCAGGGTCACCATCTCCCGCGACACCT  
CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGT  
ACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACAGGGCACACTGG  
TTACCGTGTCTAGT

**SEQ ID NO: 155 - VH (KL2B360)**

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGACCC  
TGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGA  
GGATTTCGGCAGTTCCCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTACTCCG  
GTTCCACCACCTACAACCCAGCCTGAAGTCCCAGGGTCACCATCTCCCGCGACACCT  
CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGT  
ACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACAGGGCACACTGG  
TTACCGTGTCTAGT

**SEQ ID NO: 156 - VH (KL2B30)**

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC  
TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGAT  
CCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGATATATCTATTACAGTGGGA  
GCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCA  
AGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATT  
ACTGTGCGGGGACTACGATTTTTGGAGTGGTTACCCCAACTTCTACTACGGTATGG  
ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

**SEQ ID NO: 157 - VH (KL2B53)**

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC  
TGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGACATACTGGG  
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATTTTCATATGATGGA  
AGTAAAAAAGACTATACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA  
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTTGAGGACTCGGCTG  
TGTATTCTGTGCGAGAGAAAGTGGCTGGTCCCCTACTACTATTACGGTATGGACG  
TCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA

**SEQ ID NO: 158 - VH (KL2B242)**

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC  
TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTATTGGAGCTGGCT  
CCGGCAGCCCGCCGGGTCGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTTTATATGTCAGTGGGTT  
CACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCTTGTCCTAGACCCGTCCAG  
GAACCAGTTGTCCCTGAAACTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTATATTA  
TTGTGCGGGAGATAGTGGGAACTACTGGGGTTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAA

CCCTGGTCACCGTCTCCTCA

**SEQ ID NO: 159 - VH (KL2B467)**

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC  
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGG  
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATATCATATGATGGA  
AGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA  
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTG  
TGTATTACTGTGCCACCTCCCTTATAGTGGGAGCTACTGGGCCTTTGACTACTGGG  
GCCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

**SEQ ID NO: 160 - VH (KL2B494)**

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC  
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTCATTATGCCATGAGCTGGGT  
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTGGTGGTAGTGGTG  
GTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATCTCCAGAGACAAT  
TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGT  
ATATTACTGTGCGAAACCTCATATTGTAATGGTGACTGCTCTTCTCTACGACGGTAT  
GGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA

**SEQ ID NO: 161 - VL (KL2B357)**

GACATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGACTCTCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAG  
AGCCACCATCAACTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGAATACTTCGGCACCTCTCTGAT  
GCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTC  
CAACGTGGAATCTGGCGTGCCCGATAGATTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTT  
TACCCTGACCATCAGCTCTCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTTCTGTGAGCA  
GACCCGGAAGGTGCCCTACACATTTGGCGGCCGGAACAAAGGTGGAAATCAAG

**SEQ ID NO: 162 - VL (KL2B358)**

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGA  
GAGCCACCCTCTCTTGTAGAGCCTCCGAGTCCGTGGAATACTTCGGCACCTCTCTGA  
TGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAGACTGCTGATCTACGCCGCCT  
CCAACGTGGAATCTGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACAGACT  
TTACCCTGACCATCTCCTCCGTGGAACCCGAGGATTTGCTGTGTACTTTTGCCAGCA  
GACCCGGAAGGTGCCCTACACATTTGGCGGCCGGAACAAAGGTGGAAATCAAG

**SEQ ID NO: 163 - VL (KL2B360)**

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGA  
GAGCCACCCTCTCTTGTAGAGCCTCCGAGTCCGTGGAATACTTCGGCACCTCTCTGA  
TGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAGACTGCTGATCTACGCCGCCT  
CCAACGTGGAATCTGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACAGACT  
TTACCCTGACCATCTCCTCCGTGGAACCCGAGGATTTGCTGTGTACTTTTGCCAGCA  
GACCCGGAAGGTGCCCTATACATTTGGCGGCCGGAACAAAGGTGGAAATCAAG

**SEQ ID NO: 164 - VL (KL2B30)**

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG

AGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCA  
 GCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAG  
 TGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACAAT  
 CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAATAGTTA  
 CCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

**SEQ ID NO: 165 - VL (KL2B53)**

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
 AGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCA  
 GCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCACTC  
 TGGGGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT  
 CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAAGTATAACAGTGC  
 CCCGTACACTTTTGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA

**SEQ ID NO: 166 - VL (KL2B242)**

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGAGAGACAG  
 CCAGCATCACCTGCTCTGGAGATCAATTGGGGGAAAATTATGCTTGCTGGTATCAGC  
 AGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTATCAAGATAGTAAGCGGCCCTCAG  
 GGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA  
 GCGGGACCCAGGCTCTGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAACAGT  
 ATTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

**SEQ ID NO: 167 - VL (KL2B467)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCCGGGCAGACGG  
 CCAGTATTACCTGTGGGGGAGACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAG  
 CAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATAATAGCGACCGGCCCTC  
 AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGACCACGGCCACCCTGACCAT  
 CAGCAGGGTTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTA  
 GTAGTGATCATCCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTA

**SEQ ID NO: 168 - VL (KL2B494)**

TCTTCTGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGG  
 CCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAG  
 CAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTC  
 AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCAT  
 CAGCAGGGTTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTA  
 GTAGTGATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTA

**SEQ ID NO: 169 - KL2B357 ScFv-HL**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYS  
 GSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLVT  
 VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCREASESVEYFGTSLMH  
 WYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQTRK  
 VPYTFGGGTKVEIK

**SEQ ID NO: 170 - KL2B357 ScFv-LH**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
SNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGKTKVEIKGGSE  
GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWRQFPKG  
GLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGS  
GFWGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 171 - KL2B358 ScFv-HL**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISY  
GSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTV  
VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMH  
WYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVP  
YTFGGGKTKVEIK

**SEQ ID NO: 172 - KL2B358 ScFv-LH**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS  
NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGKTKVEIKGGSEGK  
SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGL  
EWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGF  
WGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 173 - KL2B360 ScFv-HL**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWRQFPKGKGLEWIGYISY  
GSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTV  
VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMH  
WYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVP  
YTFGGGKTKVEIK

**SEQ ID NO: 174 - KL2B360 ScFv-LH**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS  
NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGKTKVEIKGGSEGK  
SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWRQFPKGKGL  
EWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGF  
WGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 175 - KL2B30 ScFv-HL**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGS  
TNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVW  
GQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSIDIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISS  
YLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQL  
NSYPLTFGGGKTKVEIK

**SEQ ID NO: 176 - KL2B30 ScFv-LH**

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQSG  
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGKTKVEIKGGSEGKSSGS  
GSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYI  
YYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYG

MDVWGQGTTVTVSS

**SEQ ID NO: 177 - KL2B53 ScFv-HL**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYD  
GSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRLVEDSAVYSCARESGWVSHYGGMD  
VWGQGTMTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ  
DISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYY  
CQKYNAPYTFGQGRLEIK

**SEQ ID NO: 178 - KL2B53 ScFv-LH**

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASLH  
SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGRLEIKGGSEGKSSG  
SGSESKSTGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWV  
AIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRLVEDSAVYSCARESGWVSHYGG  
YGMVWGQGTMTVTVSS

**SEQ ID NO: 179 - KL2B242 ScFv-HL**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSG  
FTNYPNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQG  
TLTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSSYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYAC  
WYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDN  
SIVVFGGGTKLTVL

**SEQ ID NO: 180 - KL2B242 ScFv-LH**

SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPS  
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGGSEGKSS  
GSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWI  
GRLYVSGFTNYPNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFD  
DPWGQGTTLTVTVSS

**SEQ ID NO: 181 - KL2B467 ScFv-HL**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISY  
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDY  
WGQGTQVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGS  
KSVHWYQQKPGQAPVLLVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQ  
VWDSSSDHPVVFVGGGKVTV

**SEQ ID NO: 182 - KL2B467 ScFv-LH**

QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDNSDRP  
SGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFVGGGKVTVGGSEG  
KSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGK  
GLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPY  
SGSYWAFDYWGQGTQVTVSS

**SEQ ID NO: 183 - KL2B494 ScFv-HL**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSVRQAPGGGLEWVSTGGSG  
STYYADSVKGGLEWVSTNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTSGGSGSGS

GSGSESKGSGSSELTQPPSVSPARGQTARITCGNNGSKSVHWYQQKPGQAPVVYDDRS  
DRPSGIMYYYYQVWDSSSDHVVFVGGGTKLTVL VL

**SEQ ID NO: 184 - KL2B494 ScFv-LH**

SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRP  
SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGTKLTVLGGSEG  
KSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGK  
GLEWVSTIGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIV  
MVTALLYDGMDVWGQGTMTVTVSS

**SEQ ID NO: 185 - KL2B30 HC IgG4**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGS  
TNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVW  
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP  
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ  
VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL  
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

**SEQ ID NO: 186 - KL2B30 LC IgG4**

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASSTLQS  
GVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYSLSS  
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 187 - KL2B53 HC IgG4**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYD  
GSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRLVEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMD  
VWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP  
PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHN  
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF  
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

**SEQ ID NO: 188 - KL2B53 LC IgG4**

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASSTLH  
SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGRLEIKRTVAAPSVF  
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYSL  
SSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 189 - KL2B242 HC IgG4**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSG  
FTNYNPSLKSRTLSLDPNRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNWYWGWFDPWGQG  
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTF

PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE  
 AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP  
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY  
 TLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL  
 TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 190 - KL2B242 LC IgG4**

SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPS  
 GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGQPKAAPS  
 VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYA  
 ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

**SEQ ID NO: 191 - KL2B467 HC IgG4**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISY  
 DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDY  
 WGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
 S DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 192 - KL2B467 LC IgG4**

QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDNSDRP  
 SGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFVGGGKTVTLGQPK  
 AAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN  
 NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

**SEQ ID NO: 193 - KL2B494 HC IgG4**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGG  
 SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDG  
 MDVWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD  
 KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK  
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 194 - KL2B494 LC IgG4**

SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRP  
 SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKA  
 APS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN  
 KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

**SEQ ID NO: 195 - DHK KL2B30 HC**

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC

TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGAT  
 CCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGATATATCTATTACAGTGGGA  
 GCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCA  
 AGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATT  
 ACTGTGCGGGGACTACGATTTTTGGAGTGGTTACCCCAACTTCTACTACGGTATGG  
 ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCAT  
 CCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGG  
 GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC  
 GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC  
 TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACT  
 TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAA  
 ATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAG  
 TCTTCTGTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG  
 TCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG  
 TACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTT  
 CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA  
 CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGA  
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCC  
 CCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGG  
 CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA  
 ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA  
 GGCTAACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTG  
 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT  
 AAA

**SEQ ID NO: 196 - ДНК KL2B30 LC**

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
 AGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCA  
 GCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAG  
 TGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAAT  
 CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAATAGTTA  
 CCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCAC  
 CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGT  
 TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGG  
 ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG  
 GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA  
 ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA  
 AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

**SEQ ID NO: 197 - ДНК KL2B53 HC**

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCTCAGTAGTTATGACATACTGGG

TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATTTTCATATGATGGA  
 AGTAAAAAAGACTATACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA  
 TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTTGAGGACTCGGCTG  
 TGTATTCCTGTGCGAGAGAAAAGTGGCTGGTCCCCTACTACTATTACGGTATGGACG  
 TCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCG  
 TCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT  
 GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCC  
 CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC  
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACTTGC  
 AACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATA  
 TGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTT  
 CCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC  
 GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG  
 TGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAAC  
 AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC  
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAAC  
 CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT  
 CCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC  
 TACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA  
 CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCT  
 AACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC  
 ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

**SEQ ID NO: 198 - ДНК KL2B53 LC**

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG  
 AGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCA  
 GCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGTTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCACTC  
 TGGGGTCCCATCTCGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT  
 CAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAGTATAACAGTGC  
 CCCGTACACTTTTGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGTACGGTGGCTGCAC  
 CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGT  
 TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGG  
 ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG  
 GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA  
 ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA  
 AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

**SEQ ID NO: 199 - ДНК KL2B242 HC**

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC  
 TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTATTGGAGCTGGCT  
 CCGGCAGCCC GCCGGGTCCGGACTGGAGTGGATTGGGCGTTTATATGTCAGTGGGTT  
 CACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCTTGTCAGTACAGCCGTCCAG

GAACCAGTTGTCCCTGAAACTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTATATTA  
 TTGTGCGGGAGATAGTGGGAACTACTGGGGTTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAA  
 CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCC  
 CTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT  
 ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG  
 CACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG  
 ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACTTGCAACGTAGATCACAA  
 GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCC  
 CACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAA  
 AACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGG  
 ACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAG  
 GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT  
 GGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT  
 GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC  
 AAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCAGGAGGAGAT  
 GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACA  
 TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCT  
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG  
 AGCAGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA  
 CAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

**SEQ ID NO: 200 - ДНК KL2B242 LC**

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGAGAGACAG  
 CCAGCATCACCTGCTCTGGAGATCAATTGGGGGAAAATTATGCTTGCTGGTATCAGC  
 AGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTATCAAGATAGTAAGCGGCCCTCAG  
 GGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCA  
 GCGGGACCCAGGCTCTGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAACAGT  
 ATTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTAGGTCAGCCCAAGGCTGC  
 ACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCAC  
 ACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGC  
 CGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCA  
 ACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCC  
 CACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAG  
 TGGCCCCTACAGAATGTTCA

**SEQ ID NO: 201 - ДНК KL2B467 HC**

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGG  
 TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATATCATATGATGGA  
 AGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA  
 TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTG  
 TGTATTACTGTGCCACCTCCCTTATAGTGGGAGCTACTGGGCCTTTGACTACTGGG

GCCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC  
 CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG  
 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACC  
 AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC  
 AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG  
 AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA  
 CAAAATCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGACCGTCAG  
 TCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG  
 TCACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG  
 TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT  
 ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA  
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAG  
 AAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC  
 CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
 GCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC  
 AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC  
 AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT  
 GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG  
 TAAA

**SEQ ID NO: 202 - ДНК KL2B467 LC**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCCGGGCAGACGG  
 CCAGTATTACCTGTGGGGGAGACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAG  
 CAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTGCTATGATAATAGCGACCGGCCCTC  
 AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGACCACGGCCACCCTGACCAT  
 CAGCAGGGTTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTA  
 GTAGTGATCATCCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGGTCAGC  
 CCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCA  
 ACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTG  
 GCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTC  
 CAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGC  
 AGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTG  
 GAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

**SEQ ID NO: 203 - ДНК KL2B494 HC**

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTCATTATGCCATGAGCTGGGT  
 CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTGGTGGTAGTGGTG  
 GTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAT  
 TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGT  
 ATATTACTGTGCGAAACCTCATATTGTAATGGTGACTGCTCTTCTCTACGACGGTAT  
 GGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCC

CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC  
 TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAG  
 GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT  
 ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA  
 TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC  
 AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCCGG  
 GGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG  
 GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAGCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA  
 AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG  
 GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA  
 GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG  
 CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG  
 TACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG  
 CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC  
 AGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT  
 TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTC  
 TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC  
 CTGTCTCCGGGTAAA

**SEQ ID NO: 204 - ДНК KL2B494 LC**

TCTTCTGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGG  
 CCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAG  
 CAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTC  
 AGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCAT  
 CAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTA  
 GTAGTGATCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTGAGCCC  
 AAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAC  
 AAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCC  
 TGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAA  
 ACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT  
 GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG  
 AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

**SEQ ID NO: 205 - CAR (KL2B357 HL и KL2B357 LH)**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYS  
 GSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLVT  
 VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCREASESVEYFGTSLMH  
 WYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQTRK  
 VPYTFGGGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY  
 IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG  
 GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN  
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP

PR

**SEQ ID NO: 207 - CAR (KL2B358 HL)**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIWIRQPPGKGLEWIGYISYS  
GSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVT  
VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMH  
WYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVP  
YTFGGGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW  
APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC  
ELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPENGGKPRRKNPQ  
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

**SEQ ID NO: 208 - CAR (KL2B358 LH)**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS  
NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGGSEGK  
SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIWIRQPPGKGL  
EWIGYISYSGSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGF  
WGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW  
APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC  
ELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPENGGKPRRKNPQ  
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

**SEQ ID NO: 209 - CAR (KL2B360 HL)**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIWIRQPPGKGLEWIGYISYS  
GSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVT  
VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMH  
WYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVP  
YTFGGGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW  
APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC  
ELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPENGGKPRRKNPQ  
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

**SEQ ID NO: 210 - CAR (KL2B360 LH)**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS  
NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGGSEGK  
SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWIWIRQPPGKGL  
EWIGYISYSGSTTYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGF  
WGQGTLVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW  
APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC  
ELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPENGGKPRRKNPQ  
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

**SEQ ID NO: 211 - CAR (KL2B30 HL)**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGS  
TNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVW

GQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSIDIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISS  
 YLAWYQQKPGKAPKFLIYAASSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQL  
 NSYPLTFGGGTKVEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD  
 IYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE  
 GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRK  
 NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  
 LPPR

**SEQ ID NO: 212 - CAR (KL2B30 LH)**

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASSTLQS  
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK  
 GGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPP  
 GKGLEWIGYIYSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIF  
 GVVTPNFY YGMDVWGQGTTVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV  
 HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED  
 GCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRD  
 PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKD  
 TYDALHMQUALPPR

**SEQ ID NO: 213 - CAR (KL2B53 HL)**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYD  
 GSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRVED  
 SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVM  
 TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASSTLHSGVPSRFSG  
 SSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGRLEIKTSTPAPRPPTPAPTIASQP  
 LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKLLYI  
 FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNL  
 GRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG  
 KGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

**SEQ ID NO: 214 - CAR (KL2B53 LH)**

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASSTLH  
 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGRLEIKGGSEGKSSG  
 SGSESKSTGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWV  
 AIIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRVED  
 SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMTVTVSSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA  
 CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFM  
 RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY  
 DVLKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDG  
 LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

**SEQ ID NO: 215 - CAR (KL2B242 HL)**

QVQLQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQAPAGSGLEWIGRLYVSG  
 FTNYPNPSLKSRTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQG

TLVTVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSSYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYAC  
 WYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDN  
 SIVVFGGGTKLTVLTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG  
 GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN  
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP  
 PR

**SEQ ID NO: 216 - CAR (KL2B242 LH)**

SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPS  
 GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGGSEKSS  
 GSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWI  
 GRLYVSGFTNYPNPSLKSRVTLSLDPNRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGW  
 DPWGQGLTVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG  
 GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN  
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP  
 PR

**SEQ ID NO: 217 - CAR (KL2B467 HL)**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISY  
 DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDY  
 WGQGTQVTVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSQSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGDNIGS  
 KSVHWYQQKPGQAPVLLVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQ  
 VWDSSSDHPVVFVGGGKVTVTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL  
 DFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC  
 RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG  
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL  
 HMQALPPR

**SEQ ID NO: 218 - CAR (KL2B467 LH)**

QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDNSDRP  
 SGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFVGGGKVTVGGSEG  
 KSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGK  
 GLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPY  
 SGSYWAFDYWGQGTQVTVSSTSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG  
 LDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC  
 RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG  
 GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDA  
 LHMALPPR

**SEQ ID NO: 219 - CAR (KL2B494 HL)**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGG  
 SGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDG



WGQGTLVTVSS

**SEQ ID NO: 225 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B360 HL)**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWRQFPGKGLEWIGYISYS  
GSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVT  
VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMH  
WYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVP  
YTFGGGTKVEIK

**SEQ ID NO: 226 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B360 LH)**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASN  
NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGGSEGK  
SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWRQFPGKGL  
EWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGF  
WGQGTLVTVSS

**SEQ ID NO: 227 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B30 HL)**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGS  
TNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVW  
GQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPP  
YLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQL  
NSYPLTFGGGTKVEIK

**SEQ ID NO: 228 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B30 LH)**

DIQMTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQSS  
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK  
GGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPP  
GKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIF  
GVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS

**SEQ ID NO: 229 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B53 HL)**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYD  
GSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSL RVED  
SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPP  
TQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASLHSGVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGTTRLEIK

**SEQ ID NO: 230 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B53 LH)**

DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASLH  
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGTTRLEIKGGSEGKSSG  
SGSESKSTGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWV  
AIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSL RVED  
SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMTVTVSS

**SEQ ID NO: 231 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B242 HL)**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSG  
FTNYNPSLKSRTVLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDWPWGQ

TLVTVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSSYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYAC  
WYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDN  
SIVVFGGGTKLTVL

**SEQ ID NO: 232 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B242 LH)**

SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPS  
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGGSEKSS  
GSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWI  
GRLYVSGFTNYNPSLKSRTLSLDPNRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGW  
DPWGQGLVTVSS

**SEQ ID NO: 233 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B467 HL)**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISY  
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDY  
WGQGTQVTVSSGGSEKSSGSGSESKSTGGSQSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGDNIGS  
KSVHWYQQKPGQAPVLLVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQ  
VWDSSSDHPVVFVGGGKVTV

**SEQ ID NO: 234 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B467 LH)**

QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDNSDRP  
SGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFVGGGKVTVGGSEG  
KSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGK  
GLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPY  
SGSYWAFDYWGQGTQVTVSS

**SEQ ID NO: 235 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B494 HL)**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSVRQAPGGGLEWVSTGGSG  
STYYADSVKGGLEWVSTNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTSGGSGSGS  
GSGSESKSGSSELTQPPSVSPARGQTARITCGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVYDDRS  
DRPSGIMYYYYQVWDSSSDHVVFVGGGKLTVL VL

**SEQ ID NO: 236 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B494 LH)**

SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLLVYDDSDRP  
SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGKLTVLGGSEG  
KSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSVRQAPGK  
GLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIV  
MVTALLYDGMDVWGQGTMTVTVSS

**SEQ ID NO: 237 - линкерная последовательность**

GGGSGGGS

**SEQ ID NO: 238 - линкерная последовательность**

GGGSGGGS

**SEQ ID NO: 239 - линкерная последовательность**

GGGSGGGS

**SEQ ID NO: 240 - линкерная последовательность**

GGGSGGGS

**SEQ ID NO: 241 - линкерная последовательность**

GGGGSGGGGSGGGGS

**SEQ ID NO: 242 - линкерная последовательность**

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

**SEQ ID NO: 243 - линкерная последовательность**

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

**SEQ ID NO: 244 - линкерная последовательность**

GSTSGSGKPGSGEGSTKG

**SEQ ID NO: 245 - линкерная последовательность**

IRPRAIGGSKPRVA

**SEQ ID NO: 246 - линкерная последовательность**

GKGGSGKGGSGKGGGS

**SEQ ID NO: 247 - линкерная последовательность**

GGKGS GGKGS GGKGS

**SEQ ID NO: 248 - линкерная последовательность**

GGGKSGGGKSGGGKS

**SEQ ID NO: 249 - линкерная последовательность**

GKGKSGKGKSGKGKS

**SEQ ID NO: 250 - линкерная последовательность**

GGGKSGGKGS GGKGS

**SEQ ID NO: 251 - линкерная последовательность**

GKPGSGKPGSGKPGS

**SEQ ID NO: 252 - линкерная последовательность**

GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS

**SEQ ID NO: 253 - линкерная последовательность**

GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS

**SEQ ID NO: 254 - линкерная последовательность**

STAGDTHLGGEDFD

**SEQ ID NO: 255 - линкерная последовательность**

GEGGSGEGGSGEGGS

**SEQ ID NO: 256 - линкерная последовательность**

GGEGSGGEGSGGEGS

**SEQ ID NO: 257 - линкерная последовательность**

GEGESGEGESGEGES

**SEQ ID NO: 258 - линкерная последовательность**

GGGESGGEGSGEGGS

**SEQ ID NO: 259 - линкерная последовательность**

GEGESGEGESGEGESGEGES

**SEQ ID NO: 260 - линкерная последовательность**

GSTSGSGKPGSGEGSTKG

**SEQ ID NO: 261 - линкерная последовательность**

PRGASKSGSASQTGSAPGS

**SEQ ID NO: 262 - линкерная последовательность**

GTAAAGAGAAGGAAAGAAG

**SEQ ID NO: 263 - линкерная последовательность**

GTSGSSGSGSGGSGSGGGG

**SEQ ID NO: 264 - линкерная последовательность**

GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS

**SEQ ID NO: 265 - линкерная последовательность**

GSGS

**SEQ ID NO: 266 - линкерная последовательность**

APAPAPAPAP

**SEQ ID NO: 267 - линкерная последовательность**

APAPAPAPAPAPAPAPAP

**SEQ ID NO: 268 - линкерная последовательность**

AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKAAA

**SEQ ID NO: 269 - шарнирная последовательность CAR**

EPKSCDKTHTCPPCP

**SEQ ID NO: 270 - шарнирная последовательность CAR**

ERKCCVECPCP

**SEQ ID NO: 271 - шарнирная последовательность CAR**

ELKTPLGDTTHTCPRCP(EPKSCDTPPCPRCP)3

**SEQ ID NO: 272 - шарнирная последовательность CAR**

ESKYGPPCPSCP

**SEQ ID NO: 273 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 1****(HL HCG5 LCD6 20AA) с сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA  
 WNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAV  
 YYCATGYYYGSGFWGQGTTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL  
 GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD  
 FTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 274 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 2****(HL HCG5 LCHumanized 20AA) с сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA  
 WNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAV  
 YYCATGYYYGSGFWGQGTTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL  
 GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD  
 FTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 275 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 3****(HL HCF3 LCB7 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA  
 WNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTPVDTAVY  
 YCATGYYYGSGFWGQGTTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLG  
 ERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDF  
 TLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 276 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 4  
 (HL HCG5 LCB7 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA  
 WNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSVTPVDTAV  
 YYCATGYYYGSGFWGQGTTLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL  
 GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD  
 FTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 277 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 5  
 (LH LCD6 HCG5 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS  
 LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQ  
 TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA  
 VSGNSITSDYAWNIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKL  
 SSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTTLVTVSS

**SEQ ID NO: 278 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 6  
 (LH LCHumanized HCF3 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS  
 LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ  
 TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA  
 VSGNSITSDYAWNIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLS  
 SVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTTLVTVSS

**SEQ ID NO: 279 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 7  
 (LH LCHumanized HCG5 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS  
 LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ  
 TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA  
 VSGNSITSDYAWNIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKL  
 SSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTTLVTVSS

**SEQ ID NO: 280 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 8  
 (LH LCB7 HCF3 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS  
 LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQ  
 TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA  
 VSGNSITSDYAWNIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLS  
 SVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTTLVTVSS

**SEQ ID NO: 281 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 9**  
**(LH LCB7 HCG5 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS  
 LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQ  
 TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA  
 VSGNSITSDYAWNWRQFPKGKLEWIMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKL  
 SSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTTLTVSS

**SEQ ID NO: 282 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 10**  
**(LH LCD6 HCF3 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS  
 LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQ  
 TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA  
 VSGNSITSDYAWNWRQFPKGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLS  
 SVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTTLTVSS

**SEQ ID NO: 283 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 11**  
**(HL HCHumanized LCB7 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA  
 WNWIRQPPGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDVAV  
 YYCATGYYYGSGFWGQGTTLTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL  
 GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD  
 FTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 284 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 12**  
**(HL HCHumanized LCD6 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA  
 WNWIRQPPGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDVAV  
 YYCATGYYYGSGFWGQGTTLTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL  
 GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD  
 FTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 285 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 13**  
**(HL HCHumanized LCHumanized 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYA  
 WNWIRQPPGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDVAV  
 YYCATGYYYGSGFWGQGTTLTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSL  
 GERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTD  
 FTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 286 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 14**  
**(LH LCD6 HCHumanized 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS  
 LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQ  
 TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCA

VSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RV TMSRDT SKNQFSLKL  
SSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLVTVSS

**SEQ ID NO: 287 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 15 (LH LCHumanized HCHumanized 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS  
LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQ  
TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTC  
VSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RV TMSRDT SKNQFSLKL  
SSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLVTVSS

**SEQ ID NO: 288 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 16 (LH LCB7 HCHumanized 20AA) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTS  
LMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQQ  
TRKVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTC  
VSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RV TMSRDT SKNQFSLKL  
SSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLVTVSS

**SEQ ID NO: 289 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 17 (KL2B413 HL) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM  
TWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT  
AVYYCARDQNYDILTGHYGMVWVGQTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLT  
QSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSG  
SGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK

**SEQ ID NO: 290 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 18 (KL2B413 LH) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLSWY  
QQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPRT  
FGQGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  
SYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR  
AEDTAVYYCARDQNYDILTGHYGMVWVGQTTVTVSS

**SEQ ID NO: 291 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 19 (KL2B359-HL) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYA  
WNWRQFPGRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKS RV TISRDT SKNQFSLKLSSVTAAADV  
YCATGYYYGSGFWGQGLVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGE  
RATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTL  
TISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK

**SEQ ID NO: 292 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен 20 (KL2B359-LH) с сигнальным пептидом**

MAVWVWTLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSL

MHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTR  
 KVPYTFGGGKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS  
 GNSITSDYAWNWRIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV  
 TAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 293 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B357 HL) с  
 сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYA  
 WNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY  
 YCATGYYYGSGFWGQGLTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLG  
 ERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDF  
 TLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO: 294 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B357 LH) с  
 сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQADIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSL  
 MHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQT  
 RKVPYTFGGGKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTV  
 SGNSITSDYAWNWRIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSS  
 VTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 295 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B358 HL) с  
 сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYA  
 WNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY  
 YCATGYYYGSGFWGQGLTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGE  
 RATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTL  
 TISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO: 296 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B358 LH) с  
 сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSL  
 MHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTR  
 KVPYTFGGGKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS  
 GNSITSDYAWNWRIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV  
 TAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 297 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B360 HL) с  
 сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYA  
 WNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY  
 YCATGYYYGSGFWGQGLTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGE  
 RATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTL  
 TISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO: 298 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B360 LH) с**

**сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSL  
 MHWYQQKPGQPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTR  
 KVPYTFGGGKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS  
 GNSITSDYAWNWRQFPKGKLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSV  
 TAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 299 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B30 HL) с****сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWS  
 WIRQPPGKLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC  
 AGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPS  
 FLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT  
 EFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGKVEIK

**SEQ ID NO: 300 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B30 LH) с****сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQADIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAW  
 YQQKPGKAPKFLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPL  
 TFGGGKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSI  
 SYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT  
 AVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS

**SEQ ID NO: 301 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B53 HL) с****сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIH  
 WVRQAPGKLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRVEDSAV  
 YSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQS  
 PSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASLHSGVPSRFSGSGS  
 GTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNAPYTFGQGRLEIK

**SEQ ID NO: 302 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B53 LH) с****сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQADIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAW  
 YQQKPGKVPKFLIYAASLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNAP  
 YTFGQGRLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFT  
 FSSYDIHWVRQAPGKLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLR  
 VEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMTVTVSS

**SEQ ID NO: 303 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B242 HL) с****сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWS  
 WLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYY  
 CAGDSGNYWGWFDPWGQGLTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSSYELTQPPSVSVSP  
 GETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS

GTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL

**SEQ ID NO: 304 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B242 LH) с сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQASYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWY  
 QKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIV  
 VFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSI  
 SSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPNRNQLSLKLSSVTAA  
 DTAVYYCAGDSGNYWGWFDPPWGQGLTVTVSS

**SEQ ID NO: 305 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B467 HL) с сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYG  
 MHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED  
 TAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQSVLTQP  
 PSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQKPGQAPVLVVDNSDRPSGIPERFSGSNSG  
 TTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTV

**SEQ ID NO: 306 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B467 LH) с сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAQSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHW  
 YQKPGQAPVLVVDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSS  
 SDHPVVFGGGTKVTVGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA  
 SGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
 MNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS

**SEQ ID NO: 307 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B494 HL) с сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAM  
 SWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA  
 VYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSSSELT  
 QPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQKPGQAPVLVYDSDRPSGIPERFSGS  
 NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVFGGGTKLTVL

**SEQ ID NO: 308 - Внеклеточный антигенсвязывающий домен (KL2B494 LH) с сигнальным пептидом**

MAWVWTLFLMAAAQSIQASSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWY  
 QKPGQAPVLVYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSS  
 DHVVFVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS  
 GFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM  
 NSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMTVTVSS

**SEQ ID NO: 309 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

GFTFSSYWMT

**SEQ ID NO: 310 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

NIKQDGSERY

**SEQ ID NO: 311 - последовательность CDR3 тяжелой цепи**

DQNYDILTGHYGM DV

**SEQ ID NO: 312 - последовательность CDR1 легкой цепи**

RASQGISSYLS

**SEQ ID NO: 313 - последовательность CDR2 легкой цепи**

ATSTLQS

**SEQ ID NO: 314 - последовательность CDR1 тяжелой цепи**

SYWMT

**SEQ ID NO: 315 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

NIKQDGSERYVDSVKG

**SEQ ID NO: 316 - последовательность CDR2 тяжелой цепи**

YISYSGSTTYSPSLKS

**SEQ ID NO: 317 - VH (m11B6)**

DVQLQESG PGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWN WIRQFPGNRLEWMGYISY  
SGSTTYSPSLKSRFSITRDT SKNQFFLQLNSVTPEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGLVT  
VSS

**SEQ ID NO: 318 - VL (m11B6)**

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHWYRQKPGQPPKLLIYAA  
SNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIQPVEEDDFSMYFCQQRKVPYTFGGGKLEIK

**SEQ ID NO: 319 - человеческий калликреин-2 6-His белок**

VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCLKK  
NSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDSSHDLMLLRSE  
PAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTCYASGWGSIPEEFLRPRSLQCVSLHYSEKVFTEFMLC  
AGLWTGGKDTCCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKD  
TIAANPHHHHHH

**SEQ ID NO: 320 - κДНК VH (m11B6)**

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCTGGACCCGGACTTGTTAAACCAAGTCAGTCTC  
TGTCCTGACCTGTACCGTCACCGGCAACAGCATCACAAGCGATTACGCATGGAAC  
GGATCAGGCAGTTCCTGAAATCGACTCGAATGGATGGGCTACATTTCACTCCG  
GTTCAACCACTTACTCTCCATCCTTGAAATCTAGGTTTCAGCATCACCCGTGATACCTC  
AAAGAACCAATTTTTTCTGCAACTGAATAGCGTAACTCCAGAGGACACAGCCACAT  
ATTTCTGCGCCACTGGGTATTACTATGGCTCAGGTTTCTGGGGTCAGGGCACTCTCG  
TCACCGTCAGCAGC

**SEQ ID NO: 321 - κДНК VH (hu11B6)**

CAGGTCCAACCTGCAAGAGAGCGGACCGGGCCTGGTAAAGCCATCCGACACA  
TTGTCCCTGACGTGTGCGGTAAGTGGAACCTCTATCACTAGCGACTATGCGTGGAAT  
TGGATAAGACAACCGCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGATAGGATATATCAGCTATTC  
CGGTTCTACGACATACAATCCTTCCCTGAAAAGCAGAGTCACTATGTCACGCGACAC  
GTCCAAGAATCAGTTCTCATTGAAATTGTCATCCGTAACGGCCGTTGACACTGCGGT  
TTATTATTGCGCAACCGGATATTACTACGGCTCTGGTTTTTGGGGACAGGGAACACT

TGTTACTGTTAGTTCA

**SEQ ID NO: 322 - κDHK VH (HCF3-LCD6)**

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGCGACACC  
CTGAGCCTGACCTGCGCCGTGAGCGGCAACAGCATCACCAGCGACTACGCCTGGAA  
CTGGATCCGCCAGTTCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCAGCTACA  
GCGGCAGCACCACTACAACCCAAGCCTGAAGAGCCGCGTCACCATCAGCCGCGAC  
ACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCCCTGTGGACACCGC  
CGTGTACTACTGCGCCACCGGCTACTACTACGGCAGCGGCTTCTGGGGCCAGGGCAC  
CCTGGTGACCGTGAGCAGC

**SEQ ID NO: 323 - κDHK VH (HCG5-LCB7)**

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGCGACACC  
CTGAGCCTGACCTGCGCCGTGAGCGGCAACAGCATCACCAGCGACTACGCCTGGAA  
CTGGATCCGCCAGTTCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTACATCAGCTACA  
GCGGCAGCACCACTACAACCCAAGCCTGAAGAGCCGCGTCACCATCAGCCGCGAC  
ACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCCCTGTGGACACCGC  
CGTGTACTACTGCGCCACCGGCTACTACTACGGCAGCGGCTTCTGGGGCCAGGGCAC  
CCTGGTGACCGTGAGCAGC

**SEQ ID NO: 324 - κDHK VH (KL2B359)**

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGACCC  
TGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCAACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGA  
GGATTCGGCAGTTCCTGGCAAGCGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCCTACTCCG  
GTTCCACCACCTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGGTCACCATCTCCCGCGACACCT  
CCAAGAACCAGTTCCTGGAAGCTGTCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGT  
ACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTTGGGGACAGGGCACACTGG  
TTACCGTGTCTAGT

**SEQ ID NO: 325 - κDHK VH (KL2B413)**

GAGGTGCAACTTGTGGAGAGCGGCGGAGGTCTGGTCCAACCCGGAGGAAGT  
CTCCGTCTCTCCTGTGCTGCTAGTGGCTTCACTTTCAGCTCATATTGGATGACATGGG  
TGAGACAAGCCCCAGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTAGCTAACATTAACAGGACGG  
CTCCGAACGGTACTATGTTGATTCTGTGAAGGGACGGTTCATATATCCAGGGATAA  
TGCAAAAAATTCACTCTATCTTCAAATGAACTCACTCAGAGCAGAGGACACTGCCGT  
GTATTATTGCGCCAGGGATCAAAATTATGACATACTGACCGGTCATTATGGAATGGA  
TGTTTGGGGCCAGGGAACAACCGTTACCGTCTCAAGT

**SEQ ID NO: 326 - κDHK VL (m11B6)**

GACATTGTGCTGACACAGAGTCCAGCATCCTTGGCAGTATCTTTGGGGCAGC  
GGGCAACAATTTTCATGCCGTGCATCTGAAAGTGTGGAGTATTTTGGAACTTCTCTTA  
TGCACTGGTATCGCCAGAAGCCTGGGCAGCCTCCCAAACCTTATATATGCCGCTT  
CCAACGTGGAGTCCGGAGTACCAGCACGCTTTTCCGGCTCTGGGTCCGGCACAGACT  
TTTCCCTCAATATCCAACCTGTTGAAGAAGACGATTTTTCATGTATTTTGGCAACA  
GACACGCAAGGTTCCATATACATTCGGCGGCGGCACTAACTTGAGATCAAA

**SEQ ID NO: 327 - κJHK VL (hu11B6)**

GACATAGTCTTGACTCAGAGCCCGGATTCCCTTGCTGTGTCTCTGGGAGAACG  
 AGCTACGATCAACTGCAAGGCAAGTGAATCCGTAGAATACTTCGGGACATCATTGA  
 TGCATTGGTATCAACAGAAACCGGGGCAACCGCCCAAATTGCTGATATATGCGGCT  
 AGTAATAGAGAATCAGGAGTACCGGATAGGTTTAGTGGTTCAGGATCAGGTACAGA  
 TTTCACCCTGACAATAAGTAGCTTGCAAGCCGAAGACGTAGCAGTGTATTACTGCCA  
 ACAAACCCGAAAGGTGCCATATACGTTTGGACAGGGTACAAAGTTGGAAATCAAA

**SEQ ID NO: 328 - κJHK VL (HCF3-LCD6)**

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCAGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGC  
 GCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCGAGAGCGTGGAGTACTTCGGCACCAGCCTG  
 ATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTACGCTGC  
 CAGCAACCGCGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCG  
 ACTTCACCCTGACCATCCAGAGCGTGCAGGCCGAGGACGTCTCCGTGTACTTCTGCC  
 AGCAGACCCGCAAGGTGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

**SEQ ID NO: 329 - κJHK VL (HCG5-LCB7)**

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCAGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGC  
 GCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCGAGAGCGTGGAGTACTTCGGCACCAGCCTG  
 ATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTACGCTGC  
 CAGCAACCGCGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCG  
 ACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGGCCGAGGACGTCCGCGTGTACTACTGCC  
 AGCAGACCCGCAAGGTGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

**SEQ ID NO: 330 - κJHK VL (KL2B359)**

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGA  
 GAGCCACCCTCTCTTGTAGAGCCTCCGAGTCCGTGGAATACTTCGGCACCTCTCTGA  
 TGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAGACTGCTGATCTACGCCGCT  
 CCAACGTCGAATCTGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACAGACT  
 TTACCCTGACCATCTCCTCCGTGGAACCCGAGGATTCGCTGTGTACTTTTGCCAGCA  
 GACCCGGAAGGTGCCCTACACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAAG

**SEQ ID NO: 331 - κJHK VL (KL2B413)**

GAAATCGTACTGACCCAGTCCCCTTCTTTCTTGAGTGCATCAGTTGGGGATAG  
 AGTGACCATTACTTGTAGAGCATCTCAAGGTATTTCTTCATACTTGTCTTGGTATCAA  
 CAAAAACCTGGCAAGGCACCCAAACTCTTGATCTACGCCACCTCTACATTGCAAAGT  
 GGGGTTCCCTTCTAGGTTTTTCAGGCTCCGGCTCTGGTACCGAGTTCACCCTCACTATAA  
 GCAGTCTCCAACCTGAAGATTCGCTACTTATTATTGTCAGCAGCTTAATTCTTATCC  
 CCGAACCTTTGGTCAAGGAACCTAAGGTTCGAGATCAAA

**SEQ ID NO: 332 - m11B6 HC IgG4**

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIRQFPGNRLEWMGYISY  
 SGSTTYSPLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGLVT  
 VSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVL  
 QSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLL

GGPSVFIFPPKIKDVLMLISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHRED  
 YNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP  
 EEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLR  
 VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

**SEQ ID NO: 333 - m11B6 LC IgG4**

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHWYRQKPGQPPKLLIYAA  
 SNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIQPVEEDDFSMYFCQQRKVPYTFGGGKLEIKRADA  
 APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDS  
 TYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK

**SEQ ID NO: 334 - h11B6 HC IgG4**

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCVSGNSITSDYAWNWRQPPGKGLEWIGYISYS  
 GSTTYNPSLKSRTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
 LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPE  
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
 TLPDSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL  
 TVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 335 - h11B6 LC IgG4**

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA  
 SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQRKVPYTFGQGTLEIKRTVA  
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
 STYLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 336 - ДНК m11B6 HC**

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCTGGACCCGGACTTGTTAAACCAAGTCAGTCTC  
 TGTCCTGACCTGTACCGTCACCGGCAACAGCATCACAAGCGATTACGCATGGAAC  
 GGATCAGGCAGTTCCTGGAAATCGACTCGAATGGATGGGCTACATTCATACTCCG  
 GTTCAACCACTTACTCTCCATCCTTGAATCTAGGTTTCAGCATCACCCGTGATACCTC  
 AAAGAACCAATTTTTTCTGCAACTGAATAGCGTAACTCCAGAGGACACAGCCACAT  
 ATTTCTGCGCCACTGGGTATTACTATGGCTCAGGTTTCTGGGGTCAGGGCACTCTCG  
 TCACCGTCAGCAGCGCCAAAACAACAGCACCAAGTGTCTATCCACTGGCCCCTGTGT  
 GTGGAGATACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATTTCC  
 CTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCT  
 TCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGACTGTAACCT  
 CGAGCACCTGGCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCACCCGGCAAGCAGC  
 ACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCAGAGGGCCACAATCAAGCCCTGTCCCTCC  
 ATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCC  
 AAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGT  
 GGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGG  
 AAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGG

GTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAA  
 ATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAAC  
 CCAAAGGGTTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAG  
 ATGACTAAGAAACAGGTCACCTCTGACCTGCATGGTCACCGACTTCATGCCTGAAGAC  
 ATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGA  
 ACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAA  
 GAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGC  
 ACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAA

**SEQ ID NO: 337 - ДНК mu11B6 LC**

GACATTGTGCTGACACAGAGTCCAGCATCCTTGGCAGTATCTTTGGGGCAGC  
 GGGCAACAATTTTCATGCCGTGCATCTGAAAGTGTGGAGTATTTTGGAACTTCTCTTA  
 TGCCTGGTATCGCCAGAAGCCTGGGCAGCCTCCCAAACCTCCTTATATATGCCGCTT  
 CCAACGTGGAGTCCGGAGTACCAGCACGCTTTTCCGGCTCTGGGTCCGGCACAGACT  
 TTTCCCTCAATATCCAACCTGTTGAAGAAGACGATTTTTCCATGTATTTTTGCCAACA  
 GACACGCAAGGTTCCATATACATTCGGCGGGCGGCACTAAACTTGAGATCAAACGGG  
 CTGATGCTGCACCGACTGTGTCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTG  
 GAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCA  
 AGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGAT  
 CAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGA  
 CGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTT  
 CACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT

**SEQ ID NO: 338 - ДНК hu11B6 HC**

CAGGTCCAACCTGCAAGAGAGCGGACCGGGCCTGGTAAAGCCATCCGACACA  
 TTGTCCCTGACGTGTGCGGTAAGTGGAACTCTATCACTAGCGACTATGCGTGGAAT  
 TGGATAAGACAACCGCCGGGCAAGGGGCTGGAATGGATAGGATATATCAGCTATTC  
 CGGTTCTACGACATAACAATCCTTCCCTGAAAAGCAGAGTCACTATGTCACGCGACAC  
 GTCCAAGAATCAGTTCTCATTGAAATTGTCATCCGTAACGGCCGTTGACACTGCGGT  
 TTATTATTGCGCAACCGGATATTACTACGGCTCTGGTTTTTTGGGGACAGGGAACACT  
 TGTTACTGTTAGTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC  
 TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT  
 CCCC GAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA  
 CCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG  
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA  
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACTCACACA  
 TGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC  
 CCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT  
 GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG  
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA  
 CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT  
 ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC

AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCGGGA  
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA  
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC  
 CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT  
 GGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG  
 CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

**SEQ ID NO: 339 - ДHK hu11B6 LC**

GACATAGTCTTGACTCAGAGCCCCGATTCCCTTGCTGTGTCTCTGGGAGAACG  
 AGCTACGATCAACTGCAAGGCAAGTGAATCCGTAGAATACTTCGGGACATCATTGA  
 TGCATTGGTATCAACAGAAACCGGGGCAACCGCCCAAATTGCTGATATATGCGGCT  
 AGTAATAGAGAATCAGGAGTACCGGATAGGTTTAGTGGTTCAGGATCAGGTACAGA  
 TTTACCCCTGACAATAAGTAGCTTGCAAGCCGAAGACGTAGCAGTGTATTACTGCCA  
 ACAAACCCGAAAGGTGCCATATACGTTTGGACAGGGTACAAAGTTGGAAATCAAAC  
 GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT  
 CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG  
 TACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACA  
 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAA  
 AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA  
 GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

**SEQ ID NO: 340 - scFv 17 (KL2B413 HL)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQ  
 DGSERYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTGHY  
 MDVWGQGTTVTVSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPSFLSASVGDRTITCRAS  
 QGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY  
 CQQLNSYPRTFGQGTKVEIK

**SEQ ID NO: 341 - scFv 18 (KL2B413 LH)**

EIVLTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQ  
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIKGGSEGKSSG  
 GSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEW  
 VANIKQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILT  
 GHYGMVWGQGTTVTVSS

**SEQ ID NO: 342 - scFv 19 (KL2B359 HL)**

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGNSITSDYAWNWRQFPGRLEWIGYISYS  
 GSTTYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGLTV  
 VSSGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMH  
 WYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYFCQQTRKVP  
 YTFGGGTKVEIK

**SEQ ID NO: 343 - scFv 20 (KL2B359 LH)**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS  
 NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIKGGSEGK

SSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGGLVKPSQTL~~SLTCTVSGNSITSDYAWN~~WIRQFPGKRL  
EWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGF  
WGQGT~~LVTVSS~~

**SEQ ID NO: 344 консенсусная последовательность VH**

QVQLQESGPGGLVKPSX<sub>1</sub>TL~~SLTCX<sub>2</sub>VSGNSITSDYAWN~~WIRQX<sub>3</sub>PGKGLEWX<sub>4</sub>GYI  
SYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>DTAVYYCATGYYYGSGFWGQ  
GTLVTVSS

X1 представляет собой D или Q; X2 представляет собой A или T; X3 представляет собой P или F; X4 представляет собой I или M; X5 представляет собой A или P; или X6 представляет собой V или A. Остатки HCDR выделены подчеркиванием.

**SEQ ID NO: 345 консенсусная последовательность VL**

X<sub>1</sub>IVLTQSPX<sub>2</sub><sup>×</sup><sub>3</sub>LX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>SX<sub>6</sub>GERATX<sub>6</sub>X<sub>8</sub>CX<sub>9</sub>ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPX<sub>1</sub>  
0LLIYAASN<sub>11</sub>ESGX<sub>12</sub>PX<sub>13</sub>RFSGSGSGTDFTLTIX<sub>14</sub>SLQX<sub>15</sub>EDX<sub>16</sub>AVYX<sub>17</sub>CQOTRKVPYT  
FG X<sub>18</sub>GTKX19EIK

X1 представляет собой D или E; X2 представляет собой D или A; X3 представляет собой S или T; X4 представляет собой A или S; X5 представляет собой V или L; X6 представляет собой L или P; X7 представляет собой I или L; X8 представляет собой N или S; X9 представляет собой R или K; X10 представляет собой K или R; X11 представляет собой V или R; X12 представляет собой V или I; X13 представляет собой A или D; X14 представляет собой Q или S; X15 представляет собой P или A; X16 представляет собой F или V; X17 представляет собой Y или F; X18 представляет собой Q или G; и X19 представляет собой L или V. Остатки LCDR выделены подчеркиванием.

**SEQ ID NO: 346 - эпитоп**

KVTEF

**SEQ ID NO: 347 - эпитоп**

HYRKW

**SEQ ID NO: 348 - эпитоп**

SHGWAH

**SEQ ID NO: 349 - эпитоп**

RHNLFEPEDTGQRVP

**SEQ ID NO: 350 - эпитоп**

GWGSIEPEE

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

- (a) внеклеточный домен, который специфически связывается с антигеном человеческого калликреина-2 (hK2);
- (b) трансмембранный домен; и
- (c) внутриклеточный сигнальный домен, необязательно содержащий по меньшей мере один костимулирующий домен.

2. CAR по п.1, дополнительно включающий

- (d) шарнирную область CD8a,

где трансмембранный домен включает полипептид CD8a трансмембранной области (CD8a-TM); и

где внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен, содержащий компонент члена 9 суперсемейства TNF-рецепторов (CD137) и первичный сигнальный домен, содержащий компонент дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток.

3. CAR по п.2, в котором

шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере

на 90% идентична SEQ ID NO: 25, 269, 270, 271 или 272;

трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 26; и/или

внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий

трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:

NO: 27, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая

по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 28.

4. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 315, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 311;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 309, CDR2 тяжелой цепи, имеющую



аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; или

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122,

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген hK2.

5. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 312, CDR2 легкой цепи, имеющую









аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138.

8. CAR по п.6, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и определяющую комплементарность область 1 (CDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91.

9. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельный домен (VL) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 74, 75, 147, 148, 149, 150, 151, 152 и 318; и/или

вариабельный домен (VH) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, 5, 6, 76, 77, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146 и 317;

причем внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает антиген человеческого калликреина-2 (hK2).

10. CAR по п.9, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную



аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146;

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 318, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 317.

11. CAR по любому из пп. 1-10, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), scFv содержит вариабельную область легкой цепи (VL) и вариабельную область тяжелой цепи (VH).

12. CAR по п.11, в котором scFv содержит линкерный полипептид между вариабельной областью легкой цепи (VL) и вариабельной областью тяжелой цепи (VH).

13. CAR по п.12, в котором линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

14. CAR по любому из пп. 11-13, в котором scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-23, 169-184 и 340-343.

15. CAR по любому из пп. 1-14, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит сигнальный полипептид.

16. CAR по п.15, в котором сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

17. CAR по любому из пп. 4-16, в котором внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента члена 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), компонента дзета-цепи CD3 (CD3z) поверхностного гликопротеина Т-клеток, компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента члена суперсемейства дифференцировки и их комбинации.

18. CAR по п.17, в котором компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

19. CAR по п.17 или п.18, в котором компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

20. CAR по любому из пп. 17-19, в котором внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, или, дополнительно, внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и первичный сигнальный домен,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

21. CAR по любому из пп. 4-20, в котором трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM).

22. CAR по п.21, в котором полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

23. CAR по любому из пп. 4-22, дополнительно содержащий шарнирную область, связывающую трансмембранный домен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом.

24. CAR по п.23, в котором шарнирная область представляет собой шарнирную область CD8a.

25. CAR по п.24, в котором шарнирная область CD8a содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, 269, 270, 271 или 272.

26. CAR по любому из пп. 1-25, в котором внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-44, 78-81, 221-236 и 273-308.

27. CAR по любому из пп. 1-26, в котором CAR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-61, 82-85 и 205-220.

28. Выделенный лимфоцит, экспрессирующий CAR по любому из пп. 1-27.

29. Выделенный лимфоцит по п.28, причем лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит.

30. Выделенный лимфоцит по п.28, причем Т-лимфоцит представляет собой клетку-натуральный киллер (NK).

31. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR по любому из пп. 1-27.

32. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.31.

33. Клетка, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты по п.31.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество лимфоцита по любому из пп. 28-30.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество лимфоцита по любому из пп. 28-30 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

36. CAR по любому из пп. 1-27 или фармацевтическая композиция по п.34 или п.35 для применения в терапии.

37. CAR по любому из пп. 1-27 или фармацевтическая композиция по п.34 или п.35 для применения в способе лечения субъекта, имеющего рак.

38. Способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий:

введение терапевтически эффективного количества лимфоцита по любому из пп. 28-30 нуждающемуся в этом субъекту, в результате чего лимфоцит индуцирует уничтожение раковых клеток у субъекта.

39. Способ по п.38, или CAR, или фармацевтическая композиция для применения в способе по п.37, в котором рак представляет собой рак предстательной железы или рак

молочной железы, экспрессирующий андрогенный рецептор.

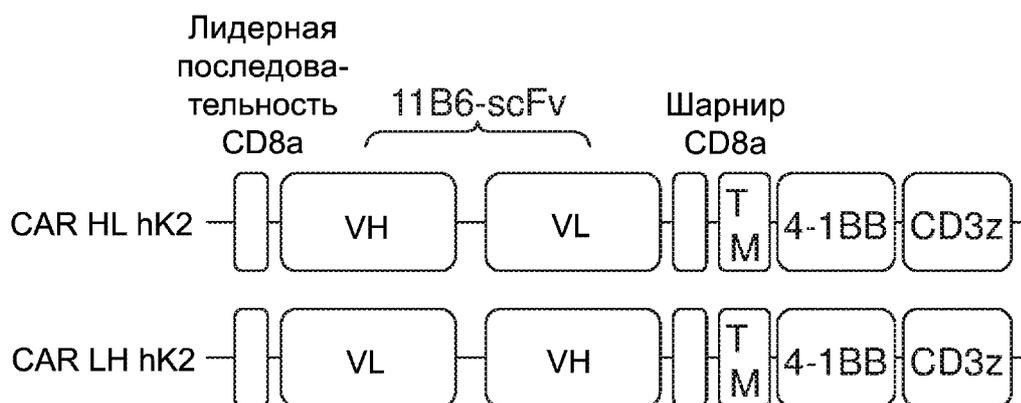
40. Способ направленного уничтожения раковой клетки, включающий:  
приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом по любому из пп. 28-30, в результате чего

лимфоцит индуцирует уничтожение раковой клетки.

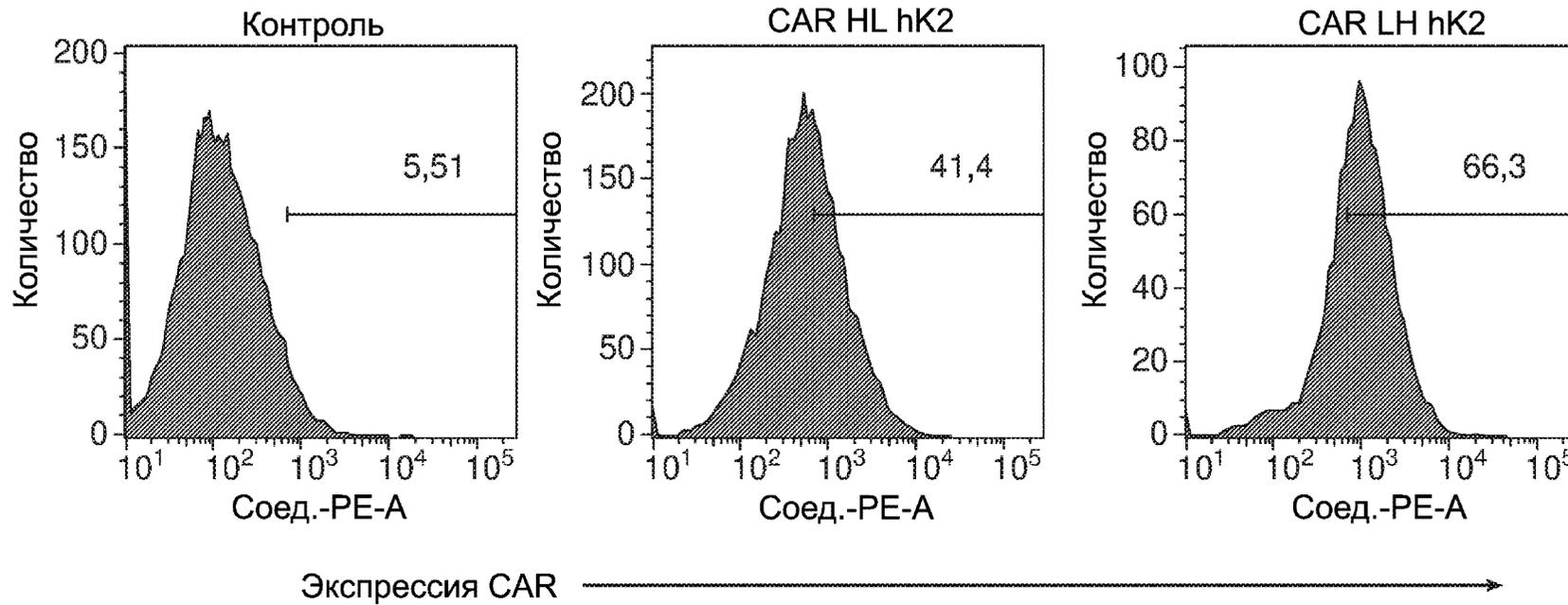
41. Способ по п.40, в котором раковая клетка представляет собой клетку рака предстательной железы или клетку рака молочной железы.

42. Способ обнаружения наличия рака у субъекта, включающий:  
приведение образца клеток, полученного от субъекта, в контакт с CAR по пп. 1-27 с формированием, тем самым, комплекса CAR-клетка, и  
обнаружение комплекса, причем обнаружение комплекса указывает на наличие рака у субъекта.

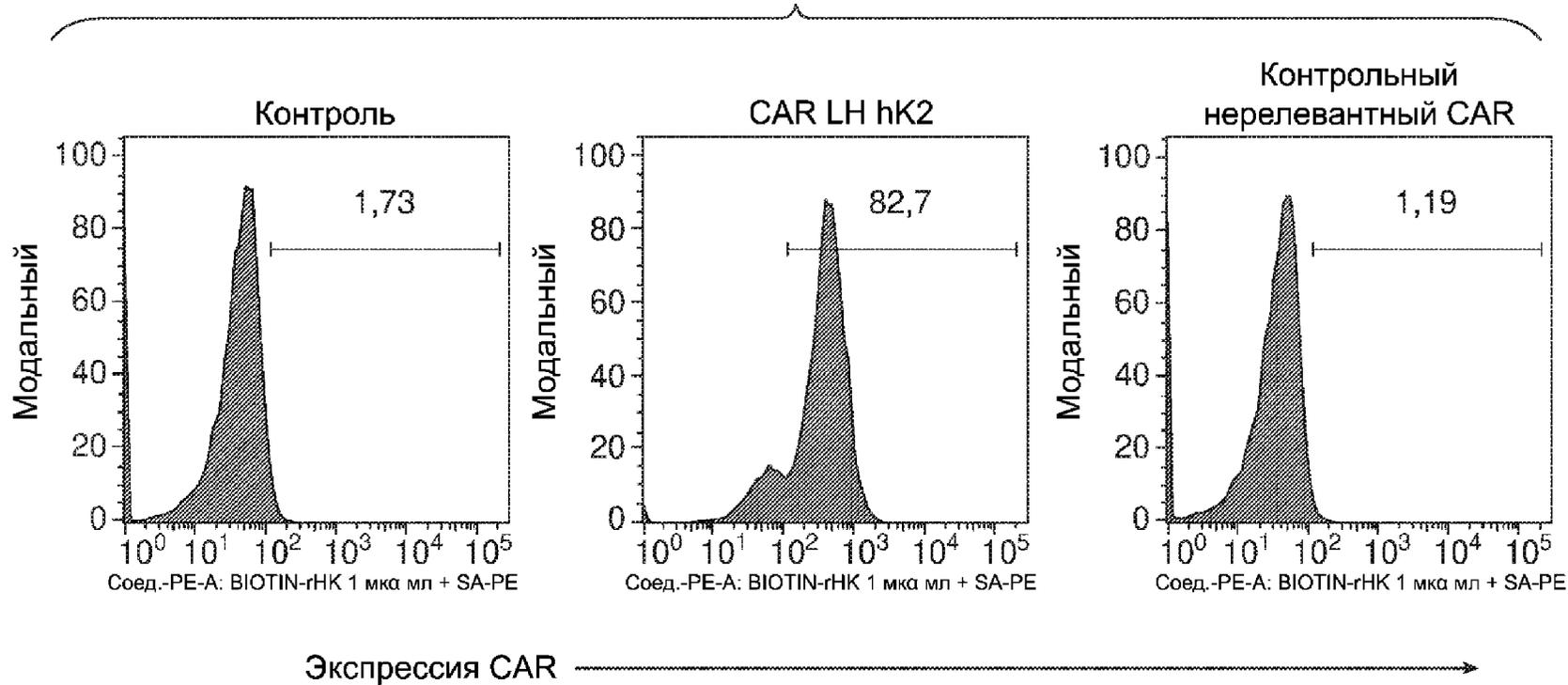
По доверенности

**ФИГ. 1А**

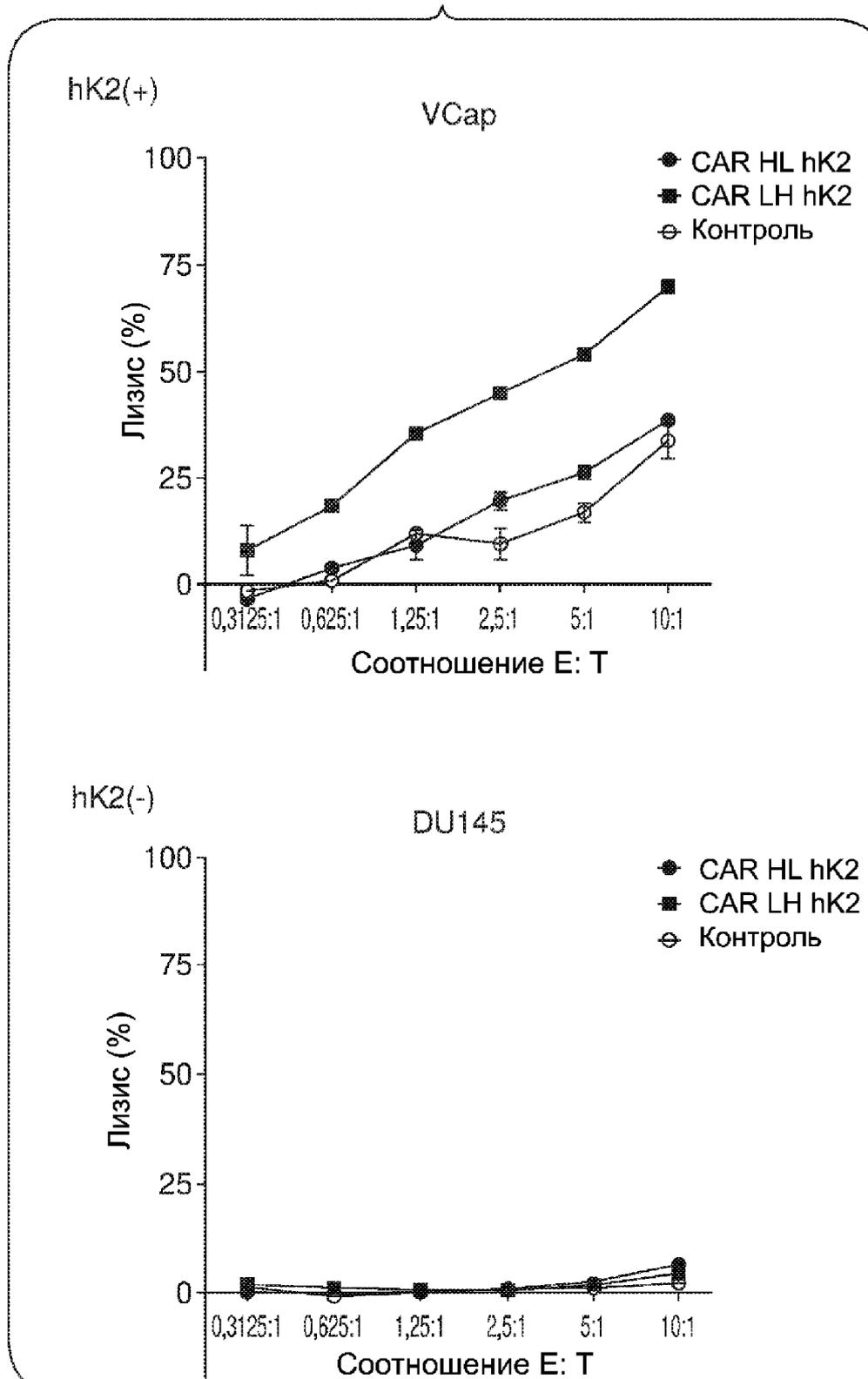
**ФИГ. 1В**



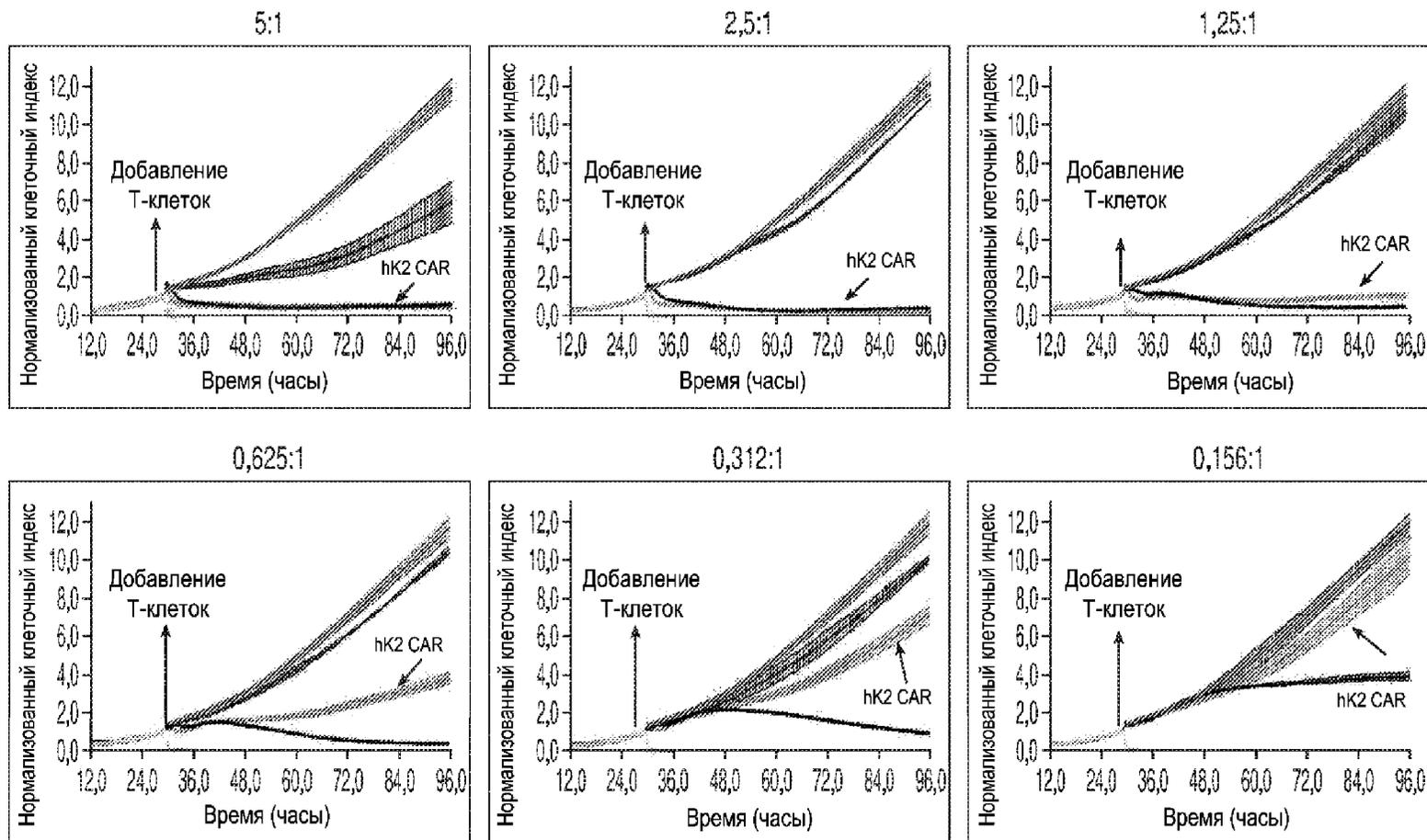
**ФИГ. 1С**



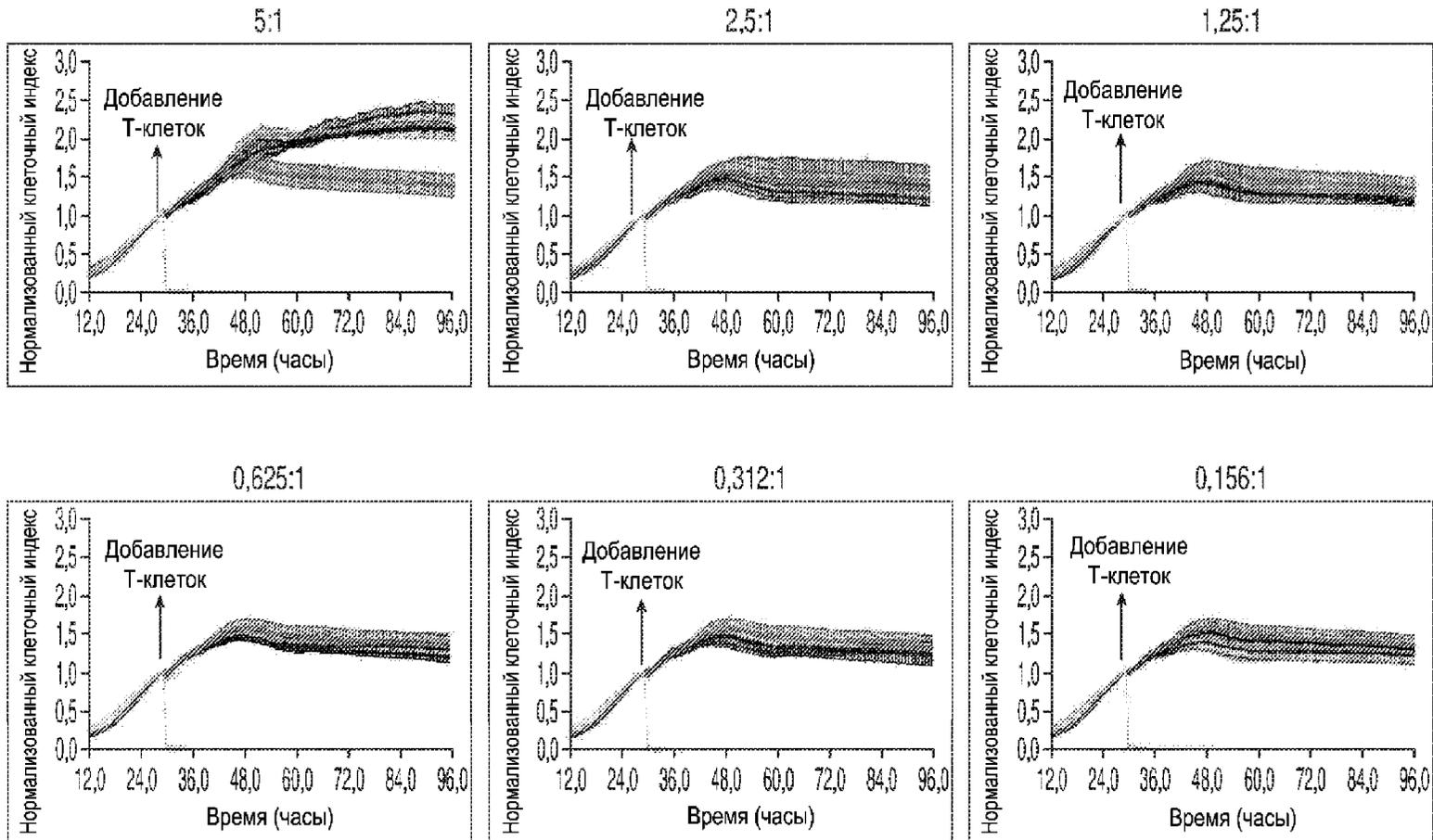
ФИГ. 2



ФИГ. 3А

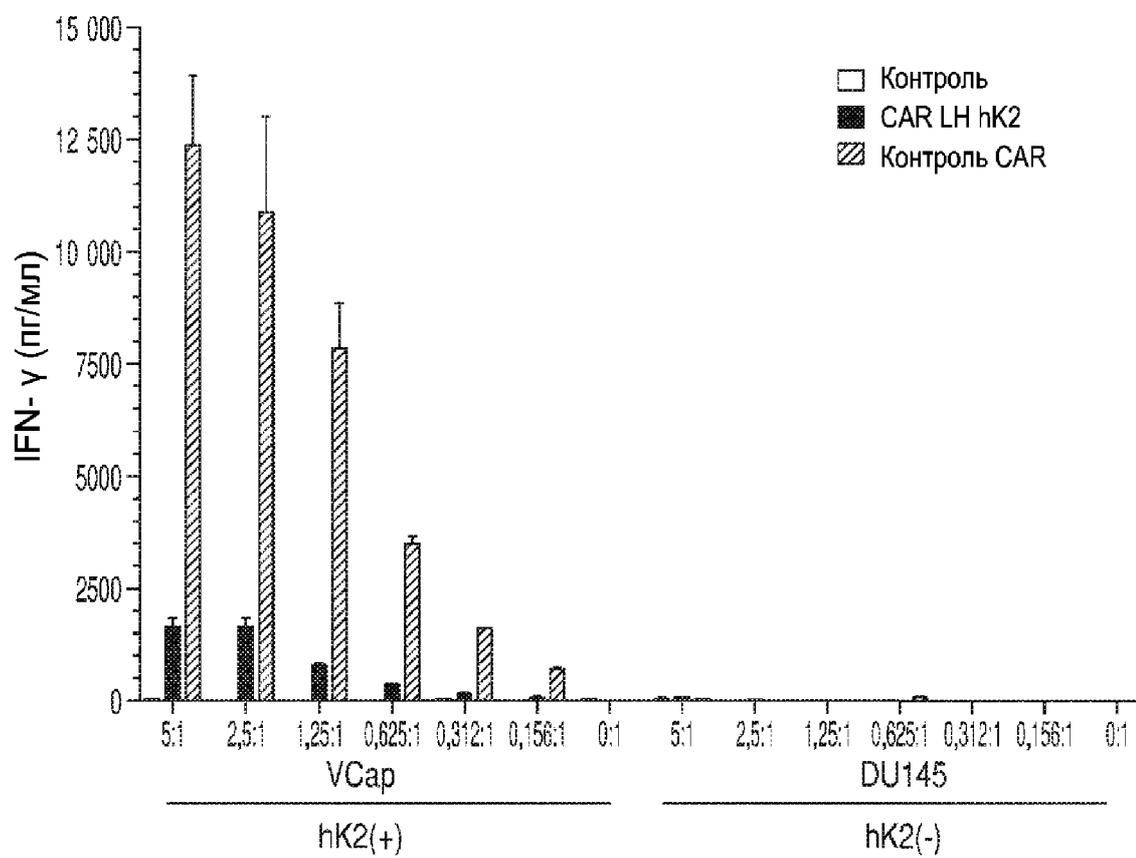


**ФИГ. 3В**

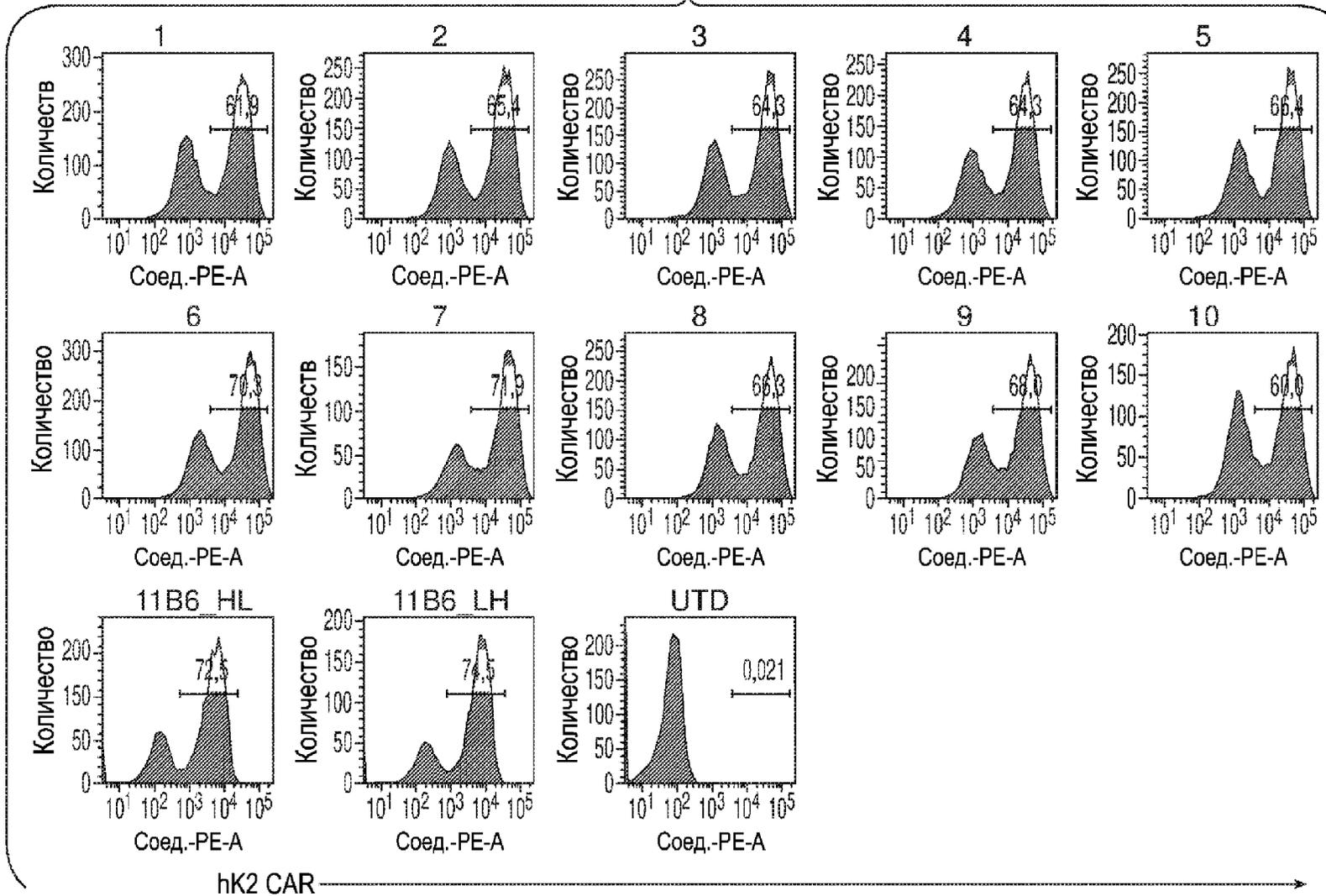


DU145

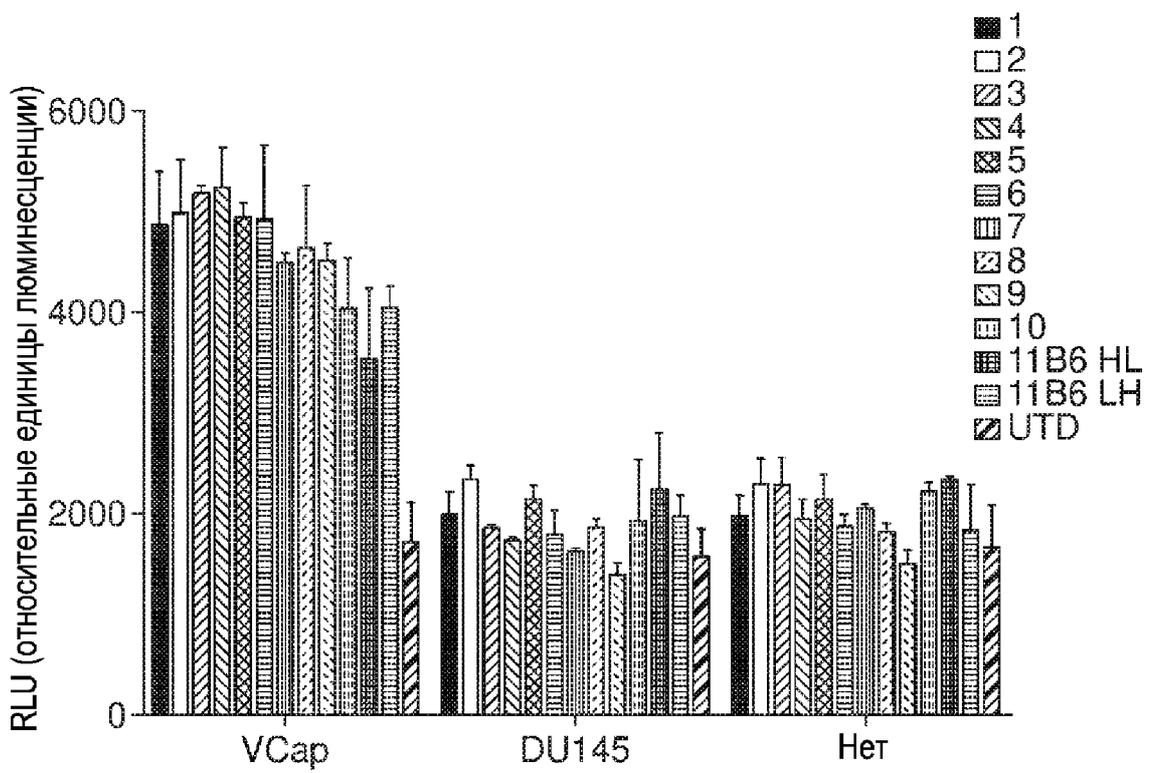
ФИГ. 4



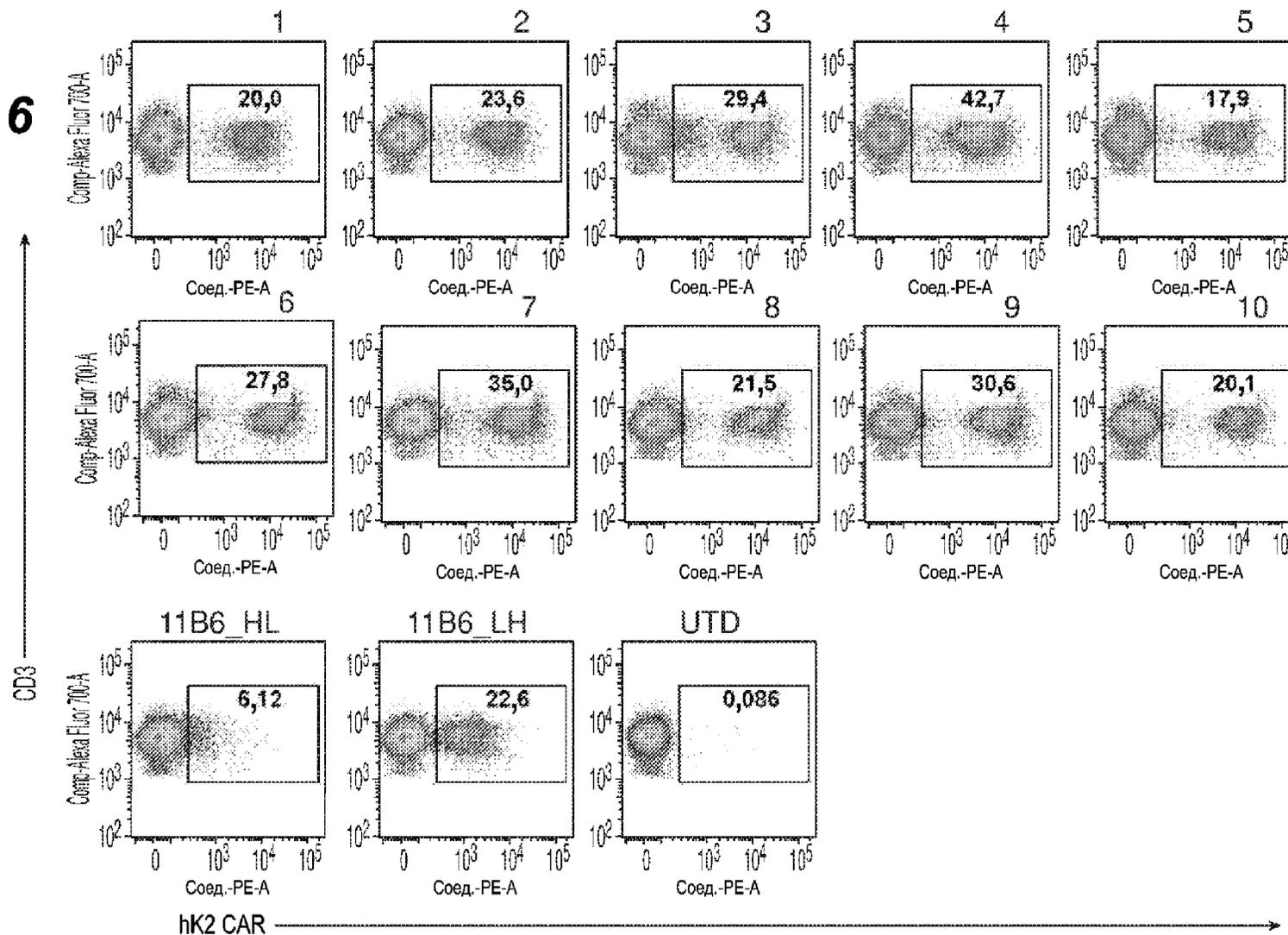
ФИГ. 5А



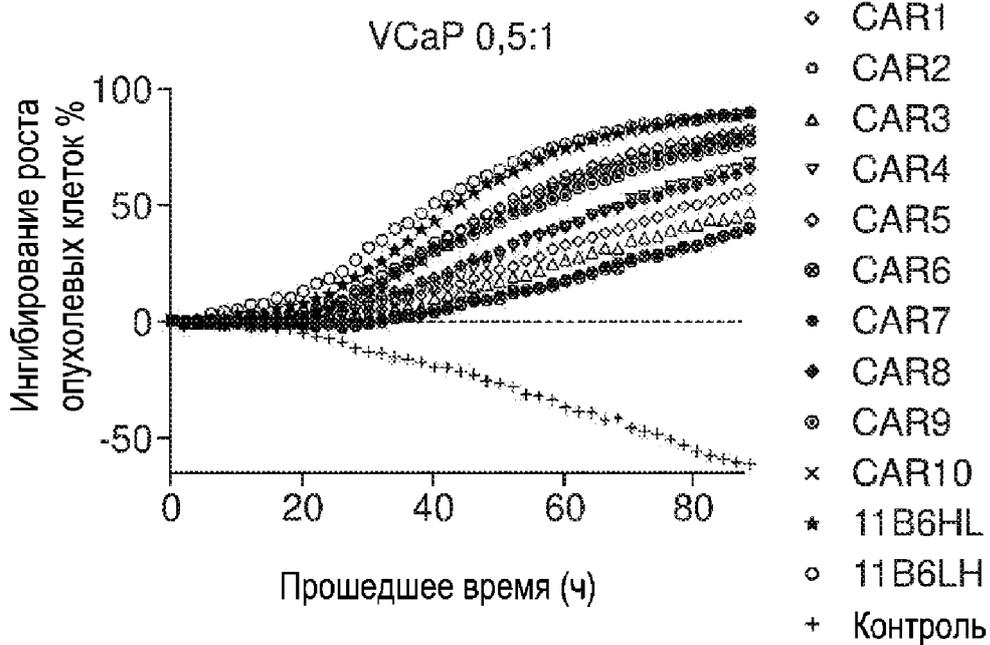
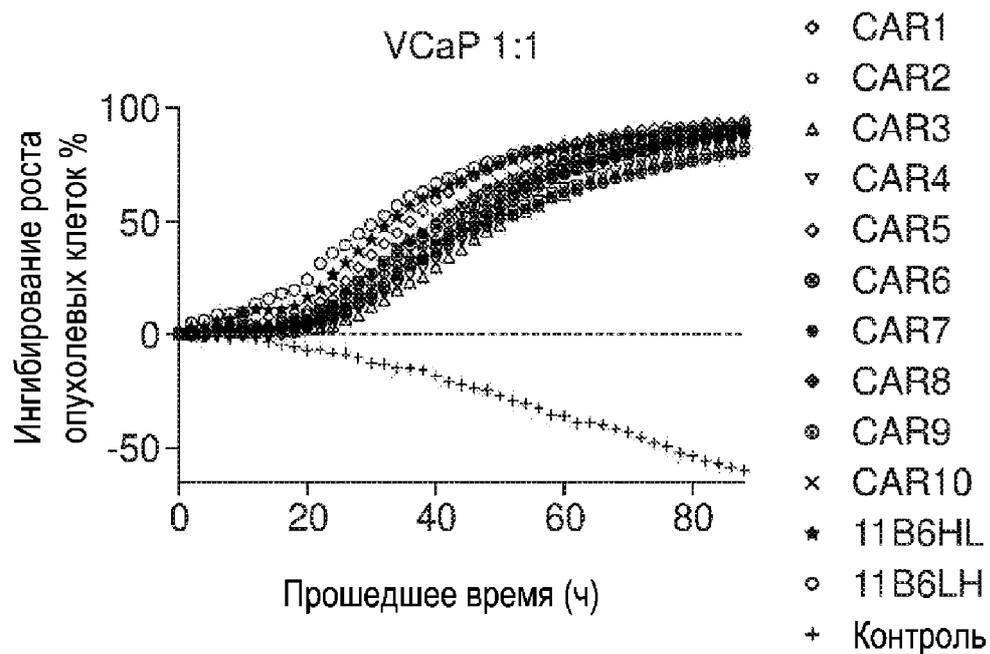
**ФИГ. 5В**



**ФИГ. 6**

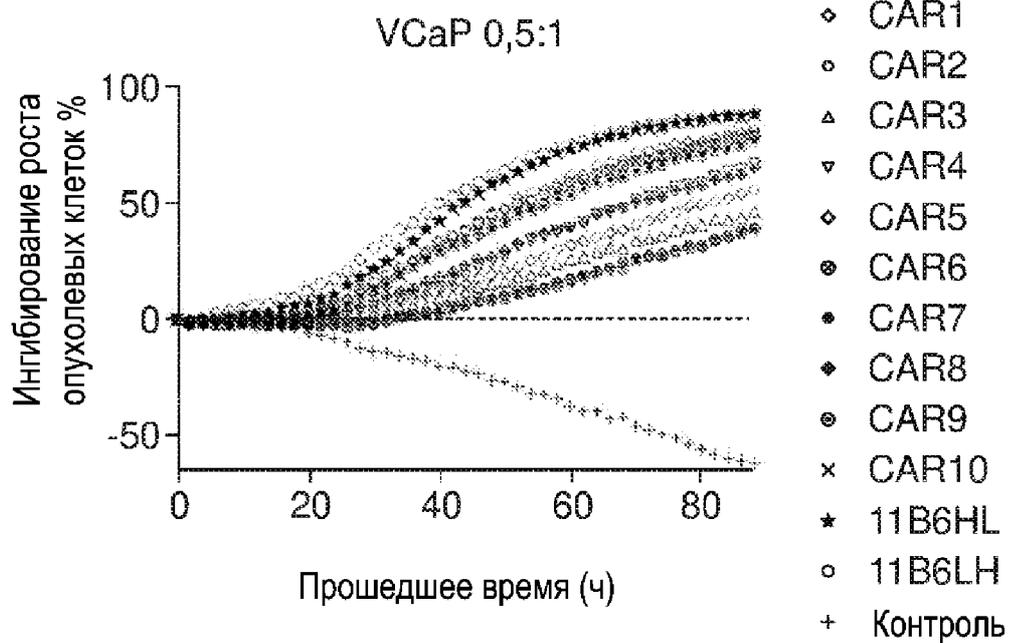
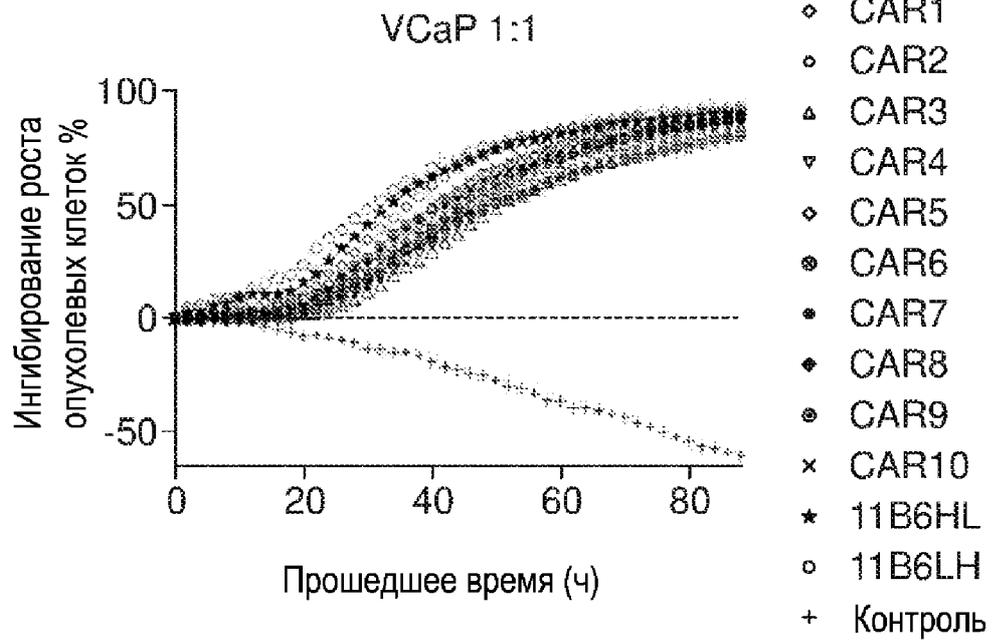


## ФИГ. 7А

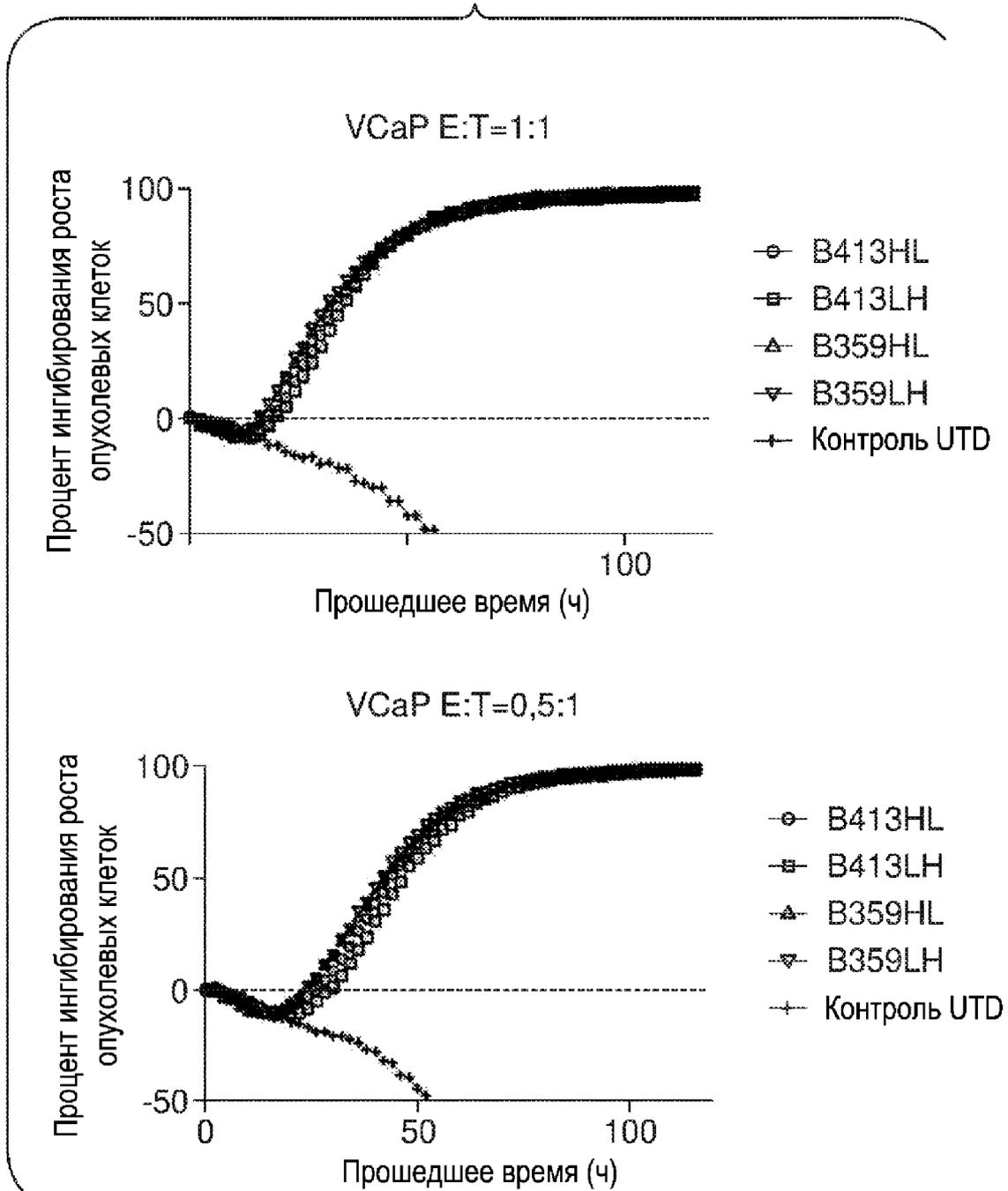




ФИГ. 7С

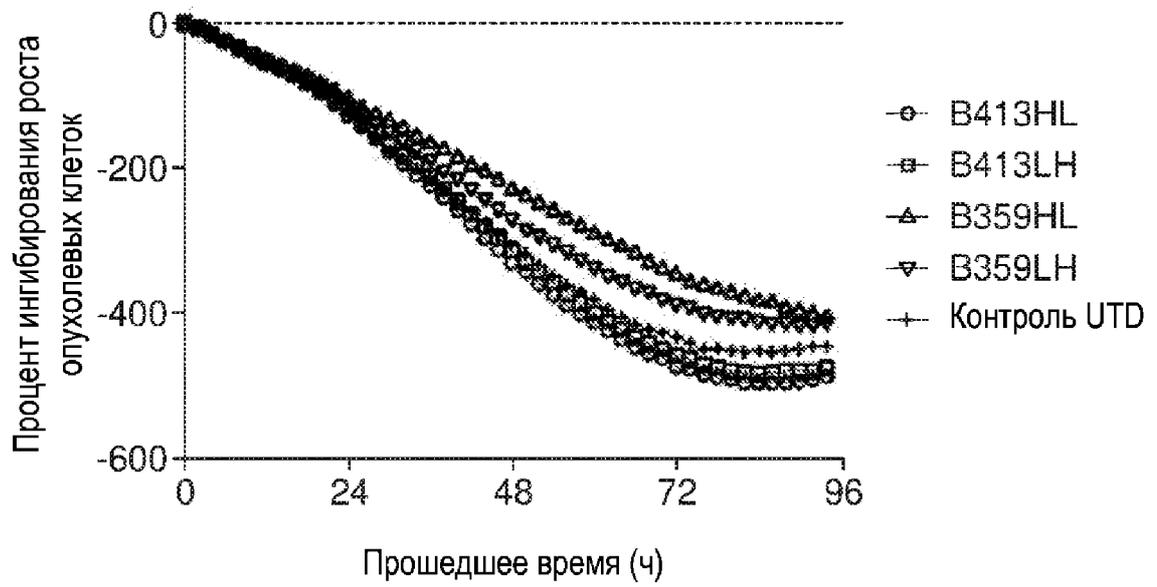




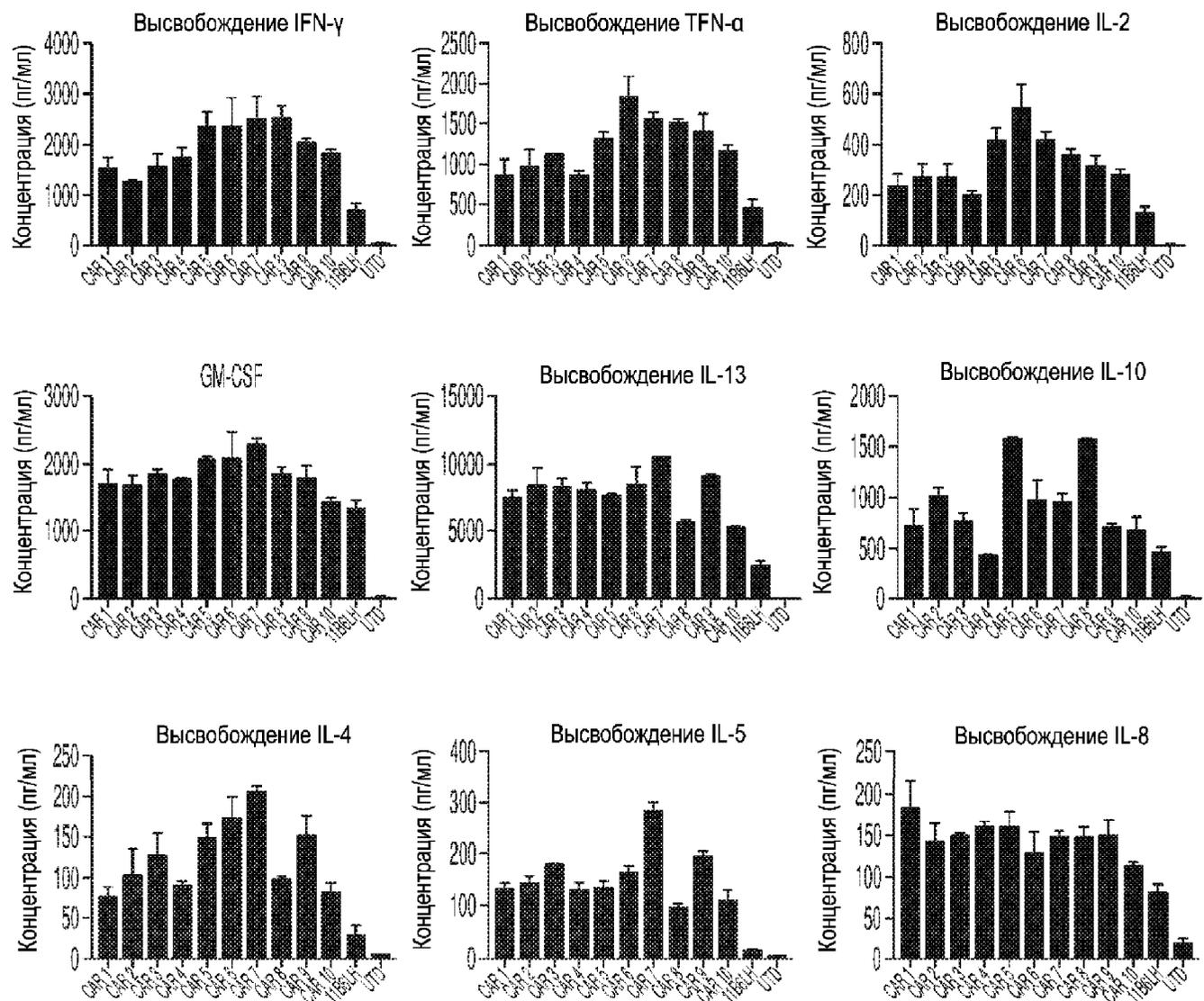
**ФИГ. 7Е**

**ФИГ. 7F**

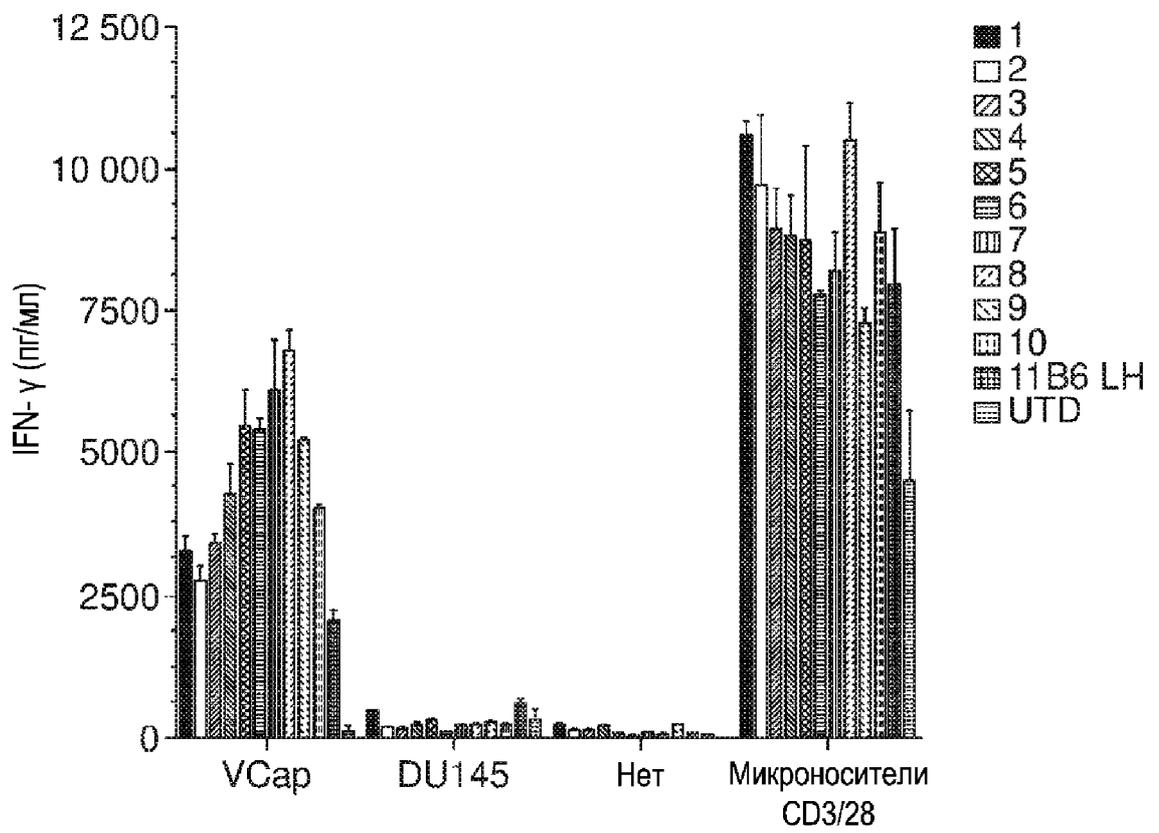
DU145 E:T=1:1



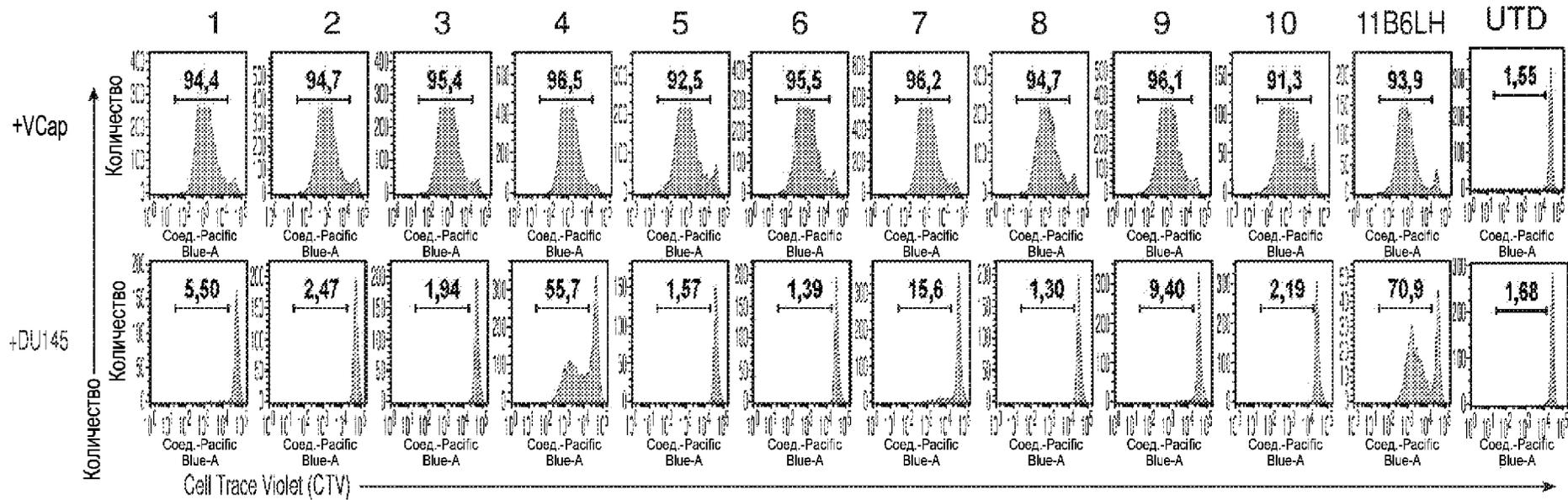
**ФИГ. 8**



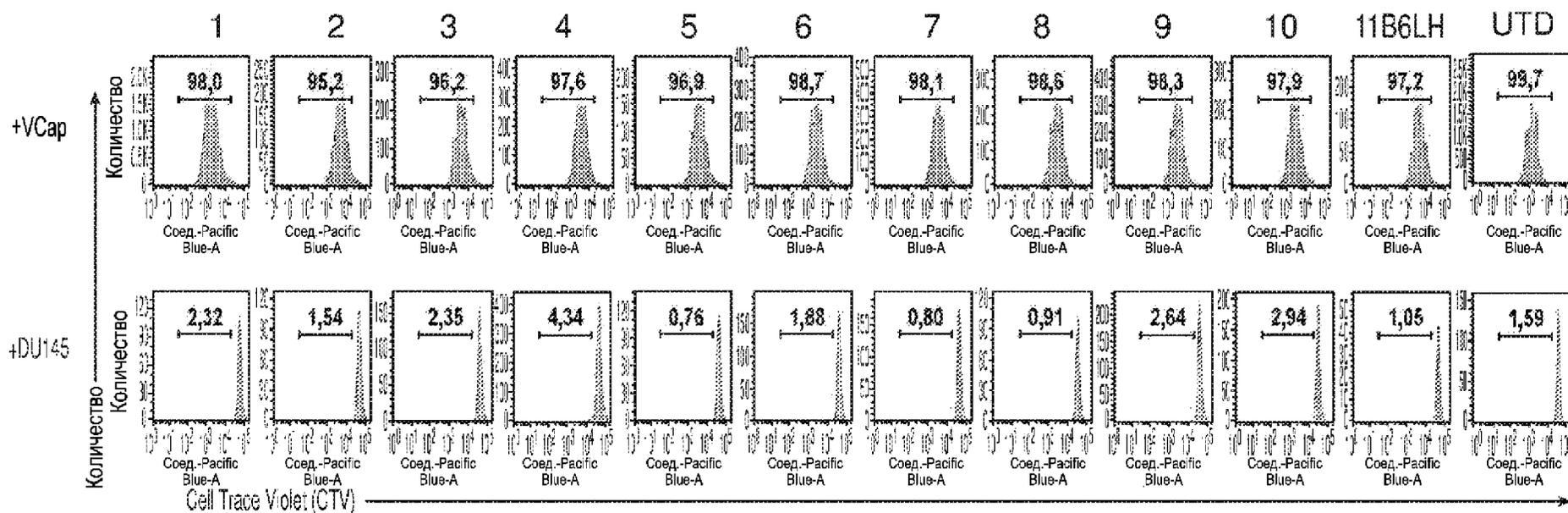
ФИГ. 9



# ФИГ. 10А

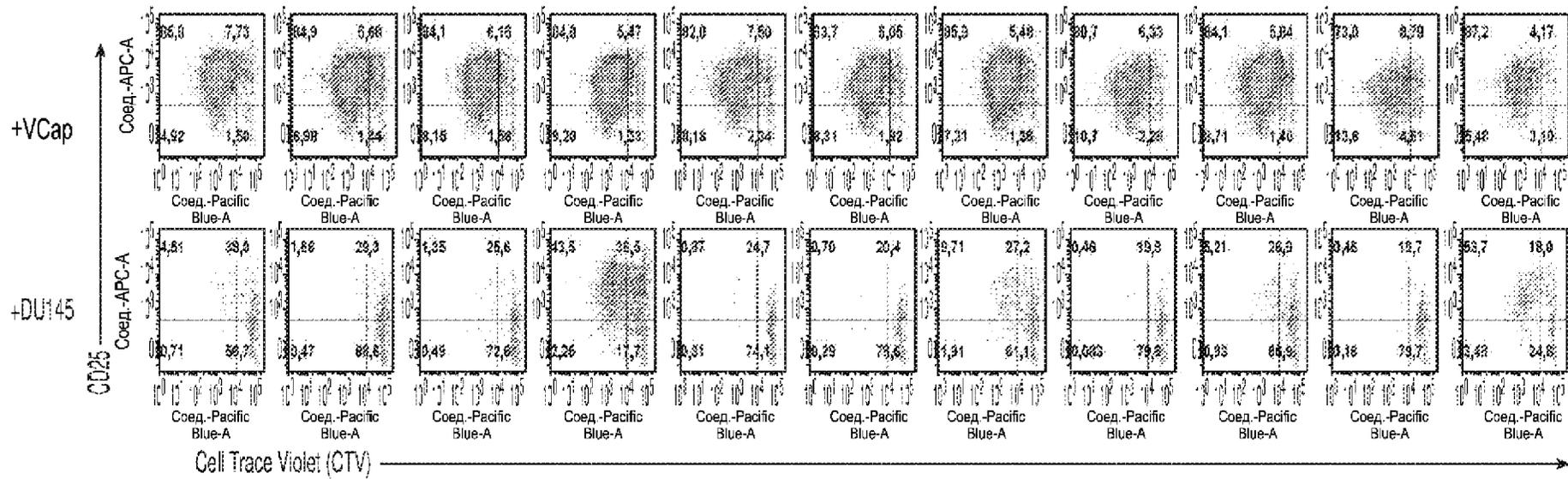


# ФИГ. 10В



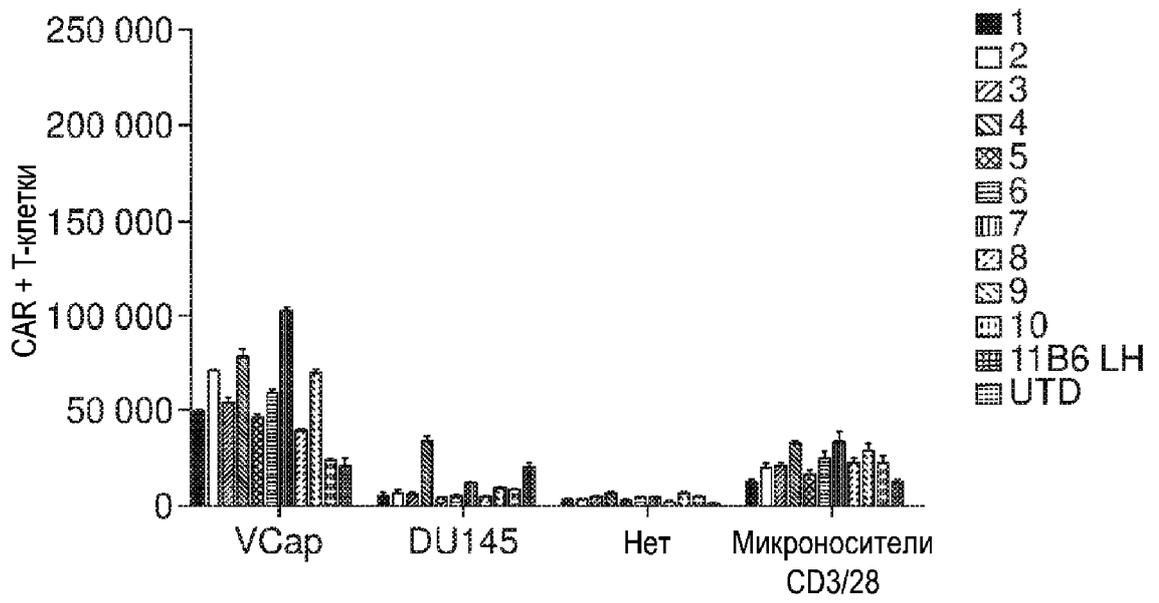
20/40

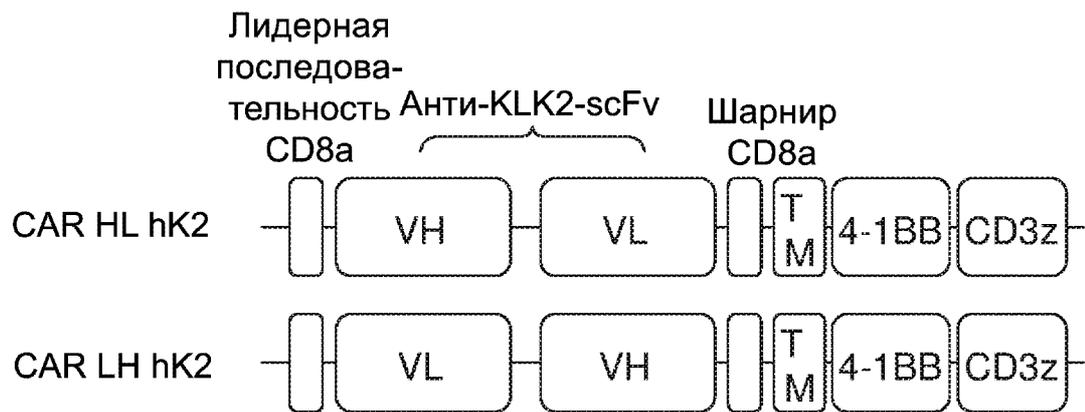
# ФИГ. 10С



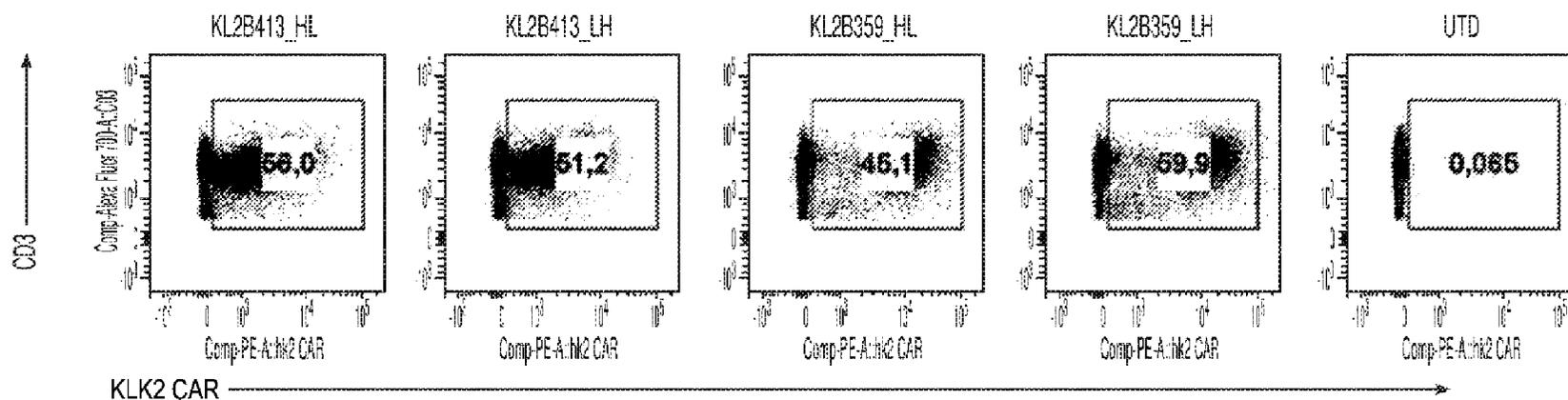


**ФИГ. 10Е**

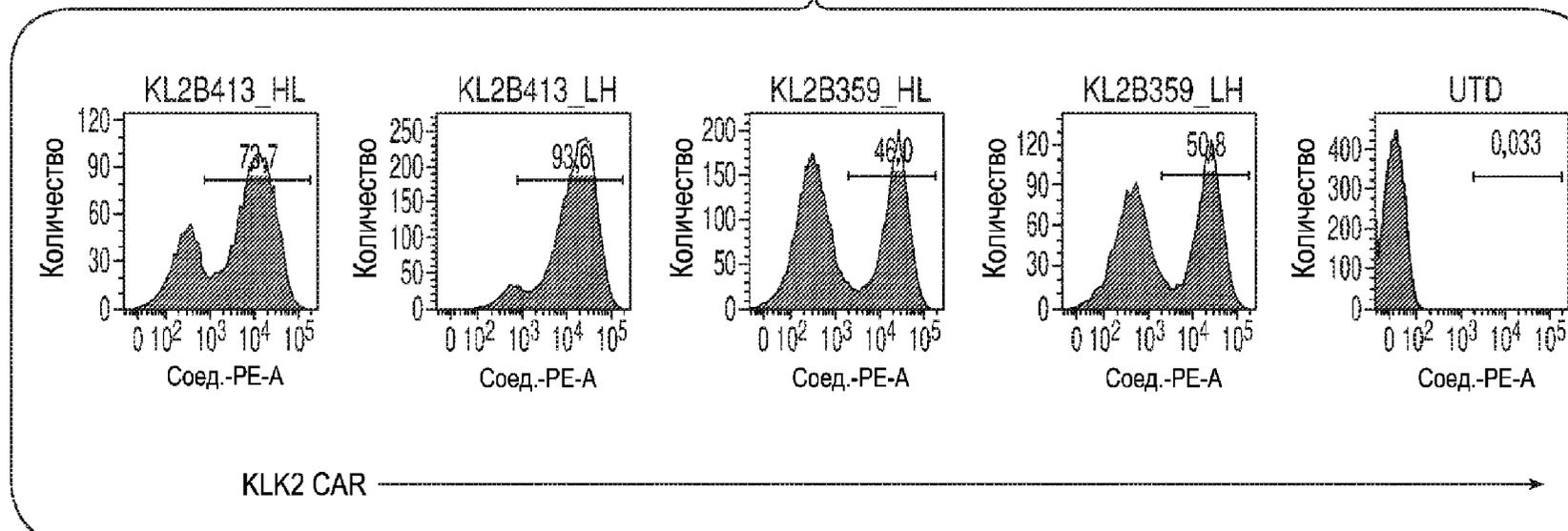


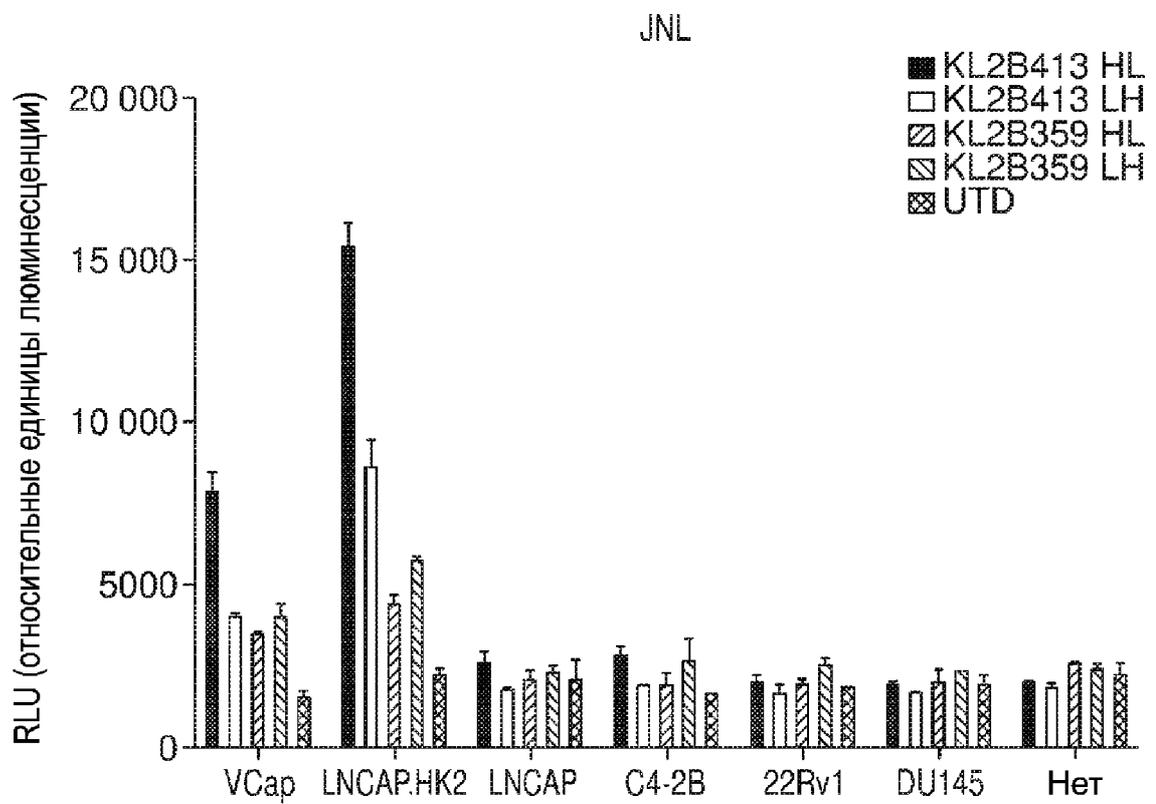
**ФИГ. 11А**

# ФИГ. 11В

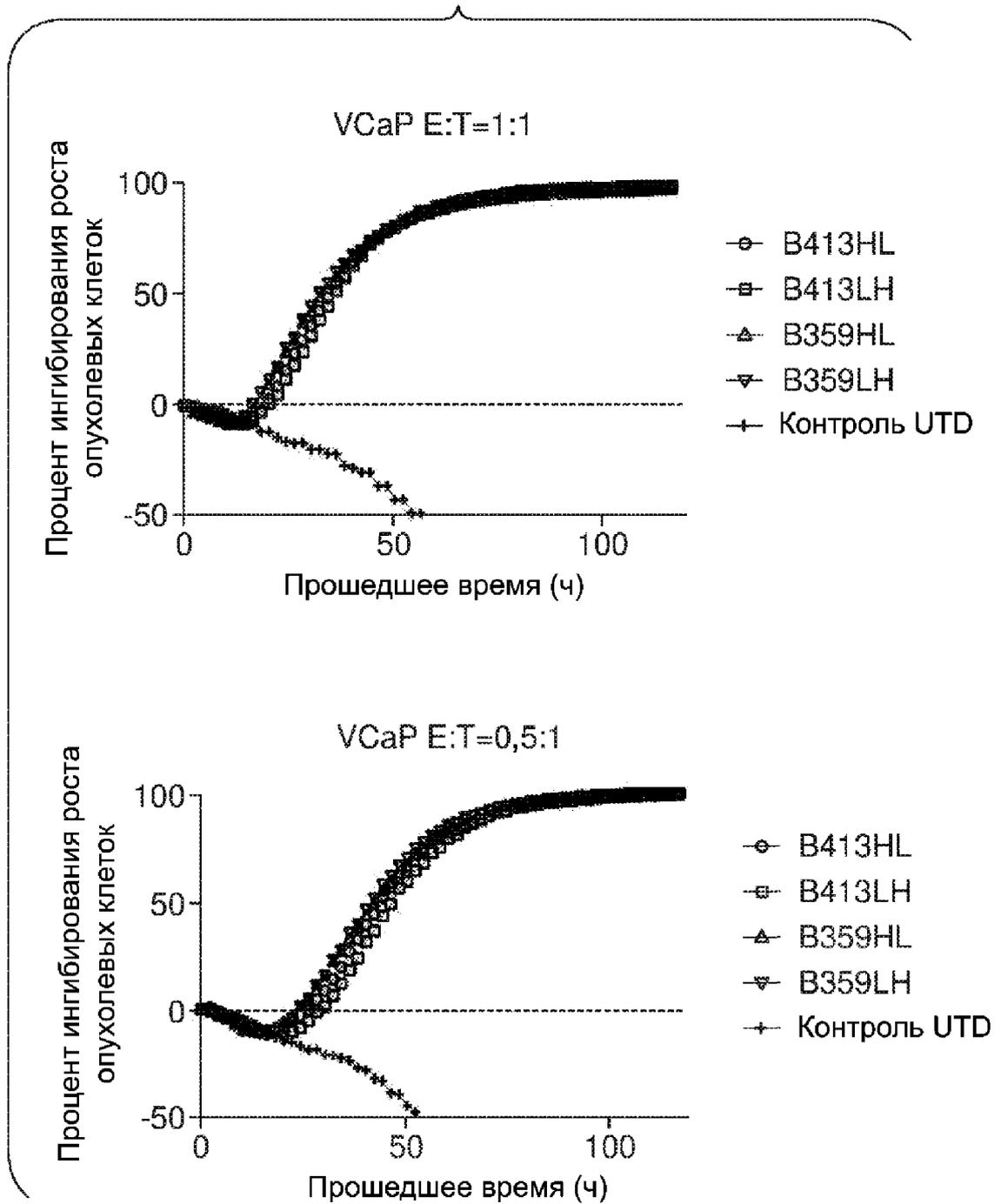


**ФИГ. 12А**



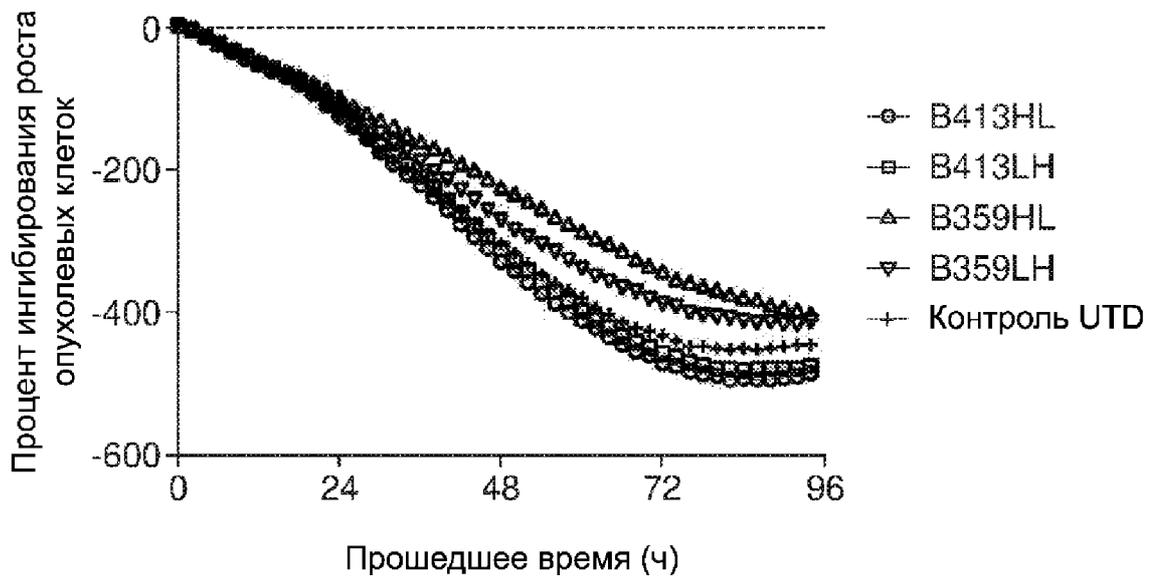
**ФИГ. 12В**

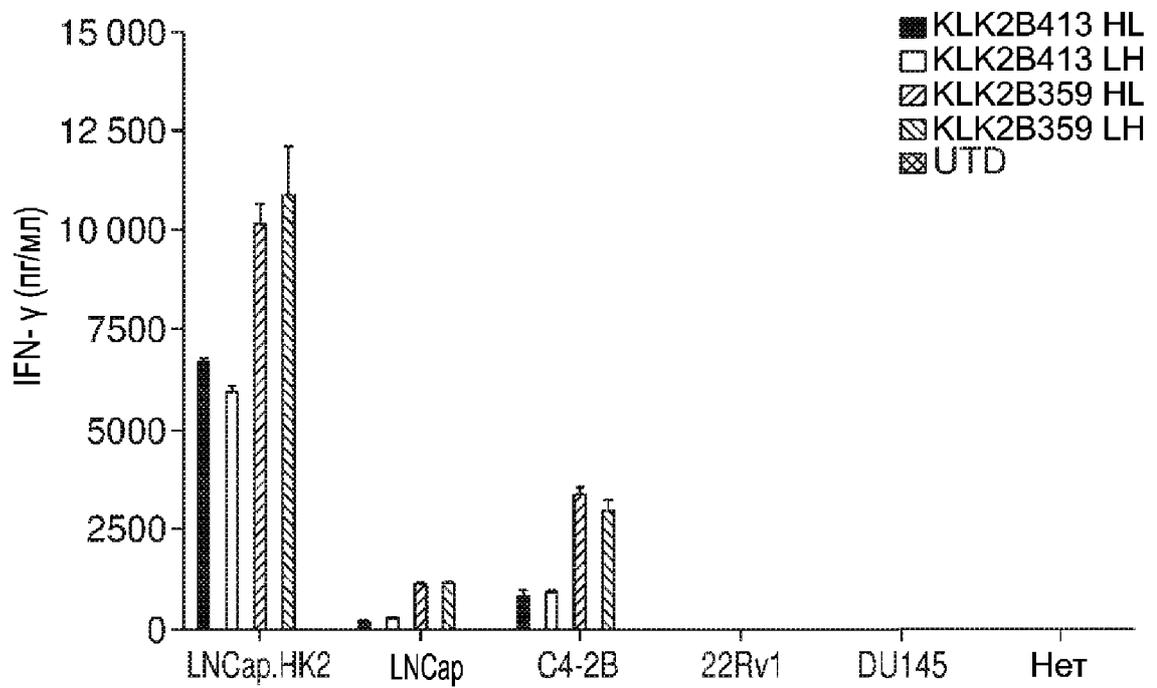
ФИГ. 13А



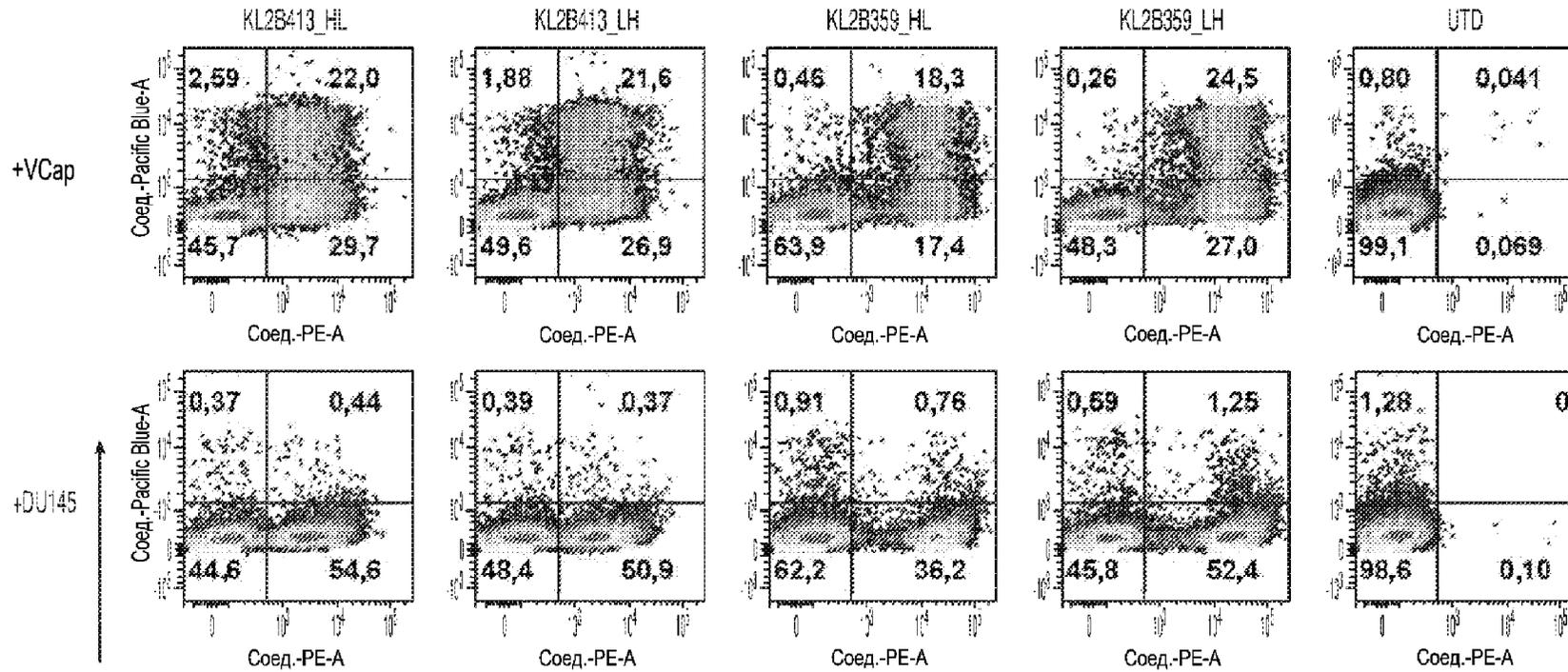
**ФИГ. 13В**

DU145 E:T=1:1



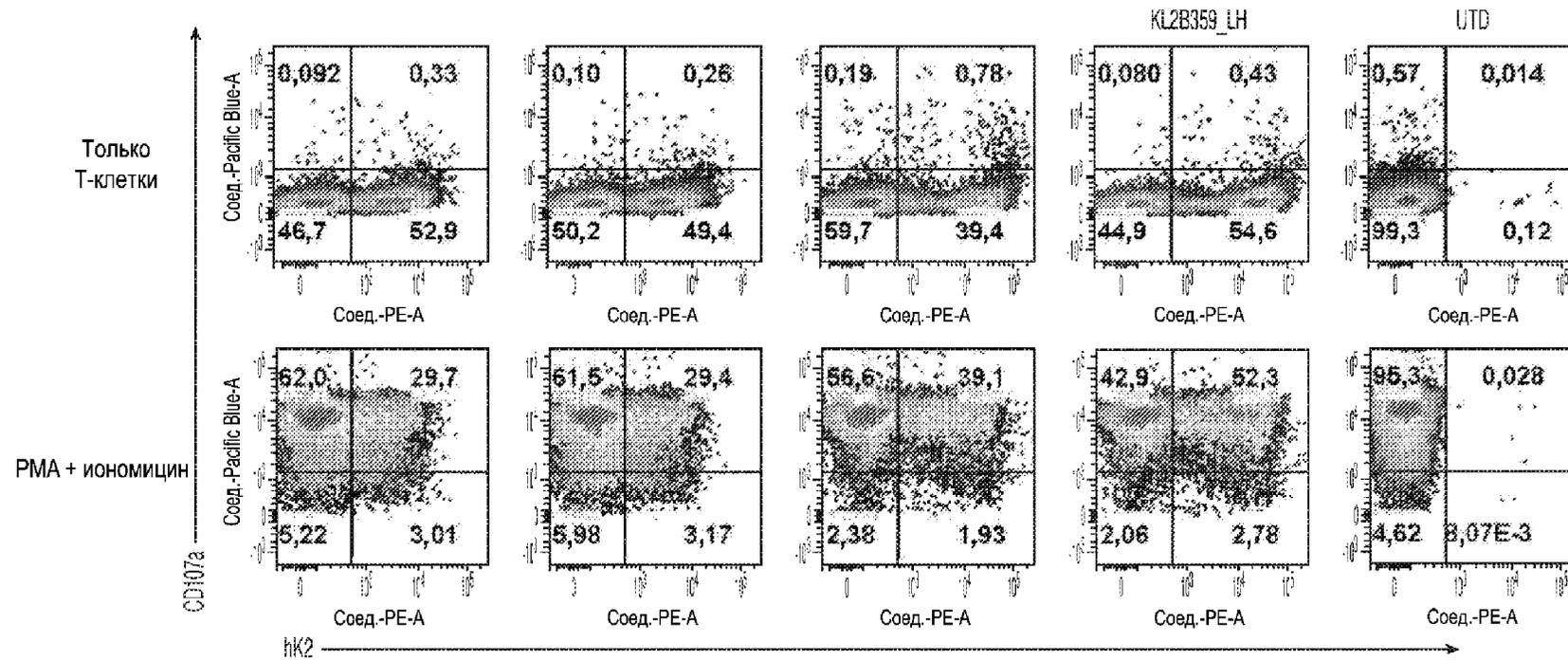
**ФИГ. 14**

# ФИГ. 15

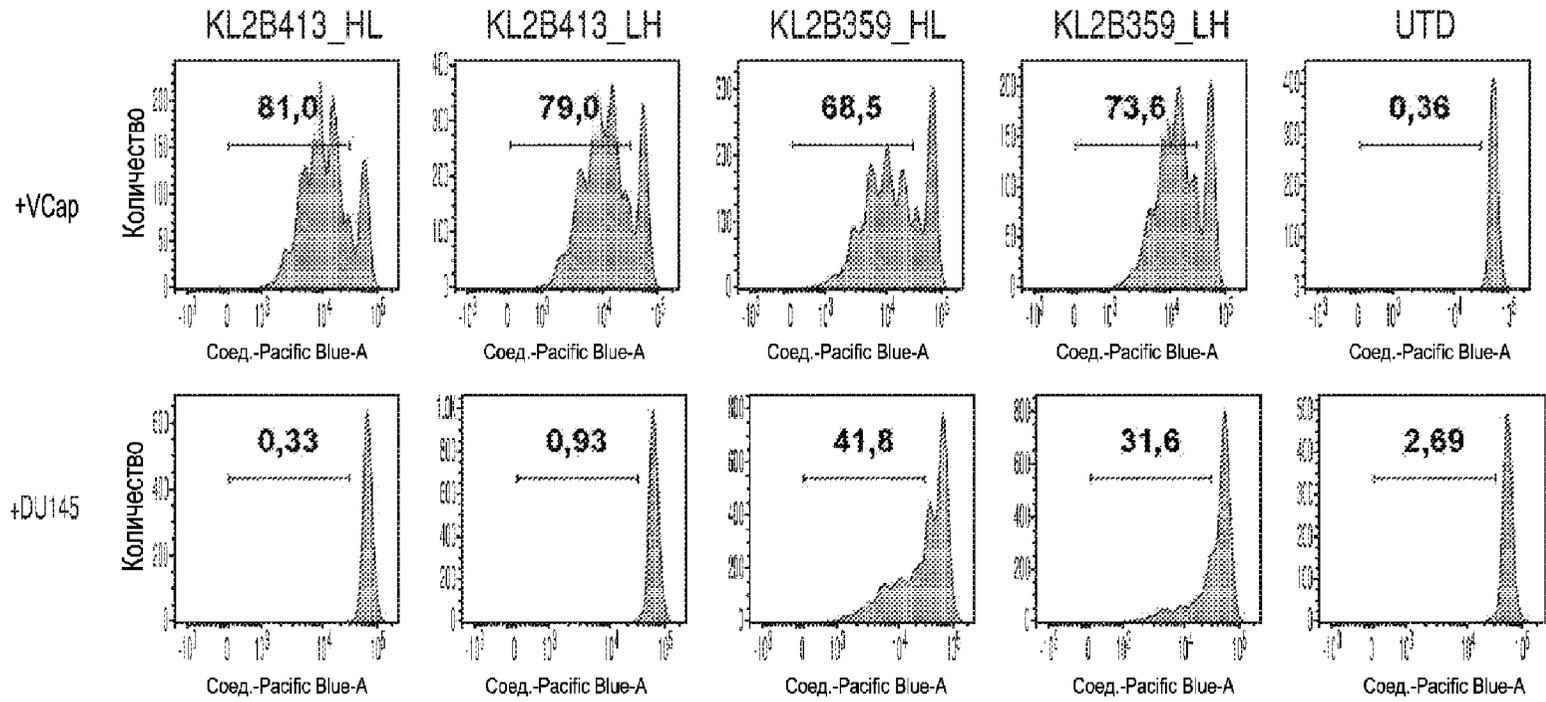


Продолжение на следующей странице

Начало на предыдущей странице



# ФИГ. 16А

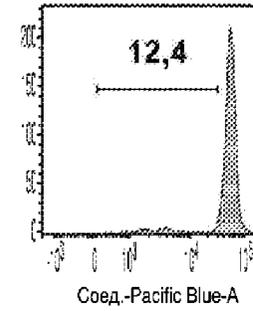
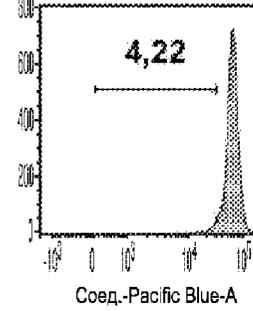
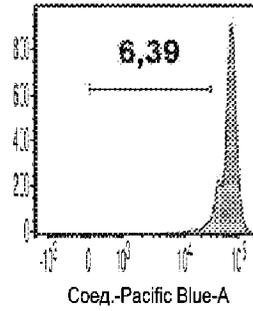
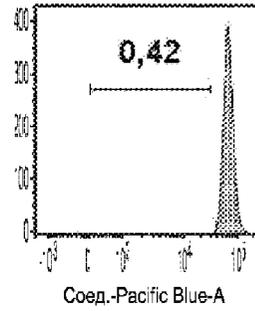
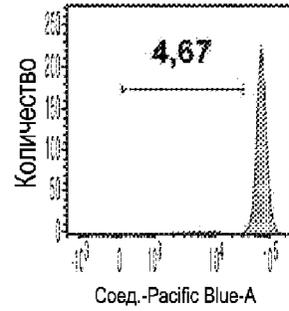


33/40

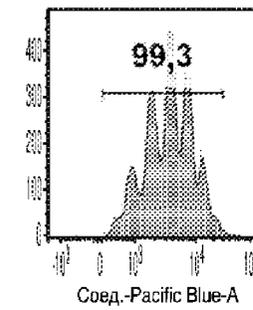
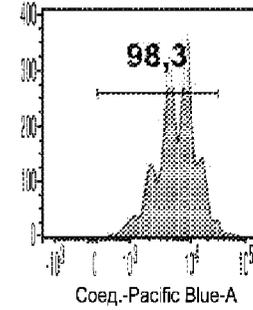
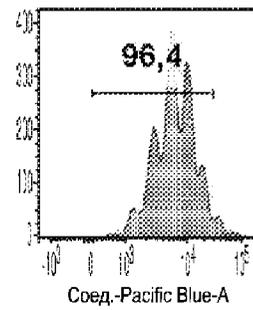
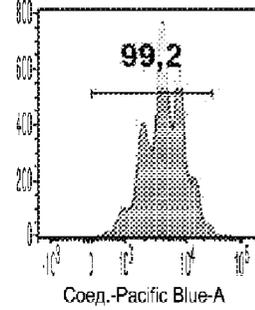
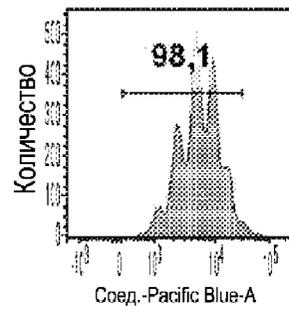
Продолжение на следующей странице

Начало на предыдущей странице

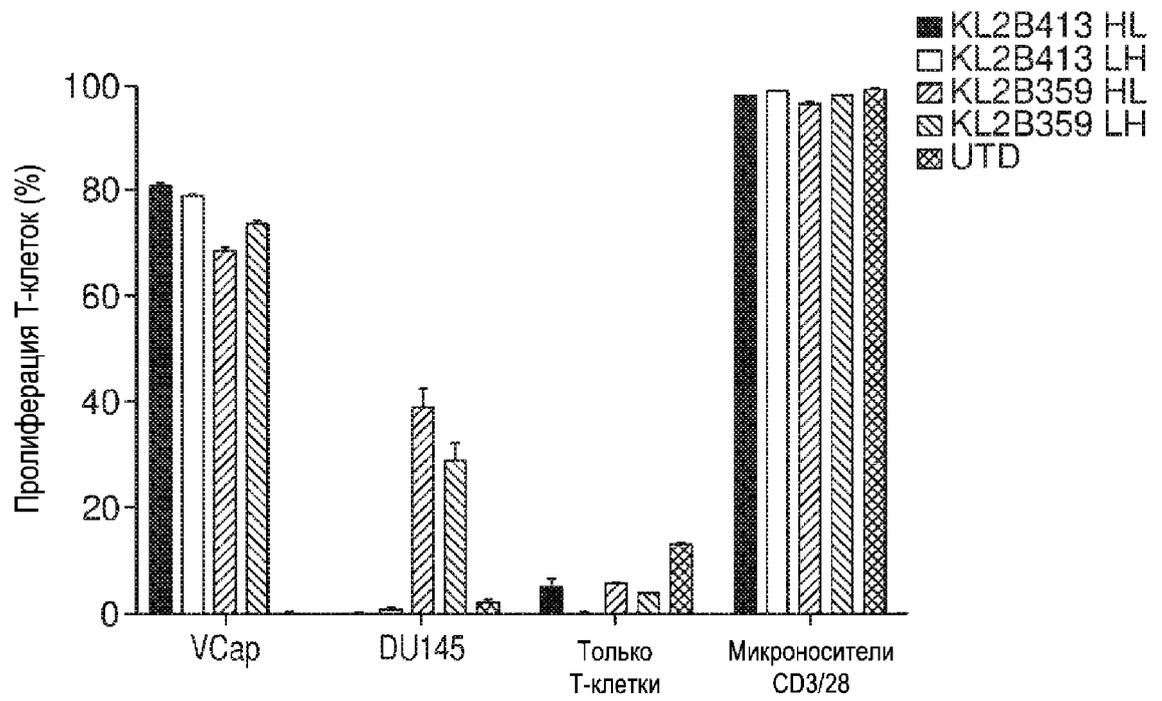
Только  
Т-клетки



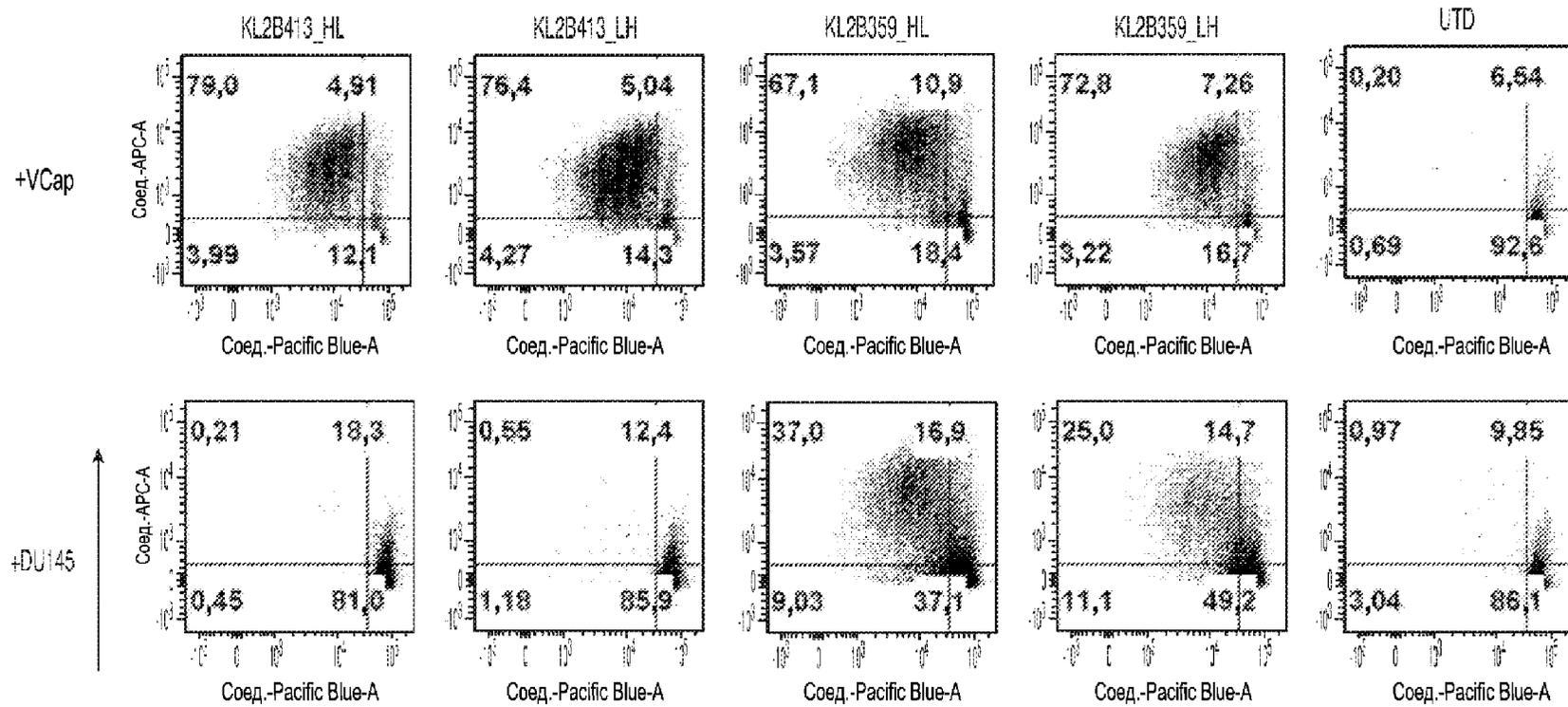
Микроносители  
+CD3/28



CTV →

**ФИГ. 16В**

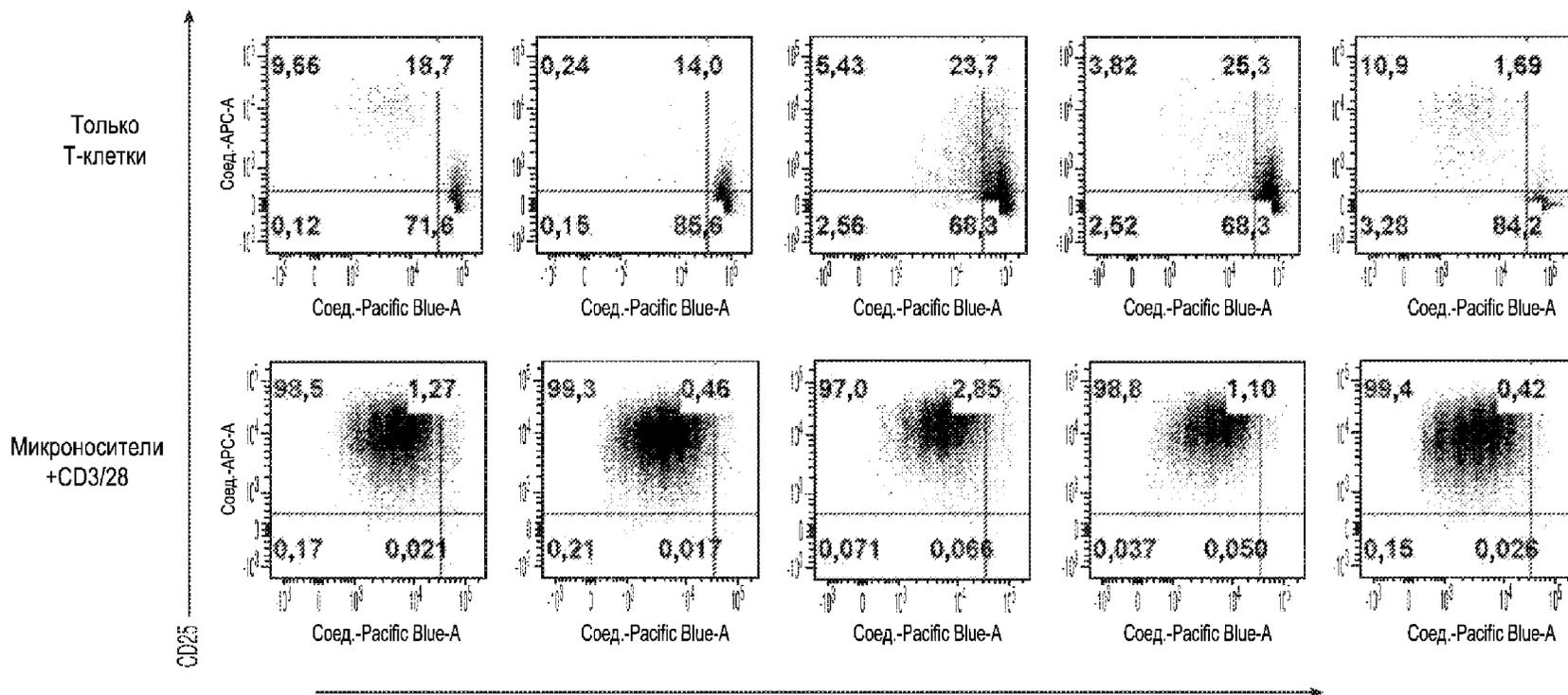
# ФИГ. 16С

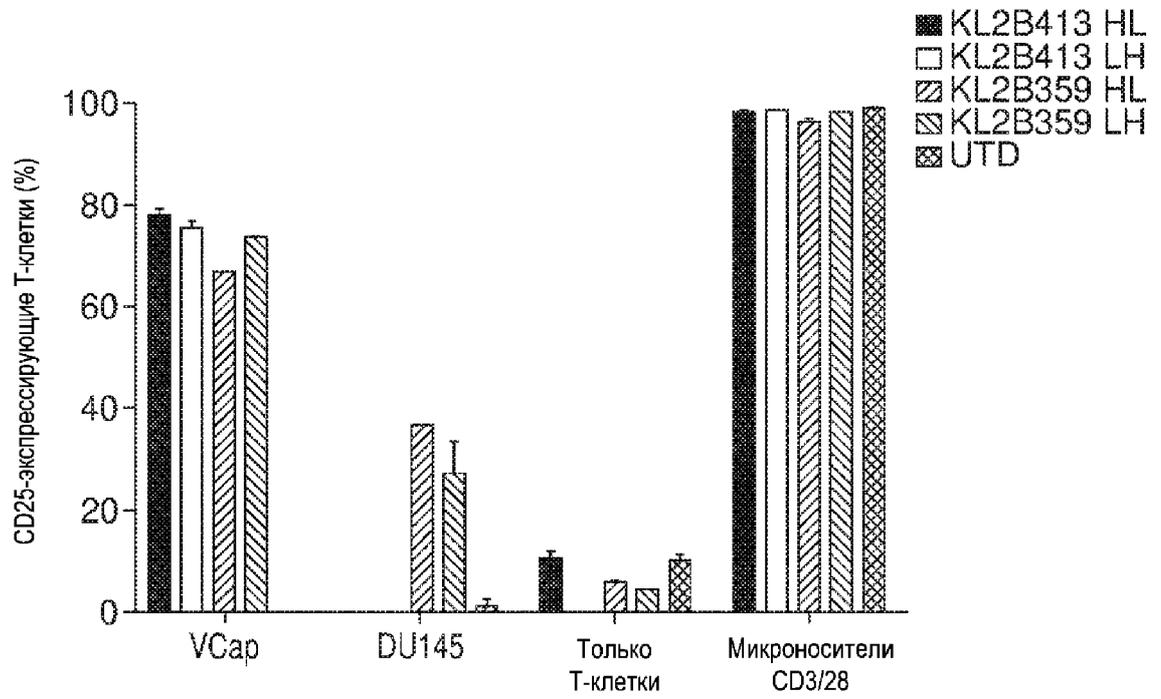


36/40

Продолжение на следующей странице

Начало на предыдущей странице



**ФИГ. 16D**



## ФИГ. 17В

1 50  
 h1136 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL  
 KL23494 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL  
 KL23467 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL  
 KL2330 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL  
 KL23413 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL  
 KL2353 VPLIEGRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCL

51 100  
 h1136 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS  
 KL23494 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS  
 KL23467 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS  
 KL2330 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS  
 KL23413 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS  
 KL2353 KKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDS

101 150  
 h1136 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLLR  
 KL23494 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLLR  
 KL23467 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLLR  
 KL2330 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLLR  
 KL23413 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLLR  
 KL2353 SHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLLR

151 200  
 h1136 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCCGDSGGPL  
 KL23494 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCCGDSGGPL  
 KL23467 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCCGDSGGPL  
 KL2330 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCCGDSGGPL  
 KL23413 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCCGDSGGPL  
 KL2353 PRSLQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCCGDSGGPL

201 244  
 h1136 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP  
 KL23494 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP  
 KL23467 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP  
 KL2330 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP  
 KL23413 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP  
 KL2353 VCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANP