(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390649 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.04

(22) Дата подачи заявки
2021.08.20

(51) Int. Cl. ***A61K 39/00*** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/49 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 47/59 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01)
A61K 47/61 (2017.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ CAR, IN VIVO

(31) **63/068,876; 63/154,609**
(32) **2020.08.21; 2021.02.26**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/046994**
(87) **WO 2022/040586 2022.02.24**
(88) **2022.05.12**

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Коши Сандип Тхариан, Дранофф Гленн, Броджи Мария Анна София, Бриджмен Крис, Кэнхам Стивен Майкл, Меллс Йоел (US), Сиб Режи (CH), Гранда Брайан Вальтер, Тринор Луиз Мэри, Джэйэшенкар Шиамали, Янг Дженнифер, Рэйо Эми, Прайс Эндрю Патрик (US), Скегро Дарко, Гийо Джастин (CH), Апсунде Тушар Датту, Ли Камерон Чак-Мунн (US), Бардрофф Михаэль, Миллер Сандра (DE)

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

(57) Аспекты настоящего изобретения в целом относятся к применению биологических материалов для получения клеток, экспрессирующих CAR, in vivo. В некоторых вариантах осуществления биологические материалы включают в себя одно или несколько из композиции для привлечения клеток, вирусного вектора и/или средства для активации клеток.

202390649 A1

202390649 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577343EA/022

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ CAR, IN VIVO

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/068876, поданной 21 августа 2020 года, и предварительной заявке на патент США № 63/154609, поданной 26 февраля 2021 года, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 20 августа 2021 года, имеет название N2067-7176WO_SL.txt, и ее размер составляет 987095 байтов.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Аспекты настоящего изобретения в целом относятся к применению биологических материалов для получения клеток, экспрессирующих CAR, in vivo. В некоторых вариантах осуществления биологические материалы содержатся в композиции, которая дополнительно содержит одно или несколько из композиции для привлечения клеток, вирусного вектора и/или средства для активации клеток.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Протоколы адоптивного переноса Т-клеток демонстрируют потенциал в отношении ряда путей терапевтического применения, как, например, при раке, при этом виды терапии с использованием CAR-T-клеток недавно были одобрены для лечения В-клеточных злокачественных новообразований. Существующие методики изготовления CAR-T-клеток осуществляют ex vivo: при этом клетки извлекают из организма субъекта, конструируют их таким образом, чтобы они экспрессировали химерный антигенный рецептор (CAR), и затем повторно вводят их в организм субъекта для лечения заболевания, нарушения или состояния, такого как рак. В данной области техники сохраняется необходимость в эффективном изготовлении клеток, экспрессирующих CAR, включая без ограничения таковое, обеспечивающее возможность сайт-специфической доставки и/или получения in vivo.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описана первая композиция, содержащая биологический материал и фактор привлечения клеток; и вторая композиция, содержащая вирусный вектор. В некоторых аспектах в настоящем изобретении описана первая композиция, содержащая биологический материал и молекулу (например, VEGF-C, IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), GM-CSF, CXCL12, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10 или CXCL11); и вторая композиция, содержащая вирусный вектор.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описана первая композиция, содержащая биологический материал и фактор привлечения клеток, где биологический материал содержит гидрогель, например, криогель, например, альгинатный криогель, и где фактор привлечения клеток содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 741 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, при условии, что аминокислота в положении 26 в SEQ ID NO: 741 не представляет собой цистеин (C), где необязательно аминокислота в положении 26 в SEQ ID NO: 741 представляет собой аланин (A).

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описана вторая композиция, содержащая мезопористую частицу кремнезема; вирусный вектор и средство для активации клеток.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ трансдукции клеток субъекта in vivo или лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта. Способ включает введение биологического материала и фактора привлечения клеток в участок (например, верхнее подкожное пространство или подкожное пространство, прилегающее к дерме) у субъекта и введение субъекту вирусного вектора или нуклеиновой кислоты, содержащих трансген; за счет чего осуществляется трансдукция клеток субъекта с помощью трансгена. В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ трансдукции клеток субъекта in vivo или лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта. Способ включает введение биологического материала и молекулы (например, VEGF-C, IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), GM-CSF, CXCL12, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10 или CXCL11) в участок (например, верхнее подкожное пространство или подкожное пространство, прилегающее к дерме) у субъекта и введение субъекту вирусного вектора или нуклеиновой кислоты, содержащих трансген; за счет чего осуществляется трансдукция клеток субъекта с помощью трансгена.

В некоторых вариантах осуществления биологический материал и фактор привлечения клеток содержатся в первой композиции, а вирусный вектор или нуклеиновая кислота содержатся во второй композиции. В некоторых вариантах осуществления биологический материал и молекула (например, VEGF-C, IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), GM-CSF, CXCL12, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10 или CXCL11) содержатся в первой композиции, а вирусный вектор или нуклеиновая кислота содержатся во второй композиции.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ трансдукции клеток субъекта in vivo или лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, при этом способ включает введение вирусного вектора или нуклеиновой кислоты, содержащих трансген, в участок у субъекта, где субъекту ранее вводили биологический материал и фактор привлечения клеток в количестве, достаточном для индуцирования лимфангиогенеза и/или привлечения Т-клеток в участок у субъекта; за счет чего осуществляется трансдукция клеток. В некоторых аспектах в настоящем изобретении

описан способ трансдукции клеток субъекта in vivo или лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, при этом способ включает введение вирусного вектора или нуклеиновой кислоты, содержащих трансген, в участок у субъекта, где субъекту ранее вводили биологический материал и молекулу (например, VEGF-C, IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), GM-CSF, CXCL12, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10 или CXCL11) в количестве, достаточном для индуцирования лимфангиогенеза и/или привлечения Т-клеток в участок у субъекта; за счет чего осуществляется трансдукция клеток.

В любом из аспектов в данном документе, например, в вышеописанных композициях и способах, могут применяться любые из вариантов осуществления в данном документе (например, нижеуказанные).

В некоторых вариантах осуществления биологический материал (i) содержит гидрогель; (ii) содержит криогель; (iii) содержит желатин, гиалуроновую кислоту, коллаген, альгинат, ламинин, хитозан, фиброин шелка, агарозу, поли(этиленгликоль), поливиниловый спирт и/или гидроксиэтилметилакрилат; (iv) содержит альгинатный гидрогель, где необязательно альгинатный гидрогель дополнительно содержит норборнен и/или тетразин, где необязательно норборнен и/или тетразин ковалентно связаны, например, химически связаны, или нековалентно связаны с альгинатом, например, адсорбированы на нем; и/или (v) содержит поры диаметром от приблизительно 10 мкм до приблизительно 300 мкм, например, от приблизительно 50 мкм до приблизительно 300 мкм, или не содержит пор; и/или (vi) является химически сшитым. В некоторых вариантах осуществления первая композиция, содержащая биологический материал, дополнительно содержит лапонит, где необязательно лапонит присутствует в концентрации от приблизительно 0,15 мг/мл до приблизительно 0,35 мг/мл, например, приблизительно 0,25 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления биологический материал дополнительно содержит лапонит, где необязательно лапонит присутствует в концентрации от приблизительно 0,15 мг/мл до приблизительно 0,35 мг/мл, например, приблизительно 0,25 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток (i) нековалентно связан с биологическим материалом, например, адсорбирован на нем; или (ii) ковалентно связан с биологическим материалом, например, конъюгирован с ним. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток (i) индуцирует лимфангиогенез; (ii) индуцирует рост лимфатических эндотелиальных клеток и/или (ii) привлекает иммунные клетки, где необязательно иммунные клетки включают в себя Т-клетки и/или NK-клетки.

В некоторых вариантах осуществления индуцирование лимфангиогенеза (i) включает повышение уровня лимфатических эндотелиальных клеток (LEC) (например, CD45- CD31+ PDPN+ клеток), где необязательно уровень LEC повышается на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или 200% по сравнению с эталонным уровнем (например, уровнем LEC в участке у субъекта до

инъекции множества композиций или первой композиции), при измерении с помощью анализа, например, анализа методом проточной цитометрии, например, как описано в примере H или I; и/или (ii) приводит к получению по меньшей мере 50 LEC (например, по меньшей мере 75, 100, 125, 150, 200, 225 или 250 LEC) на миллиграмм ткани при измерении с помощью анализа, например, анализа методом проточной цитометрии, например, как описано в примере H или I.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток осуществляет привлечение Т-клеток, где необязательно Т-клетки включают в себя необученные Т-клетки (например, CD45RA+ CD62L+ Т-клетки или CD45RA+ CD62L+ CCR7+ CD27+ CD95+ Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления привлечение Т-клеток включает повышение уровня Т-клеток, где необязательно уровень Т-клеток повышается на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200% или 300% по сравнению с эталонным уровнем (например, уровнем Т-клеток в участке у субъекта до инъекции множества композиций или первой композиции), при измерении с помощью анализа, например, анализа методом проточной цитометрии, например, как описано в примере H или I.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток выбран из VEGF-C, IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), GM-CSF, CXCL12, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10 или CXCL11. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток включает в себя VEGF-C или его функциональный вариант; IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или его функциональный вариант; IL-7 или его функциональный вариант или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток включает в себя VEGF-C, где необязательно VEGF-C (i) включает в себя зрелый пептид VEGF-C, необязательно его минорную или основную форму или мутантный вариант; (ii) представляет собой мономер или димер и/или (iii) присутствует в эффективном количестве, необязательно в количестве, которое меньше 1 мг или составляет приблизительно это значение, меньше 10 мг или составляет приблизительно это значение, больше 10 мкг или составляет приблизительно это значение, больше 1 мкг или составляет приблизительно это значение, от приблизительно 1 мкг до 1 мг, от приблизительно 10 мкг до 1 мг, от приблизительно 1 мкг до 10 мг или от приблизительно 10 мкг до 10 мг.

В некоторых вариантах осуществления VEGF-C содержит (i) аминокислотную последовательность согласно любой из последовательностей, представленных в таблице 18, или последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, где необязательно последовательность содержит или не содержит линкер (например, глицин-сериновый линкер) и/или His-метку; и/или (ii) аминокислотную замену C137A, пронумерованную согласно SEQ ID NO: 725.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток содержит (i) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 741 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью

последовательности с ней, при условии, что аминокислота в положении 26 в SEQ ID NO: 741 не представляет собой цистеин (C), где необязательно аминокислота в положении 26 в SEQ ID NO: 741 представляет собой аланин (A); (ii) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 743 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней; (iii) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 740 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней; (iv) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 736 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней; (v) линкер, например, где линкер имеет последовательность Gly-Ser, где необязательно линкер расположен с C-концевой стороны от SEQ ID NO: 743 или последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней; (vi) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 735 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней; (vii) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 734 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней и/или (viii) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 733 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления любая из композиций, например, любая из первых композиций, описанных в данном документе, дополнительно содержит IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления любая из композиций, например, любая из первых композиций, описанных в данном документе, дополнительно содержит IL-7 или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления любая из композиций, например, любая из первых композиций, описанных в данном документе, дополнительно содержит IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или его функциональный вариант и IL-7 или его функциональный вариант.

В некоторых вариантах осуществления любой из способов, описанных в данном документе, дополнительно включает введение IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления любой из способов, описанных в данном документе, дополнительно включает введение IL-7 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления любой из способов, описанных в данном документе, дополнительно включает введение IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) и его функционального варианта или IL-7 или его функционального варианта.

В некоторых вариантах осуществления вторая композиция дополнительно содержит частицу. В некоторых вариантах осуществления частица представляет собой мезопористую частицу, частицу кремнезема и/или мезопористую частицу кремнезема, где

необязательно мезопористая частица кремнезема представляет собой мезопористый стержень из кремнезема. В некоторых вариантах осуществления мезопористая частица кремнезема содержит модификацию поверхности, где необязательно модификация поверхности включает в себя (a) -OH (гидроксил), амин, карбоновую кислоту, фосфонат, галогенид, азид, алкин, эпоксид, сульфгидрил, полиэтиленимин, гидрофобный фрагмент или их соли, необязательно с использованием C1-C20-алкильного линкера или линкера (O(CH2CH2)1-25; (b) первичный, вторичный, третичный или четвертичный амин и/или (c) полиэтиленимин со средней молекулярной массой от приблизительно 1000 до 20000 Да, от приблизительно 1200 до 15000 Да, от приблизительно 1500 до 12000 Да, приблизительно 2000 Да, приблизительно 3000 Да, приблизительно 4000 Да, приблизительно 5000 Да, приблизительно 6000 Да, приблизительно 7000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 9000 Да или приблизительно 10000 Да согласно измерению посредством гель-проникающей хроматографии (GPC). В некоторых вариантах осуществления мезопористая частица кремнезема (i) представляет собой мезопористую частицу кремнезема, функционализированную с помощью триметиламмония, например, мезопористую частицу кремнезема, функционализированную с помощью N,N,N-триметилпропан-1-аммония; (iii) содержит множество пор, где необязательно диаметр пор составляет 2-50 нм; и/или (iv) предусматривает площадь поверхности, составляющую по меньшей мере приблизительно 100 м2/г.

В некоторых вариантах осуществления (i) вирусный вектор нековалентно, например, электростатически, или ковалентно связан с мезопористой частицей кремнезема; и/или (ii) средство для активации клеток нековалентно или ковалентно связано с мезопористой частицей кремнезема. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор включает в себя (i) лентивирус, ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус или вирус герпеса и/или (ii) вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный TCR, цитокин, хемокин, shRNA или полипептид, сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген.

В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Ag Tn, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R,

CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, E6, E7 HPV, MAGE-A1, ETV6-AML, белка 17 сперматозоидов, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутантного p53, простеина, сурвивина и теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутантного Ras, hTERT, антигенов саркомы с точечными разрывами при транслокации, ML-IAP, ERG (продукта слитого гена TMPRSS2 и ETS), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1 и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор кодирует CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен, где (i) антигенсвязывающий домен связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD123, CD22, CD20, EGFRvIII, BCMA, мезотелина, CD33, CLL-1 и любой их комбинации; (ii) трансмембранный домен содержит шарнирную область CD8; (iii) костимулирующая сигнальная область выбрана из костимулирующего сигнального домена 4-1BB или CD28; и/или (iv) сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления вторая композиция дополнительно содержит средство для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток включает в себя средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток включает в себя полиспецифическую связывающую молекулу, содержащую (A) домен, связывающий CD3, и (B) домен, связывающий костимулирующую молекулу (например, домен, связывающий CD2, или домен, связывающий CD28).

В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, расположен с N-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу, например, Fab для CD2 или Fab для CD28; или домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, расположен с C-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу, например, Fab для CD2 или Fab для CD28, где необязательно между доменом, связывающим CD3, и доменом, связывающим костимулирующую молекулу, расположена Fc-область; или полиспецифическая связывающая молекула содержит CH2, и домен, связывающий CD3, расположен с N-концевой стороны от CH2.

В некоторых вариантах осуществления вторых композиций и способов в данном документе полиспецифическая связывающая молекула содержит (i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH домена, связывающего CD3, VL домена,

связывающего CD3, VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, CH2 и CH3; и (ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит (i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, CH2, CH3, VH домена, связывающего CD3, и VL домена, связывающего CD3; и (ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит (i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, VH домена, связывающего CD3, VL домена, связывающего CD3, CH2 и CH3; и (ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит scFv, и домен, связывающий костимулирующую молекулу, является частью Fab-фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток содержит аминокислотную последовательность любой тяжелой цепи, представленной в таблице 20, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; и/или аминокислотную последовательность любой легкой цепи, представленной в таблице 20, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток конъюгировано с частицей, например, мезопористой частицей кремнезема, или адсорбировано на ней.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит Fc-область, содержащую (i) мутацию L234A, L235A, S267K и P329A (LALASKPA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; (ii) мутацию L234A, L235A и P329G (LALAPG), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; (iii) мутацию G237A, D265A, P329A и S267K (GADAPASK), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; (iv) мутацию L234A, L235A и G237A (LALAGA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; (v) мутацию D265A, P329A и S267K (DAPASK), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; (vi) мутацию G237A, D265A и P329A (GADAPA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; (vii) мутацию L234A, L235A и P329A (LALAPA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; или (viii) аминокислотную последовательность любой из Fc-областей в таблице 20 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с ней.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит (i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 726, 1416, 893, 1417 или 895 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью

последовательности с ней; и/или (ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 728, 730, 892 или 894 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит (i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 726 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 728 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; (ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 726 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 730 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; (iii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1416 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 728 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; (iv) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1416 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 730 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; (v) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 893 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 892 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; (vi) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1417 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 892 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; или (vii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 895 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 894 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления вторая композиция дополнительно содержит первую популяцию частиц и вторую популяцию частиц, например, первую популяцию мезопористых частиц кремнезема и вторую популяцию мезопористых частиц кремнезема, где первая популяция содержит вирусный вектор, и вторая популяция содержит средство для активации клеток, например, где вирусный вектор нековалентно связан с частицей из первой популяции, и средство для активации клеток нековалентно связано с частицей из второй популяции.

В некоторых вариантах осуществления композиция, например, первая или вторая композиция, является подходящей для инъекционного применения.

В некоторых вариантах осуществления композиция, например, первая или вторая композиция, описанная в данном документе, дополнительно содержит ингибитор Tet2 и/или ингибитор ZBTB32. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Tet2 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на один или несколько сайтов в пределах гена, кодирующего Tet2, или ее соответствующие регуляторные элементы; (2) нуклеиновую кислоту (например, siRNA или shRNA), которая ингибирует экспрессию Tet2; (3) белок Tet2 (например, с доминантно-негативным эффектом, например, каталитически неактивный) или партнера Tet2 по связыванию (например, партнера Tet2 по связыванию с доминантно-негативным эффектом); (4) малую молекулу, которая ингибирует экспрессию и/или функцию Tet2; (5) нуклеиновую кислоту, кодирующую любое из (1)-(3); или (6) любую комбинацию (1)-(5). В некоторых вариантах осуществления представлены ген ZBTB32 или один или несколько его компонентов; (2) нуклеиновая кислота, кодирующая один или несколько компонентов системы редактирования генов; или (3) комбинация (1) и (2). В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на ген ZBTB32, или один или несколько ее компонентов. В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов системы редактирования генов. В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя комбинацию (1) и (2).

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, дополнительно включают введение субъекту (i) ингибитора Tet2, где необязательно ингибитор Tet2 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на один или несколько сайтов в пределах гена, кодирующего Tet2, или ее соответствующие регуляторные элементы; (2) нуклеиновую кислоту (например, siRNA или shRNA), которая ингибирует экспрессию Tet2; (3) белок Tet2 (например, с доминантно-негативным эффектом, например, каталитически неактивный) или партнера Tet2 по связыванию (например, партнера Tet2 по связыванию с доминантно-негативным эффектом); (4) малую молекулу, которая ингибирует экспрессию и/или функцию Tet2; (5) нуклеиновую кислоту, кодирующую любое из (1)-(3); или (6) любую комбинацию (1)-(5); и/или (ii) ингибитора ZBTB32, где необязательно ингибитор ZBTB32 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на ген ZBTB32, или один или несколько ее

компонентов; (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов системы редактирования генов, или (3) комбинацию (1) и (2). В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на ген ZBTB32, или один или несколько ее компонентов. В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов системы редактирования генов. В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя комбинацию (1) и (2).

В некоторых вариантах осуществления первую композицию вводят до введения второй композиции, где необязательно (i) первую композицию вводят за приблизительно 1-4 недели, например, за приблизительно 2 недели, до введения второй композиции; или (ii) первую композицию вводят за по меньшей мере две недели до введения второй композиции.

В некоторых вариантах осуществления любой из способов, описанных в данном документе, дополнительно включает оценивание, например, измерение, лимфангиогенеза в образце, полученном от субъекта (например, в образце, полученном из участка введения или вблизи него), где лимфангиогенез измеряют после введения первой композиции и/или до введения второй композиции, где необязательно измерение лимфангиогенеза включает определение значения уровня и/или активности лимфатических эндотелиальных клеток (LEC) (например, CD45- CD31+ PDPN+ клеток) в образце.

В некоторых вариантах осуществления любой из способов, описанных в данном документе, дополнительно включает оценивание, например, измерение, привлечения Т-клеток в образце, полученном от субъекта (например, в образце, полученном из участка введения или вблизи него), где привлечение Т-клеток измеряют после введения первой композиции и/или до введения второй композиции, где необязательно измерение привлечения Т-клеток включает определение значения уровня и/или активности Т-клеток (например, необученных Т-клеток, например, CD45RA+ CD62L+ Т-клеток и/или CD45RA+ CD62L+ CCR7+ CD27+ CD95+ Т-клеток) в образце.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется заболевание, нарушение или состояние или было диагностировано его наличие; и/или субъект является человеком.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние включает (i) рак; (ii) гематологический рак, где необязательно гематологический рак включает лейкоз или лимфому; (iii) гематологический рак, выбранный из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), множественной миеломы, острого лимфоидного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфоидного лейкоза (BALL), Т-клеточного острого лимфоидного лейкоза (TALL), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (SLL), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), DLBCL, ассоциированной с хроническим воспалением, хронического миелоидного лейкоза, миелопролиферативных новообразований, фолликулярной

лимфомы, педиатрической фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, MALT-лимфомы (экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны из лимфоидной ткани слизистых оболочек), лимфомы из клеток маргинальной зоны, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, новообразования из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки, лимфомы/лейкоза селезенки, диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки, варианта волосатоклеточного лейкоза, лимфоплазмоцитарной лимфомы, болезни тяжелых цепей, плазмоклеточной миеломы, солитарной плазмоцитомы кости, внекостной плазмоцитомы, нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, педиатрической нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, первичной кожной лимфомы из клеток центра фолликула, лимфоматоидного гранулематоза, первичной медиастинальной (тимической) крупноклеточной В-клеточной лимфомы, внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфомы, ALK+ крупноклеточной В-клеточной лимфомы, крупноклеточной В-клеточной лимфомы, возникающей при HHV8-ассоциированной многоочаговой болезни Кастлемана, первичной выпотной лимфомы, В-клеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза (AML) или неклассифицируемой лимфомы; (iv) солидный рак; (v) солидный рак, выбранный из одного или нескольких из мезотелиомы, злокачественной мезотелиомы плевры, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака легкого, крупноклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, аденокарциномы пищевода, рака молочной железы, глиобластомы, рака яичника, колоректального рака, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака кожи, меланомы, рака почки, рака печени, рака головного мозга, тимомы, саркомы, карциномы, рака матки, рака почки, рака желудочно-кишечного тракта, уротелиального рака, рака глотки, рака головы и шеи, рака прямой кишки, рака пищевода или рака мочевого пузыря или их метастазов; или (iv) аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или трансплантацию. В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляют собой аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или трансплантацию, и экспрессируемый CAR связывается с В-клеточным антигеном, например, CD19, CD20, CD22, CD123, FcRn5, FcRn2, BCMA, CS-1 и CD138.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние включает солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления при лечении солидной опухоли с помощью клетки, экспрессирующей CAR, изготовленной с применением способов, описанных в данном документе, клетка экспрессирует два CAR - первый CAR связывается с В-клеточным антигеном, а второй CAR связывается с антигеном солидной опухоли. В некоторых вариантах осуществления при лечении солидной опухоли с помощью клетки, экспрессирующей CAR, изготовленной с

применением способов, описанных в данном документе, клетка экспрессирует полиспецифический CAR, который содержит первый связывающий домен, который связывается с В-клеточным антигеном, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном солидной опухоли. Без ограничения какой-либо теорией, экспрессия CAR, который связывается с В-клеточным антигеном, в таких клетках может способствовать улучшению пролиферации и/или выживаемости клеток, экспрессирующих CAR. В-клеточные антигены (например, CD19 на нормальных В-клетках) могут улучшать пролиферацию и/или выживаемость таких клеток, экспрессирующих CAR, даже если уровень опухолевого антигена является низким (например, если число опухолевых клеток является низким или до того, как клетки, экспрессирующие CAR, изготовленные с применением способов, описанных в данном документе, встречаются с клетками солидной опухоли).

В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние включает миелоидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления при лечении миелоидной опухоли с помощью клетки, экспрессирующей CAR, изготовленной с применением способов, описанных в данном документе, клетка экспрессирует два CAR - первый CAR связывается с В-клеточным антигеном, а второй CAR связывается с антигеном миелоидной опухоли. В некоторых вариантах осуществления при лечении миелоидной опухоли с помощью клетки, экспрессирующей CAR, изготовленной с применением способов, описанных в данном документе, клетка экспрессирует полиспецифический CAR, который содержит первый связывающий домен, который связывается с В-клеточным антигеном, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном миелоидной опухоли. Без ограничения какой-либо теорией, экспрессия CAR, который связывается с В-клеточным антигеном, в таких клетках может способствовать улучшению пролиферации и/или выживаемости клеток, экспрессирующих CAR. В-клеточные антигены (например, CD19 на нормальных В-клетках) могут улучшать пролиферацию и/или выживаемость таких клеток, экспрессирующих CAR, даже если уровень опухолевого антигена является низким (например, если число опухолевых клеток является низким или до того, как клетки, экспрессирующие CAR, изготовленные с применением способов, описанных в данном документе, встречаются с клетками миелоидной опухоли).

В некоторых вариантах осуществления способов или вторых композиций, описанных в данном документе, вирусный вектор или нуклеиновая кислота кодируют:

(i) первый CAR, который связывается с В-клеточным антигеном (например, CD19), и второй CAR, который связывается с (a) антигеном солидной опухоли (например, EGFRvIII), (b) антигеном миелоидной опухоли или (c) антигеном гематологической опухоли, не относящейся к В-клеточной линии дифференцировки; или

(2) CAR, который содержит первый связывающий домен, который связывается с В-клеточным антигеном (например, CD19), и второй связывающий домен, который связывается с (a) антигеном солидной опухоли (например, EGFRvIII), (b) антигеном

миелоидной опухоли или (c) антигеном гематологической опухоли, не относящейся к B-клеточной линии дифференцировки.

В некоторых вариантах осуществления B-клеточный антиген представляет собой CD5, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27, CD30, CD34, CD37, CD38, CD40, CD53, CD69, CD72, CD73, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD123, CD135, CD138, CD179, CD269, Flt3, ROR1, BCMA, FcRn5, FcRn2, CS-1, CXCR4, 5, 7, IL-7/3R, IL7/4/3R или IL4R. В некоторых вариантах осуществления B-клеточный антиген представляет собой CD19, CD20, CD22, CD123, FcRn5, FcRn2, BCMA, CS-1 или CD138.

В некоторых вариантах осуществления антиген солидной опухоли представляет собой EGFRvIII, мезотелин, GD2, Ag Tn, PSMA, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, KIT, IL-13Ra2, легуман, GD3, CD171, IL-11Ra, PSCA, MAD-CT-1, MAD-CT-2, VEGFR2, антиген Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, рецептор фолиевой кислоты альфа, ERBB (например, ERBB2), Her2/neu, MUC1, EGFR, NCAM, эфрин B2, CAIX, LMP2, sLe, HMWMAA, o-ацетил-GD2, рецептор фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, FAP, легумаин, E6 или E7 HPV, ML-IAP, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, полисиаловую кислоту, Fos-родственный антиген, эластазу нейтрофилов, TRP-2, CYP1B1, белок 17 сперматозоидов, бета-субъединицу хорионического гонадотропина человека, AFP, тиреоглобулин, PLAC1, GloboH, RAGE1, MN-CA IX, обратную транскриптазу теломеразы человека, кишечную карбоксилэстеразу, мутантный вариант hsp 70-2, NA-17, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, Ly6k, OR51E2, TARP, GFRα4 или пептид любого из этих антигенов, презентированный на MHC.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе также предусмотрен набор, содержащий первую композицию, описанную в данном документе, и вторую композицию, описанную в данном документе.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, при этом способ включает введение вирусного вектора или нуклеиновой кислоты, содержащих трансген, в участок у субъекта, у которого индуцировали осуществление лимфангиогенеза в участке, за счет чего осуществляется трансдукция клеток.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ подготовки субъекта к получению вирусного вектора, кодирующего химерный антигенный рецептор (CAR), включающий введение субъекту биологического материала и фактора привлечения клеток, за счет чего осуществляется подготовка субъекта к получению вирусного вектора, кодирующего CAR. В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ подготовки субъекта к получению вирусного вектора, кодирующего химерный антигенный рецептор (CAR), включающий введение субъекту биологического материала и молекулы (например, VEGF-C, IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), GM-CSF, CXCL12, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10 или CXCL11), за счет чего осуществляется подготовка субъекта к получению вирусного вектора, кодирующего CAR.

В некоторых вариантах осуществления подготовка включает индуцирование лимфангиогенеза и/или привлечение Т-клеток (например, CD45RA+ CD62L+ Т-клеток и/или CD45RA+ CD62L+ CCR7+ CD27+ CD95+ Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение вирусного вектора, кодирующего CAR, где необязательно вирусный вектор конъюгирован с частицей (например, мезопористой частицей кремнезема, которая содержит или не содержит средство для активации клеток).

В данном документе также предусмотрена композиция, содержащая биологический материал, содержащий фактор привлечения клеток; первую популяцию мезопористых частиц кремнезема; вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток. В данном документе также предусмотрена композиция, содержащая биологический материал и фактор привлечения клеток; первую популяцию мезопористых частиц кремнезема; вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления биологический материал содержит гидрогель, необязательно криогель. В некоторых вариантах осуществления криогель содержит желатин, гиалуроновую кислоту, коллаген, альгинат, ламинин, хитозан, фиброин шелка, агарозу, поли(этиленгликоль), поливиниловый спирт и/или гидроксиэтилметилакрилат. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая криогель, дополнительно содержит лапонит. В некоторых вариантах осуществления криогель содержит поры диаметром от приблизительно 10 до 300 мкм, необязательно от приблизительно 50 до 300 мкм. В некоторых вариантах осуществления криогель является химически сшитым.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток осуществляет селективное привлечение иммунных клеток, необязательно Т-клеток и/или NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток выбран из группы, состоящей из CCL19, CXCL9, CXCL10, XCL1, IL-2, IL-7, CCL21, GM-CSF, CCL17, CCL22, CCL20, CCL27, IL-15, лимфотоксина-альфа, лимфотоксина-бета, VEGF-C, FLT3L, G-CSF, PDGF, S100A8/A9, CSF-1, CXCL8, CCL20, CCL17, CCR5, CCR6, CCL2, VEGF, ангиопоэтина-2, PGE2, LTB4, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10, CXCL11 и/или CXCL12. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C выбран из группы, состоящей из незрелого пептида VEGF-C или зрелого пептида VEGF-C. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой минорную зрелую форму или основную зрелую форму. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой минорную зрелую форму дикого типа или основную зрелую форму дикого типа. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой модифицированную минорную зрелую форму или модифицированную основную зрелую форму. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой модифицированную минорную зрелую форму, содержащую мутацию в положении цистеина 137 (например, C137A), или модифицированную основную зрелую форму, содержащую мутацию в положении цистеина 137 (например, C137A). В

некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой модифицированную минорную зрелую форму, содержащую мутацию C137A, или модифицированную основную зрелую форму, содержащую мутацию C137A. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C присутствует в виде димера или мономера. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C представляет собой димер основной зрелой формы, дополнительно содержащий мутацию C137A в каждом мономере. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C представляет собой димер минорной зрелой формы, дополнительно содержащий мутацию C137A в каждом мономере. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C выбран из последовательности, представленной в **таблице 18**, где необязательно His-метка не включена в последовательность. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C присутствует в эффективном количестве, необязательно в количестве, которое меньше 1 мг или составляет приблизительно это значение, меньше 10 мг или составляет приблизительно это значение, больше 10 мкг или составляет приблизительно это значение, больше 1 мкг или составляет приблизительно это значение, от приблизительно 1 мкг до 1 мг, от приблизительно 10 мкг до 1 мг, от приблизительно 1 мкг до 10 мг или от приблизительно 10 мкг до 10 мг.

В некоторых вариантах осуществления первая популяция мезопористых частиц кремнезема подвергнута модификации поверхности. В некоторых вариантах осуществления модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой -OH (гидроксил), амин, карбоновую кислоту, фосфонат, галогенид, азид, алкин, эпоксид, сульфгидрил, полиэтиленимин, гидрофобный фрагмент или их соли, необязательно с использованием C_1-C_{20}алкильного линкера или линкера (-O(CH2-CH_2-)$_{1-25}$. В некоторых вариантах осуществления модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой первичный, вторичный, третичный или четвертичный амин. В некоторых вариантах осуществления модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой полиэтиленимин со средней молекулярной массой от приблизительно 1000 до 20000 Да, от приблизительно 1200 до 15000 Да, от приблизительно 1500 до 12000 Да, приблизительно 2000 Да, приблизительно 3000 Да, приблизительно 4000 Да, приблизительно 5000 Да, приблизительно 6000 Да, приблизительно 7000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 9000 Да или приблизительно 10000 Да согласно измерению посредством гель-проникающей хроматографии (GPC). В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема содержат поры диаметром 2-50 нм. В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема имеют площадь поверхности, составляющую по меньшей мере приблизительно 100 $м^2$/г. В некоторых вариантах осуществления композиция является подходящей для инъекционного применения. В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема представлены в форме мезопористых стержней из кремнезема.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор конъюгирован с первой

популяцией мезопористых частиц кремнезема. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор электростатически или ковалентно конъюгирован с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса или лентивирус. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор включает в себя вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный TCR, один или несколько цитокинов, один или несколько хемокинов, shRNA для блокирования ингибирующей молекулы, или где нуклеотидная последовательность содержит мРНК для индуцирования экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления полипептид нацеливается на опухолевый антиген, выбранный из группы, состоящей из TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Ag Tn, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, E6, E7 HPV, MAGE-A1, ETV6-AML, белка 17 сперматозоидов, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутантного p53, простеина, сурвивина и теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутантного Ras, hTERT, антигенов саркомы с точечными разрывами при транслокации, ML-IAP, ERG (продукта слитого гена TMPRSS2 и ETS), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область выбрана из 41BB (т. е. CD137), CD27, ICOS и/или CD28.

В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток

конъюгировано с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема или второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или адсорбировано на ней. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток представляет собой соединение, стимулирующее Т-клетки, антиидиотипическое антитело к антигенсвязывающему домену CAR и/или опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления соединение, стимулирующее Т-клетки, представляет собой IL-2, IL-15, mAb к CD2, mAb к CD3, mAb к CD28, неоантигенные пептиды, пептиды из общих антигенов, таких как TRP2, gp100, лизат опухолевых клеток, CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелин, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипид F77, EGFRvIII, GD-2, TCR NY-ESO-1 и/или TCR MAGEA3. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток включает в себя комплекс CD3/TCR и/или средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, где необязательно средство для активации клеток представляет собой полиспецифическую связывающую молекулу, включающую в себя средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток выбрано из последовательности, представленной в **таблице 20**. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток конъюгировано со второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или с липидной оболочкой на поверхности второй популяции мезопористых частиц кремнезема. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит цитокин. В некоторых вариантах осуществления цитокин конъюгирован с первой или второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или адсорбирован на ней. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21 или трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), или их агонист, их миметик, их вариант, их функциональный фрагмент, или их комбинацию.

В данном документе также предусмотрен способ трансдукции клеток in vivo, включающий введение субъекту биологического материала, содержащего фактор привлечения клеток; первой популяции мезопористых частиц кремнезема; вирусного вектора и необязательно средства для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления компоненты вводят одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления биологический материал, содержащий фактор привлечения клеток, вводят в первую очередь. В некоторых вариантах осуществления первую популяцию мезопористых стержней из кремнезема, вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток вводят одновременно и необязательно после биологического материала.

В данном документе также предусмотрен способ трансдукции клеток in vivo, включающий введение субъекту биологического материала и фактора привлечения клеток; первой популяции мезопористых частиц кремнезема; вирусного вектора и необязательно средства для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления компоненты вводят одновременно или последовательно. В некоторых вариантах

осуществления биологический материал и фактор привлечения клеток вводят в первую очередь. В некоторых вариантах осуществления первую популяцию мезопористых стержней из кремнезема, вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток вводят одновременно и необязательно после биологического материала и фактора привлечения клеток.

В данном документе также предусмотрен способ трансдукции клеток in vivo, включающий введение субъекту биологического материала и молекулы (например, VEGF-C, IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), GM-CSF, CXCL12, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10 или CXCL11); первой популяции мезопористых частиц кремнезема; вирусного вектора и необязательно средства для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления компоненты вводят одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления биологический материал и молекулу вводят в первую очередь. В некоторых вариантах осуществления первую популяцию мезопористых стержней из кремнезема, вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток вводят одновременно и необязательно после биологического материала и молекулы.

В некоторых вариантах осуществления биологический материал содержит гидрогель, необязательно криогель. В некоторых вариантах осуществления криогель содержит желатин, гиалуроновую кислоту, коллаген, альгинат, ламинин, хитозан, фиброин шелка, агарозу, поли(этиленгликоль), поливиниловый спирт и/или гидроксиэтилметилакрилат. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая криогель, дополнительно содержит лапонит. В некоторых вариантах осуществления криогель содержит поры диаметром от приблизительно 10 до 300 мкм, необязательно от приблизительно 50 до 300 мкм. В некоторых вариантах осуществления криогель является химически сшитым.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток осуществляет селективное привлечение иммунных клеток, необязательно Т-клеток и/или NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток выбран из группы, состоящей из CCL19, CXCL9, CXCL10, XCL1, IL-2, IL-7, CCL21, GM-CSF, CCL17, CCL22, CCL20, CCL27, IL-15, лимфотоксина-альфа, лимфотоксина-бета, VEGF-C, FLT3L, G-CSF, PDGF, S100A8/A9, CSF-1, CXCL8, CCL20, CCL17, CCR5, CCR6, CCL2, VEGF, ангиопоэтина-2, PGE2, LTB4, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10, CXCL11 и/или CXCL12. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C выбран из группы, состоящей из незрелого пептида VEGF-C или зрелого пептида VEGF-C. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой минорную зрелую форму или основную зрелую форму. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой минорную зрелую форму дикого типа или основную зрелую форму дикого типа. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой модифицированную минорную зрелую форму или модифицированную основную зрелую форму. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C

представляет собой модифицированную минорную зрелую форму, содержащую мутацию в положении цистеина 137 (например, C137A), или модифицированную основную зрелую форму, содержащую мутацию в положении цистеина 137 (например, C137A). В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой модифицированную минорную зрелую форму, содержащую мутацию C137A, или модифицированную основную зрелую форму, содержащую мутацию C137A. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C присутствует в виде димера или мономера. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C представляет собой димер основной зрелой формы, дополнительно содержащий мутацию C137A в каждом мономере. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C представляет собой димер минорной зрелой формы, дополнительно содержащий мутацию C137A в каждом мономере. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C выбран из **таблицы 18**, где необязательно His-метка не включена в последовательность. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C присутствует в эффективном количестве, необязательно в количестве, которое меньше 1 мг или составляет приблизительно это значение, меньше 10 мг или составляет приблизительно это значение, больше 10 мкг или составляет приблизительно это значение, больше 1 мкг или составляет приблизительно это значение, от приблизительно 1 мкг до 1 мг, от приблизительно 10 мкг до 1 мг, от приблизительно 1 мкг до 10 мг или от приблизительно 10 мкг до 10 мг.

В некоторых вариантах осуществления первая популяция мезопористых частиц кремнезема подвергнута модификации поверхности. В некоторых вариантах осуществления модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой -OH (гидроксил), амин, карбоновую кислоту, фосфонат, галогенид, азид, алкин, эпоксид, сульфгидрил, полиэтиленимин, гидрофобный фрагмент или их соли, необязательно с использованием C_1-C_{20}алкильного линкера или линкера (-O(CH2-CH_2-)$_{1-25}$. В некоторых вариантах осуществления модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой первичный, вторичный, третичный или четвертичный амин. В некоторых вариантах осуществления модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой полиэтиленимин со средней молекулярной массой от приблизительно 1000 до 20000 Да, от приблизительно 1200 до 15000 Да, от приблизительно 1500 до 12000 Да, приблизительно 2000 Да, приблизительно 3000 Да, приблизительно 4000 Да, приблизительно 5000 Да, приблизительно 6000 Да, приблизительно 7000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 9000 Да или приблизительно 10000 Да согласно измерению посредством гель-проникающей хроматографии (GPC). В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема содержат поры диаметром 2-50 нм. В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема имеют площадь поверхности, составляющую по меньшей мере приблизительно 100 $м^2$/г. В некоторых вариантах осуществления композиция является подходящей для инъекционного применения. В некоторых вариантах осуществления мезопористые

частицы кремнезема представлены в форме мезопористых стержней из кремнезема.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор конъюгирован с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор электростатически или ковалентно конъюгирован с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса или лентивирус. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор включает в себя вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный TCR, один или несколько цитокинов, один или несколько хемокинов, shRNA для блокирования ингибирующей молекулы, или где нуклеотидная последовательность содержит мРНК для индуцирования экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления полипептид нацеливается на опухолевый антиген, выбранный из группы, состоящей из TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Ag Tn, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, E6, E7 HPV, MAGE-A1, ETV6-AML, белка 17 сперматозоидов, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутантного p53, простеина, сурвивина и теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутантного Ras, hTERT, антигенов саркомы с точечными разрывами при транслокации, ML-IAP, ERG (продукта слитого гена TMPRSS2 и ETS), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная

область выбрана из 41BB (т. е. CD137), CD27, ICOS и/или CD28.

В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток конъюгировано с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема или второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или адсорбировано на ней. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток представляет собой соединение, стимулирующее Т-клетки, антиидиотипическое антитело к антигенсвязывающему домену CAR и/или опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления соединение, стимулирующее Т-клетки, представляет собой IL-2, IL-15, mAb к CD2, mAb к CD3, mAb к CD28, неоантигенные пептиды, пептиды из общих антигенов, таких как TRP2, gp100, лизат опухолевых клеток, CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелин, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипид F77, EGFRvIII, GD-2, TCR NY-ESO-1 и/или TCR MAGEA3. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток включает в себя комплекс CD3/TCR и/или средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, где необязательно средство для активации клеток представляет собой полиспецифическую связывающую молекулу, включающую в себя средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток выбрано из последовательности, представленной в **таблице 20**. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток конъюгировано со второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или с липидной оболочкой на поверхности второй популяции мезопористых частиц кремнезема. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит цитокин. В некоторых вариантах осуществления цитокин конъюгирован с первой или второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или адсорбирован на ней. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21 или трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), или их агонист, их миметик, их вариант, их функциональный фрагмент, или их комбинацию.

В данном документе также предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется заболевание, нарушение или состояние, включающий введение субъекту биологического материала, содержащего фактор привлечения клеток; первой популяции мезопористых частиц кремнезема; вирусного вектора и необязательно средства для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления компоненты вводят одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления биологический материал, содержащий фактор привлечения клеток, вводят в первую очередь. В некоторых вариантах осуществления первую популяцию мезопористых стержней из кремнезема, вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток вводят одновременно и необязательно после биологического материала.

В данном документе также предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется заболевание, нарушение или состояние, включающий введение субъекту биологического материала и фактора привлечения клеток; первой популяции

мезопористых частиц кремнезема; вирусного вектора и необязательно средства для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления компоненты вводят одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления биологический материал и фактор привлечения клеток вводят в первую очередь. В некоторых вариантах осуществления первую популяцию мезопористых стержней из кремнезема, вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток вводят одновременно и необязательно после биологического материала и фактора привлечения клеток.

В данном документе также предусмотрен способ лечения субъекта, у которого имеется заболевание, нарушение или состояние, включающий введение субъекту биологического материала и молекулы (например, VEGF-C, IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), GM-CSF, CXCL12, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10 или CXCL11); первой популяции мезопористых частиц кремнезема; вирусного вектора и необязательно средства для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления компоненты вводят одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления биологический материал и молекулу вводят в первую очередь. В некоторых вариантах осуществления первую популяцию мезопористых стержней из кремнезема, вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток вводят одновременно и необязательно после биологического материала и молекулы.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак, характеризующийся экспрессией одного или нескольких опухолевых антигенов, выбранных из группы, состоящей из TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Ag Tn, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, E6, E7 HPV, MAGE-A1, ETV6-AML, белка 17 сперматозоидов, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутантного p53, простеина, сурвивина и теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутантного Ras, hTERT, антигенов саркомы с точечными разрывами при транслокации, ML-IAP, ERG (продукта слитого гена TMPRSS2 и ETS), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5,

IGLL1 и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления биологический материал содержит гидрогель, необязательно криогель. В некоторых вариантах осуществления криогель содержит желатин, гиалуроновую кислоту, коллаген, альгинат, ламинин, хитозан, фиброин шелка, агарозу, поли(этиленгликоль), поливиниловый спирт и/или гидроксиэтилметилакрилат. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая криогель, дополнительно содержит лапонит. В некоторых вариантах осуществления криогель содержит поры диаметром от приблизительно 10 до 300 мкм, необязательно от приблизительно 50 до 300 мкм. В некоторых вариантах осуществления криогель является химически сшитым.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток осуществляет селективное привлечение иммунных клеток, необязательно Т-клеток и/или NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток выбран из группы, состоящей из CCL19, CXCL9, CXCL10, XCL1, IL-2, IL-7, CCL21, GM-CSF, CCL17, CCL22, CCL20, CCL27, IL-15, лимфотоксина-альфа, лимфотоксина-бета, VEGF-C, FLT3L, G-CSF, PDGF, S100A8/A9, CSF-1, CXCL8, CCL20, CCL17, CCR5, CCR6, CCL2, VEGF, ангиопоэтина-2, PGE2, LTB4, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10, CXCL11 и/или CXCL12. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C выбран из группы, состоящей из незрелого пропептида VEGF-C или зрелого пептида VEGF-C. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой минорную зрелую форму или основную зрелую форму. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой минорную зрелую форму дикого типа или основную зрелую форму дикого типа. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой модифицированную минорную зрелую форму или модифицированную основную зрелую форму. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой модифицированную минорную зрелую форму, содержащую мутацию в положении цистеина 137 (например, C137A), или модифицированную основную зрелую форму, содержащую мутацию в положении цистеина 137 (например, C137A). В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой модифицированную минорную зрелую форму, содержащую мутацию C137A, или модифицированную основную зрелую форму, содержащую мутацию C137A. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C присутствует в виде димера или мономера. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C представляет собой димер основной зрелой формы, дополнительно содержащий мутацию C137A в каждом мономере. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C представляет собой димер минорной зрелой формы, дополнительно содержащий мутацию C137A в каждом мономере. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C выбран из **таблицы 18**, где необязательно His-метка не включена в последовательность. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C присутствует в эффективном количестве, необязательно в количестве, которое меньше 1 мг или составляет приблизительно это значение, меньше 10

мг или составляет приблизительно это значение, больше 10 мкг или составляет приблизительно это значение, больше 1 мкг или составляет приблизительно это значение, от приблизительно 1 мкг до 1 мг, от приблизительно 10 мкг до 1 мг, от приблизительно 1 мкг до 10 мг или от приблизительно 10 мкг до 10 мг.

В некоторых вариантах осуществления первая популяция мезопористых частиц кремнезема подвергнута модификации поверхности. В некоторых вариантах осуществления модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой -OH (гидроксил), амин, карбоновую кислоту, фосфонат, галогенид, азид, алкин, эпоксид, сульфгидрил, полиэтиленимин, гидрофобный фрагмент или их соли, необязательно с использованием C_1-C_{20}алкильного линкера или линкера (-O(CH2-CH_2-)$_{1-25}$. В некоторых вариантах осуществления модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой первичный, вторичный, третичный или четвертичный амин. В некоторых вариантах осуществления модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой полиэтиленимин со средней молекулярной массой от приблизительно 1000 до 20000 Да, от приблизительно 1200 до 15000 Да, от приблизительно 1500 до 12000 Да, приблизительно 2000 Да, приблизительно 3000 Да, приблизительно 4000 Да, приблизительно 5000 Да, приблизительно 6000 Да, приблизительно 7000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 9000 Да или приблизительно 10000 Да согласно измерению посредством гель-проникающей хроматографии (GPC). В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема содержат поры диаметром 2-50 нм. В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема имеют площадь поверхности, составляющую по меньшей мере приблизительно 100 $м^2$/г. В некоторых вариантах осуществления композиция является подходящей для инъекционного применения. В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема представлены в форме мезопористых стержней из кремнезема.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор конъюгирован с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор электростатически или ковалентно конъюгирован с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса или лентивирус. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор включает в себя вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный TCR, один или несколько цитокинов, один или несколько хемокинов, shRNA для блокирования ингибирующей молекулы, или где нуклеотидная последовательность содержит мРНК для индуцирования экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность кодирует

полипептид, сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления полипептид нацеливается на опухолевый антиген, выбранный из группы, состоящей из TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Ag Tn, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, E6, E7 HPV, MAGE-A1, ETV6-AML, белка 17 сперматозоидов, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутантного p53, простеина, сурвивина и теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутантного Ras, hTERT, антигенов саркомы с точечными разрывами при транслокации, ML-IAP, ERG (продукта слитого гена TMPRSS2 и ETS), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область выбрана из 41BB (т. е. CD137), CD27, ICOS и/или CD28.

В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток конъюгировано с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема или второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или адсорбировано на ней. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток представляет собой соединение, стимулирующее Т-клетки, антиидиотипическое антитело к антигенсвязывающему домену CAR и/или опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления соединение, стимулирующее Т-клетки, представляет собой IL-2, IL-15, mAb к CD2, mAb к CD3, mAb к CD28, неоантигенные пептиды, пептиды из общих антигенов, таких как TRP2, gp100, лизат опухолевых клеток, CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелин, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипид F77, EGFRvIII, GD-2, TCR NY-ESO-1 и/или TCR MAGEA3. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток включает в себя комплекс CD3/TCR и/или средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, где необязательно средство для активации клеток представляет собой полиспецифическую связывающую молекулу, включающую в себя

средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток выбрано из последовательности, представленной в **таблице 20**. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток конъюгировано со второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или с липидной оболочкой на поверхности второй популяции мезопористых частиц кремнезема. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит цитокин. В некоторых вариантах осуществления цитокин конъюгирован с первой или второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или адсорбирован на ней. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21 или трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), или их агонист, их миметик, их вариант, их функциональный фрагмент, или их комбинацию.

Специалистам в данной области будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, или они будут способны установить такие эквиваленты посредством проведения только обычных экспериментов. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются нижеследующими пронумерованными вариантами осуществления.

Пронумерованные варианты осуществления

1. Композиция, содержащая:

(a) биологический материал, содержащий фактор привлечения клеток;

(b) первую популяцию мезопористых частиц кремнезема;

(c) вирусный вектор и

(d) необязательно средство для активации клеток.

2. Композиция согласно варианту осуществления 1, где биологический материал содержит гидрогель, необязательно криогель.

3. Композиция согласно варианту осуществления 2, где криогель:

(a) содержит желатин, гиалуроновую кислоту, коллаген, альгинат, ламинин, хитозан, фиброин шелка, агарозу, поли(этиленгликоль), поливиниловый спирт и/или гидроксиэтилметилакрилат, где необязательно криогель дополнительно содержит лапонит;

(b) содержит поры диаметром от приблизительно 10 до 300 мкм, необязательно от приблизительно 50 до 300 мкм; и/или

(c) является химически сшитым.

4. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где фактор привлечения клеток выбран из группы, состоящей из CCL19, CXCL9, CXCL10, XCL1, IL-2, IL-7, CCL21, GM-CSF, CCL17, CCL22, CCL20, CCL27, IL-15, лимфотоксина-альфа, лимфотоксина-бета, VEGF-C, FLT3L, G-CSF, PDGF, S100A8/A9, CSF-1, CXCL8, CCL20, CCL17, CCR5, CCR6, CCL2, VEGF, ангиопоэтина-2, PGE2, LTB4, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10, CXCL11 и/или CXCL12.

5. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где

фактор привлечения клеток осуществляет селективное привлечение иммунных клеток, необязательно Т-клеток и/или NK-клеток.

6. Композиция согласно варианту осуществления 5, где фактор привлечения клеток выбран из группы, состоящей из:

(a) IL-2, IL-7, CCL21, IL-15, GM-CSF и/или VEGF-C для привлечения Т-клеток и/или

(b) CXCL12, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10 и/или CXCL11 для привлечения NK-клеток.

7. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где фактор привлечения клеток представляет собой VEGF-C, необязательно в виде мономера или димера.

8. Композиция согласно варианту осуществления 7, где VEGF-C представляет собой зрелый пептид VEGF-C, необязательно минорную или основную зрелую форму или мутантный вариант каждого из них.

9. Композиция согласно варианту осуществления 8, где зрелый пептид VEGF-C содержит мутацию C137A.

10. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 7-9, где VEGF-C содержит последовательность, представленную в **таблице 18**, где необязательно His-метка не включена в последовательность.

11. Композиция согласно варианту осуществления 10, где VEGF-C содержит димер одной или нескольких из последовательностей, представленных в **таблице 18**, где необязательно His-метка не включена в последовательность.

12. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 7-10, где VEGF-C присутствует в эффективном количестве, необязательно в количестве, которое меньше 1 мг или составляет приблизительно это значение, меньше 10 мг или составляет приблизительно это значение, больше 10 мкг или составляет приблизительно это значение, больше 1 мкг или составляет приблизительно это значение, от приблизительно 1 мкг до 1 мг, от приблизительно 10 мкг до 1 мг, от приблизительно 1 мкг до 10 мг или от приблизительно 10 мкг до 10 мг.

13. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где вирусный вектор конъюгирован с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема.

14. Композиция согласно варианту осуществления 13, где вирусный вектор электростатически или ковалентно конъюгирован с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема.

15. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где первая популяция мезопористых частиц кремнезема подвергнута модификации поверхности.

16. Композиция согласно варианту осуществления 15, где модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой -OH (гидроксил), амин, карбоновую кислоту, фосфонат, галогенид, азид, алкин, эпоксид,

сульфгидрил, полиэтиленимин, гидрофобный фрагмент или их соли, необязательно с использованием C_1-C_{20}алкильного линкера или линкера (-O(CH2-CH_2-)$_{1-25}$.

17. Композиция согласно варианту осуществления 15, где модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой первичный, вторичный, третичный или четвертичный амин.

18. Композиция согласно варианту осуществления 15, где модификация поверхности для первой популяции мезопористых частиц кремнезема представляет собой полиэтиленимин со средней молекулярной массой от приблизительно 1000 до 20000 Да, от приблизительно 1200 до 15000 Да, от приблизительно 1500 до 12000 Да, приблизительно 2000 Да, приблизительно 3000 Да, приблизительно 4000 Да, приблизительно 5000 Да, приблизительно 6000 Да, приблизительно 7000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 9000 Да или приблизительно 10000 Да согласно измерению посредством гель-проникающей хроматографии (GPC).

19. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где вирусный вектор представляет собой ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса или лентивирус.

20. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где вирусный вектор включает в себя вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии.

21. Композиция согласно варианту осуществления 20, где нуклеотидная последовательность кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный TCR, один или несколько цитокинов, один или несколько хемокинов, shRNA для блокирования ингибирующей молекулы, или где нуклеотидная последовательность содержит мРНК для индуцирования экспрессии белка.

22. Композиция согласно варианту осуществления 21, где нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген.

23. Композиция согласно варианту осуществления 22, где опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Ag Tn, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, E6, E7

HPV, MAGE-A1, ETV6-AML, белка 17 сперматозоидов, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутантного p53, простеина, сурвивина и теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутантного Ras, hTERT, антигенов саркомы с точечными разрывами при транслокации, ML-IAP, ERG (продукта слитого гена TMPRSS2 и ETS), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1 и любой их комбинации.

24. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где вектор кодирует CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен.

25. Композиция согласно варианту осуществления 24, где:

(a) антигенсвязывающий домен связывает антиген, выбранный из CD19, CD123, CD22, CD20, EGFRvIII, BCMA, мезотелина, CD33, CLL-1 и любой их комбинации;

(b) трансмембранный домен содержит шарнирную область CD8;

(c) костимулирующая сигнальная область выбрана из костимулирующего сигнального домена 4-1BB или CD28; и/или

(d) сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета.

26. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где средство для активации клеток представляет собой соединение, стимулирующее Т-клетки, антиидиотипическое антитело к антигенсвязывающему домену CAR или опухолевый антиген.

27. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где средство для активации клеток:

(a) включает в себя комплекс CD3/TCR и/или средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста;

(b) представляет собой полиспецифическую связывающую молекулу, включающую в себя средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста; и/или

(c) содержит последовательность, представленную в **таблице 20** и/или представленную в одном или нескольких форматах в соответствии с **фигурой 37**.

28. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где средство для активации клеток конъюгировано с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема, второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или липидной оболочкой на поверхности второй популяции мезопористых частиц кремнезема или адсорбировано на ней.

29. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где мезопористые частицы кремнезема представляют собой мезопористые стержни из кремнезема.

30. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где мезопористые частицы кремнезема содержат поры диаметром 2-50 нм.

31. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где мезопористые частицы кремнезема имеют площадь поверхности, составляющую по меньшей мере приблизительно 100 $м^2$/г.

32. Композиция согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где композиция является подходящей для инъекционного применения.

33. Способ трансдукции клеток in vivo, включающий введение композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-32, при этом каждый компонент вводят одновременно или последовательно.

34. Способ лечения заболевания, нарушения или состояния, включающий введение композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-32, при этом каждый компонент вводят одновременно или последовательно.

35. Способ согласно варианту осуществления 34, где заболевание, нарушение или состояние представляет собой рак.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1** представлена серия модификаций поверхности в мезопористых частицах кремнезема.

На **фиг. 2** представлены результаты окрашивания на белок вирусной оболочки (VSV-G) на поверхности MSR после адсорбции псевдотипированного с VSV-G лентивируса на MSR. Контрольные MSR представлены на верхней панели, а инкубированные с вирусом стержни представлены на нижней панели.

На **фиг. 3** представлена схема адсорбции вируса на MSR и трансдукции Т-клеток.

На **фиг. 4** представлены результаты экспрессии GFP Т-клетками, инкубированными со свободным лентивирусом или лентивирусом, связанным с MSR. Разбавление покрытых вирусом MSR от начальной концентрации 40 мкг/мл соответствует указанному. Условие "1x лент." является эквивалентным условиям с указанным количеством вируса, инкубированного с MSR. Условие "2x лент." является эквивалентным условиям с удвоенным количеством, используемым для покрытия MSR.

На **фиг. 5** представлена схема общей стратегии презентации лиганда на поверхности MSR. Липосомы инкубируют с MSR с образованием липидного бислоя на подложке. Лиганды можно подвергать сочетанию с липидным бислоем на MSR с использованием взаимодействий стрептавидин-биотин.

На **фиг. 6** показано изображение MSR, покрытых липосомами из POPC, содержащими 1 мол. % PE-карбоксифлуоресцеина. Показаны светлопольные (слева), флуоресцентные (в центре) и наложенные (справа) изображения.

На **фиг. 7** изображена пептидная последовательность пептида, связывающего CAR для EGFRvIII (LEEKKGNYVVTDH (SEQ ID NO: 756)).

На **фиг. 8** проиллюстрировано продуцирование цитокинов EGFRvIII-CAR-Т-клетками в зависимости от иммобилизации пептида на MSR. Результаты представляют

продуцирование интерферона-гамма и интерлейкина-2 EGFRvIII-CAR-T-клетками, стимулированными MSR с липидным покрытием (1% PE-биотин в липидном покрытии), презентирующими пептид, связывающий CAR для EGFRvIII, по сравнению с контрольными условиями.

На **фиг. 9** проиллюстрирована пролиферация EGFRvIII-CAR-T-клеток в зависимости от иммобилизации пептида на MSR. Композицию на основе MSR с липидным покрытием с 0,01% PE-биотином применяли для иммобилизации пептида, и концентрация MSR составляла 30 мкг/мл в лунке. Подсчет клеток выполняли в день 7 культивирования в указанных условиях.

На фиг. 10A и 10B проиллюстрированы пролиферация EGFRvIII-CAR-T-клеток и конечный клеточный состав в зависимости от иммобилизации пептида на MSR. Начальная концентрация MSR составляла 50 мкг/мл, и разведения MSR от данной начальной концентрации являются такими, как указано по оси. На **фиг. 10A** показана процентная доля CD4 и CD8 T-клеток в конце периода культивирования с указанными материалами. На **фиг. 10B** изображен FACS-анализ CD8+ и CD4+ CAR-T-клеток по разбавлению CFSE в ходе 3-дневного периода культивирования с использованием MSR с различным количеством пептида, связывающего CAR для EGFRvIII, с антителом к CD28 на поверхности MSR или без него.

На фиг. 11A и 11B проиллюстрированы пролиферация клеток CART для BCMA и конечная клеточный состав в зависимости от иммобилизации белка BCMA на MSR. Начальная концентрация MSR составляла 50 мкг/мл, и разведения MSR от данной начальной концентрации являются такими, как указано по оси. На **фиг. 11A** показана процентная доля CD4 и CD8 T-клеток в конце периода культивирования с указанными материалами. На **фиг. 11B** продемонстрирован FACS-анализ CD8+ и CD4+ CAR-T-клеток по разбавлению CFSE в ходе 3-дневного периода культивирования с использованием MSR с различным количеством пептида, связывающего CAR для EGFRvIII, с антителом к CD28 на поверхности MSR или без него.

На **фиг. 12** представлена схема одновременной стимуляции и трансдукции нестимулированных T-клеток человека с использованием MSR в соответствии с некоторыми вариантами осуществления. Получают две популяции MSR - 1) MSR, презентирующие агонистические антитела к CD3/CD28 для стимуляции T-клеток, 2) положительно заряженные PEI-MSR, которые были связаны с лентивирусом для облегчения доставки вируса к T-клеткам. Два типа MSR можно смешивать в различных соотношениях для корректировки количества средства для стимуляции и вируса, воздействующих на T-клетки.

На **фиг. 13** проиллюстрирована эффективность трансдукции T-клеток, подвергнутых воздействию стимулирующих (MSR с иммобилизованными антителами к CD3/CD28) и PEI-MSR, инкубированных с вирусом. T-клетки инкубировали с различными количествами стимулирующих стержней (Стимуляция 1,00 обозначает 70 мкг/мл MSR) и подвергали воздействию лентивируса с GFP при различных значениях

множественности инфицирования (MOI) - либо связанного с PEI-MSR, либо в форме свободного вируса. Наиболее высокая концентрация MSR в условиях с вирусом составляла 22 мкг/мл.

На **фиг. 14** проиллюстрирована эффективность трансдукции Т-клеток, подвергнутых воздействию стимулирующих (с иммобилизованными антителами к CD3/CD28) MSR и PEI-MSR, инкубированных с вирусом. На графиках показана эффективность трансдукции в зависимости от концентрации стимулирующих MSR при различных значениях общего количества вируса. Концентрация MSR для условия 1.0 со стимулирующими MSR составляет 70 мкг/мл. Концентрация MSR для условия 1 с PEI-MSR составляет 22 мкг/мл. Трансдукцию оценивали через 3 дня после начала культивирования.

На **фиг. 15** представлены результаты сравнения стратегий вирусной доставки в отношении эффективности трансдукции. В условиях "PEI" и "свободный" Т-клетки стимулировали с помощью "высокого" уровня антител к CD3/CD28, связанных с MSR (концентрация MSR 70 мкг/мл), и указанного вируса, связанного с PEI-MSR либо доставляемого в свободной форме в среды соответственно (концентрация вируса 1.0 предусматривает 22 мкг/мл MSR, MOI ~ 6,7). В "PEI+CD3/CD28" вирус и агонистические антитела к CD3/CD28 были связаны с PEI-MSR (концентрация 1.0 предусматривает 22 мкг/мл MSR). Трансдукцию оценивали через 3 дня после начала культивирования.

На **фиг. 16** представлены результаты сравнения различных стратегий доставки для трансдукции в популяции PBMC. Условия, представленные на фиг. 15, добавляли к PBMC. Количественно определяли долю трансдуцированных клеток для каждого типа клеток. Трансдукцию оценивали через 3 дня после начала культивирования.

На **фиг. 17** представлены разные фракции трансдуцированных клеток в PBMC при различных стратегиях вирусной доставки. На верхней панели представлен общий состав клеток, присутствующих в популяциях PBMC при условиях, указанных на фиг. 15. На нижней панели представлен состав фракции трансдуцированных клеток, присутствующей после вирусной доставки с применением условий, указанных на фиг. 15. Трансдукцию оценивали через 3 дня после начала культивирования.

На **фиг. 18** представлена неограничивающая иллюстративная схема композиции, раскрытой в данном документе, для применения в качестве терапевтического средства для лечения рака, где на (A) изображено осуществление доставки фактора роста VEGF-C, который индуцирует лимфангиогенез уже существующих кожных лимфатических капилляров; на (B) изображены полученные лимфатические эндотелиальные клетки, секретирующие хемокины (такие как CCL21), которые привлекают иммунные клетки (главным образом необученные Т-клетки) из циркулирующей крови в дерму над гелем; на (C) изображены лимфатические эндотелиальные клетки, обучающие Т-клетки - не ограничиваясь какой-либо теорией, заявители считают, что такое обучение может приводить к получению высокой доли фенотипа стволовых клеток памяти, которые, в свою очередь, после трансдукции могут являться более эффективными клетками - после

привлечения Т-клеток в данный участок примирования, на (D) изображен лентивирус, кодирующий один или несколько химерных антигенных рецепторов (CAR), доставляемый в комбинации с мезопористыми стержнями из кремнезема для предотвращения системного распространения - не ограничиваясь какой-либо теорией, заявители считают, что локальное размещение вируса может способствовать трансдукции локально привлеченных Т-клеток, и что активация может дополнительно улучшать трансдукцию, предотвращать утечку и трансдукцию нежелательных клеток; на (E) и (F) изображены трансдуцированные и обученные клетки, возвращающиеся в системный кровоток через кожные лимфатические сосуды, лимфатические узлы и грудной проток - не ограничиваясь какой либо теорией, заявители считают, что такие клетки будут дополнительно размножаться в ответ на опухолевый антиген.

На фиг. 19A-19C изложены характеристики различных вариантов белка VEGF-C. На **фиг. 19A** представлена схема как природного, так и модифицированного VEGF-C. Незрелый VEGF-C (#1) обычно встречается внутриклеточно с N-концевыми и C-концевыми пропептидными последовательностями. После высвобождения белок VEGF-C подвергается протеолитическому расщеплению и присутствует во внеклеточном пространстве в виде минорной или основной зрелой формы (#2, #7) в форме димера или мономера. Стабилизированные димеры основной (#9) и минорной зрелой (#8) формы были сконструированы посредством вставки мутации C137A в последовательности. Основное различие между минорной зрелой и основной зрелой формами заключается в наличии дополнительной короткой пропептидной последовательности на N-конце минорной зрелой формы. Не ограничиваясь какой либо теорией, заявители считают, что дополнительный короткий пропептид, по-видимому, стимулирует образование димера, а также экспрессию белка как в клетках HEK293T, так и в клетках CHO MaKo. На **фиг. 19B** изображен полиакриламидный гель с SDS, подвергнутый электрофорезу в невосстанавливающих (NR) и восстанавливающих условиях (R), нагруженный очищенными вариантами VEGF-C. Подробные данные для лунок с соответствующим вариантом VEGF-C показаны на **фиг. 19C**, и наличие димера (**) и мономера (*) обозначено с помощью звездочки. Незрелый VEGF-C с полноразмерным пропептидом (#1) получают в виде димера среди некоторых примесей (лунки 2 и 3); удаление пропептида приводит к получению двух основных зрелых форм VEGF-C (#2) - одной нековалентной димерной формы (лунки 5, 6) и мономерной формы (лунки 8, 9); добавление мутации C137A в #2 приводит к получению ковалентного димера (лунки 21, 22) и мономерной формы (лунки 24, 25). Короткий N-концевой пропептид оставляют присоединенным к белку для получения минорной зрелой формы VEGF-C (#7) в нековалентной димерной (лунки 11, 12) или в мономерной форме (лунки 15, 16). Не ограничиваясь какой либо теорией, заявители определили, что мутация C137A в #7 VEGF-C приводит к получению только димера VEGF-C (лунки 18, 19), что может являться подходящим для крупномасштабного получения. В рядах 1, 4, 7, 10, 13, 14, 17, 20, 23 и 26 показан маркер молекулярной массы в кДа.

На фиг. 20A-20C показаны результаты анализа разрастания HDLEC с использованием различных вариантов VEGF-C. Димерные формы VEGF-C, по-видимому, демонстрировали высокую активность in vitro. На **фиг. 20A** изображена экспериментальная модель анализа разрастания дермальных лимфатических эндотелиальных клеток человека (HDLEC) in vitro для тестирования биологической активности вариантов VEGF-C. После инкубирования клетки оценивали в отношении пролиферации с помощью анализа WT-8 на **фиг. 20B** и визуализировали в отношении трубкообразования после окрашивания фаллоидином на **фиг. 20C**. На изображениях трубкообразования показано, что основные и минорные зрелые формы (#2, 7, 8, 9) стимулируют лучшее разрастание HDLEC, чем незрелая форма (#1). Без ограничения какой-либо теорией считается, что более высокая активность разрастания у димерных форм (#2D, 7D, 8D, 9D) делает их более предпочтительными по сравнению с мономерными формами (#2M, 7M, 9M).

На фиг. 21A-21D показана скорость высвобождения VEGF-C из составов на основе альгинатного криогеля, а также проверка обоснованности концепции о том, что его можно инъецировать мыши подкожно. На **фиг. 21A** представлена неограничивающая иллюстративная схема изготовления альгинатных криогелей. Альгинатный жидкий форполимер смешивают с лапонитом и белком, представляющим интерес, затем замораживают и снова размораживают перед инъекцией с получением пористой матрицы. На **фиг. 21B** показано модулирование высвобождения VEGF-C in vitro различными типами альгинатных гелей: нанопористым альгинатом (гелификация происходит перед криогелированием, поэтому поры не образуются), альгинатным криогелем (после замораживания и криогелирования, пористым) и альгинатным криогелем с 0,25% лапонитом. Альгинатный криогель с 0,25% лапонитом демонстрирует контролируемое и длительное высвобождение белка VEGF-C in vitro. На **фиг. 21C** показано модулирование профиля высвобождения VEGF-C in vitro из альгинатных криогелей с 0,25% или 0,5% лапонитом, нагруженных 10 мкг или 50 мкг VEGF-C. 30% общего VEGF-C высвобождается из гелей, и с учетом профиля контролируемого высвобождения альгинатный криогель с 0,25% лапонитом был выбран для работы in vivo. На **фиг. 21D** представлено изображение, на котором показан криогель, инъецируемый мышам подкожно с помощью иглы 16G.

На фиг. 22A-22C изображено индуцирование лимфангиогенеза in vivo с помощью VEGF-C в ранее не подвергавшейся воздействию коже мышей. Без ограничения какой-либо теорией, полагают, что минорный зрелый ковалентный димерный VEGF-C, по всей видимости, характеризуется более высокой эффективностью. На **фиг. 22A** изображена экспериментальная модель in vivo, и на **фиг. 22B** показаны иллюстративные точечные диаграммы, демонстрирующие лимфангиогенез in vivo, оцениваемый посредством окрашивания лимфатических эндотелиальных клеток (CD45-, CD31+, PDPN+) с помощью проточной цитометрии после выполнения расщепления кожи через 14 дней после имплантации криогеля. На **фиг. 22C** показан лимфангиогенез в коже мышей,

определяемый количественно после окрашивания в виде показателей количества лимфатических эндотелиальных клеток/мг. Ковалентные димеры (#8, #9) демонстрируют высокий уровень лимфангиогенеза in vivo. Соответственно, #8 применяли в дополнительных экспериментах. PDPN: подопланин.

На фиг. 23A-23E показано, что кожные лимфатические сосуды отвечают на 10 мкг VEGF-C (вариант #7, SEQ ID NO: 734), доставленного с помощью альгинатных криогелей, и лимфангиогенез достигает пика через 14 дней после имплантации криогеля, что соответствует пику иммунной инфильтрации в ранее не подвергавшейся воздействию коже мышей C57/BL6. На **фиг. 23A** изображены дозозависимый эффект VEGF-C, загруженного в альгинатные криогели (1, 10, 20, 50 мкг), in vivo и индуцирование лимфангиогенеза (представленное в виде показателей общего количества лимфатических эндотелиальных клеток (LEC)/мг ткани, верхний график), а также динамика лимфангиогенеза после доставки 10 мкг VEGF-C (нижний график). Данные результаты указывали на то, что 10 мкг VEGF-C индуцировали высокий уровень лимфангиогенеза in vivo, и что пик лимфангиогенеза наблюдался через 14 дней после подкожной доставки криогеля. **Фиг. 23B**. Иллюстративные графики результатов окрашивания LEC (CD45- CD31+ PDPN+) и клеток эндотелия кровеносных сосудов (BEC, CD45- CD31+ PDPN-), выделенных после расщепления кожи мышей C57/BL6 через 14 дней после имплантации геля. **Фиг. 23C**. Количественное определение эндотелиальных клеток в виде показателей общего количества клеток/мг ткани. **Фиг. 23D**. Количественное определение, представленное в виде показателей общего количества клеток/мг ткани, для CD4+ T-клеток и CD8+ T-клеток. Показатели количества LEC коррелируют с T-клеточными инфильтратами, особенно необученного фенотипа (CD62L+, CD44-). Гистограммы включают 5 независимых экспериментов, объединенных для условий с VEGF-C и контрольных условий (VEGF-C - n=30, контроль - n=18, не подвергавшиеся воздействию - n=3), и данные представлены в виде среднего значения+SEM с использованием непараметрического t-критерия Манна-Уитни: **** - $p < 0,0001$; ** - $p < 0,01$. На **фиг. 23E** показано количественное определение указанных типов клеток (LEC, CD4 T-клеток или CD8 T-клеток) на мг ткани в течение нескольких дней после инъекции альгинатного криогеля с VEGF-C.

На фиг. 24A-24C подтверждается, что VEGF-C #8, продуцируемый в клетках CHO MaKo, является функциональным. На **фиг. 24A** представлен анализ разрастания HDLEC in vitro, демонстрирующий сопоставимую активность белка VEGF-C #8, продуцируемого в клетках CHO (8CHO), по сравнению с #8, продуцируемым в клетках HEK293T. На **фиг. 24B** сопоставимая биологическая активность также подтверждалась in vivo с помощью окрашивания LEC после расщепления кожи через 14 дней после доставки криогеля. На **фиг. 24C** показано количественное определение лимфангиогенеза в виде показателей общего количества LEC/мг ткани у мышей, которым инъецировали чистый криогель или криогель, нагруженный VEGF-C #8HEK или #8CHO. На BEC (CD45- CD31+ PDPN-) не влияла доставка VEGF-C #8, тогда как пик лимфангиогенеза соответствовал пику

иммунной инфильтрации CD4 и CD8 Т-клеток (CD45+) в коже над криогелями в день 14 после доставки криогеля. n > 9. Гистограммы представлены в виде среднего значения+SEM с использованием непараметрического t-критерия Манна-Уитни при сравнении между CHO и контролем, HEK и контролем или CHO и HEK: **** - $p < 0,0001$; ** - $p < 0,01$.

На фиг. 25A-25C продемонстрировано, что VEGF-C также индуцирует лимфангиогенез у мышей NSG с ослабленным иммунитетом, и LEC мыши эффективно осуществляют привлечение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека. На **фиг. 25A** представлены иллюстративные графики проточной цитометрии для окрашивания LEC кожи и BEC у мышей NSG, C57/BL6 через 14 дней после доставки VEGF-C (вариант #8, минорная зрелая форма с мутацией C137A, SEQ ID NO: 736) или чистого криогеля. На **фиг. 25B** изложена экспериментальная модель доставки геля у мышей NSG и последующей внутривенной инъекции PBMC человека (в день 10). Мышей умерщвляли и анализировали в отношении лимфангиогенеза и иммунной инфильтрации в коже в день 17 после имплантации геля. На **фиг. 25C** показано количественное определение, представленное в виде показателей общего количества клеток/мг для LEC, общей популяции Т-клеток (CD45+ CD3+), субпопуляций CD8 (CD3+ CD8+) и CD4 (CD3+ CD4+) Т-клеток, а также В-клеток (CD45+ CD19+). Эти данные демонстрируют, что Т-клетки являются главным типом клеток среди PBMC, привлеченных у мышей NSG.

На фиг. 26A-26B представлена схема доставки VEGF-C в кожу мыши с получением вторичного участка примирования для Т-клеток, подлежащих обучению и трансдукции после инъекции вирусных частиц, связанных с мезопористыми частицами кремнезема (MSP), например, гомогенизированными мезопористыми стержнями из кремнезема (MSR), в комбинации со STARTERS, связанными с MSP (например, STARTERS, связанными с гомогенизированными MSR) (**фиг. 26A**), или свободного вируса в комбинации со STARTERS, связанными с MSP (например, STARTERS, связанными с гомогенизированными MSR) (**фиг. 26B**).

На фиг. 27A-27B представлено определение характеристик емкости нагрузки MSP, в частности гомогенизированных MSR, лентивирусом, кодирующим CAR для CD19. MSR с триметиламмонием совместно инкубировали с лентивирусом, экспрессирующим GFP, в различных количествах в соответствии с функциональным титром, определенным посредством клеточных анализов трансдукции. Определяли характеристики количества вируса в трех фракциях - загрузочном растворе вируса (исходное вводимое количество, добавленное к MSR), вирусе, связанном с MSR (количество, остающееся связанным с MSR после инкубирования и промывания), и несвязанном вирусе (количество в растворе, остающееся после совместного инкубирования MSR и вируса). MSR и вирус совместно инкубировали в течение 30 минут на льду, надосадочную жидкость удаляли (несвязанный вирус), и MSR дважды промывали перед оценкой вируса, связанного с MSR. Неиспользованные загрузочные растворы вируса для каждого условия также анализировали. На **фиг. 27A** результаты показывают, что большая часть вируса из

вводимого загрузочного раствора вируса удерживается во фракции вируса, связанного с MSR, после адсорбции и промывания. Количество вируса, адсорбированного на MSR, увеличивается по мере увеличения количества вируса в загрузочном растворе вируса. На **фиг. 27A** показано, что расчетная фракция вируса, связанного с MSR, по сравнению с загрузочным раствором вируса обладает сильной эффективностью загрузки и удерживания на MSR после адсорбции и промывания.

На **фиг. 28** представлено определение характеристик удерживания вируса на MSP, в частности гомогенизированных MSR. Лентивирус и MSR совместно инкубировали в течение 30 минут на льду, и MSR дважды промывали. Затем MSR культивировали в среде R10, содержащей 10% FCS, или бессывороточной среде OpTmizer, и вводимый исходный раствор вируса также инкубировали в среде. Надосадочную жидкость удаляли в указанные моменты времени после начала инкубирования и анализировали в отношении общего содержания вируса. Результаты указывают на то, что MSR высвобождают лишь определенную долю вводимого вируса в течение первых 18 часов.

На фиг. 29A-29C показано функциональное получение CAR-T-клеток с применением MSP, в частности, гомогенизированных MSR, связанных с вирусом, кодирующим CAR для CD19 (CAR19). Клетки CART получали с помощью свободного лентивируса (CAR-свободный) либо с помощью лентивируса, связанного с MSR с триметиламмонием (CAR-MSR). Указана MOI, используемая для трансдукции CAR-свободным, и MOI для общего количества вируса, используемого для адсорбции на MSR в условии CAR-MSR. Данные MOI выбирали для получения клеток CART с эффективностью трансдукции, сходной для двух условий. MSR промывали после стадии адсорбции, поэтому общее количество вируса при трансдукции Т-клеток в режиме с MSR может быть представлено при более низкой MOI, чем указанная. 4,3e6 TU/вирус на 1 мг MSR использовали при совместном инкубировании MSR и вируса перед промыванием и высеванием Т-клеток. Т-клетки обрабатывали с помощью конструкции 4 (**таблица 20, фиг. 38A-38B**) и указанного вирусного препарата в течение 1 дня с последующим промыванием и культивированием в течение дополнительных 3 дней. На **фиг. 29A** показан % CAR+, измеренный в день 4 после трансдукции. Клетки использовали в анализах уничтожения с клетками Nalm6-Luc в день 4 после трансдукции и совместно инкубировали при указанном соотношении эффекторы:мишени (соотношение E:T; Т-клетки) после нормализации по общему количеству клеток и количеству CAR+ клеток. Результаты указывают на то, что представленная на **фиг. 29B** активность специфичного уничтожения и представленное на **фиг. 29C** высвобождение интерферона-гамма в ходе совместного инкубирования в течение 24 часов являлись сопоставимыми между условиями с CAR-MSR и CAR-свободным, тем самым демонстрируя, что трансдукция с помощью состава с MSR обеспечивает получение в эквивалентной степени функциональных клеток CART in vitro по сравнению с традиционной трансдукцией с помощью свободного вируса.

На фиг. 30A-30B продемонстрировано, что инъекционная способность MSR

улучшалась при уменьшении размера посредством гомогенизации. MSR гомогенизировали с применением смесителя с гранулами для уменьшения их размера и улучшения инъекционной способности. На **фиг. 30A** уменьшение размера наблюдалось в отношении длины MSR, и это позволяло осуществлять инъекцию во внутридермальное пространство с помощью иглы с меньшим диаметром. На **фиг. 30A** на стандартные MSR с триметиламмонием или гомогенизированные MSR адсорбировали лентивирус, и серию разведений данного комплекса получали и применяли для трансдукции Т-клеток с помощью лентивируса, кодирующего GFP. Гомогенизация MSR по существу не изменяла показатели трансдукции in vitro.

На фиг. 31A-31B изображен окрашенный гематоксилином и эозином (H&E) срез кожи, содержащий прилегающие друг к другу криогель и MSP, в частности гомогенизированные MSR. Чистые альгинатные криогели инъецировали подкожно, и через 7 дней вирусные частицы (4e6 TU), свободные или связанные с MSR, инъецировали во внутридермальное пространство над гелем с помощью шприца для инсулина (для группы, получавшей вирус на MSR) или шприца Гамильтона (для группы, получавшей свободный вирус). Через 72 ч. после доставки вируса мышей умерщвляли, и ткани (кожу и дренирующий лимфатический узел) собирали для иммуногистохимического анализа. Для облегчения доставки VEGF-C в лимфатические капилляры криогель имплантировали в верхнее подкожное пространство над поверхностной мышцей. На **фиг. 31A**, на которой изображены окрашенные с помощью H&E срезы, продемонстрирована локализация подкожного криогеля над поверхностной мышцей в гиподерме. MSP, в частности гомогенизированные MSR, наблюдались в виде слегка эозинофильного зернистого материала в смеси с мононуклеарными клетками, расположенными в дермо-гиподермальном соединении, прилегающем к имплантированному криогелю (см. **фиг. 31A** и **фиг. 31B** в увеличенном масштабе).

На фиг. 32A-32B показана гибридизация in situ для определения мРНК CAR в срезах кожи. Гибридизация in situ для выявления мРНК-транскрипта CAR демонстрировала устойчивый сигнал в областях, соответствующих инъецированным MSP, в частности гомогенизированным MSR, у мышей, которым инъецировали вирус, связанный с MSR (**фиг. 32A**), тогда как в клетках, инфильтрирующих гель, а также в клетках, прилегающих к нему, в условии со свободным вирусом выявлялся диффузный сигнал (**фиг. 32B**). Без ограничения какой-либо теорией, заявители считают, что эти данные подтверждают концепцию о том, что MSP, в частности гомогенизированные MSR, могут поддерживать локализацию вируса в дерме, где Т-клетки инфильтрируют кожу.

На фиг. 33A-33B показано, что у мыши, которой инъецировали вирус на MSP, в частности вирус на гомогенизированных MSR, имелось меньшее количество клеток, положительных в отношении мРНК-транскрипта CAR, в дренирующем лимфатическом узле по сравнению с группой, получавшей свободный вирус. Показана гибридизация in situ для определения мРНК CAR в срезах дренирующего лимфатического узла (dLN). С помощью гибридизации in situ выявили только одну клетку, положительную в отношении

мРНК-транскрипта CAR, в dLN мышей, которым инъецировали вирус, связанный с MSR (**фиг. 33**A), тогда как у мышей, которым инъецировали свободный вирус, наблюдалось незначительное количество клеток, положительных в отношении мРНК-транскрипта CAR, в субкапсулярном синусе, что соответствовало локальному оттоку вируса или клеток из участка имплантации криогеля (**фиг. 33**B).

На фиг. 34A-34C показано получение CD19+ CAR-T-клеток in vivo и истощение популяции B-клеток в селезенке. На **фиг. 34A** представлена временная шкала для экспериментальной модели изготовления клеток CART in vivo. В день 0 альгинатные криогели, нагруженные VEGF-C, инъецировали подкожно мышам NSG. В день 10 (за 3 дня до того как, как известно, достигается пик лимфангиогенеза), PBMC инъецируют мышам внутривенно, и через 7 дней (в день 17) вирус на MSP (в частности вирус на гомогенизированных MSR), свободный вирус или PBS в качестве контроля инъецировали соответствующим группам совместно со STARTERS на MSP, в частности STARTERS на гомогенизированных MSR, для возможной стимуляции активации Т-клеток и способствования трансдукции Т-клеток. В день 35 мышей умерщвляли, и селезенку и кровь собирали для определения того, вызывает ли доставка вируса, кодирующего CAR для CD19, in vivo трансдукцию Т-клеток, привлекаемых посредством лимфангиогенеза, индуцированного с помощью VEGF-C. На **фиг. 34B** представлены иллюстративные графики проточной цитометрии (FACS) для популяций иммунных клеток, на которых показаны истощение популяции B-клеток и трансдукция Т-клеток (CD19 CAR+ клеток) в селезенке мышей, обработанных свободным вирусом или вирусом на MSP, в частности вирусом на гомогенизированных MSR. На **фиг. 34C** показано количественное определение истощения популяции B-клеток и CAR-T-клеток в селезенке мышей во всех группах.

На **фиг. 35** продемонстрирован минимальный уровень трансдукции клеток, отличных от Т-клеток, с помощью композиции. Представлены иллюстративные графики проточной цитометрии (FACS) для CD11b+ моноцитов человека, моноцитов мыши (нефункциональных у мыши NSG), а также стромальных клеток в селезенке мышей, обработанных свободным вирусом или вирусом на MSP, в частности вирусом на гомогенизированных MSR, или контролем, представляющим собой PBS. Незначительное количество клеток-моноцитов человека продемонстрировало положительное окрашивание на CAR для CD19.

На фиг. 36A-36B показано, что истощение популяции B-клеток коррелирует с размножением CAR-T-клеток в селезенке и крови. На **фиг. 36A** CAR-T-клетки (показатели общего количества/мг ткани) показаны на графике в зависимости от B-клеток (показателей общего количества/мг ткани) в селезенке, и на **фиг. 36B** CAR-T-клетки (кровь, представлены как показатели общего количества клеток/мкл) показаны на графике в зависимости от истощения популяции B-клеток (селезенка, представленных как показатели общего количества клеток/мг ткани).

На **фиг. 37A-37C** представлена иллюстративная схема для биспецифических

антител, включая схему для одиночного биспецифического антитела (**фиг. 37A**), схему мультимерного биспецифического антитела (**фиг. 37B**) и условные обозначения к фигуре (**фиг. 37C**).

Фиг. 38. Т-клетки привлекаются в участке имплантации. На фиг. 38 показана экспериментальная модель (выше) и иллюстративное изображение (ниже) IHC-анализа CD3 в коже мыши, получающей имплантат в виде криогеля с VEGF-C вместе с вирусом на MSP и STARTERS на MSP, через 18 дней после доставки вируса.

Фиг. 39. Сигнал ISH CAR в мононуклеарных клетках, окружающих гель. На фиг. 39 показаны иллюстративные изображения ISH-анализа клеток в отношении CAR (РНК CAR для CD19) в коже мыши, получающей имплантат в виде криогеля с VEGF-C вместе с вирусом на MSP и STARTERS на MSP, через 18 дней после доставки вируса.

Фиг. 40. CAR-Т-клетки, полученные локально in vivo, мигрируют в селезенку и коррелируют с истощением В-клеток. На фиг. 40 показано иллюстративное изображение ISH-анализа клеток в отношении CAR в селезенке мыши, получающей имплантат в виде криогеля с VEGF-C вместе с вирусом на MSP и STARTERS на MSP, через 18 дней после доставки вируса.

Фиг. 41A-41B. Получение CAR-Т-клеток in vivo коррелирует с уничтожением В-клеток в участке имплантации и в селезенке. Показано иллюстративное изображение флуоресцентно меченных CD19+ В-клеток и CD3+ Т-клеток в участке имплантации (**фиг. 41A**, флуоресцентное изображение на верхней панели и светлопольное изображение на нижней панели), а также в селезенке (**фиг. 41B**) для мышей, получающих имплантат в виде криогеля с VEGF-C вместе с вирусом на MSP и STARTERS на MSP, через 18 дней после доставки вируса.

Фиг. 42A-42B. Анализ циркулирующих Т-клеток человека у мышей NSG с течением времени. На фиг. 42A показана схема эксперимента и группы. На фиг. 42B представлен набор графиков, на которых показан анализ методом проточной цитометрии с течением времени для мышей, подвергнутых имплантации. Данные проточной цитометрии представлены в виде среднего значения ± SEM.

Фиг. 43A-43B. Истощение популяции В-клеток в кровотоке коррелирует с размножением CAR-Т-клеток. Показан анализ методом проточной цитометрии с течением времени для определения CAR-Т-клеток (**фиг. 43A**) и В-клеток (**фиг. 43B**) в кровотоке мышей, подвергнутых имплантации. Данные проточной цитометрии представлены в виде среднего значения ± SEM (на **фиг. 43A** и **43B**) или в виде отдельных кривых для каждой мыши (**фиг. 43B**).

Фиг. 44A-44B. Сильная корреляция размножения CAR-Т-клеток с истощением В-клеток в кровотоке и в селезенке. Показана корреляция числа В-клеток и числа Т-клеток в крови (**фиг. 44A**) и в селезенке (**фиг. 44B**) мышей, обработанных с использованием различных условий. Число клеток представлено показателями количества клеток/мг ткани или показателями количества клеток/мкл для крови, определенными в ходе анализа методом проточной цитометрии.

Фиг. 45A-45B. Количественное определение размножения CAR-T-клеток и соответствующего истощения популяции B-клеток в селезенке через 18 дней после доставки вируса. Показано количественное определение показателей количества клеток CART (**фиг. 45A**) и B-клеток (**фиг. 45B**)/мг ткани в селезенке мышей, подвергнутых обработке. Данные проточной цитометрии представлены в виде среднего значения ± SEM.

Фиг. 46A-46D. Размножение CAR-T-клеток коррелирует с лимфангиогенезом, а также локальным истощением популяции B-клеток в коже через 18 дней после доставки вируса. Показано количественное определение показателей количества клеток CART (**фиг. 46A**) и B-клеток (фиг. 46B)/мг ткани в селезенке мышей, подвергнутых обработке. Данные проточной цитометрии представлены в виде среднего значения ± SEM. Показан график корреляции числа B-клеток и числа CAR-T-клеток (**фиг. 46C**), а также числа CAR-T-клеток и числа лимфатических эндотелиальных клеток (LEC) (**фиг. 46D**) в коже. На графиках корреляции число клеток представлено в виде показателей количества клеток/мг ткани.

Фиг. 47. Экспрессия трансгена GFP в зависимости от дозы MSP.

На **фиг. 48A-48B** изображена схема 17 различных полиспецифических конструкций, содержащих антигенсвязывающий домен для CD3, содержащий тяжелую и легкую цепи, полученные из антитела к CD3, и, во всех конструкциях, кроме контрольных конструкций 11, 14 и 17, антигенсвязывающий домен для CD28 или CD2, как указано, содержащий тяжелую и легкую цепи, полученные из антитела к CD28 или CD2 соответственно. Без ограничения какой-либо теорией понятно, что любую одну или несколько из данных конструкций можно применять в качестве средства для активации клеток, как раскрыто в данном документе.

Конструкция 1 содержит scFv для CD3, слитый с Fab для CD2, который дополнительно слит с Fc-областью. Конструкция 1 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD2. Конструкция 2 содержит scFv для CD3, слитый с Fab для CD28, который дополнительно слит с Fc-областью. Конструкция 2 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD28.

Конструкция 3 содержит Fab для CD2, слитый с Fc-областью, которая дополнительно слита с scFv для CD3. Конструкция 3 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2, CH3 антитела к CD2, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3. Конструкция 4 содержит Fab для CD28, слитый с Fc-областью, которая дополнительно слита с scFv для CD3. Конструкция 4 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь

содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2, CH3 антитела к CD28, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3.

Конструкция 5 содержит Fab для CD2, слитый с scFv для CD3, который дополнительно слит с Fc-областью. Конструкция 5 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1 антитела к CD2, линкер (G4S)2 (SEQ ID NO: 767), VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), CH2 и CH3. Конструкция 6 содержит Fab для CD28, слитый с scFv для CD3, который дополнительно слит с Fc-областью. Конструкция 6 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1 антитела к CD28, линкер (G4S)2 (SEQ ID NO: 767), VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), CH2 и CH3.

Конструкция 7 содержит scFv для CD3, слитый с Fc-областью, которая дополнительно слита с Fab для CD2. Конструкция 7 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768), CH2, CH3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VH и CH1 антитела к CD2. Конструкция 8 содержит scFv для CD3, слитый с Fc-областью, которая дополнительно слита с Fab для CD28. Конструкция 8 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768), CH2, CH3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VH и CH1 антитела к CD28.

Конструкция 9 содержит Fab для CD2, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 9 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD2. Третья цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768), CH2 и CH3. Конструкция 10 содержит Fab для CD28, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 10 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD28. Третья цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768), CH2 и CH3.

Конструкция 11 содержит scFv для CD3, слитый с Fc-областью. Конструкция 11 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу CH2 и CH3. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4

(SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768), CH2 и CH3.

Конструкция 12 содержит Fab для CD2, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 12 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD2. Третья цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768), CH2, CH3, линкер (G4S)3 (SEQ ID NO: 30) и матрилин 1. Конструкция 13 содержит Fab для CD28, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 13 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD28. Третья цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768), CH2, CH3, линкер (G4S)3 (SEQ ID NO: 30) и матрилин 1.

Конструкция 14 содержит scFv для CD3, слитый с Fc-областью. Конструкция 14 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу CH2 и CH3. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768), CH2, CH3, линкер (G4S)3 (SEQ ID NO: 30) и матрилин 1.

Конструкция 15 содержит Fab для CD2, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 15 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD2. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD2. Третья цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768), CH2, CH3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768) и суперспиральный домен олигомерного матриксного белка хряща (COMPcc). Конструкция 16 содержит Fab для CD28, слитый с первой Fc-областью, и scFv для CD3, слитый со второй Fc-областью. Конструкция 16 содержит первую цепь, вторую цепь и третью цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу VL и CL антитела к CD28. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH, CH1, CH2 и CH3 антитела к CD28. Третья цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768), CH2, CH3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768) и COMPcc.

Конструкция 17 содержит scFv для CD3, слитый с Fc-областью. Конструкция 17 содержит первую цепь и вторую цепь. Первая цепь содержит от N-конца к C-концу CH2 и CH3. Вторая цепь содержит от N-конца к C-концу VH антитела к CD3, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), VL антитела к CD3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768), CH2, CH3, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768) и COMPcc.

Иллюстративные последовательности конструкции 1 - конструкции 17 представлены в таблице 20. Дополнительные последовательности (например, средств,

связывающих CD3, раскрытых в данном документе, средств, связывающих CD28, раскрытых в данном документе, средств, связывающих CD2, раскрытых в данном документе, или Fc-областей, раскрытых в данном документе) можно использовать для получения конструкции 1 - конструкции 17.

На фиг. 49A-49B показана информация о связывании (**фиг. 49A**) и конфигурация (**фиг. 49B**) молекул STARTERS второго поколения. "F5 на основе антитела к CD3 (2)" относится к конструкции F5 со средством, связывающим CD3, на основе антитела к CD3 (2).

На фиг. 50A-50B показана информация о связывании (**фиг. 50A**) и конфигурация (**фиг. 50B**) молекул STARTERS третьего поколения.

На **фиг. 51A** показана конфигурация молекулы STARTERS, тестируемой в примере J. На **фиг. 51B и 51C** показана активация и трансдукция Т-клеток, опосредованная смесями MSP-лентивирус-STARTERS. Концентрация молекулы STARTERS в каждом разведении смеси MSP-лентивирус-STARTERS показана по оси x. С помощью составов, полученных из обеих партий MSP, получали сходные показатели эффективности активации (фиг. 51B) и трансдукции (фиг. 51C) Т-клеток in vitro. Доставка молекулы STARTERS, связанной с MSP ("партия 1" и "партия 2" на фиг. 51B-C), усиливала активацию и трансдукцию по сравнению с доставкой растворимой молекулы STARTERS ("без MSP" на фиг. 51B-C). День 1 на фиг. 51B и день 4 на фиг. 51C относятся к моменту времени после начала культивирования Т-клеток (т. е. когда клетки и MSP-STARTERS-вирус были изначально смешаны друг с другом).

На фиг. 52A и 52B показана активация и трансдукция Т-клеток, опосредованная смесями MSP-лентивирус-STARTERS. Лентивирус, кодирующий GFP, и молекулу STARTERS загружали в полноразмерные ("MSP") или уменьшенные в размере MSP, где уменьшение размера достигалось путем гомогенизации MSP с помощью гранул ("гомогенизированные с помощью гранул") или их обработки ультразвуком ("обработанные ультразвуком"). Соотношение лентивируса и Т-клеток (MOI) в каждом разведении смеси MSP-лентивирус-STARTERS показано по оси x. Уменьшение размера MSP не оказывало отрицательного влияния на активность in vitro с точки зрения активации (фиг. 52A) и трансдукции (фиг. 52B) Т-клеток. Как гомогенизация с помощью гранул, так и обработка ультразвуком приводили к получению результатов, сопоставимых с таковыми для полноразмерных MSP.

На фиг. 53A и 53B показана схема исследования in vivo. На **фиг. 53C** представлен график корреляции размножения CD19-CAR-Т-клеток и истощения популяции В-клеток в крови мышей в день 18 после инъекции инъекционного средства 2. На **фиг. 53D** показаны измерения биолюминесценции экспрессирующих люциферазу опухолей из NALM6, привитых мышам NSG в течение 4 дней и затем обработанных дозой 3e5 подвергнутых адоптивному переносу CAR+ Т-клеток из изначальной когорты мышей, подвергнутых процессу получения клеток CART in vivo. Изображения были получены через 13 дней после адоптивного переноса. Мышей обрабатывали дозой 3e5 клеток CAR-T,

изготовленных с применением свободного вируса ("свободный вирус") или вируса, доставляемого с помощью MSP ("вирус на MSP"). Также показаны контрольные группы, где опухоли обрабатывали с помощью перенесенных PBMC от мышей-доноров без CART ("контроль с PBMC") или где опухоли не обрабатывали ("NALM6"). Мышь, помеченная с помощью "a", получала 1,5e5 CAR+ клеток из группы, получавшей свободный вирус. Мышь, помеченная с помощью "b", получала 2,3e5 CAR+ клеток из группы, получавшей свободный вирус. **На фиг. 53E, 53F и 53G** представлены графики, на которых показан % клеток CART в общей популяции Т-клеток в кровотоке (фиг. 53E), количество клеток CART в кровотоке (фиг. 53F) и количество циркулирующих CD3+ Т-клеток (фиг. 53G) через 13 дней после внутридермальной инъекции инъекционного средства 2 в очаге криогеля. **На фиг. 53H, 53I и 53J** представлены графики для мышей, выбранных для адоптивного переноса циркулирующих лимфоцитов мышам, подвергнутым стимуляции с помощью NALM6, на которых показано количество циркулирующих Т-клеток (фиг. 53H), количество циркулирующих CAR-Т-клеток (фиг. 53I) и % клеток CART в общей популяции Т-клеток в кровотоке (фиг. 53J) через 18 дней после внутридермальной инъекции инъекционного средства 2. **На фиг. 53K и 53L** показаны результаты комбинированного анализа методом проточной цитометрии для крови от мышей, используемых для адоптивного переноса, и оставшихся мышей, включенных в исследование, демонстрирующие количество циркулирующих Т-клеток (фиг. 53K) и количество CAR-Т-клеток в кровотоке (фиг. 53L) через 18 или 19 дней после внутридермальной инъекции инъекционного средства 2.

На фиг. 54A, 54B, 54C и 54D представлены графики, на которых показаны данные о высвобождении in vitro. На фиг. 54A показаны данные для гидрогеля H2a (200 кДа [HA-N_3]-24%; степень сшивания 9%) и гидрогеля H4a (700 кДа [HA-N_3]-16%; степень сшивания 18%). На фиг. 54B показаны данные для гидрогеля H4a (700 кДа [HA-N_3]-16%; степень сшивания 18%; без лапонита), гидрогеля H5a (700 кДа [HA-N_3]-16%; степень сшивания 18%; 0,25 мг/мл лапонита) и гидрогеля H6a (700 кДа [HA-N_3]-16%; степень сшивания 18%; 1 мг/мл лапонита). На фиг. 54C показаны данные для гидрогеля H5a (in situ; 0,25 мг/мл лапонита) и гидрогеля H5b (частицы; 0,25 мг/мл лапонита). На фиг. 54D показаны данные для гидрогеля H6a (in situ; 1 мг/мл лапонита) и гидрогеля H6b (частицы; 1 мг/мл лапонита).

На фиг. 55A и 55B представлены графики, на которых показан PD-ответ in vivo в день 7.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Форма единственного числа относится к одному или нескольким (т. е. по меньшей мере одному) грамматическим объектам настоящей заявки. В качестве примера, "элемент"

означает один элемент или несколько элементов.

Подразумевается, что термин "приблизительно" в отношении измеряемой величины, такой как количество, временной промежуток и т. п., охватывает отклонения на ± 20%, или в некоторых случаях на ± 10%, или в некоторых случаях на ± 5%, или в некоторых случаях на ± 1%, или в некоторых случаях на ± 0,1% от указанного значения, поскольку такие отклонения являются допустимыми для осуществления раскрытых способов.

Используемый в данном документе термин "фактор привлечения клеток" относится к средству, обладающему способностью к привлечению клеток, например, иммунных клеток. Неограничивающие примеры таких факторов привлечения включают IL-2, IL-7, CCL21, IL 5, GM-CSF, CCL19, CXCL9, CXCL10, XCL1, лимфотоксин-альфа, лимфотоксин-бета и VEGF-C. Известно, что такие факторы привлекают иммунные клетки, такие как Т-клетки. Дополнительные неограничивающие примеры факторов привлечения клеток, которые привлекают конкретные типы клеток, включают хоминговые хемокины кожи, такие как, без ограничения, CCL17, CCL22, CCL20 и CCL27; хемоаттрактанты миелоидных клеток, такие как, без ограничения, FLT3L, G-CSF, PDGF, S100A8/A9, CSF-1, CXCL8, CCL20, CCL17, CCR5, CCR6, CCL2, VEGF, ангиопоэтин-2, CXCL12, PGE2 и LTB4; и NK-специфические факторы привлечения, такие как, без ограничения, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10, CXCL11 и CXCL12.

Используемый в данном документе термин "средство для активации клеток" относится к средству, обладающему способностью к активации клетки для выполнения заданной функции - например, в случае Т-клеток, взаимодействие с эндогенными или сконструированными рецепторами (например, CAR) или маркерами клеточной поверхности активирует пролиферацию Т-клеток и, в определенных случаях, секрецию ими соответствующих цитокинов.

Термин "химерный антигенный рецептор" или в качестве альтернативы "CAR" относится к рекомбинантной полипептидной конструкции, содержащей по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (также называемый в данном документе "внутриклеточным сигнальным доменом"), содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, определенной ниже. В некоторых вариантах осуществления домены в полипептидной конструкции CAR находятся в одной и той же полипептидной цепи, например, образуют химерный слитый белок. В некоторых вариантах осуществления домены в полипептидной конструкции CAR не являются смежными друг с другом, например, находятся в разных полипептидных цепях, например, как представлено в RCAR, описанном в данном документе.

В некоторых аспектах цитоплазматический сигнальный домен содержит первичный сигнальный домен (например, первичный сигнальный домен CD3-дзета). В некоторых аспектах цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или несколько функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей

мере одной костимулирующей молекулы, определенной ниже. В некоторых аспектах костимулирующая молекула выбрана из 4-1BB (т. е. CD137), CD27, ICOS и/или CD28. В некоторых аспектах CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В некоторых аспектах 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 некоторых аспектах CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий два функциональных сигнальных домена, полученных из одной или нескольких костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В некоторых аспектах 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 нескольких костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В некоторых аспектах CAR содержит необязательную лидерную последовательность на аминоконце (N-конце) слитого белка CAR. В некоторых аспектах CAR дополнительно содержит лидерную последовательность на N-конце внеклеточного антигенраспознающего домена, где лидерная последовательность необязательно отщепляется от антигенраспознающего домена (например, scFv) в ходе клеточного процессинга и локализации CAR в клеточной мембране.

CAR, содержащий антигенсвязывающий домен (например, scFv, однодоменное антитело или TCR (например, связывающий домен альфа-цепи TCR или связывающий домен бета-цепи TCR)), который нацеливается на конкретный опухолевый маркер X, где X может быть опухолевым маркером, описанным в данном документе, также называется XCAR. Например, CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, нацеливающийся на BCMA, называется CAR для BCMA. CAR может экспрессироваться в любой клетке, например, иммунной эффекторной клетке, описанной в данном документе (например, Т-клетке или NK-клетке).

Термин "сигнальный домен" относится к функциональной части белка, которая действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности посредством определенных сигнальных путей, образуя вторичные мессенджеры или функционируя в качестве эффекторов путем ответа на такие мессенджеры.

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к последовательности белка или полипептида, полученной из молекулы иммуноглобулина,

который специфично связывается с антигеном. Антитела могут быть поликлональными или моноклональными, много- или одноцепочечными или интактными иммуноглобулинами и могут быть получены из природных источников или из рекомбинантных источников. Антитела могут представлять собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов.

Термин "фрагмент антитела" относится к по меньшей мере одной части антитела, которая сохраняет способность специфично взаимодействовать (например, посредством связывания, стерического затруднения, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом антигена. Примеры фрагментов антител включают без ограничения Fab-, Fab'-, F(ab')2-, Fv-фрагменты, scFv-фрагменты антител, Fv, стабилизированные дисульфидными связями (sdFv), Fd-фрагмент, состоящий из VH- и CH1-доменов, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (либо VL, либо VH), VHH-домены верблюдовых, полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител, таких как бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, и выделенную CDR или другие эпитопсвязывающие фрагменты антитела. Антигенсвязывающий фрагмент также может быть включен в состав однодоменных антител, максиантител, миниантител, нанотел, интрател, диател, триател, тетрател, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть привиты на остовы на основе полипептидов, таких как фибронектин III типа (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описаны миниантитела на основе полипептида фибронектина).

Часть CAR по настоящему изобретению, предусматривающая антитело или фрагмент этого антитела, может существовать во множестве форм, в которых антигенсвязывающий домен экспрессируется в виде части непрерывной полипептидной цепи, в том числе, например, в виде фрагмента однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечного антитела (scFv), гуманизированного антитела или биспецифического антитела (Harlow et al., 1999, в: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, в: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен в композиции на основе CAR по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте CAR содержит фрагмент антитела, который содержит scFv. Точные границы аминокислотной последовательности указанной CDR могут быть определены с использованием любой из ряда хорошо известных схем, в том числе описанных в Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации "по Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации "по Chothia") или их комбинации.

Используемый в данном документе термин "связывающий домен" или "молекула

антитела" относится к белку, например, к цепи иммуноглобулина или ее фрагменту, содержащему по меньшей мере последовательность одного вариабельного домена иммуноглобулина. Термин "связывающий домен" или "молекула антитела" охватывает антитела и фрагменты антител. В некоторых вариантах осуществления молекула антитела представляет собой молекулу полиспецифического антитела, например, она содержит совокупность последовательностей вариабельных доменов иммуноглобулина, где последовательность первого вариабельного домена иммуноглобулина из совокупности характеризуется специфичностью связывания с первым эпитопом, а последовательность второго вариабельного домена иммуноглобулина из совокупности характеризуется специфичностью связывания со вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления молекула полиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело характеризуется специфичностью в отношении не более чем двух антигенов. Молекула биспецифического антитела характеризуется наличием первой последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, которая характеризуется специфичностью связывания с первым эпитопом, и второй последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, которая характеризуется специфичностью связывания со вторым эпитопом.

Термины "биспецифическое антитело" и "биспецифические антитела" относятся к молекулам, в которых объединены антигенсвязывающие участки двух антител в пределах одной молекулы. Таким образом, биспецифическое антитело способно связывать два разных антигена одновременно или последовательно. Способы получения биспецифических антител хорошо известны из уровня техники. Различные форматы объединения двух антител также известны из уровня техники. Формы биспецифических антител по настоящему изобретению включают без ограничения диатело, одноцепочечное диатело, продукт димеризации Fab (Fab-Fab), Fab-scFv и тандемное антитело, как известно специалистам в данной области.

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

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

Термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу, образованному с помощью технологии рекомбинантных ДНК, такому как, например, антитело, экспрессируемое в бактериофаговой или дрожжевой системе экспрессии. Термин также следует истолковывать как означающий антитело, которое было образовано в результате синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, при этом данная молекула ДНК экспрессирует белковое антитело или аминокислотную последовательность,

определяющую антитело, где последовательность ДНК или аминокислотная последовательность были получены с помощью технологии рекомбинантных ДНК или аминокислотных последовательностей, доступной и хорошо известной из уровня техники.

Термин "антиген" или "Ag" относится к молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может предусматривать продуцирование антител либо активацию специфических иммунокомпетентных клеток или как то, так и другое. Специалисту в данной области будет понятно, что любая макромолекула, в том числе практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Кроме того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, тем самым кодирует "антиген", как этот термин используется в данном документе. Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что антиген не должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает без ограничения применение частичных нуклеотидных последовательностей более одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности составлены в различных комбинациях для того, чтобы кодировать полипептиды, которые вызывают требуемый иммунный ответ. Более того, специалисту в данной области будет понятно, что антиген вообще не обязательно должен кодироваться "геном". Очевидно, что антиген может быть синтезирован или может быть получен из биологического образца или может представлять собой макромолекулу, отличную от полипептида. Такой биологический образец может включать без ограничения образец ткани, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами.

Термин "полиспецифическая связывающая молекула" относится к молекуле, которая специфично связывается с по меньшей мере двумя антигенами и содержит два или более антигенсвязывающих домена. Каждый из антигенсвязывающих доменов может независимо представлять собой фрагмент антитела (например, scFv, Fab, нанотело), лиганд или связывающее средство, полученное не из антитела (например, фибронектин, финомер, дарпин).

Термин "одновалентный", используемый в данном документе применительно к полиспецифической связывающей молекуле, антителу (например, биспецифическому антителу) или фрагменту антитела, относится к полиспецифической связывающей молекуле, антителу (например, биспецифическому антителу) или фрагменту антитела, в которых имеется единственный антигенсвязывающий домен для каждого антигена, с которым связываются полиспецифическая связывающая молекула, антитело (например, биспецифическое антитело) или фрагмент антитела.

Термин "двухвалентный", используемый в данном документе применительно к полиспецифической связывающей молекуле, антителу (например, биспецифическому антителу) или фрагменту антитела, относится к полиспецифической связывающей

молекуле, антителу (например, биспецифическому антителу) или фрагменту антитела, в которых имеются два антигенсвязывающих домена для каждого антигена, с которым связываются полиспецифическая связывающая молекула, антитело (например, биспецифическое антитело) или фрагмент антитела.

Термин "мультимер" относится к агрегату из множества молекул (таких как, без ограничения, антитела (например, биспецифические антитела)), необязательно конъюгированных друг с другом.

Термин "противораковый эффект" относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, в том числе без ограничения, например, в виде уменьшения объема опухоли, уменьшения числа раковых клеток, уменьшения числа метастазов, увеличения ожидаемой продолжительности жизни, уменьшения пролиферации раковых клеток, уменьшения выживаемости раковых клеток или уменьшения тяжести различных физиологических симптомов, ассоциированных с раковым состоянием. "Противораковый эффект" также может проявляться в виде способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител в первую очередь предупреждать появление рака. Термин "противоопухолевый эффект" относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, в том числе без ограничения, например, в виде уменьшения объема опухоли, уменьшения числа опухолевых клеток, уменьшения пролиферации опухолевых клеток или уменьшения выживаемости опухолевых клеток.

Термин "аутологичный" относится к любому материалу, полученному от того же индивидуума, которому он позднее должен быть повторно введен.

Термин "аллогенный" относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида, что и индивидуум, которому данный материал вводят. Говорят, что два или более индивидуума являются аллогенными по отношению друг к другу, если их гены в одном или нескольких локусах не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенные материалы от индивидуумов одного и того же вида могут быть достаточно непохожими генетически, чтобы происходило их антигенное взаимодействие.

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

Термин "рак" относится к заболеванию, которое характеризуется неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части организма. Примеры различных форм рака описаны в данном документе и включают без ограничения рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, почечный рак, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легкого и т. п. Термины "опухоль" и "рак" используются в данном документе взаимозаменяемо, например, оба термина охватывают солидные опухоли и опухоли жидких тканей, например, диффузные или циркулирующие. Используемые в данном документе термины "рак" или "опухоль" включают предраковые,

а также злокачественные формы рака и опухолей.

Как описано в данном документе, выражение "конъюгированный с чем-либо" означает связанный с чем-либо или присоединенный к чему-либо любым способом, описанным в данном документе, необязательно ковалентно или нековалентно, и/или непосредственно или посредством линкера.

Используемый в данном документе термин "полученный из" указывает на взаимосвязь между первой и второй молекулой. Это обычно относится к структурному сходству между первой молекулой и второй молекулой и не имеет дополнительного значения или не включает ограничение способа или источника в отношении первой молекулы, которая получена из второй молекулы. Например, в случае с внутриклеточным сигнальным доменом, который получен из молекулы CD3-дзета, внутриклеточный сигнальный домен сохраняет структуру CD3-дзета в достаточной мере для того, чтобы он обладал необходимой функцией, а именно способностью генерировать сигнал в соответствующих условиях. Это не имеет дополнительного значения или не включает ограничения в отношении конкретного способа получения внутриклеточного сигнального домена, например, это не означает, что для обеспечения внутриклеточного сигнального домена нужно начинать с последовательности CD3-дзета и удалять нежелательную последовательность или вводить мутации для получения внутриклеточного сигнального домена.

Фраза "заболевание, ассоциированное с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе" включает без ограничения заболевание, ассоциированное с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе, или состояние, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют опухолевый антиген, описанный в данном документе, в том числе, например, пролиферативные заболевания, такие как рак или злокачественное новообразование, или предраковое состояние, такое как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз; или не связанное с раком показание, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют опухолевый антиген, описанный в данном документе. В некоторых аспектах рак, ассоциированный с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе, представляет собой гематологический рак. В некоторых аспектах рак, ассоциированный с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе, представляет собой солидный рак. Дополнительные заболевания, ассоциированные с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе, включают без ограничения, например, атипичные и/или неклассические формы рака, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, ассоциированные с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе. Не связанные с раком показания, ассоциированные с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе, включают без ограничения, например, аутоиммунное заболевание (например, волчанку), воспалительные нарушения (аллергию и астму) и трансплантацию. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, экспрессируют

или в какой-либо момент времени экспрессировали мРНК, кодирующую опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, продуцируют опухолевый антигенный белок (например, дикого типа или мутантный), и при этом опухолевый антигенный белок может присутствовать на нормальных уровнях или сниженных уровнях. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, в один момент времени продуцировали опухолевый антигенный белок на выявляемых уровнях, а затем по существу не продуцировали опухолевый антигенный белок на выявляемых уровнях.

Термин "стимуляция" относится к первичному ответу, индуцируемому связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3 или CAR) со своим когнатным лигандом (или опухолевым антигеном в случае CAR), за счет чего опосредуется событие передачи сигнала, такое как, без ограничения, передача сигнала через комплекс TCR/CD3 или передача сигнала через соответствующий рецептор NK или сигнальные домены CAR. Стимуляция может опосредовать изменение экспрессии определенных молекул.

Термин "стимулирующая молекула" относится к молекуле, экспрессируемой иммунной клеткой (например, Т-клеткой, NK-клеткой, В-клеткой), которая обеспечивает цитоплазматическую(цитоплазматические) сигнальную(сигнальные) последовательность(последовательности), которая(которые) регулирует(регулируют) активацию иммунной клетки стимулирующим образом в по меньшей мере некоторых аспектах сигнального пути иммунной клетки. В некоторых аспектах сигнал представляет собой первичный сигнал, который инициируется, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой MHC, нагруженной пептидом, и который приводит к опосредованию Т-клеточного ответа, в том числе без ограничения пролиферации, активации, дифференцировки и т. п. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность (также называемая "первичным сигнальным доменом"), которая действует стимулирующим образом, может содержать сигнальный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры цитоплазматической сигнальной последовательности, содержащей ITAM, которая является особенно применимой в настоящем изобретении, включают без ограничения таковые, полученные из CD3-дзета, общей гамма-цепи FcR (FCER1G), Fc-гамма-RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон-R1b), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и DAP12. В конкретном CAR по настоящему изобретению внутриклеточный сигнальный домен в любом одном или нескольких CAR по настоящему изобретению содержит внутриклеточную сигнальную последовательность, например, первичную сигнальную последовательность CD3-дзета. В конкретном CAR по настоящему изобретению первичная сигнальная последовательность CD3-дзета представляет собой последовательность, представленную под SEQ ID NO: 18, или эквивалентные остатки из вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, нечеловекообразной обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п. В конкретном CAR по настоящему изобретению

первичная сигнальная последовательность CD3-дзета представляет собой последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, или эквивалентные остатки из вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, нечеловекообразной обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.

Термин "с сайленсингом Fc" относится к Fc-домену, который был модифицирован таким образом, чтобы он характеризовался минимальным взаимодействием с эффекторными клетками. Сайленсинг эффекторных функций может быть достигнут посредством мутаций в Fc-области антител, которые были описаны в уровне техники, таких как без ограничения LALA и N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691); а также D265A (Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181: 6664-69), см. также Heusser et al., WO2012065950. Примеры мутаций, обеспечивающих сайленсинг Fc, включают мутантный вариант LALA, содержащий мутации L234A и L235A в аминокислотной последовательности Fc IgG1, DAPA (D265A, P329A) (см., например, US 6737056), N297A, DANAPA (D265A, N297A и P329A) и/или LALADANAPS (L234A, L235A, D265A, N297A и P331S), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. Кроме того, неограничивающие иллюстративные варианты осуществления мутаций, обеспечивающих сайленсинг, включают LALAGA (L234A, L235A и G237A), LALASKPA (L234A, L235A, S267K и P329A), DAPASK (D265A, P329A и S267K), GADAPA (G237A, D265A и P329A), GADAPASK (G237A, D265A, P329A и S267K), LALAPG (L234A, L235A и P329G) и LALAPA (L234A, L235A и P329A), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. Если в данном документе конкретно не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области осуществляется в соответствии с системой нумерации Eu, также называемой EU-индексом, как описано в Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

Термин "комплекс CD3/TCR" относится к комплексу на поверхности Т-клеток, содержащему TCR, который содержит альфа-цепь TCR и бета-цепь TCR; CD3, который содержит одну гамма-цепь CD3, одну дельта-цепь CD3, а также две эпсилон-цепи CD3 и дзета-домен. Под номерами доступа в UniProt P01848 (TCR-альфа, константный домен), P01850 (TCR-бета, константный домен 1), A0A5B9 (TCR-бета, константный домен 2), P09693 (CD3-гамма), P04234 (CD3-дельта), P07766 (CD3-эпсилон) представлены иллюстративные человеческие последовательности этих цепей, за исключением дзета-цепи, отвечающей за внутриклеточную передачу сигнала, которая обсуждается более подробно ниже. Дополнительные соответствующие номера доступа включают A0A075B662 (TCR-альфа мыши, константный домен), A0A0A6YWV4 и/или A0A075B5J3 (TCR-бета мыши, константный домен 1), A0A075B5J4 (TCR-бета мыши, константный домен 2), P11942 (CD3-гамма мыши), P04235 (CD3-дельта мыши), P22646 (CD3-эпсилон мыши).

Термин "CD28" относится к гликопротеину CD28, специфичному для Т-клеток, также называемому Tp44, а также всем его альтернативным названиям, который

функционирует в качестве костимулирующей молекулы. Под номером доступа в UniProt P10747 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности CD28 человека (см. также HGNC: 1653, Entrez Gene: 940, Ensembl: ENSG00000178562 и OMIM: 186760). Дополнительные соответствующие последовательности CD28 включают номер доступа в UniProt P21041 (CD28 мыши).

Термин "ICOS" относится к индуцируемому костимулятору Т-клеток, также называемому AILIM, CVID1, CD278, а также всем его альтернативным названиям, который функционирует в качестве костимулирующей молекулы. Под номером доступа в UniProt Q9Y6W8 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности ICOS человека (см. также HGNC: 5351, Entrez Gene: 29851, Ensembl: ENSG00000163600 и OMIM: 604558). Дополнительные соответствующие последовательности ICOS включают номер доступа в UniProt Q9WVS0 (ICOS мыши).

Термин "CD27" относится к активационному антигену CD27 Т-клеток, представителю 7 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, T14, активационному антигену S152 Т-клеток, Tp55, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве костимулирующей молекулы. Под номером доступа в UniProt P26842 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности CD27 человека (см. также HGNC: 11922, Entrez Gene: 939, Ensembl: ENSG00000139193 и OMIM: 186711). Дополнительные соответствующие последовательности CD27 включают номер доступа в UniProt P41272 (CD27 мыши).

Термин "CD25" относится к альфа-субъединице рецептора IL-2, TAC-антигену, p55, антигену 10 инсулинозависимого сахарного диабета, IMD21, P55, TCGFR, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве рецептора фактора роста. Под номером доступа в UniProt P01589 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности CD25 человека (см. также HGNC: 6008, Entrez Gene: 3559, Ensembl: ENSG00000134460 и OMIM: 147730). Дополнительные соответствующие последовательности CD25 включают номер доступа в UniProt P01590 (CD25 мыши).

Термин "4-1BB" относится к CD137 или представителю 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве костимулирующей молекулы. Под номером доступа в UniProt Q07011 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности 4-1BB человека (см. также HGNC: 11924, Entrez Gene: 3604, Ensembl: ENSG00000049249 и OMIM: 602250). Дополнительные соответствующие последовательности 4-1BB включают номер доступа в UniProt P20334 (4-1BB мыши).

Термин "IL6RA" относится к альфа-субъединице рецептора IL-6 или CD126, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве рецептора фактора роста. Под номером доступа в UniProt P08887 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности IL6RA человека (см. также HGNC: 6019, Entrez Gene: 3570, Ensembl: ENSG00000160712 и OMIM: 147880). Дополнительные соответствующие последовательности IL6RA включают номер доступа в UniProt P22272

(IL6RA мыши).

Термин "IL6RB" относится к бета-субъединице рецептора IL-6 или CD130, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве рецептора фактора роста. Под номером доступа в UniProt P40189 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности IL6RB человека. Дополнительные соответствующие последовательности IL6RB включают номер доступа в UniProt Q00560 (IL6RB мыши).

Термин "CD2" относится к Т-клеточному поверхностному антигену T11/Leu-5/CD2, лимфоцитарному функциональному антигену 2, T11 или рецептору эритроцитов/розеток/LFA-3, а также его альтернативным названиям, который функционирует в качестве рецептора фактора роста. Под номером доступа в UniProt P06729 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности CD2 человека (см. также HGNC: 1639, Entrez Gene: 914, Ensembl: ENSG00000116824 и OMIM: 186990). Дополнительные соответствующие последовательности CD2 включают номер доступа в UniProt P08920 (CD2 мыши).

Термин "антигенпрезентирующая клетка" или "APC" относится к клетке иммунной системы, такой как вспомогательная клетка (например, В-клетка, дендритная клетка и т. п.), которая представляет чужеродный антиген в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC) на своей поверхности. Т-клетки могут распознавать эти комплексы с помощью своих Т-клеточных рецепторов (TCR). APC процессируют антигены и презентируют их Т-клеткам.

Используемый в данном документе термин "внутриклеточный сигнальный домен" относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который стимулирует иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей CAR, например, CAR-Т-клетки. Примеры иммунной эффекторной функции, например, у CAR-Т-клетки, включают цитолитическую активность и хелперную активность, в том числе секрецию цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. Иллюстративные первичные внутриклеточные сигнальные домены включают домены, полученные из молекул, отвечающих за первичную стимуляцию или антигензависимую стимуляцию. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. Иллюстративные костимулирующие внутриклеточные сигнальные домены включают домены, полученные из молекул, отвечающих за костимулирующие сигналы или антигеннезависимую стимуляцию. Например, в случае с CART первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность Т-клеточного рецептора, и 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. Примеры первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей, содержащих ITAM, включают без ограничения последовательности, полученные из CD3-дзета, общей гамма-цепи FcR (FCER1G), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон R1b), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и DAP12.

Термин "дзета" или в качестве альтернативы "дзета-цепь", "CD3-дзета" или "TCR-дзета" относится к CD247. Под номером доступа в Swiss-Prot P20963 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности CD3-дзета человека. "Стимулирующий домен дзета" или в качестве альтернативы "стимулирующий домен CD3-дзета" или "стимулирующий домен TCR-дзета" относится к стимулирующему домену CD3-дзета или его варианту (например, молекуле, имеющей мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки или делеции). В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен дзета содержит остатки 52-164 из последовательности под номером доступа в GenBank BAG36664.1 или ее варианта (например, молекулы, имеющей мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки или делеции). В некоторых вариантах осуществления "стимулирующий домен дзета" или "стимулирующий домен CD3-дзета" представляет собой последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9 или 10, или ее вариант (например, молекулу, имеющую мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки или делеции). В качестве альтернативы или дополнительно, термин "дзета" или в качестве альтернативы "дзета-цепь", "CD3-дзета" (или "CD3дзета, CD3 дзета или CD3z) или "TCR-дзета" определяется как белок, представленный под номером доступа в GenBank BAG36664.1, или эквивалентные остатки из вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, нечеловекообразной обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., и "стимулирующий домен дзета" или в качестве альтернативы "стимулирующий домен CD3-дзета" или "стимулирующий домен TCR-дзета" определяется как аминокислотные остатки цитоплазматического домена дзета-цепи или ее функциональных производных, которые являются достаточными для функциональной передачи исходного сигнала, необходимого для активации Т-клеток. В некоторых аспектах цитоплазматический домен дзета содержит остатки 52-164 из последовательности под номером доступа в GenBank BAG36664.1 или эквивалентные остатки из вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, нечеловекообразной обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., которые являются его функциональными ортологами. В некоторых аспектах "стимулирующий домен дзета" или "стимулирующий домен CD3-дзета" представляет собой последовательность, представленную под SEQ ID NO: 18. В некоторых аспектах "стимулирующий домен дзета" или "стимулирующий домен CD3-дзета" представляет собой последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20.

Термин "костимулирующая молекула" относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфично связывается с костимулирующим лигандом, опосредуя тем самым костимулируемый ответ Т-клетки, такой как, без ограничения, пролиферация. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы

клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их лигандов, которые способствуют эффективному иммунному ответу. Костимулирующие молекулы включают без ограничения молекулу MHC I класса, BTLA и лиганд Toll-подобного рецептора, а также OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137). Дополнительные примеры таких костимулирующих молекул включают CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфично связывается с CD83.

Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточную часть костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена следующими семействами белков: белки семейства TNF-рецепторов, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, ICAM-1, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CDS, CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80, NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3 и лиганд, который специфично связывается с CD83, и т. п.

Внутриклеточный сигнальный домен может содержать всю внутриклеточную часть или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он получен, или его функциональный фрагмент или производное.

Используемый в данном документе термин "иммунная эффекторная клетка" относится к клетке, которая вовлечена в иммунный ответ, например, в стимуляцию иммунного эффекторного ответа. Примеры иммунных эффекторных клеток включают Т-клетки, например, альфа/бета-Т-клетки и гамма/дельта-Т-клетки, В-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), естественные Т-клетки-киллеры (NKT), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения.

Используемый в данном документе термин "иммунная эффекторная функция или иммунный эффекторный ответ" относится к функции или ответу, например, иммунной эффекторной клетки, которые усиливают или стимулируют иммунную атаку на клетку-мишень. Например, иммунная эффекторная функция или ответ относятся к свойству Т- или NK-клетки, которое стимулирует уничтожение или ингибирование роста или пролиферации клетки-мишени. В случае с Т-клеткой первичная стимуляция и костимуляция являются примерами иммунных эффекторных функции или ответа.

Термин "кодирование" или "кодировать" относится к свойству, присущему специфическим последовательностям нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза в ходе биологических процессов других полимеров и макромолекул, имеющих заданную последовательность нуклеотидов (т. е. рРНК, тРНК и мРНК) либо заданную последовательность аминокислот и биологические свойства, обусловленные ею. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодирует белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, в клетке или другой биологической системе продуцируется белок. Как кодирующая нить, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно представлена в перечнях последовательностей, так и некодирующая нить, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут обозначаться как кодирующие белок или другой продукт данного гена или кДНК.

Если не указано иное, то "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными вариантами друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза "нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК" может также включать интроны в той степени, в которой нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в каком-либо варианте содержать интрон(интроны).

Термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, описанных в данном документе, эффективному для достижения конкретного биологического результата.

Термин "эндогенный" относится к любому материалу, полученному из организма, клетки, ткани или системы или продуцируемому внутри них.

Термин "экзогенный" относится к любому материалу, введенному в организм, клетку, ткань или систему или продуцируемому вне их.

Термин "экспрессия" относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности под управлением промотора.

Используемый в данном документе термин "средство, обеспечивающее длительное высвобождение" относится к средству, которое высвобождает заданную композицию, например, вирусный вектор (например, лентивирусный вектор) и/или средство для активации клеток, в течение более длительного периода времени, чем сопоставимый состав с немедленным высвобождением. В некоторых вариантах осуществления средство, обеспечивающее длительное высвобождение, составлено для введения путем инъекции.

Термин "вектор для переноса" относится к химическому соединению, которое содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которое можно применять для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Из уровня техники известны многочисленные векторы, в том числе без ограничения линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, ассоциированные с ионными или амфифильными соединениями,

плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор для переноса" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Данный термин также следует толковать таким образом, что он дополнительно включает неплазмидные и невирусные соединения, которые содействуют переносу нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизиновое соединение, липосома и т. п. Примеры вирусных векторов для переноса включают без ограничения аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п.

Термин "вектор экспрессии" относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; а другие элементы для экспрессии могут предоставляться клеткой-хозяином или в системе экспрессии in vitro. Векторы экспрессии включают все векторы, известные из уровня техники, в том числе космиды, плазмиды (например, "голые" или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы, "вирусные векторы"), в состав которых включен рекомбинантный полинуклеотид.

Термин "лентивирус" относится к роду из семейства Retroviridae. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов в том, что способны инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, поэтому они в качестве векторов являются одним из наиболее эффективных способов доставки генов. Все из HIV, SIV и FIV являются примерами лентивирусов.

Термин "лентивирусный вектор" относится к вектору, полученному из по меньшей мере части генома лентивируса, в том числе, в частности, к самоинактивирующемуся лентивирусному вектору, представленному в Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые можно использовать в клинической практике, включают без ограничения, например, технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и т. п. Неклинические типы лентивирусных векторов также являются доступными и должны быть известны специалисту в данной области.

Термин "гомологичный" или "идентичность" относится к идентичности последовательностей субъединиц между двумя полимерными молекулами, например, между двумя молекулами нуклеиновой кислоты, такими как две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или между двумя полипептидными молекулами. Если положение субъединицы в обеих из двух молекул занимает одна и та же мономерная субъединица, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то они являются гомологичными или идентичными по этому положению. Гомология между двумя последовательностями находится в прямой зависимости от числа совпадающих или гомологичных положений; например, если половина (например, пять положений в

полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях является гомологичной, то эти две последовательности являются гомологичными на 50%; если 90% положений (например, 9 из 10) являются совпадающими или гомологичными, то две последовательности являются гомологичными на 90%.

"Гуманизированные" формы антител, отличных от человеческих (например, мышиных), представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')2 или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, отличного от человеческого. В большинстве случаев гуманизированные антитела и фрагменты данных антител представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело или фрагмент антитела), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиента заменены остатками из CDR из вида, отличного от человека (донорного антитела), такого как мышь, крыса или кролик, обладающей требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками, отличными от человеческих. Кроме того, гуманизированное антитело/фрагмент антитела может содержать остатки, не обнаруживаемые ни в реципиентном антителе, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасных областей. С помощью этих модификаций можно дополнительно улучшить и оптимизировать функциональные характеристики антитела или фрагмента антитела. Обычно гуманизированное антитело или фрагмент этого антитела будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, и, как правило, двух, вариабельных доменов, в которых все или по существу все CDR-области соответствуют областям иммуноглобулина, отличного от человеческого, и все FR-области или их значительная часть представляют собой области с последовательностью иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело или фрагмент антитела также может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Дополнительные подробности см. в Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

"Полностью человеческий" относится к иммуноглобулину, такому как антитело или фрагмент антитела, где целая молекула имеет человеческое происхождение или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной человеческой форме антитела или иммуноглобулина.

Термин "выделенный" означает измененный относительно природного состояния или для извлеченный из него. Например, нуклеиновая кислота или пептид, в природных условиях присутствующие в живом животном, не являются "выделенными", однако те же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от материалов, сопутствующих им в их природном состоянии, являются "выделенными". Выделенные нуклеиновая кислота или белок могут находиться в по существу очищенной форме или

могут находиться в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

Термин "функционально связанный" или "транскрипционный контроль" относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, приводящей к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты в тех случаях, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты размещена в функциональной взаимосвязи со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, например, если необходимо соединить две кодирующие белок области, находятся в одной и той же рамке считывания.

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в однонитевой или двухнитевой форме. Если специально не ограничено, то данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают свойствами связывания, сходными со свойствами эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются посредством механизма, сходного с механизмом для встречающихся в природе нуклеотидов. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно охватывает ее варианты с консервативными модификациями (например, с заменами вырожденными кодонами), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, замены вырожденными кодонами можно осуществлять посредством создания последовательностей, в которых в третьем положении одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов произведена замена любым из канонических оснований и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

Термины "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не установлено ограничение на максимальное количество аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислоты, соединенные друг с другом пептидными связями. Используемый в данном документе термин относится как к коротким цепям, которые также обычно называются в данной области техники, например, пептидами, олигопептидами и олигомерами, так и к более длинным цепям, которые обычно называются в данной области техники белками, которых существует множество типов. "Полипептиды" включают, например, среди прочих,

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

Термин "промотор" относится к последовательности ДНК, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки или введенным синтетическим аппаратом, которая необходима для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Термин "промоторная/регуляторная последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая необходима для экспрессии продукта гена, функционально связанного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может являться коровой промоторной последовательностью, а в других случаях эта последовательность может также содержать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые необходимы для экспрессии продукта гена. Например, промоторная/регуляторная последовательность может представлять собой последовательность, которая обеспечивает экспрессию продукта гена тканеспецифическим образом.

Термин "конститутивный промотор" относится к нуклеотидной последовательности, которая, находясь в функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, обуславливает продуцирование продукта гена в клетке при большинстве или всех физиологических условиях клетки.

Термин "индуцируемый промотор" относится к нуклеотидной последовательности, которая, находясь в функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, обуславливает продуцирование продукта гена в клетке по существу только в случае присутствия в клетке индуктора, который соответствует данному промотору.

Термин "тканеспецифический промотор" относится к нуклеотидной последовательности, которая, находясь в функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет ген, обуславливает продуцирование продукта гена в клетке по существу только в том случае, если клетка является клеткой из того типа ткани, который соответствует данному промотору.

Термины "антиген, ассоциированный с раком" или "опухолевый антиген" взаимозаменяемо относятся к молекуле (как правило, белку, углеводу или липиду), которая экспрессируется на поверхности раковой клетки полностью либо в виде фрагмента (например, в виде комплекса молекула MHC/пептид), и которая является применимой для предпочтительного нацеливания фармакологического средства на раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой маркер, экспрессируемый как нормальными клетками, так и раковыми клетками, например, маркер линии дифференцировки, например, CD19 на B-клетках. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой молекулу клеточной

поверхности, которая в раковой клетке сверхэкспрессируется по сравнению с нормальной клеткой, например, характеризуется 1-кратной сверхэкспрессией, 2-кратной сверхэкспрессией, 3-кратной или большей сверхэкспрессией по сравнению с нормальной клеткой. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая синтезируется в раковой клетке ненадлежащим образом, например, молекулу, которая содержит делеции, добавления или мутации по сравнению с молекулой, экспрессируемой на нормальной клетке. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген будет экспрессироваться исключительно на клеточной поверхности раковой клетки, полностью или в виде фрагмента (например, в виде комплекса молекула MHC/пептид), и не будет синтезироваться или экспрессироваться на поверхности нормальной клетки. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению включают CAR, содержащие антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который связывается с пептидом, презентируемым молекулой MHC. Обычно пептиды, происходящие из эндогенных белков, заполняют карманы молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC) I класса и распознаются Т-клеточными рецепторами (TCR) на CD8+ Т-лимфоцитах. Комплексы молекул MHC I класса конститутивно экспрессируются всеми ядросодержащими клетками. При раке комплексы вирусоспецифический и/или опухолеспецифический пептид/молекула MHC представляют собой уникальный класс мишеней клеточной поверхности для иммунотерапии. Были описаны TCR-подобные антитела, нацеливающиеся на пептиды, полученные из вирусных или опухолевых антигенов, связанные с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA)-A1 или HLA-A2 (см., например, Sastry et al., J Virol. 2011 85(5):1935-1942; Sergeeva et al., Blood, 2011 117(16):4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010 184(4):2156-2165; Willemsen et al., Gene Ther 2001 8(21): 1601-1608; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5(176): 176ra33; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2):84-100). Например, TCR-подобное антитело можно идентифицировать при скрининге библиотеки, такой как фаг-дисплейная библиотека scFv человека.

Термины "антиген, обеспечивающий поддержание опухоли" или "антиген, обеспечивающий поддержание рака" взаимозаменяемо относятся к молекуле (как правило, белку, углеводу или липиду), которая экспрессируется на поверхности клетки, которая сама по себе не является раковой, но обеспечивает поддержание раковых клеток, например, путем стимуляции их роста или выживания, например, устойчивости к воздействию иммунных клеток. Иллюстративные клетки данного типа включают стромальные клетки и супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC). Антиген, обеспечивающий поддержание опухоли, сам по себе не обязательно играет роль в поддержании опухолевых клеток, при условии, что антиген присутствует в клетке, которая обеспечивает поддержание раковых клеток.

Как используется в данном документе, "РНК, транскрибированная in vitro" относится к РНК, предпочтительно мРНК, которая была синтезирована in vitro. Обычно

РНК, транскрибированная in vitro, образуется из вектора транскрипции in vitro. Вектор транскрипции in vitro содержит матрицу, используемую для образования РНК, транскрибированной in vitro.

Как используется в данном документе, "поли(А)" представляет собой группу последовательных аденозиновых остатков, присоединенных к мРНК путем полиаденилирования. В предпочтительном варианте осуществления конструкции для транзиентной экспрессии длина поли(А) составляет от 50 до 5000 (SEQ ID NO: 34), предпочтительно более 64, более предпочтительно более 100, наиболее предпочтительно более 300 или 400. Последовательности поли(А) можно модифицировать химическим или ферментативным путем для модулирования функциональных свойств мРНК, таких как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

Как используется в данном документе применительно к экспрессии, например, экспрессии молекулы CAR, "транзиентный" относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение периода нескольких часов, дней или недель, где период времени экспрессии является меньшим, чем период времени для экспрессии гена в случае, если он интегрирован в геном или содержится в стабильном плазмидном репликоне в клетке-хозяине.

Используемые в данном документе термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к снижению или уменьшению интенсивности прогрессирования, тяжести и/или продолжительности пролиферативного нарушения или ослаблению одного или нескольких симптомов (предпочтительно одного или нескольких различимых симптомов) пролиферативного нарушения в результате введения одного или нескольких средств терапии (например, одного или нескольких терапевтических средств, таких как CAR по настоящему изобретению). В конкретных вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к ослаблению по меньшей мере одного измеряемого физического параметра пролиферативного нарушения, такого как рост опухоли, не обязательно различимого для пациента. В других вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к ингибированию прогрессирования пролиферативного нарушения физическим путем, например, посредством стабилизации различимого симптома, физиологическим путем, например, посредством стабилизации физического параметра, либо ими обоими. В других вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "осуществление лечения" относятся к снижению или стабилизации размера опухоли или количества раковых клеток.

Термин "путь передачи сигнала" относится к биохимической взаимосвязи между различными молекулами-переносчиками сигналов, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Фраза "рецептор клеточной поверхности" включает молекулы и комплексы молекул, способные принимать сигнал и передавать сигнал через мембрану клетки.

Предполагается, что термин "субъект" включает живые организмы, у которых

можно вызвать иммунный ответ (например, млекопитающих, человека).

Термин "по существу очищенная" клетка относится к клетке, которая по сути свободна от других типов клеток. "По существу очищенная клетка" также относится к клетке, которая была отделена от других типов клеток, с которыми она обычно ассоциирована в своем встречающемся в природе состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к однородной популяции клеток. В других случаях данный термин просто относится к клетке, которая была отделена от клеток, с которыми она в природных условиях ассоциирована в своем природном состоянии. В некоторых аспектах клетки культивируют in vitro. В других аспектах клетки не культивируют in vitro.

Используемый в данном документе термин "терапевтический" означает лечение. Терапевтический эффект получают путем ослабления, подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

Используемый в данном документе термин "профилактика" означает предупреждение или профилактическое лечение заболевания или болезненного состояния.

Термины "трансфицированный", или "трансформированный", или "трансдуцированный" относятся к процессу, в ходе которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. "Трансфицированная", или "трансформированная", или "трансдуцированная" клетка представляет собой клетку, которая была подвергнута трансфекции, трансформации или трансдукции с помощью экзогенной нуклеиновой кислоты. Такая клетка включает первичную клетку субъекта и ее потомство.

Термин "специфично связывается" относится к антителу или лиганду, которые распознают белкового партнера по связыванию (например, опухолевый антиген), присутствующего в образце, и связываются с ним, но при этом данные антитело или лиганд по существу не распознают другие молекулы в образце или не связываются с ними.

Как используется в данном документе, "рефрактерный" относится к заболеванию, например, раку, которое не отвечает на лечение. В вариантах осуществления рефрактерный рак может быть устойчивым к лечению до или в начале лечения. В других вариантах осуществления рефрактерный рак может стать устойчивым в ходе лечения. Рефрактерный рак также называют устойчивым раком.

Как используется в данном документе, "рецидивирующий" относится к возвращению заболевания (например, рака) или признаков и симптомов заболевания, такого как рак, после периода улучшения, например, после предшествующего лечения с помощью терапии, например, противораковой терапии.

Термин "система", используемый в данном документе применительно, например, к редактированию генов, относится к группе молекул, например, одной или нескольким молекулам, которые действуют совместно для произведения требуемой функции.

Используемый в данном документе термин "система редактирования генов"

относится к системе, например, одной или нескольким молекулам, которые управляют изменением, например, делецией, и осуществляют его в одной или нескольких нуклеиновых кислотах в сайте геномной ДНК, на которую нацеливается указанная система, или рядом с ним. Системы редактирования генов известны из уровня техники и более подробно описаны ниже.

Продукт гена или белок "с доминантно-негативным эффектом" представляют собой таковые, которые препятствуют функционированию продукта гена или белка. Продукт гена, находящийся под влиянием, может быть таким же, как белок с доминантно-негативным эффектом, или отличающимся от него. Продукты генов с доминантно-негативным эффектом могут быть представлены множеством форм, включая усеченные формы, полноразмерные белки с точечными мутациями или их фрагменты или слитые формы полноразмерных белков дикого типа или мутантных белков или их фрагментов с другими белками. Наблюдаемый уровень ингибирования может являться очень низким. Например, для того, чтобы увидеть эффект, может требоваться большой избыток белка с доминантно-негативным эффектом по сравнению с функциональным белком или белками, участвующими в процессе. В нормальных условиях биологического анализа увидеть эффекты может быть трудно.

Термин "доля" относится к соотношению указанной молекулы и общего количества молекул в популяции. В иллюстративном варианте осуществления доля Т-клеток, имеющих конкретный фенотип (например, T_{SCM}-клеток), относится к соотношению количества Т-клеток, имеющих данный фенотип, и общего количества Т-клеток в популяции. В иллюстративном варианте осуществления доля Т-клеток, имеющих конкретный фенотип (например, CD45RA+ CD62L+ клеток), относится к соотношению количества Т-клеток, имеющих данный фенотип, и общего количества Т-клеток в популяции. Будет понятно, что такие доли можно измерять относительно конкретных субпопуляций клеток, где это указано. Например, долю CD4+ T_{SCM}-клеток можно измерять относительно общего количества CD4+ Т-клеток.

Используемый в данном документе термин "популяция иммунных эффекторных клеток" относится к композиции, содержащей по меньшей мере две иммунные эффекторные клетки, например, две или более, например, более чем одну, и не указывает на какой-либо уровень чистоты или наличие или отсутствие других типов клеток. В иллюстративном варианте осуществления популяция по существу не содержит других типов клеток. В другом иллюстративном варианте осуществления популяция содержит по меньшей мере две клетки, относящиеся к указанному типу клеток или имеющие указанную функцию или свойство.

Используемый в данном документе термин "биологический материал" относится к веществу, сконструированному для взаимодействия с биологической системой для терапевтической цели. "Гидрогель" представляет собой такое вещество, состоящее из сети полимерных цепей, которое можно подвергать гидратации с принятием им формы геля, как правило, в результате сшивания полимерных цепей между собой. "Криогель"

представляет собой форму гидрогеля, которая образуется посредством замораживания. В некоторых вариантах осуществления криогель образуется посредством обеспечения возможности осуществления сшивания в частично замороженном состоянии, что приводит к получению гидрогелевой сети.

Термины "T_{SCM}-подобная клетка", "наивная Т-клетка" и "необученная Т-клетка" используются взаимозаменяемо и относятся к менее дифференцированному состоянию Т-клеток, которое характеризуется поверхностной экспрессией CD45RA и CD62L (например, CD45RA-положительные и CD62L-положительные (иногда указанные как CD45RA+ CD62L+)). Обычно дифференцировка Т-клеток проходит от наиболее "необученных" до наиболее "истощенных" - T_{SCM}-подобные (например, CD45RA+ CD62L+ клетки) > T_{CM} (например, CD45RA- CD62L+ клетки) > T_{EM} (например, CD45RA- CD62L- клетки) > T_{EFF}. Необученные Т-клетки могут характеризоваться, например, наличием повышенного уровня самообновления, противоопухолевой эффективности, пролиферации и/или выживаемости по сравнению с более истощенным фенотипом Т-клеток. В иллюстративном варианте осуществления необученная Т-клетка относится к CD45RA+ CD62L+ Т-клетке. В другом иллюстративном варианте осуществления необученная Т-клетка относится к T_{SCM}-клетке, например, CD45RA+ CD62L+ CCR7+ CD27+ CD95+ Т-клетке.

Термин "T_{SCM}" относится к Т-клетке, имеющей фенотип стволовой клетки памяти, характеризующейся тем, что она экспрессирует CD45RA, CD62L, CCR7, CD27 и CD95 на своей клеточной поверхности (например, является CD45RA-положительной, CD62L-положительной, CCR7-положительной, CD27-положительной и CD95-положительной (иногда указанной как CD45RA+ CD62L+ CCR7+ CD27+ CD95+)). T_{SCM}-клетка представляет собой пример необученной Т-клетки. Т-клетка может представлять собой CD4+ и/или CD8+ Т-клетку.

Что касается конкретных белков, описанных в данном документе (например, VEGF-C), упомянутый белок включает любые встречающиеся в природе формы, варианты или гомологи белка, (например, в пределах по меньшей мере 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% активности по сравнению с нативным белком). В некоторых вариантах осуществления варианты или гомологи характеризуются по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности по всей последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению со встречающейся в природе формой. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI (например, NP_005420.1). В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой белок, идентифицированный по его эталонной последовательности в NCBI, его гомолог или функциональный фрагмент.

Используемый в данном документе термин "алкил" относится к полностью насыщенному разветвленному или неразветвленному (или с прямой цепью, или

линейному) углеводородному фрагменту, содержащему 1-20 атомов углерода. Алкил предпочтительно содержит 1-6 атомов углерода и более предпочтительно 1-4 атома углерода. Иллюстративные примеры алкила включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, неопентил, н-гексил, 3-метилгексил, 2,2-диметилпентил, 2,3-диметилпентил, н-гептил. Например, термин "C_{1-6}алкил" относится к углеводороду, содержащему от одного до шести атомов углерода, и термин "C_{1-7}алкил" относится к углеводороду, содержащему от одного до семи атомов углерода.

Используемый в данном документе термин "галогеналкил" относится к алкилу, определенному в данном документе, который замещен одной или несколькими галогеновыми группами, определенными в данном документе. Галогеналкил предпочтительно может представлять собой моногалогеналкил, дигалогеналкил или полигалогеналкил, в том числе пергалогеналкил. Моногалогеналкил может содержать один атом йода, брома, хлора или фтора в алкильной группе. Дигалогеналкильные и полигалогеналкильные группы могут содержать два или более одинаковых атомов галогена или комбинацию различных галогеновых групп в алкиле. Полигалогеналкил предпочтительно содержит вплоть до 12, или 10, или 8, или 6, или 4, или 3, или 2 галогеновых групп. Иллюстративные примеры галогеналкила представляют собой фторметил, дифторметил, трифторметил, хлорметил, дихлорметил, трихлорметил, пентафторэтил, гептафторпропил, дифторхлорметил, дихлорфторметил, дифторэтил, дифторпропил, дихлорэтил и дихлорпропил. Пергалогеналкил относится к алкилу, в котором все атомы водорода заменены атомами галогена. Например, термин "галоген-C_{1-6}алкил" относится к углеводороду, содержащему от одного до шести атомов углерода и замещенному одной или несколькими галогеновыми группами, и термин "галоген-C_{1-7}алкил" относится к углеводороду, содержащему от одного до семи атомов углерода и замещенному одной или несколькими галогеновыми группами.

Как используется в данном документе, "соли" включают фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты, которые могут быть образованы неорганическими кислотами и органическими кислотами, например, ацетатные, аспартатные, бензоатные, безилатные, бромидные/гидробромидные, бикарбонатные/карбонатные, бисульфатные/сульфатные, камфорсульфонатные, хлоридные/гидрохлоридные, хлортеофиллинатные, цитратные, этандисульфонатные, фумаратные, глюцептатные, глюконатные, глюкуронатные, гиппуратные, гидройодидные/йодидные, изетионатные, лактатные, лактобионатные, лаурилсульфатные, малатные, малеатные, малонатные, манделатные, мезилатные, метилсульфатные, нафтоатные, напсилатные, никотинатные, нитратные, октадеканоатные, олеатные, оксалатные, пальмитатные, памоатные, фосфатные/гидрофосфатные/дигидрофосфатные, полигалактуронатные, пропионатные, стеаратные, сукцинатные, сульфосалицилатные, тартратные, тозилатные и трифторацетатные соли.

Неорганические кислоты, из которых могут быть получены соли, включают,

например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т. п. Органические кислоты, из которых могут быть получены соли, включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, толуолсульфоновую кислоту, сульфосалициловую кислоту и т. п. Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания могут быть образованы неорганическими и органическими основаниями.

Неорганические основания, из которых могут быть получены соли, включают, например, соли аммония и металлов из групп I-XII периодической таблицы элементов. В определенных вариантах осуществления соли получают с использованием натрия, калия, аммония, кальция, магния, железа, серебра, цинка и меди; особенно подходящие соли включают аммониевые, калиевые, натриевые, кальциевые и магниевые соли.

Органические основания, из которых могут быть получены соли, включают, например, первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины, основные ионообменные смолы и т. п. Определенные органические амины включают изопропиламин, бензатин, холинат, диэтаноламин, диэтиламин, лизин, меглюмин, пиперазин и трометамин.

Диапазоны: во всем настоящем раскрытии различные аспекты настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазонов. Следует понимать, что описание в формате диапазонов служит лишь для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, описание диапазона следует рассматривать как конкретно раскрывающее все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, описание такого диапазона, как от 1 до 6, следует рассматривать как конкретно раскрывающее такие поддиапазоны, как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные числа в пределах этого диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера, диапазон, такой как 95-99% идентичность, включает что-либо с 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью и включает поддиапазоны, такие как 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% и 98-99% идентичность. Это применимо независимо от ширины диапазона.

Термины "B-клеточный антиген" или "антиген B-клетки" используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле (как правило, белку, углеводу или липиду), которая предпочтительно или специфически экспрессируется на поверхности B-клетки, на которую может нацеливаться средство, которое с ней связывается. B-клеточный антиген, представляющий особый интерес, предпочтительно экспрессируется на B-клетках по сравнению с другими тканями млекопитающего, отличными от B-клеток. B-клеточный антиген может экспрессироваться на одной конкретной популяции B-клеток, например, на

предшественниках В-клеток или зрелых В-клеток, или на более чем одной конкретной популяции В-клеток, например, как на предшественниках В-клеток, так и на зрелых В-клетках. Иллюстративные поверхностные маркеры В-клеток включают CD5, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27, CD30, CD34, CD37, CD38, CD40, CD53, CD69, CD72, CD73, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD123, CD135, CD138, CD179, CD269, Flt3, ROR1, BCMA, FcRn5, FcRn2, CS-1, CXCR4, 5, 7, IL-7/3R, IL7/4/3R и IL4R. В некоторых вариантах осуществления В-клеточный антиген представляет собой CD19, CD20, CD22, FcRn5, FcRn2, BCMA, CS-1 или CD138. В вариантах осуществления В-клеточный антиген представляет собой CD19. В вариантах осуществления В-клеточный антиген представляет собой CD20. В вариантах осуществления В-клеточный антиген представляет собой CD22. В вариантах осуществления В-клеточный антиген представляет собой BCMA. В вариантах осуществления В-клеточный антиген представляет собой FcRn5. В вариантах осуществления В-клеточный антиген представляет собой FcRn2. В вариантах осуществления В-клеточный антиген представляет собой CS-1. В вариантах осуществления В-клеточный антиген представляет собой CD138.

Термины "антиген солидной опухоли" или "антиген клетки солидной опухоли" относятся к молекуле (как правило, белку, углеводу или липиду), которая предпочтительно или специфически экспрессируется на поверхности клетки солидной опухоли, на которую может нацеливаться средство, которое с ней связывается. Антиген солидной опухоли, представляющий особый интерес, предпочтительно экспрессируется на клетке солидной опухоли по сравнению с другими неопухолевыми тканями млекопитающего. Антиген солидной опухоли может экспрессироваться на одной конкретной популяции клеток солидной опухоли, например, на опухолевых клетках мезотелиомы, или на более чем одной конкретной популяции клеток солидной опухоли, например, как на опухолевых клетках мезотелиомы, так и на раковых клетках яичников. Иллюстративные антигены солидной опухоли включают EGFRvIII, мезотелин, GD2, Ag Tn, PSMA, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, KIT, IL-13Ra2, легуман, GD3, CD171, IL-11Ra, PSCA, MAD-CT-1, MAD-CT-2, VEGFR2, антиген Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, рецептор фолиевой кислоты альфа, ERBB (например, ERBB2), Her2/neu, MUC1, EGFR, NCAM, эфрин B2, CAIX, LMP2, sLe, HMWMAA, о-ацетил-GD2, рецептор фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, FAP, легумаин, E6 или E7 HPV, ML-IAP, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, полисиаловую кислоту, Fos-родственный антиген, эластазу нейтрофилов, TRP-2, CYP1B1, белок 17 сперматозоидов, бета-субъединицу хорионического гонадотропина человека, AFP, тиреоглобулин, PLAC1, GloboH, RAGE1, MN-CA IX, обратную транскриптазу теломеразы человека, кишечную карбоксилэстеразу, мутантный вариант hsp 70-2, NA-17, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, Ly6k, OR51E2, TARP, GFRα4 и пептид любого из этих антигенов, презентированный на MHC. В некоторых вариантах осуществления антиген солидной опухоли представляет собой CLDN6, мезотелин или EGFRvIII.

Термины "антиген миелоидной опухоли" или "антиген клетки миелоидной опухоли" относятся к молекуле (как правило, белку, углеводу или липиду), которая предпочтительно или специфически экспрессируется на поверхности клетки миелоидной опухоли, на которую может нацеливаться средство, которое с ней связывается. Антиген миелоидной опухоли, представляющий особый интерес, предпочтительно экспрессируется на клетке миелоидной опухоли по сравнению с другими неопухолевыми тканями млекопитающего. Антиген миелоидной опухоли может экспрессироваться на одной конкретной популяции клеток миелоидной опухоли, например, на опухолевых клетках острого миелоидного лейкоза (AML), или на более чем одной конкретной популяции клеток миелоидной опухоли. Иллюстративные антигены миелоидной опухоли включают CD33 и CLL-1.

Термин "антиген гематологической опухоли, не относящейся к В-клеточной линии дифференцировки" относится к молекуле (как правило, белку, углеводу или липиду), которая предпочтительно или специфически экспрессируется на поверхности опухоли или раковой клетки, имеющих гемопоэтическое происхождение или происхождение из лимфоидной ткани, отличных от таковых, имеющих В-клеточное происхождение. Они включают опухоли, имеющие происхождение из миелоидной линии дифференцировки, например, опухоли, имеющие происхождение от гранулоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, макрофагов и/или тучных клеток или любой из популяций их клеток-предшественников, и опухоли лимфоидного происхождения, отличные от таковых В-клеточного происхождения, например, имеющие происхождение от Т-клеток, NK-клеток и/или плазмоцитов или любой из популяций их клеток-предшественников.

Заголовки, подзаголовки или пронумерованные или обозначенные буквами элементы, например, (a), (b), (i) и т. д., представлены исключительно для удобства прочтения. Использование заголовков или пронумерованных или обозначенных буквами элементов в данном документе не требует того, чтобы стадии или элементы проводились в алфавитном порядке, или того, чтобы стадии или элементы обязательно были отделены друг от друга.

Все публикации, заявки на патент, патенты и другие литературные источники, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Другие признаки, цели и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из описания и графических материалов, а также из формулы изобретения.

Описание

В данном документе предусмотрена первая композиция, содержащая биологический материал и фактор привлечения клеток, и/или вторая композиция, содержащая вирусный вектор, необязательно с частицей, например, мезопористой частицей кремнезема (MSP), и средство для активации клеток, например, полиспецифическую связывающую молекулу, описанную в данном документе.

В данном документе также предусмотрена композиция, содержащая биологический материал, содержащий фактор привлечения клеток; первую популяцию

мезопористых частиц кремнезема; вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток, а также способы ее применения. В данном документе также предусмотрены композиция и биологический материал, содержащий фактор привлечения клеток; первая популяция мезопористых частиц кремнезема; вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток, а также способы их применения.

Элементы данных композиций и способы их применения описаны в данном документе ниже. Не ограничиваясь какой-либо теорией, заявители предусматривают, что композиции могут быть доставлены локально, например, под кожу, и посредством применения фактора привлечения клеток клетки привлекаются в указанный участок доставки и могут быть трансдуцированы с помощью вирусного вектора. В вариантах осуществления, где вектор кодирует CAR, трансдуцированные клетки экспрессируют CAR и, таким образом, могут применяться для нацеливания на конкретный антиген для лечения заболевания, нарушения или состояния.

Биологические материалы

В некоторых вариантах осуществления биологический материал содержит гидрогель, необязательно криогель. В некоторых вариантах осуществления криогель содержит желатин, гиалуроновую кислоту (HA), коллаген, альгинат, ламинин, хитозан, фиброин шелка, агарозу, поли(этиленгликоль), поливиниловый спирт и/или гидроксиэтилметилакрилат. В некоторых вариантах осуществления биологический материал содержит альгинатный гидрогель, например, альгинатный криогель. В некоторых вариантах осуществления биологический материал содержит гидрогель на основе гиалуроновой кислоты (гидрогель HA). В некоторых вариантах осуществления биологический материал содержит криогель на основе гиалуроновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления альгинатный гидрогель, например, альгинатный криогель, дополнительно содержит норборнен и/или тетразин. В некоторых вариантах осуществления норборнен и/или тетразин ковалентно связаны с альгинатом, например, химически связаны с ним. В некоторых вариантах осуществления норборнен и/или тетразин нековалентно связаны с альгинатом, например, адсорбированы на нем.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая криогель, например, альгинатный криогель, и фактор привлечения клеток, дополнительно содержит лапонит. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая гидрогель, например, гидрогель HA, и фактор привлечения клеток, дополнительно содержит лапонит. Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления применение лапонита обеспечивает возможность медленного и/или контролируемого высвобождения фактора привлечения клеток из композиции. В некоторых вариантах осуществления лапонит присутствует в концентрации от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 до 0,4 мг/мл, от приблизительно 0,1 до 0,35 мг/мл, от приблизительно 0,1 до 0,3 мг/мл, от приблизительно 0,1 до 0,25 мг/мл, от приблизительно 0,1 до 0,15 мг/мл, от приблизительно 0,15 до 0,5 мг/мл, от приблизительно 0,15 до 0,4 мг/мл, от приблизительно 0,15 до 0,35 мг/мл, от

приблизительно 0,15 до 0,3 мг/мл, от приблизительно 0,15 до 0,25 мг/мл, от приблизительно 1,5 мг/мл до 0,2 мг/мл, от приблизительно 0,2 до 0,5 мг/мл, от приблизительно 0,2 до 0,4 мг/мл, от приблизительно 0,2 до 0,35 мг/мл, от приблизительно 0,2 до 0,3 мг/мл, от приблизительно 0,2 до 0,25 мг/мл, от приблизительно 0,25 до 0,5 мг/мл, от приблизительно 0,25 до 0,4 мг/мл, от приблизительно 0,25 до приблизительно 0,35 мг/мл, от приблизительно 0,25 до 0,3 мг/мл, от приблизительно 0,3 до 0,5 мг/мл, от приблизительно 0,3 до 0,4 мг/мл, от приблизительно 0,35 до 0,5 мг/мл, от приблизительно 0,35 до 0,4 мг/мл, от приблизительно 0,4 до 0,5 мг/мл, приблизительно 0,1 мг/мл, приблизительно 0,15 мг/мл, приблизительно 0,2 мг/мл, приблизительно 0,25 мг/мл, 0,3 мг/мл, приблизительно 0,35 мг/мл или приблизительно 0,5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления лапонит присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 0,25 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления криогель содержит поры диаметром от приблизительно 10 до 300 мкм, например, от приблизительно 10 до 20 мкм, от приблизительно 10 до 30 мкм, от приблизительно 10 до 40 мкм, от приблизительно 10 до 50 мкм, от приблизительно 10 до 100 мкм, от приблизительно 10 до 150 мкм, от приблизительно 10 до 200 мкм, от приблизительно 10 до 250 мкм, от приблизительно 20 до 30 мкм, от приблизительно 20 до 40 мкм, от приблизительно 20 до 50 мкм, от приблизительно 20 до 100 мкм, от приблизительно 20 до 150 мкм, от приблизительно 20 до 200 мкм, от приблизительно 20 до 250 мкм, от приблизительно 20 до 300 мкм, от приблизительно 50 до 300 мкм, от приблизительно 50 до 100 мкм, от 50 до приблизительно 150 мкм, от 50 до приблизительно 200 мкм, от 50 до приблизительно 250 мкм, от 100 до приблизительно 150 мкм, от 100 до приблизительно 200 мкм, от 100 до приблизительно 250 мкм, от приблизительно 100 до 300 мкм, от приблизительно 150 до 200 мкм, от приблизительно 150 до 250 мкм, от приблизительно 150 до 300 мкм, от приблизительно 200 до 250 мкм, от приблизительно 200 до 300 мкм или от приблизительно 250 до 300 мкм. В некоторых вариантах осуществления криогель не содержит поры. В некоторых вариантах осуществления криогель содержит поры по существу одинакового размера. В некоторых вариантах осуществления биологический материал содержит поры разных размеров. В некоторых вариантах осуществления криогель является химически сшитым.

Способы изготовления биологических материалов хорошо известны из уровня техники. См., например, Koshy, S. T., Zhang, D., Grolman, J. M., Stafford, A. G., & Mooney, D. J. (2018). Injectable nanocomposite cryogels for versatile protein drug delivery. Acta biomaterialia, 65, 36-43 (где описано изготовление альгинатного криогеля). Кроме того, биологические материалы и их компоненты могут быть приобретены коммерческим путем, например, Partek SLC (кремнезем от EMD Millipore) или частицы кремнезема TruTag.

В некоторых вариантах осуществления криогель, например, альгинатный криогель, вводят в верхнее подкожное пространство или подкожное пространство, прилегающее к

дерме. В некоторых вариантах осуществления гидрогель, например, гидрогель HA, вводят в верхнее подкожное пространство или подкожное пространство, прилегающее к дерме.

Факторы привлечения клеток

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток подлежит применению в композиции или способе, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток индуцирует лимфангиогенез. В некоторых вариантах осуществления индуцирование лимфангиогенеза включает повышение уровня и/или активацию лимфатических эндотелиальных клеток (LEC) (например, CD45- CD31+ PDPN+ клеток). В некоторых вариантах осуществления уровень LEC (например, CD45- CD31+ PDPN+ клеток) повышается на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или 200%.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток осуществляет привлечение, например, осуществляет селективное привлечение, иммунных клеток, необязательно Т-клеток и/или NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток осуществляет привлечение клеток (например, иммунных клеток, например, Т-клеток) непосредственно. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток осуществляет привлечение клеток (например, иммунных клеток, например, Т-клеток) опосредованно. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток индуцирует лимфангиогенез, что, в свою очередь, приводит к привлечению клеток, например, иммунных клеток, например, Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток осуществляет привлечение (например, непосредственно или опосредованно) Т-клеток, например, необученных Т-клеток (например, CD45RA+ CD62L+ Т-клеток или CD45RA+ CD62L+ CCR7+ CD27+ CD95+ Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления привлечение Т-клеток включает повышение уровня Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления уровень Т-клеток повышается на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 250% или 300%.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток выбран из группы, состоящей из CCL19, CXCL9, CXCL10, XCL1, IL-2, IL-7, CCL21, GM-CSF, CCL17, CCL22, CCL20, CCL27, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), лимфотоксина-альфа, лимфотоксина-бета, VEGF-C, FLT3L, G-CSF, PDGF, S100A8/A9, CSF-1, CXCL8, CCL20, CCL17, CCR5, CCR6, CCL2, VEGF, ангиопоэтина-2, PGE2, LTB4, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10, CXCL11 и/или CXCL12. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток включает в себя VEGF-C или его функциональный вариант.

Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления высвобождение фактора привлечения клеток, например, VEGF-C или его варианта, из криогеля, описанного в данном документе, индуцирует лимфангиогенез уже существующих кожных лимфатических капилляров, активируя лимфатические эндотелиальные клетки (LEC), которые, в свою очередь, секретируют хемокины, такие как

CCL21, привлекающие Т-клетки, например, необученные Т-клетки, в участок введения криогеля, например, в участок в дерме над гелем. В некоторых вариантах осуществления промежуток времени для индуцирования лимфангиогенеза и привлечения иммунных клеток, например, Т-клеток, с помощью фактора привлечения клеток, описанного в данном документе, включает от приблизительно 5 до приблизительно 28 дней, например, от приблизительно 5 до 21 дня, от приблизительно 5 до 15 дней, от приблизительно 5 до 14 дней, от приблизительно 5 до 10 дней, от приблизительно 7 до приблизительно 28 дней, от приблизительно 7 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 7 до 15 дней, от приблизительно 7 до 14 дней, от приблизительно 7 до 10 дней, от приблизительно 10 до 28 дней, от приблизительно 10 до 21 дня, от приблизительно 10 до 15 дней, от приблизительно 10 до 14 дней, от приблизительно 14 до 28 дней, от приблизительно 14 до 21 дня, от приблизительно 15 до 28 дней, от приблизительно 15 до 21 дня, от приблизительно 21 до 28 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 10 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 15 дней или приблизительно 20 дней, приблизительно 21 день, приблизительно 28 дней. В некоторых вариантах осуществления промежуток времени для индуцирования лимфангиогенеза и привлечения иммунных клеток, например, Т-клеток, с помощью фактора привлечения клеток, описанного в данном документе, включает 14 дней (например, две недели). В некоторых вариантах осуществления промежуток времени для индуцирования лимфангиогенеза и привлечения иммунных клеток, например, Т-клеток, с помощью фактора привлечения клеток, описанного в данном документе, включает 21 день (например, три недели). В некоторых вариантах осуществления промежуток времени для индуцирования лимфангиогенеза и привлечения иммунных клеток, например, Т-клеток, с помощью фактора привлечения клеток, описанного в данном документе, включает 28 дней (например, четыре недели или один месяц).

Способы получения, составления и/или приобретения данных различных факторов привлечения клеток известны из уровня техники. См., например, Leppänen VM, Prota AE, Jeltsch M, et al. Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(6):2425-2430. doi:10.1073/pnas.0914318107; Leppänen VM, Tvorogov D, Kisko K, et al. Structural and mechanistic insights into VEGF receptor 3 ligand binding and activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(32):12960-12965. doi:10.1073/pnas.1301415110; Joyce Chiu, Jason W. H. Wong, Michael Gerometta, and Philip J. Hogg. Mechanism of Dimerization of a Recombinant Mature Vascular Endothelial Growth Factor C Biochemistry 2013 53 (1), 7-9. doi: 10.1021/bi401518b; Broggi, M. A. S., Schmaler, M., Lagarde, N., Rossi, S. W. Isolation of Murine Lymph Node Stromal Cells. J. Vis. Exp. (90), e51803, doi:10.3791/51803 (2014); Fankhauser, M., M.A. Broggi, L. Potin, N. Bordry, L. Jeanbart, A.W. Lund, E. Da Costa, S. Hauert, M. Rincon-Restrepo, and C. Tremblay. 2017. Tumor lymphangiogenesis promotes T cell infiltration and potentiates immunotherapy in melanoma. Science translational medicine. 9:eaal4712; US 2019/0099485 A1: "Lymphangiogenesis for therapeutic immunomodulation" (2017); и Vokali, E., S.Y. Shann, S.

Hirosue, M. Rincon-Restrepo, F.V. Duraes, S. Scherer, P. Corthésy-Henrioud, W.W. Kilarski, A. Mondino, and D. Zehn. 2020. Lymphatic endothelial cells prime naïve CD8+ T cells into memory cells under steady-state conditions. Nature communications. 11:1-18.

В некоторых вариантах осуществления VEGF-C выбран из группы, состоящей из незрелого пептида VEGF-C или зрелого пептида VEGF-C. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой минорную зрелую форму или основную зрелую форму. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой минорную зрелую форму дикого типа или основную зрелую форму дикого типа. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой модифицированную минорную зрелую форму или модифицированную основную зрелую форму. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой модифицированную минорную зрелую форму, содержащую мутацию в положении цистеина 137 (например, C137A), или модифицированную основную зрелую форму, содержащую мутацию в положении цистеина 137 (например, C137A), пронумерованную согласно SEQ ID NO: 725. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C представляет собой модифицированную минорную зрелую форму, содержащую мутацию C137A, или модифицированную основную зрелую форму, содержащую мутацию C137A. В некоторых вариантах осуществления зрелый пептид VEGF-C присутствует в виде димера или мономера. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C представляет собой димер основной зрелой формы, дополнительно содержащий мутацию C137A в каждом мономере. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C представляет собой димер минорной зрелой формы, дополнительно содержащий мутацию C137A в каждом мономере. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C выбран из последовательности, представленной в таблице 18 ниже. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C выбран из последовательности, представленной в таблице 18, или последовательности, характеризующейся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления последовательность VEGF-C содержит или не содержит линкер (например, глицин-сериновый линкер) и/или His-метку.

В некоторых вариантах осуществления VEGF-C содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 731, 732, 733 или 734 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 741 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней, при условии, что в положении 26 не находится цистеин (C), например, находится аланин (A). В некоторых вариантах осуществления VEGF-C содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 737 или 738 или последовательность,

характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления VEGF-C содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 743 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C дополнительно содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 740 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления VEGF-C содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 736 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления VEGF-C содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 735 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

Таблица 18 - Варианты VEGF-C

Последовательности, представленные ниже, соответствуют мономеру. При образовании димера 2 одинаковые последовательности собираются вместе посредством цистеиновых мостиков. Следует заметить, что His-метка используется для экспериментальных целей, однако может не являться необходимой во всех вариантах осуществления.

SEQ ID NO:	ДЕСКРИПТОР	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ПОЯСНЕНИЕ
725	**>sp|P49767|VEGFC_ЧЕЛОВЕК Фактор роста эндотелия сосудов С OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VEGFC PE=1 SV=1**	MHLLGFFSVACSLLAAALLPGPREAPA AAAA**FESGLDLSDAEPDAGEATAYAS KDLEEQLRSVSSVDELMTVLYPEYW KMYKCQLRKGGWQHNREQANLNS RTEETIKFAA**AHYNTEILKSIDNEWRK TQCMPREVCIDVGKEFGVATNTFFKPP CVSVYRCGGCCNSEGLQCMNTSTSYLS KTLFEITVPLSQGPKPVTISFANHTSCRC MSKLDVYRQVHSIIRRSLPATLPQCQA ANKTCPTNYMWNNHICRCLAQEDFMF SSDAGDDSTDGFHDICGPNKELDEETC QCVCRAGLRPASCGPHKELDRNSCQC VCKNKLFPSQCGANREFDENTCQCVC	Нижнее подчеркивание: отщепляемые остатки **Жирный шрифт:** пропептид

		KRTCPRNQPLNPGKCACECTESPQKCL LKGKKFHHQTCSCYRRPCTNRQKACE PGFSYSEEVCRCVPSYWKRPQMS	
727	**>1 незрелый пептид (32-227)-VEGFC_His**	FESGLDLSDAEPDAGEATAYASKDLEE QLRSVSSVDELMTVLYPEYWKMYKCQ LRKGGWQHNREQANLNSRTEETIKFA AAHYNTEILKSIDNEWRKTQCMPREVC IDVGKEFGVATNTFFKPPCVSVYRCGG CCNSEGLQCMNTSTSYLSKTLFEITVPL SQGPKPVTISFANHTSCRCMSKLDVYR QVHSIIRRGS**HHHHHH**	Нижнее подчеркивание: пропептид Двойное нижнее подчеркивание: GS-линкер **Жирный шрифт**: His-метка
729	**>1 незрелый пептид (32-227)-VEGFC**	FESGLDLSDAEPDAGEATAYASKDLEE QLRSVSSVDELMTVLYPEYWKMYKCQ LRKGGWQHNREQANLNSRTEETIKFA AAHYNTEILKSIDNEWRKTQCMPREVC IDVGKEFGVATNTFFKPPCVSVYRCGG CCNSEGLQCMNTSTSYLSKTLFEITVPL SQGPKPVTISFANHTSCRCMSKLDVYR QVHSIIRR	Нижнее подчеркивание: пропептид
731	**>2 основная зрелая форма (112-227)-VEGFC_His**	AHYNTEILKSIDNEWRKTQCMPREVCI DVGKEFGVATNTFFKPPCVSVYRCGGC CNSEGLQCMNTSTSYLSKTLFEITVPLS QGPKPVTISFANHTSCRCMSKLDVYRQ VHSIIRRGS**HHHHHH**	Двойное нижнее подчеркивание: GS-линкер **Жирный шрифт**: His-метка
732	**>2 основная зрелая форма (112-227)-VEGFC**	AHYNTEILKSIDNEWRKTQCMPREVCI DVGKEFGVATNTFFKPPCVSVYRCGGC CNSEGLQCMNTSTSYLSKTLFEITVPLS QGPKPVTISFANHTSCRCMSKLDVYRQ VHSIIRR	
733	**>7 минорная зрелая форма**	TEETIKFAAahynteilksidnewrktqcmprevcid vgkefgvatntffkppcvsvyrcggccnseglqcmntsts	Заглавные буквы:

	(103-227)-VEGFC_His	ylsktlfeitvplsqgpkpvtisfanhtscrcmskldvyrqv hsiirrgs**hhhhhh**	фрагмент пропептида Двойное нижнее подчеркивание: GS-линкер **Жирный шрифт**: His-метка
734	**>7 минорная зрелая форма (103-227)-VEGFC**	TEETIKFAAahynteilksidnewrktqcmprevcid vgkefgvatntffkppcvsvyrcggccnseglqcmntsts ylsktlfeitvplsqgpkpvtisfanhtscrcmskldvyrqv hsiirr	Заглавные буквы: фрагмент пропептида
735	**>8 минорная зрелая форма с мутацией (103-227)-VEGFC_C137A_His**	TEETIKFAAahynteilksidnewrktqcmprev**A**i dvgkefgvatntffkppcvsvyrcggccnseglqcmntst sylsktlfeitvplsqgpkpvtisfanhtscrcmskldvyrqv hsiirrgs**hhhhhh**	Заглавные буквы: фрагмент пропептида Заглавная буква A, выделенная **жирным шрифтом**: мутация по типу замены C на A Двойное нижнее подчеркивание: GS-линкер **Жирный шрифт**: His-метка
736	**>8 минорная зрелая форма с мутацией**	TEETIKFAAahynteilksidnewrktqcmprev**A**i dvgkefgvatntffkppcvsvyrcggccnseglqcmntst sylsktlfeitvplsqgpkpvtisfanhtscrcmskldvyrqv	Заглавные буквы: фрагмент

	(103-227)-VEGFC_C137A	hsiirr	пропептида Заглавная буква A, выделенная **жирным шрифтом**: мутация по типу замены C на A
737	**>9 основная зрелая форма с мутацией (112-227)-VEGFC_C137A_His**	ahynteilksidnewrktqcmprev**A**idvgkefgvatntf fkppcvsvyrcggccnseglqcmntstsylsktlfeitvpls qgpkpvtisfanhtscrcmskldvyrqvhsiirrgs**hhhh hh**	Заглавная буква A, выделенная **жирным шрифтом**: мутация по типу замены C на A Двойное нижнее подчеркивание: GS-линкер **Жирный шрифт**: His-метка
738	**>9 основная зрелая форма с мутацией (112-227)-VEGFC_C137A**	ahynteilksidnewrktqcmprev**A**idvgkefgvatntf fkppcvsvyrcggccnseglqcmntstsylsktlfeitvpls qgpkpvtisfanhtscrcmskldvyrqvhsiirr	Заглавная буква A, выделенная **жирным шрифтом**: мутация по типу замены C на A
739	**Пропептид**	FESGLDLSDAEPDAGEATAYASKDLEE QLRSVSSVDELMTVLYPEYWKMYKCQ LRKGGWQHNREQANLNSRTEETIKFA	

		A	
740	**Фрагмент пропептида**	TEETIKFAA	
741	**Консенсусная последовательность VEGF-C**	ahynteilksidnewrktqcmprev**X**idvgkefgvatntf fkppcvsvyrcggccnseglqcmntstsylsktlfeitvpls qgpkpvtisfanhtscrcmskldvyrqvhsiirr	где X представляет собой C или A
742	**VEGF-C**	ahynteilksidnewrktqcmprevcidvgkefgvatntff kppcvsvyrcggccnseglqcmntstsylsktlfeitvplsq gpkpvtisfanhtscrcmskldvyrqvhsiirr	
743	**VEGF-C с мутацией**	ahynteilksidnewrktqcmprev**A**idvgkefgvatntf fkppcvsvyrcggccnseglqcmntstsylsktlfeitvpls qgpkpvtisfanhtscrcmskldvyrqvhsiirr	Заглавная буква A, выделенная **жирным шрифтом**: мутация по типу замены C на A

В некоторых вариантах осуществления VEGF-C присутствует в эффективном количестве, необязательно в количестве, которое меньше 1 мг или составляет приблизительно это значение, меньше 10 мг или составляет приблизительно это значение, больше 10 мкг или составляет приблизительно это значение, больше 1 мкг или составляет приблизительно это значение, от приблизительно 1 мкг до 1 мг, от приблизительно 10 мкг до 1 мг, от приблизительно 1 мкг до 10 мг или от приблизительно 10 мкг до 10 мг.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток может индуцировать, например, стимулировать, миграцию иммунных клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток может увеличивать размножение или пролиферацию популяции иммунных клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток включает в себя IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или его функциональный вариант. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что применение фактора привлечения клеток, например, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или его варианта, в комбинации с криогелем индуцирует размножение или пролиферацию иммунных клеток, что приводит к локализованной активации, а также стимуляции и усилению миграции иммунных клеток, например, Т-клеток, в криогель.

В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток повышает выживаемость иммунных клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах

осуществления фактор привлечения клеток включает в себя IL-7 или его функциональный вариант. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что применение фактора привлечения клеток, например, IL-7 или его функционального варианта, в комбинации с криогелем повышает выживаемость и пролиферацию иммунных клеток, например, Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления один, два, три или более факторов привлечения клеток подлежат применению в композиции или способе, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток включает в себя VEGF-C или его функциональный вариант; IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или его функциональный вариант; IL-7 или его функциональный вариант или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток включает в себя VEGF-C или его функциональный вариант и IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток включает в себя VEGF-C или его функциональный вариант и IL-7 или функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток включает в себя VEGF-C или его функциональный вариант; IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или его функциональный вариант и IL-7 или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления фактор привлечения клеток включает в себя IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или его функциональный вариант и IL-7 или его функциональный вариант.

Средство для стимуляции функции Т-клеток

В некоторых вариантах осуществления в композиции или способе, описанных в данном документе, используется средство, которое стимулирует функцию иммунных клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления средство для стимуляции функции Т-клеток снижает истощение Т-клеток и/или предупреждает нарушение функции Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления средство для стимуляции функции Т-клеток включает в себя ингибитор гена Tet2, например, ингибитор Tet2. Без ограничения какой-либо теорией, нарушение одного аллеля гена Tet (например, Tet1, Tet2 или Tet3) приводит к снижению общих уровней 5-гидроксиметилцитозина совместно с усилением пролиферации, регуляции продуцирования эффекторных цитокинов и дегрануляции, и тем самым приводит к увеличению пролиферации и/или функции CAR-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Tet2 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на один или несколько сайтов в пределах гена, кодирующего Tet2, или ее соответствующие регуляторные элементы; (2) нуклеиновую кислоту (например, siRNA или shRNA), которая ингибирует экспрессию Tet2; (3) белок Tet2 (например, с доминантно-негативным эффектом, например, каталитически неактивный) или партнера Tet2 по связыванию (например, партнера Tet2 по связыванию с доминантно-негативным эффектом); (4) малую молекулу, которая ингибирует экспрессию

и/или функцию Tet2; (5) нуклеиновую кислоту, кодирующую любое из (1)-(3); или (6) любую комбинацию (1)-(5). В некоторых вариантах осуществления средство для стимуляции функции Т-клеток включает в себя ингибитор Tet2, описанный, например, в WO2017/049166, WO2018/175733 и WO2019/210153, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления средство для стимуляции функции Т-клеток включает в себя ингибитор ZBTB32, например, ингибитор ZBTB32. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что в некоторых вариантах осуществления ингибирование ZBTB32 может усиливать опосредованный Т-клетками противоопухолевый ответ. В определенных вариантах осуществления ингибирование ZBTB32 усиливает активность CAR-Т-клеток, например, размножение, продуцирование цитокинов, персистенцию, устойчивость к истощению и противоопухолевую активность клеток in vivo. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на ген ZBTB32, или один или несколько ее компонентов; (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов системы редактирования генов, или (3) комбинацию (1) и (2). В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на ген ZBTB32, или один или несколько ее компонентов. В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов системы редактирования генов. В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя комбинацию (1) и (2). В некоторых вариантах осуществления средство для стимуляции функции Т-клеток включает в себя ингибитор ZBTB32, описанный в PCT/US2021/037048, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Средство, обеспечивающее длительное высвобождение

В некоторых вариантах осуществления в композиции или способе, описанных в данном документе, используется средство, обеспечивающее длительное высвобождение. В некоторых вариантах осуществления средство, обеспечивающее длительное высвобождение, может применяться для обеспечения длительного высвобождения вирусного вектора (например, лентивирусного вектора, например, лентивирусного вектора, кодирующего CAR), средства для активации клеток или как вирусного вектора, так и средства для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления средство, обеспечивающее длительное высвобождение, составлено для введения путем инъекции. В некоторых вариантах осуществления средство, обеспечивающее длительное высвобождение, включает в себя частицу, например, частицу кремнезема, например, мезопористую частицу кремнезема.

Мезопористые частицы кремнезема, подвергнутые модификации поверхности

В некоторых вариантах осуществления в композиции или способе, описанных в данном документе, используется мезопористая частица кремнезема. Мезопористые частицы кремнезема имеют пористое тело, например, содержащее шестиугольные

равномерные поры цилиндрической формы с высокой плотностью расположения. Мезопористые частицы кремнезема можно синтезировать посредством применения стержневидной мицеллы поверхностно-активного вещества в качестве матрицы, которая образуется в воде посредством растворения и гидролиза источника кремнезема, такого как алкоксисилан, раствор силиката натрия, канемит, мелкие частицы кремнезема, в воде или спирте в присутствии кислотного или основного катализатора. См., например, публикацию заявки на патент США № 2015-0072009 и Hoffmann et al., Angewandte Chemie International Edition, 45, 3216-3251, 2006. Много видов поверхностно-активных веществ, таких как катионные, анионные и неионогенные поверхностно-активные вещества, изучали в качестве поверхностно-активного вещества, и известно, что обычно использование алкилтриметиламмониевой соли катионного поверхностно-активного вещества приводит к получению мезопористого кремнезема, имеющего наибольшую удельную площадь поверхности и объем пор. См. публикацию заявки на патент США № 2013/0052117 и Katiyar et al. (Journal of Chromatography 1122 (1-2): 13-20).

Мезопористые частицы кремнезема могут быть представлены в различных формах, например, в форме микросфер, частиц с неровной поверхностью, прямоугольных стержней, округлых наностержней. Мезопористые частицы кремнезема могут иметь различные заранее определенные формы, включающие, например, сферическую форму, эллипсоидную форму, стержневидную форму или криволинейную цилиндрическую форму. В конкретных вариантах осуществления в композициях и способах, перечисленных в данном документе, применяются мезопористые стержни из кремнезема (MSR). Способы сборки мезопористого кремнезема с получением микростержней известны из уровня техники. См. Wang et al , Journal of Nanoparticle Research, 15: 1501, 2013. В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема синтезируют посредством осуществления реакции тетраэтилортосиликата с матрицей, изготовленной из мицеллярных стержней. Результат представляет собой совокупность мезопористых сфер или стержней из кремнезема, которые наполнены регулярно расположенными порами. Затем матрица может быть удалена путем промывания растворителем, доведенным до надлежащего значения pH. В данном примере после удаления матриц на основе поверхностно-активного вещества мезопористые частицы кремнезема, характеризующиеся равномерной, упорядоченной и связной мезопористостью, получают с удельной площадью поверхности, составляющей, например, от приблизительно 600 $м^2/г$ до приблизительно 1200 $м^2/г$, в частности от приблизительно 800 $м^2/г$ до приблизительно 1000 $м^2/г$ и в особенности от приблизительно 850 $м^2/г$ до приблизительно 950 $м^2/г$. В другом варианте осуществления мезопористые частицы кремнезема можно синтезировать с применением способа золь-гель или способа распылительной сушки. Тетраэтилортосиликат также применяют с мономером дополнительного полимера (в качестве матрицы). В еще одном варианте осуществления один или несколько тетраалкоксисиланов и один или несколько (3-цианопропил)триалкоксисиланов можно подвергать соконденсации с получением

мезопористых частиц кремнезема в виде стержней. См. публикации заявок на патент США №№ 2013-0145488, 2012-0264599 и 2012-0256336, содержание которых включено посредством ссылки во всей своей полноте.

Мезопористые частицы кремнезема (MSP) (например, MSR) могут содержать поры, которые могут быть упорядоченно или произвольно распределены, диаметром 2-100 нм или диаметром 2-50 нм, например, поры диаметром 2-5 нм, 10-20 нм, 10-30 нм, 10-40 нм, 20-30 нм, 30-50 нм, 30-40 нм, 40-50 нм. В некоторых вариантах осуществления микростержни содержат поры диаметром примерно 5 нм, 6 нм, 7 нм, 8 нм, 9 нм, 10 нм, 11 нм, 12 нм или больше. Размер пор можно изменять в зависимости от типа применения.

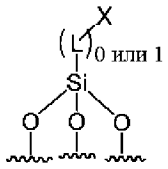
В некоторых вариантах осуществления длина MSR находится в микрометрическом диапазоне, варьируя от приблизительно 5 мкм до приблизительно 500 мкм. В одном примере MSR имеют длину 5-50 мкм, например, 10-20 мкм, 10-30 мкм, 10-40 мкм, 20-30 мкм, 30-50 мкм, 30-40 мкм, 40-50 мкм. В некоторых вариантах осуществления MSR имеют длину от 50 мкм до 250 мкм, например, приблизительно 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 120 мкм, 150 мкм, 180 мкм, 200 мкм, 225 мкм или больше. В некоторых вариантах осуществления применяются MSR с более высоким соотношением размеров, например, где стержни имеют длину от 50 мкм до 200 мкм, в частности длину от 80 мкм до 120 мкм, в особенности длину приблизительно 100 мкм или больше.

В еще одном варианте осуществления MSP (например, MSR) обеспечивают высокий показатель площади поверхности для присоединения к клеткам-мишеням, например, Т-клеткам, и/или связывания с ними. Способы получения мезопористых силикатов с высоким показателем площади поверхности известны из уровня техники. См., например, патент США № 8883308 и публикацию заявки на патент США № 2011-0253643, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления высокий показатель площади поверхности обусловлен волокнистой морфологией наночастиц, что обеспечивает возможность получения высокой концентрации высокодиспергированных и легкодоступных молекул на поверхности. В определенных вариантах осуществления MSP с высоким показателем площади поверхности (например, MSR) имеют площадь поверхности, составляющую по меньшей мере приблизительно 100 $м^2$/г, по меньшей мере 150 $м^2$/г или по меньшей мере 300 $м^2$/г. В других вариантах осуществления MSP с высоким показателем площади поверхности (например, MSR) имеют площадь поверхности от приблизительно 100 $м^2$/г до приблизительно 1000 $м^2$/г, включая все значения или поддиапазоны в этом промежутке, например, 50 $м^2$/г, 100 $м^2$/г, 200 $м^2$/г, 300 $м^2$/г, 400 $м^2$/г, 600 $м^2$/г, 800 $м^2$/г, 100-500 $м^2$/г, 100-300 $м^2$/г, 500-800 $м^2$/г или 500-1000 $м^2$/г.

В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема могут иметь модификацию поверхности. Как используется в данном документе, "модификация поверхности" означает присоединение или прикрепление функциональных групп к поверхности MSP (например, MSR). В некоторых вариантах осуществления функциональные группы адсорбированы на поверхностях, выстилающих поры и/или

наноканалы, или на поверхности MSP (например, MSR) или ковалентно связаны с ними. Как используется в данном документе, "функциональная группа" определяет химический фрагмент, связанный с MSR. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа представляет собой -OH (гидроксил), амин, карбоновую кислоту, фосфонат, галогенид, азид, алкин, эпоксид, сульфгидрил, дисульфид, полиэтиленимин, гидрофобный фрагмент или их соли. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа (т. е. -OH (гидроксил), амин, карбоновая кислота, фосфонат, галогенид, азид, алкин, эпоксид, сульфгидрил, дисульфид, полиэтиленимин, гидрофобный фрагмент или их соли) может быть отделена от поверхности кремнезема посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа ковалентно связана с поверхностью MSP или MSR посредством C_1-C_{20}алкильного линкера. В других вариантах осуществления функциональная группа ковалентно связана с поверхностью MSP или MSR посредством полиэтиленгликолевого линкера. В конкретных вариантах осуществления полиэтиленгликолевый линкер имеет формулу $(-O(CH_2-CH_2-)_{1-25}$. В конкретных вариантах осуществления модификация поверхности представляет собой C_1-C_{20}алкильный пергалогеналкил или C_1-C_{20}алкильный перфторалкил.

Общая структура модификаций поверхности может быть представлена следующим образом:



,

где L представляет собой линкер, и X представляет собой функциональную группу.

В некоторых вариантах осуществления L может представлять собой C_1-C_{20}алкильную группу или полиэтиленгликолевую группу, и X может представлять собой -OH (гидроксил), первичный, вторичный, третичный или четвертичный амин, карбоновую кислоту, фосфонат, галогенид, азид, алкин, эпоксид, сульфгидрил, дисульфид, полиэтиленимин или гидрофобный фрагмент или их соли.

Как используется в данном документе, модификация поверхности, содержащая фосфонат (также известная как модифицированные фосфонатом наночастицы), содержит по меньшей мере одну группу фосфоновой кислоты $(-P(O)(OH)_2)$ или фосфиновую кислоту (-P(O)(OH)R, где R представляет собой C_1-C_{20}алкильную группу). Фосфоновая или фосфиновая кислота может являться заряженной или незаряженной в зависимости от pH. При физиологическом значении pH фосфоновые кислоты и фосфиновые кислоты являются отрицательно заряженными или анионными. Фосфонатные модификации можно получать, например, посредством обработки поверхности тела кремнезема с помощью несущего фосфонат триалкилсилоксанового соединения или несущего фосфонат тригидроксилсилильного соединения, такого как (тригидроксилсилил)пропилметилфосфонат.

В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема

(например, MSR) подвергнуты модификации поверхности с помощью первичного, вторичного, третичного или четвертичного амина. Вторичные, третичные и четвертичные амины могут быть замещены C_1-C_{20}алкильными группами и могут являться заряженными. В некоторых вариантах осуществления аминогруппа может быть представлена в форме соли. В некоторых вариантах осуществления первичный, вторичный, третичный или четвертичный амин может быть отделен от поверхности MSP посредством линкера. В конкретных вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема модифицированы полиэтиленимином. В конкретных вариантах осуществления полиэтиленимин является разветвленным или неразветвленным. В альтернативных вариантах осуществления полиэтилениминовая группа имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1000 до 100000 дальтонов (Да) согласно измерению посредством гель-проникающей хроматографии (GPC). В некоторых вариантах осуществления полиэтилениминовая группа имеет среднюю молекулярную массу, составляющую от приблизительно 1200 до 15000 Да, от приблизительно 1500 до 12000 Да, приблизительно 2000 Да, приблизительно 3000 Да, приблизительно 4000 Да, приблизительно 5000 Да, приблизительно 6000 Да, приблизительно 7000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 9000 Да, приблизительно 10000 Да или приблизительно 20000 Да согласно измерению посредством гель-проникающей хроматографии (GPC).

Структуры различных иллюстративных мезопористых частиц кремнезема, подвергнутых модификации поверхности, показаны на фиг. 1.

MSP (например, MSR), перечисленные в данном документе, получают способами, известными специалистам в данной области, как указано в данном документе. Как правило, MSP с модификацией поверхности можно получать следующим способом.

Обычно любую реакционную смесь, способную вступать в реакцию с силилгидроксидной поверхностью MSP (например, MSR), можно применять для ковалентной модификации поверхности. Например, поверхность MSP (например MSR) можно обрабатывать триалкоксисилильным соединением или тригидроксисилильным соединением. В некоторых вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема суспендированы в подходящем реакционном растворителе. В некоторых вариантах осуществления реакционный растворитель может представлять собой водные растворители или буферы с pH 0-14. Можно применять дополнительную совместную смесь водных растворов с 1 или несколькими органическими растворителями, включающими без ограничения тетрагидрофуран, 2-метилтетрагидрофуран, этилацетат, толуол, триэтиламин, диметилформамид, диметилацетамид, диметилсульфоксид, метанол, этанол, метиленхлорид или дихлорэтан. В некоторых вариантах осуществления суспендированные мезопористые частицы кремнезема подвергают реакции с триалкоксисилильным или тригидроксисилильным реагентом, содержащим требуемую функциональную группу, как описано в данном документе. Аминные модификации можно получать, например, посредством обработки MSP несущим амин

триалкоксисилановым соединением, таким как аминопропилтриэтоксисилан, 3-(2-аминоэтиамино)пропилтриметоксисилан или 3-триметоксисилилпропилэтилендиамин. В определенных вариантах осуществления триалкоксисилил представляет собой триметоксисилильную или триэтоксисилильную группу. В альтернативных вариантах осуществления триалкоксисилильный реагент представляет собой триалкоксиалкиламин. В некоторых вариантах осуществления триалкоксиалкиламин содержит первичный, вторичный, третичный или четвертичный амин.

В определенных вариантах осуществления триалкоксисилильный реагент содержит полиэтилениминовую группу. В конкретных вариантах осуществления полиэтиленимин является разветвленным или неразветвленным. В альтернативных вариантах осуществления полиэтилениминовая группа имеет среднюю молекулярную массу, составляющую от приблизительно 1000 до 20000 Да, от приблизительно 1200 до 15000 Да, от приблизительно 1500 до 12000 Да, приблизительно 2000 Да, приблизительно 3000 Да, приблизительно 4000 Да, приблизительно 5000 Да, приблизительно 6000 Да, приблизительно 7000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 9000 Да или приблизительно 10000 Да согласно измерению посредством гель-проникающей хроматографии (GPC). В некоторых вариантах осуществления триалкоксисилильный реагент содержит C_{1-20}алкилазидную группу. В определенных вариантах осуществления триалкоксисилильный реагент содержит группу C_{1-20}алкилкарбоновой кислоты. В других вариантах осуществления триалкоксисилильный реагент содержит C_{1-20}алкильную группу.

Сульфгидрильную модификацию на MSP (например, MSR) можно получать, например, посредством обработки MSP несущим сульфгидрил триалкоксисилановым соединением, таким как 3-меркаптопропилтриэтоксисилан.

Дисульфидную модификацию на MSP (например, MSR) можно получать, например, посредством обработки поверхности наночастицы несущим дисульфид триалкоксисилановым соединением или посредством обработки модифицированной с сульфгидрилом поверхности 2,2′-дитиодипиридином или другим дисульфидом.

Модификации поверхности MSP (например, MSR), предусматривающие группу карбоновой кислоты, можно получать, например, посредством обработки поверхности несущим карбоновую кислоту триалкоксисилановым соединением или посредством обработки MSP триалкоксисилановым соединением, несущим функциональную группу, которую можно превратить в карбоновую кислоту химическим путем. Например, MSP можно обрабатывать 3-цианопропилтриэтоксисиланом с последующим гидролизом серной кислотой.

Модификации поверхности MSP (например, MSR), предусматривающие эпоксид, которые будут содержать по меньшей мере один эпоксид, можно получать, например, посредством обработки MSP несущим эпоксид триалкоксисилановым соединением, таким как глицидоксипропилтриэтоксисилан.

Модификации поверхности, содержащие гидрофобный фрагмент, будут содержать по меньшей мере один фрагмент, предназначенный для снижения растворимости в воде

или повышения растворимости в органических растворителях. Примеры гидрофобных фрагментов включают длинноцепочечные алкильные группы (например, C_8-C_{20}алкильные группы), сложные эфиры жирных кислот (например, C_1-C_{22}алкильные сложные эфиры кислот) и ароматические кольца, содержащие атомы углерода C_6-C_{10}.

В некоторых вариантах осуществления реакцию между MSP (например, MSR) и триалкоксисилильным реагентом осуществляют при температуре окружающей среды или комнатной температуре. В других вариантах осуществления реакцию осуществляют при повышенных температурах. В дополнительных вариантах осуществления температура протекания реакции составляет от приблизительно 40°C до приблизительно 120°C, от приблизительно 50°C до приблизительно 100°C, от приблизительно 60°C до приблизительно 80°C, от приблизительно 70°C до приблизительно 80°C или приблизительно 50°C, приблизительно 55°C, приблизительно 60°C, приблизительно 65°C, приблизительно 70°C, приблизительно 75°C, приблизительно 80°C, приблизительно 85°C, приблизительно 90°C, приблизительно 95°C или приблизительно 100°C.

Вирусные векторы

В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, могут содержать средство, обеспечивающее длительное высвобождение, например, мезопористую частицу кремнезема, описанную в данном документе, и вирусный вектор.

Вирусный вектор может представлять собой любой вирусный вектор. Технология вирусных векторов хорошо известна из уровня техники и описана, например, в Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. В качестве примера, вирусный вектор может представлять собой аденовирус, лентивирус, ретровирус, аденоассоциированный вирус или вирус герпеса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или аденовирусный вектор.

Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом по сравнению с векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мышей, заключающимся в том, что ими можно трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности. Ретровирусный вектор также может представлять собой, например, гамма-ретровирусный вектор. Гамма-ретровирусный вектор может содержать, например, промотор, сигнал упаковки (ψ), сайт связывания праймера (PBS), один или несколько (например, два) длинных концевых повторов (LTR) и трансген, представляющий интерес, например, ген, кодирующий CAR. В гамма-ретровирусном векторе могут отсутствовать структурные гены вирусов, такие как gag, pol и env.

Иллюстративные гамма-ретровирусные векторы включают вирус лейкоза мышей (MLV), вирус некроза селезенки (SFFV) и вирус миелопролиферативной саркомы (MPSV), а также векторы, полученные из них. Другие гамма-ретровирусные векторы описаны, например, в Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713.

В другом варианте осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую требуемый CAR по настоящему изобретению, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35). В другом варианте осуществления экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, можно достичь с помощью транспозонов, таких как "спящая красавица", CRISPR, CAS9 и нуклеаз с "цинковыми пальцами". См. June et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716, включенную в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор включает в себя вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный TCR, цитокины, хемокины, shRNA для блокирования ингибирующей молекулы или мРНК для индуцирования экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность в вирусном векторе экспрессирует пептид, сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления пептид нацеливается на опухолевый антиген, выбранный из группы, состоящей из TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Ag Tn, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, E6, E7 HPV, MAGE-A1, ETV6-AML, белка 17 сперматозоидов, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутантного p53, простеина, сурвивина и теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутантного Ras, hTERT, антигенов саркомы с точечными разрывами при транслокации, ML-IAP, ERG (продукта

слитого гена TMPRSS2 и ETS), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный TCR. Такие пептиды более подробно описаны в данном документе ниже в разделе под названием "Общее описание технологии химерных антигенных рецепторов".

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность в векторе экспрессирует белок, сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из одного или нескольких из CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (также называемого CD2 субпопуляции 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); молекулы 1, подобной лектинам C-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); антигена созревания B-клеток (BCMA), являющегося представителем семейства рецепторов TNF; Tn-антигена ((Ag Tn) или (GalNAcα-Ser/Thr)); простатического специфического мембранного антигена (PSMA); орфанного рецептора 1, подобного рецепторной тирозинкиназе (ROR1); Fms-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; раково-эмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); альфа-2-субъединицы рецептора интерлейкина-13 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; альфа-субъединицы рецептора интерлейкина 11 (IL-11Ra); антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA); сериновой протеазы 21 (тестизина или PRSS21); рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2); антигена системы Льюис (Y); CD24; рецептора фактора роста тромбоцитов бета-типа (PDGFR-бета); стадиеспецифического эмбрионального антигена 4 (SSEA-4); CD20; рецептора фолиевой кислоты альфа; рецепторной тирозинпротеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, ассоциированного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простазы; простатической кислой фосфатазы (PAP); мутантного фактора элонгации 2 (ELF2M); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы бета-типа 9 протеасомы (просомы, мультикаталитической протеазы) (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); онкогенного слитого белка, состоящего из кластерного региона точечных разрывов (BCR) и гомолога 1 онкогена вируса лейкоза мышей Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина A-типа (EphA2); фукозил-GM1; молекулы адгезии, представляющей собой сиалилированный антиген системы Льюис (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer);

трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); ганглиозида о-ацетил-GD2 (OAcGD2); рецептора фолиевой кислоты бета; опухолевого эндотелиального маркера 1 (TEM1/CD248); белка, родственного опухолевому эндотелиальному маркеру 7 (TEM7R); клаудина 6 (CLDN6); рецептора тиреотропного гормона (TSHR); представителя D группы 5 класса C рецепторов, сопряженных с G-белками (GPRC5D); белка, кодируемого открытой рамкой считывания 61 X-хромосомы (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; плацентоспецифического белка 1 (PLAC1); гексасахаридной части гликоцерамида globoH (GloboH); дифференцировочного антигена молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора 1 вируса гепатита A (HAVCR1); бета-3-адренорецептора (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); рецептора 20, сопряженного с G-белком (GPR20); антигена локуса K9 комплекса лимфоцитарных антигенов 6 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка, кодируемого альтернативной рамкой считывания гена TCR-гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); раково-тестикулярного антигена 1 (NY-ESO-1); раково-тестикулярного антигена 2 (LAGE-1a); антигена 1, ассоциированного с меланомой (MAGE-A1); белка, кодируемого транслокационным вариантом 6 гена ETS, локализованным в p-плече 12 хромосомы (ETV6-AML); белка спермы 17 (SPA17); представителя 1A семейства X-антигенов (XAGE1); ангиопоэтин-связывающего рецептора клеточной поверхности 2 (TIE-2); раково-тестикулярного антигена меланомы 1 (MAD-CT-1); раково-тестикулярного антигена меланомы 2 (MAD-CT-2); Fos-родственного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутантного p53; простеина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена 1 карциномы предстательной железы (PCTA-1 или галектина 8), антигена меланомы 1, распознаваемого T-клетками (MelanA или MART1); мутантного антигена саркомы крыс (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); антигена саркомы с точечными разрывами при транслокации; меланомного ингибитора апоптоза (ML-IAP); ERG (продукта слитого гена трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2) и ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парным box-доменом Pax-3 (PAX3); андрогенового рецептора; циклина B1; нейробластомного гомолога онкогена вируса миелоцитоматоза птиц v-myc (MYCN); представителя C семейства гомологов Ras (RhoC); белка 2, родственного тирозиназе (TRP-2); цитохрома P450 1B1 (CYP1B1); белка, подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с "цинковыми пальцами") (BORIS или паралога регулятора импринтированных сайтов), антигена плоскоклеточной карциномы 3, распознаваемого T-клетками (SART3); белка с парным box-доменом Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TES1); лимфоцитоспецифической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы A (AKAP-4); антигена 2 синовиальной саркомы с точечным разрывом в X-хромосоме (SSX2); рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE-1); почечного убиквитарного белка 1 (RU1); почечного убиквитарного белка 2 (RU2); легумаина; E6 вируса папилломы человека (E6 HPV); E7 вируса папилломы человека (E7 HPV);

кишечной карбоксилэстеразы; мутантного белка теплового шока 70-2 (мутантного варианта hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; иммуноглобулиноподобного рецептора 1, ассоциированного с лейкоцитами (LAIR1); рецептора Fc-фрагмента IgA (FCAR или CD89); представителя 2 подсемейства A лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов (LILRA2); представителя f семейства белков, подобных молекулам CD300 (CD300LF); представителя A семейства 12 лектиновых доменов C-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2, подобного муциноподобному рецептору гормона, содержащего EGF-подобный модуль (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); антигена 5, подобного Fc-рецептору (FCRL5); и полипептида 1, подобного иммуноглобулину лямбда (IGLL1).

CAR, описанный в данном документе, может содержать антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела, TCR или фрагмент TCR), который связывается с антигеном, обеспечивающим поддержание опухоли (например, антигеном, обеспечивающим поддержание опухоли, описанным в данном документе). В некоторых вариантах осуществления антиген, обеспечивающий поддержание опухоли, представляет собой антиген, присутствующий на стромальной клетке или супрессорной клетке миелоидного происхождения (MDSC). Стромальные клетки способны секретировать факторы роста для стимуляции деления клеток в микроокружении. Клетки MDSC способны ингибировать пролиферацию и активацию Т-клеток. Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, разрушают клетки, обеспечивающие поддержание опухоли, за счет чего опосредованно ингибируется рост или выживаемость опухоли.

В некоторых вариантах осуществления антиген стромальных клеток выбран из одного или нескольких из антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2), белка активации фибробластов (FAP) и тенасцина. В некоторых вариантах осуществления FAP-специфическое антитело представляет собой сибротузумаб, конкурирует с ним за связывание или содержит такие же CDR. В вариантах осуществления антиген MDSC выбран из одного или нескольких из CD33, CD11b, C14, CD15 и CD66b. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антиген, обеспечивающий поддержание опухоли, выбран из одного или нескольких из антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2), белка активации фибробластов (FAP) или тенасцина, CD33, CD11b, C14, CD15 и CD66b.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен кодируемой молекулы CAR содержит антитело, фрагмент антитела, scFv, Fv, Fab, (Fab')2, однодоменное антитело (SDAB), VH- или VL-домен, VHH-домен верблюдовых или бифункциональное (например, биспецифическое) гибридное антитело (например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)).

В некоторых случаях scFv можно получить в соответствии со способом, известным из уровня техники (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426, и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Молекулы scFv можно получить путем

связывания VH- и VL-областей друг с другом с помощью гибких полипептидных линкеров. Молекулы scFv содержат линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотным составом. Длина линкера может сильно влиять на укладку и взаимодействие вариабельных областей scFv. В действительности, если используют короткий полипептидный линкер (например, длиной 5-10 аминокислот), то предотвращается внутрицепочечная укладка. Межцепочечная укладка также необходима для объединения двух вариабельных областей вместе с образованием функционального эпитопсвязывающего участка. Примеры ориентации и размера линкеров см., например, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, публикациях заявок на патент США №№ 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 и публикациях согласно PCT №№ WO2006/020258 и WO2007/024715, включенных в данный документ посредством ссылки.

ScFv может содержать линкер из по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или больше аминокислотных остатков между его VL- и VH-областями. Линкерная последовательность может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В другом варианте осуществления линкерная последовательность содержит группы глициновых и сериновых повторов, таких как $(Gly_4Ser)n$, где n представляет собой положительное целое число, равное 1 или больше (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой $(Gly_4Ser)_4$ (SEQ ID NO: 29) или $(Gly_4Ser)_3$ (SEQ ID NO: 30). При изменении длины линкера может сохраняться или усиливаться активность, что приводит к улучшению эффективности в исследованиях активности.

В другом аспекте антигенсвязывающий домен представляет собой Т-клеточный рецептор ("TCR") или его фрагмент, например, одноцепочечный TCR (scTCR). Способы получения таких TCR известны из уровня техники. См., например, Willemsen RA et al, Gene Therapy 7: 1369-1377 (2000); Zhang T et al, Cancer Gene Ther 11: 487-496 (2004); Aggen et al, Gene Ther. 19(4):365-74 (2012) (литературные источники включены в данный документ во всей своей полноте). Например, может быть сконструирован scTCR, который содержит гены Vα и Vβ из клона Т-клеток, связанные с помощью линкера (например, гибкого пептида). Данный подход является весьма применимым для мишени, ассоциированной с раком, которая сама по себе является внутриклеточной, однако фрагмент такого антигена (пептида) презентируется на поверхности раковых клеток с помощью MHC.

В определенных вариантах осуществления кодируемый антигенсвязывающий домен характеризуется аффинностью связывания с KD, составляющей от 10^{-4} М до 10^{-8} М.

В некоторых вариантах осуществления кодируемая молекула CAR содержит антигенсвязывающий домен, который характеризуется аффинностью связывания с KD в отношении антигена-мишени, составляющей от 10^{-4} М до 10^{-8} М, например, от 10^{-5} М до 10^{-7} М, например, 10^{-6} М или 10^{-7} М. В некоторых вариантах осуществления

антигенсвязывающий домен характеризуется аффинностью связывания, в по меньшей мере пять раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 100 раз или 1000 раз меньшей, чем у эталонного антитела, например, антитела, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления кодируемый антигенсвязывающий домен характеризуется аффинностью связывания, в по меньшей мере 5 раз меньшей, чем у эталонного антитела (например, антитела, из которого получен антигенсвязывающий домен). В некоторых аспектах такие фрагменты антитела являются функциональными в том смысле, что они обеспечивают биологический ответ, который может включать без ограничения активацию иммунного ответа, ингибирование начала передачи сигнала от их антигена-мишени, ингибирование киназной активности и т. п., как будет понятно специалисту в данной области.

В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv-фрагмент антитела, который является гуманизированным по сравнению с мышиной последовательностью scFv, из которого он получен.

В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен CAR по настоящему изобретению (например, scFv) кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, последовательность которой была кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего. В некоторых аспектах целая конструкция CAR по настоящему изобретению кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, целая последовательность которой была кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего. Оптимизация кодонов относится к обнаружению того, что частота встречаемости синонимичных кодонов (т. е. кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту) в кодирующей ДНК смещена у разных видов. Такая вырожденность кодонов обеспечивает возможность кодирования идентичного полипептида различными нуклеотидными последовательностями. Из уровня техники известны различные способы оптимизации кодонов, и они включают, например, способы, раскрытые по меньшей мере в патентах США №№ 5786464 и 6114148.

В некоторых вариантах осуществления, касающихся иммунных эффекторных клеток, сконструированных для экспрессии молекулы CAR, например, как описано в данном документе, понятно, что способ обработки может дополнительно включать любые из стадий, аспектов или признаков, описанных ниже в разделе, относящемся к химерным антигенным рецепторам.

Клетки предпочтительно представляют собой иммунные эффекторные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой NK-клетки. В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к популяции клеток по настоящему изобретению, например, популяции иммунных эффекторных клеток по настоящему изобретению. В вариантах осуществления популяция клеток по настоящему изобретению содержит клетки указанного типа и может содержать другие типы (например, популяция иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, сконструированных для экспрессии

молекулы CAR, например, как описано в данном документе, может содержать Т-клетки, сконструированные для экспрессии молекулы CAR, а также Т-клетки (или другие типы клеток), которые не были сконструированы для экспрессии молекулы CAR). В вариантах осуществления популяция клеток, используемая в способах по настоящему изобретению, состоит по сути из клеток указанного типа. В вариантах осуществления популяция клеток по настоящему изобретению по существу не содержит другие типы клеток. В вариантах осуществления популяция клеток по настоящему изобретению состоит из указанного типа клеток.

В любом из вышеуказанных аспектов и вариантов осуществления клетки и/или популяция клеток представляют собой или содержат иммунные эффекторные клетки, например, популяция иммунных эффекторных клеток содержит Т-клетки или NK-клетки, например, состоит из них. В вариантах осуществления клетки представляют собой Т-клетки, например, CD8+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки или их комбинацию. В вариантах осуществления клетки представляют собой NK-клетки.

В вариантах осуществления клетки представляют собой клетки человека. В вариантах осуществления клетки являются аутологичными, например, по отношению к субъекту, которому будут вводить клетки. В вариантах осуществления клетки являются аллогенными, например, по отношению к субъекту, которому будут вводить клетки.

Обычно в способах, описанных в данном документе, композиции, описанные в данном документе, могут вводиться в терапевтически эффективных количествах, как описано выше, посредством любого из обычных и приемлемых способов, известных из уровня техники, по отдельности либо в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами. В конкретных вариантах осуществления композиции вводят путем инъекции. В еще нескольких конкретных вариантах осуществления, касающихся введения in vivo, композиции вводят подкожно субъекту, нуждающемуся в этом. В других вариантах осуществления композиции можно вводить в форме имплантата в требуемое место действия. Место действия может быть определено специалистом в данной области в соответствии с потребностями субъекта.

Мишени для CAR

В данном документе описаны вирусные векторы для трансдукции иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток), которые сконструированы таким образом, чтобы они содержали один или несколько CAR, которые направляют иммунные эффекторные клетки на нежелательные клетки (например, раковые клетки). Это достигается с помощью антигенсвязывающего домена в CAR, который является специфичным в отношении антигена, ассоциированного с раком. Существует два класса антигенов, ассоциированных с раком (опухолевых антигенов), на которые можно нацеливаться с помощью CAR по настоящему изобретению: (1) антигены, ассоциированные с раком, которые экспрессируются на поверхности раковых клеток; и (2) антигены, ассоциированные с раком, которые сами по себе являются внутриклеточными, однако фрагмент такого антигена (пептида) презентируется на поверхности раковых

клеток с помощью MHC (главного комплекса гистосовместимости).

В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген выбран из одного или нескольких из CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (также называемого CD2 субпопуляции 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24); молекулы 1, подобной лектинам C-типа (CLL-1 или CLECL1); CD33; варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII); ганглиозида G2 (GD2); ганглиозида GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); антигена созревания B-клеток (BCMA), являющегося представителем семейства рецепторов TNF; Tn-антигена ((Ag Tn) или (GalNAcα-Ser/Thr)); простатического специфического мембранного антигена (PSMA); орфанного рецептора 1, подобного рецепторной тирозинкиназе (ROR1); Fms-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3); опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72); CD38; CD44v6; раково-эмбрионального антигена (CEA); молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); альфа-2-субъединицы рецептора интерлейкина-13 (IL-13Ra2 или CD213A2); мезотелина; альфа-субъединицы рецептора интерлейкина 11 (IL-11Ra); антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA); сериновой протеазы 21 (тестизина или PRSS21); рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2); антигена системы Льюис (Y); CD24; рецептора фактора роста тромбоцитов бета-типа (PDGFR-бета); стадиеспецифического эмбрионального антигена 4 (SSEA-4); CD20; рецептора фолиевой кислоты альфа; рецепторной тирозинпротеинкиназы ERBB2 (Her2/neu); муцина 1, ассоциированного с клеточной поверхностью (MUC1); рецептора эпидермального фактора роста (EGFR); молекулы адгезии нервных клеток (NCAM); простазы; простатической кислой фосфатазы (PAP); мутантного фактора элонгации 2 (ELF2M); эфрина B2; белка активации фибробластов альфа (FAP); рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (рецептора IGF-I), карбоангидразы IX (CAIX); субъединицы бета-типа 9 протеасомы (просомы, мультикаталитической протеазы) (LMP2); гликопротеина 100 (gp100); онкогенного слитого белка, состоящего из кластерного региона точечных разрывов (BCR) и гомолога 1 онкогена вируса лейкоза мышей Абельсона (Abl) (bcr-abl); тирозиназы; рецептора 2 эфрина A-типа (EphA2); фукозил-GM1; молекулы адгезии, представляющей собой сиалилированный антиген системы Льюис (sLe); ганглиозида GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); трансглутаминазы 5 (TGS5); высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMWMAA); ганглиозида o-ацетил-GD2 (OAcGD2); рецептора фолиевой кислоты бета; опухолевого эндотелиального маркера 1 (TEM1/CD248); белка, родственного опухолевому эндотелиальному маркеру 7 (TEM7R); клаудина 6 (CLDN6); рецептора тиреотропного гормона (TSHR); представителя D группы 5 класса C рецепторов, сопряженных с G-белками (GPRC5D); белка, кодируемого открытой рамкой считывания 61 X-хромосомы (CXORF61); CD97; CD179a; киназы анапластической лимфомы (ALK); полисиаловой кислоты; плацентоспецифического белка 1 (PLAC1); гексасахаридной части гликоцерамида globoH (GloboH); дифференцировочного антигена молочной железы (NY-BR-1); уроплакина 2 (UPK2); клеточного рецептора 1 вируса

гепатита A (HAVCR1); бета-3-адренорецептора (ADRB3); паннексина 3 (PANX3); рецептора 20, сопряженного с G-белком (GPR20); антигена локуса K9 комплекса лимфоцитарных антигенов 6 (LY6K); обонятельного рецептора 51E2 (OR51E2); белка, кодируемого альтернативной рамкой считывания гена TCR-гамма (TARP); белка опухоли Вильмса (WT1); раково-тестикулярного антигена 1 (NY-ESO-1); раково-тестикулярного антигена 2 (LAGE-1a); антигена 1, ассоциированного с меланомой (MAGE-A1); белка, кодируемого транслокационным вариантом 6 гена ETS, локализованным в p-плече 12 хромосомы (ETV6-AML); белка спермы 17 (SPA17); представителя 1A семейства X-антигенов (XAGE1); ангиопоэтин-связывающего рецептора клеточной поверхности 2 (TIE-2); раково-тестикулярного антигена меланомы 1 (MAD-CT-1); раково-тестикулярного антигена меланомы 2 (MAD-CT-2); Fos-родственного антигена 1; опухолевого белка p53 (p53); мутантного p53; простеина; сурвивина; теломеразы; опухолевого антигена 1 карциномы предстательной железы (PCTA-1 или галектина 8), антигена меланомы 1, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1); мутантного антигена саркомы крыс (Ras); обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT); антигена саркомы с точечными разрывами при транслокации; меланомного ингибитора апоптоза (ML-IAP); ERG (продукта слитого гена трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2) и ETS); N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (NA17); белка с парным box-доменом Pax-3 (PAX3); андрогенового рецептора; циклина B1; нейробластомного гомолога онкогена вируса миелоцитоматоза птиц v-myc (MYCN); представителя C семейства гомологов Ras (RhoC); белка 2, родственного тирозиназе (TRP-2); цитохрома P450 1B1 (CYP1B1); белка, подобного CCCTC-связывающему фактору (белку с "цинковыми пальцами") (BORIS или паралога регулятора импринтированных сайтов), антигена плоскоклеточной карциномы 3, распознаваемого Т-клетками (SART3); белка с парным box-доменом Pax-5 (PAX5); проакрозин-связывающего белка sp32 (OY-TES1); лимфоцитоспецифической протеинтирозинкиназы (LCK); якорного белка 4 киназы A (AKAP-4); антигена 2 синовиальной саркомы с точечным разрывом в X-хромосоме (SSX2); рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE-1); почечного убиквитарного белка 1 (RU1); почечного убиквитарного белка 2 (RU2); легумаина; E6 вируса папилломы человека (E6 HPV); E7 вируса папилломы человека (E7 HPV); кишечной карбоксилэстеразы; мутантного белка теплового шока 70-2 (мутантного варианта hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; иммуноглобулиноподобного рецептора 1, ассоциированного с лейкоцитами (LAIR1); рецептора Fc-фрагмента IgA (FCAR или CD89); представителя 2 подсемейства A лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов (LILRA2); представителя f семейства белков, подобных молекулам CD300 (CD300LF); представителя A семейства 12 лектиновых доменов C-типа (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); белка 2, подобного муциноподобному рецептору гормона, содержащего EGF-подобный модуль (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана-3 (GPC3); антигена 5, подобного Fc-рецептору (FCRL5); и полипептида 1, подобного иммуноглобулину лямбда (IGLL1).

CD19

Неограничивающий иллюстративный опухолевый антиген представляет собой CD19. CAR, которые связываются с CD19, известны из уровня техники. Например, они раскрыты в WO2012/079000 и WO2014/153270. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой известный CAR для CD19, например, антигенсвязывающий домен для CD19 из любого известного из уровня техники CAR для CD19. Например, CAR для CD19 LG-740 описан в патенте США № 8399645; патенте США № 7446190; Xu et al., Leuk Lymphoma. 2013 54(2):255-260(2012); Cruz et al., Blood 122(17):2965-2973 (2013); Brentjens et al., Blood, 118(18):4817-4828 (2011); Kochenderfer et al., Blood 116(20):4099-102 (2010); Kochenderfer et al., Blood 122 (25):4129-39 (2013) и 16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther (ASGCT) (May 15-18, Salt Lake City) 2013, Abst 10.

Неограничивающие иллюстративные CAR для CD19 включают CAR для CD19, описанные в данном документе, или CAR для CD19, описанный в Xu et al. Blood 123.24(2014):3750-9; Kochenderfer et al. Blood 122.25(2013):4129-39, Cruz et al. Blood 122.17(2013):2965-73, NCT00586391, NCT01087294, NCT02456350, NCT00840853, NCT02659943, NCT02650999, NCT02640209, NCT01747486, NCT02546739, NCT02656147, NCT02772198, NCT00709033, NCT02081937, NCT00924326, NCT02735083, NCT02794246, NCT02746952, NCT01593696, NCT02134262, NCT01853631, NCT02443831, NCT02277522, NCT02348216, NCT02614066, NCT02030834, NCT02624258, NCT02625480, NCT02030847, NCT02644655, NCT02349698, NCT02813837, NCT02050347, NCT01683279, NCT02529813, NCT02537977, NCT02799550, NCT02672501, NCT02819583, NCT02028455, NCT01840566, NCT01318317, NCT01864889, NCT02706405, NCT01475058, NCT01430390, NCT02146924, NCT02051257, NCT02431988, NCT01815749, NCT02153580, NCT01865617, NCT02208362, NCT02685670, NCT02535364, NCT02631044, NCT02728882, NCT02735291, NCT01860937, NCT02822326, NCT02737085, NCT02465983, NCT02132624, NCT02782351, NCT01493453, NCT02652910, NCT02247609, NCT01029366, NCT01626495, NCT02721407, NCT01044069, NCT00422383, NCT01680991, NCT02794961 или NCT02456207, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержит последовательность слитого полипептида, представленную под SEQ ID NO: 12 в WO2012/079000, в которой представлен scFv-фрагмент мышиного происхождения, который специфично связывается с CD19 человека.

В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12 в WO2012/079000.

В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержит аминокислотную последовательность

diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyf cqqgntlpytfgggtkleitggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkglewlgviwg settyynsalksrltiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtvsstttpaprpptpaptiasqplslrp eacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfs

rsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdgly qglstatkdtydalhmqalppr (SEQ ID NO: 757) или последовательность, по существу гомологичную ей.

В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержит аминокислотную последовательность eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgnt lpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyy qsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss (SEQ ID NO: 758).

В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 представляет собой гуманизированный CAR для CD19, содержащий аминокислотную последовательность

eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavy fcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviw gsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslr peacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkf srsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdgl yqglstatkdtydalhmqalppr (SEQ ID NO: 759).

В некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержат последовательность, например, CDR, VH, VL, scFv или полную последовательность CAR, раскрытую в таблице 1 ниже, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ней.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности иллюстративных молекул, связывающихся с CD19

SEQ ID NO	**Область**	**Последовательность**
CTL019		
760	HCDR1 (Kabat)	DYGVS
761	HCDR2 (Kabat)	VIWGSETTYYNSALKS
762	HCDR3 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY
763	LCDR1 (Kabat)	RASQDISKYLN
764	LCDR2 (Kabat)	HTSRLHS
765	LCDR3 (Kabat)	QQGNTLPYT
766	Полная аминокислотная последовательность CTL019	MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvti scrasqdiskylnwyqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysl tisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggsggggsggggsev klqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkglewlgviw gsettyynsalksrltiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyygg syamdywgqgtsvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaagga

		vhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrp vqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnl grreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
685	Полная нуклеотидная последовательность CTL019	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgc cgccaggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctct ctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaa tatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctac catacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggt ctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgcc acttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggga ccaagctggagatcacaggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggt ggcggcggatctgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggc gccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattaccc gactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtgg ctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatc cagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatg aacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattattac tacggtggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctcagtcacc gtctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgccca ccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcg gcgggggggcgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatatcta catctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttat caccctttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaa ccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgcc gatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagca ggagcgcagacgcccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataa cgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacg tggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctca ggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctaca gtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatg gcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttc acatgcaggccctgcccccctcgc
686	scFv-домен CTL019	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvklliyhts rlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtklei

		tggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdyg vswirqpprkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnsksqvflkmn slqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtvss
Гуманизированный CAR2		
760	HCDR1 (Kabat)	DYGVS
687	HCDR2 (Kabat)	VIWGSETTYYQSSLKS
762	HCDR3 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY
763	LCDR1 (Kabat)	RASQDISKYLN
764	LCDR2 (Kabat)	HTSRLHS
76-	LCDR3 (Kabat)	QQGNTLPYT
758	scFv-домен CAR2 - а. к. (линкер подчеркнут)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEW IGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAV-YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
688	scFv-домен CAR2 - н. к.	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgc cgctcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcac ccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaat accttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctac cacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcgga tctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcg ctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctttggacagggc accaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccg gcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtg aagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctcccc gattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatg gattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtc acgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactg tcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta

		ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcacc gt-tccagccaccaccatcatcaccatcaccat
689	CAR2 - полный - а. к.	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSL SPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRL LIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG VSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYY QSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERR- GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
690	CAR2 - полный - н. к.	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgc cgctcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcac ccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaat accttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctac cacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcgga tctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcg ctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctttggacagggc accaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccg gcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtg aagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctcccc gattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatg gattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtc acgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactg tcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcacc gtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctac catcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacattt

		gggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcact ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctt catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggtt cccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacga actcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagc gagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgga ctgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcac atgcaggccctgccgcctcgg
349	CAR 2A - полная аминокислотная последовательность; сигнальный пептид подчеркнут	<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u>EIVMTQSPATLSL SPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRL LIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG VSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYY QSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR
225	CAR 2A - аминокислотная последовательность; сигнальный пептид отсутствует	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEW IGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ GTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL

		LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
354	CAR 2A - полная последовательность нуклеиновой кислоты; сигнальный пептид и стоп-кодон подчеркнуты	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgc cgctcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcac ccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaat accttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctac cacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcgga tctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcg ctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctttggacagggc accaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccg gcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtg aagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctcccc gattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatg gattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtc acgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactg tcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcacc gtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctac catcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacattt gggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcact ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctt catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggtt cccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacga actcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagc gagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgga ctgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcac atgcaggccctgccgcctcggtaa
355	CAR 2A -	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgc

	последовательность нуклеиновой кислоты; сигнальный пептид подчеркнут; стоп-кодон отсутствует	cgctcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcac ccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaat accttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctac cacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcgga tctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcg ctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctttggacagggc accaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccg gcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtg aagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctcccc gattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatg gattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtc acgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactg tcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcacc gtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctac catcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacattt gggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcact ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctt catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggtt cccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacga actcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagc gagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgga ctgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcac atgcaggccctgccgcctcgg
356	CAR 2A - последовательность нуклеиновой кислоты; сигнальный пептид отсутствует; стоп-кодон подчеркнут	gaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagc gcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccg actacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttct gtcagcaagggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctc gagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggtggag

		gaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatca gaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggg gtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtg atttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcac catctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtga ccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgg gagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccag caccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcct cccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggg gccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccc tctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgt aagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggc ctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagagg aggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcaga tgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatct tggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggga cccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcct gtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattg gtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtacca gggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcggtaa
417	CAR 2A - последовательность нуклеиновой кислоты; сигнальный пептид отсутствует; стоп-кодон отсутствует	gaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagc gcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagcc ggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccg actacaccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttct gtcagcaagggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctc gagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggtggag gaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatca gaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggg gtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtg atttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcac catctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtga ccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgg gagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccag

		caccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcct cccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggg gccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccc tctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgt aagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggc ctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagagg aggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcaga tgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatct tggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacggga cccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcct gtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattg gtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtacca gggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
250	VH для CD19	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVT ISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGTLVTVSS
251	VL для CD19	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIK
331	VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPGKCLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVT ISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYY GGSYAMDYWGQGTLVTVSS
332	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLN WYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGCGT KLEIK

BCMA

Неограничивающий иллюстративный опухолевый антиген представляет собой BCMA. CAR, которые связываются с BCMA, известны из уровня техники. Например, они раскрыты в WO2016/014565 или WO2019/241426. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой известный CAR для BCMA, например,

антигенсвязывающий домен для BCMA из любого известного из уровня техники CAR для BCMA. Например, BCMA-1, BCMA-2, BCMA-3, BCMA-4, BCMA-5, BCMA-6, BCMA-7, BCMA-8, BCMA-9, BCMA-10, BCMA-11, BCMA-12, BCMA-13, BCMA-14, BCMA-15, 149362, 149363, 149364, 149365, 149366, 149367, 149368, 149369, BCMA_EBB-C1978-A4, BCMA_EBB-C1978-G1, BCMA_EBB-C1979-C1, BCMA_EBB-C1978-C7, BCMA_EBB-C1978-D10, BCMA_EBB-C1979-C12, BCMA_EBB-C1980-G4, BCMA_EBB-C1980-D2, BCMA_EBB-C1978-A10, BCMA_EBB-C1978-D4, BCMA_EBB-C1980-A2, BCMA_EBB-C1981-C3, BCMA_EBB-C1978-G4, A7D12.2, C11D5.3, C12A3.2 или C13F12.1, раскрытые в WO2016/014565.

В некоторых вариантах осуществления CAR для BCMA содержит одну или несколько CDR, VH, VL, scFv или полноразмерных последовательностей BCMA-1, BCMA-2, BCMA-3, BCMA-4, BCMA-5, BCMA-6, BCMA-7, BCMA-8, BCMA-9, BCMA-10, BCMA-11, BCMA-12, BCMA-13, BCMA-14, BCMA-15, 149362, 149363, 149364, 149365, 149366, 149367, 149368, 149369, BCMA_EBB-C1978-A4, BCMA_EBB-C1978-G1, BCMA_EBB-C1979-C1, BCMA_EBB-C1978-C7, BCMA_EBB-C1978-D10, BCMA_EBB-C1979-C12, BCMA_EBB-C1980-G4, BCMA_EBB-C1980-D2, BCMA_EBB-C1978-A10, BCMA_EBB-C1978-D4, BCMA_EBB-C1980-A2, BCMA_EBB-C1981-C3, BCMA_EBB-C1978-G4, A7D12.2, C11D5.3, C12A3.2 или C13F12.1, раскрытых в WO2016/014565, или последовательность, по существу (например, на 95-99%) идентичную им.

В некоторых вариантах осуществления CAR для BCMA содержит последовательность, например, CDR, VH, VL, scFv или полную последовательность CAR, раскрытую в таблицах 2-14, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ней.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот для иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из PALLAS

SEQ ID NO	**Название/ описание**	**Последовательность**
R1B6		
SEQ ID NO: 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 46	HCDR3 (Kabat)	REWVPYDVSWYFDY
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS

NO: 48		
SEQ ID NO: 46	HCDR3 (Chothia)	REWVPYDVSWYFDY
SEQ ID NO: 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
SEQ ID NO: 51	HCDR3 (IMGT)	ARREWVPYDVSWYFDY
SEQ ID NO: 52	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WVPYDVSWYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 53	ДНК VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACT GGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCGCTTGAGCTG CGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTACGCC ATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGG ACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGG CGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGG CCGCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGAA CACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAGGGC CGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACG GGAGTGGGTGCCCTACGATGTCAGCTGGTACTT CGACTACTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGT GTCCTCC
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY
SEQ ID	LCDR2 (Chothia)	AAS

NO: 58		
SEQ ID NO: 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL
SEQ ID NO: 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
SEQ ID NO: 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEI K
SEQ ID NO: 62	ДНК VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTC TCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACGATCACG TGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTG AACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACC GAAGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCA GTCCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGG CTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAG CCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTG TCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGG CCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 64	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WVPYDVSWYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGQGTKVEIK
SEQ ID	ДНК scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACT

NO: 65		GGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCGCTTGAGCTG CGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTACGCC ATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGG ACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGG CGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGG CCGCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGAA CACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAGGGC CGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACG GGAGTGGGTGCCCTACGATGTCAGCTGGTACTT CGACTACTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGT GTCCTCCGGTGGTGGTGGATCGGGGGGTGGTGG TTCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGT CGGACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCC TCTCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACGATCA CGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACC TGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCA CCGAAGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTG CAGTCCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCG GGCTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGC AGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTAC TGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTC GGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
SEQ ID NO: 66	Полная аминокислотная последовательность CAR	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WVPYDVSWYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG

		KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 67	Полная последовательность ДНК CAR	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACT GGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCGCTTGAGCTG CGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTACGCC ATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGG ACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGG CGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGG CCGCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGAA CACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAGGGC CGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACG GGAGTGGGTGCCCTACGATGTCAGCTGGTACTT CGACTACTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGT GTCCTCCGGTGGTGGTGGATCGGGGGGTGGTGG TTCGGGCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGT CGGACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCC TCTCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACGATCA CGTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACC TGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCA CCGAAGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTG CAGTCCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCG GGCTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGC AGCCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTAC TGTCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTC GGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAGACCAC TACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCC TACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCG TGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATA TCTACATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCG GGGTCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTA CTGTAAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACAT CTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGAC TACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTT CCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGC GCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCA

		GCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAA CGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACG ACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCA GAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCC CCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGG ATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGT ATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCC ACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCC ACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAG GCCCTGCCGCCTCGG
R1F2		
SEQ ID NO: 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 68	HCDR3 (Kabat)	REWWYDDWYLDY
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS
SEQ ID NO: 68	HCDR3 (Chothia)	REWWYDDWYLDY
SEQ ID NO: 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
SEQ ID NO: 69	HCDR3 (IMGT)	ARREWWYDDWYLDY
SEQ ID NO: 70	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WWYDDWYLDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID	ДНК VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACT

NO: 71		GGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCGCTTGAGCTG CGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTACGCC ATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGG ACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGG CGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGG CCGCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGAA CACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAGGGC CGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACG GGAGTGGTGGTACGACGATTGGTACCTGGACTA CTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCCTC C
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY
SEQ ID NO: 58	LCDR2 (Chothia)	AAS
SEQ ID NO: 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL
SEQ ID NO: 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
SEQ ID NO: 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEI K
SEQ ID	ДНК VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTC

NO: 62		TCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACGATCACG TGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTG AACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACC GAAGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCA GTCCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGG CTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAG CCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTG TCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGG CCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 72	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WWYDDWYLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 73	ДНК scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACT GGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCGCTTGAGCTG CGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTACGCC ATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGG ACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGG CGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGG CCGCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGAA CACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAGGGC CGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACG GGAGTGGTGGTACGACGATTGGTACCTGGACTA CTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCCTC CGGTGGTGGTGGATCGGGGGGTGGTGGTTCGG GCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGAC ATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTCTCC GCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACGATCACGTGC AGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAA

		CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGA AGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGT CCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCT CAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGCC TGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTC AGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCC AAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
SEQ ID NO: 74	Полная аминокислотная последовательность CAR	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WWYDDWYLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 75	Полная последовательность ДНК CAR	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACT GGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCGCTTGAGCTG CGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTACGCC ATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGG ACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGG CGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGG CCGCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGAA CACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAGGGC CGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACG GGAGTGGTGGTACGACGATTGGTACCTGGACTA CTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCCTC CGGTGGTGGTGGATCGGGGGGTGGTGGTTCGG GCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGAC ATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTCTCC

		GCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACGATCACGTGC AGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAA CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGA AGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGT CCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCT CAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGCC TGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTC AGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCC AAGGGACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACC CCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACC ATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAG GCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCAT ACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTAC ATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTC CTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTA AGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTA AGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTC AAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCA GAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGT GAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTA CCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAAC TCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTG CTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAAT GGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAG ATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAA AGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGAC GGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAA GGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCT GCCGCCTCGG
R1G5		
SEQ ID NO: 44	HCDR1 (Kabat)	SYAMS
SEQ ID NO: 45	HCDR2 (Kabat)	AISGSGGSTYYADSVKG

SEQ ID NO: 76	HCDR3 (Kabat)	REWWGESWLFDY
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 48	HCDR2 (Chothia)	SGSGGS
SEQ ID NO: 76	HCDR3 (Chothia)	REWWGESWLFDY
SEQ ID NO: 49	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 50	HCDR2 (IMGT)	ISGSGGST
SEQ ID NO: 77	HCDR3 (IMGT)	ARREWWGESWLFDY
SEQ ID NO: 78	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WWGESWLFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 79	ДНК VH	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACT GGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCGCTTGAGCTG CGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTACGCC ATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGG ACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGG CGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGG CCGCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGAA CACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAGGGC CGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACG GGAGTGGTGGGGAGAAAGCTGGCTGTTCGACT ACTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCCT CC
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Kabat)	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Kabat)	AASSLQS

SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Kabat)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 57	LCDR1 (Chothia)	SQSISSY
SEQ ID NO: 58	LCDR2 (Chothia)	AAS
SEQ ID NO: 59	LCDR3 (Chothia)	SYSTPL
SEQ ID NO: 60	LCDR1 (IMGT)	QSISSY
SEQ ID NO: 58	LCDR2 (IMGT)	AAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (IMGT)	QQSYSTPLT
SEQ ID NO: 61	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEI K
SEQ ID NO: 62	ДНК VL	GACATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTC TCCGCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACGATCACG TGCAGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTG AACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACC GAAGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCA GTCCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGG CTCAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAG CCTGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTG TCAGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGG CCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 80	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WWGESWLFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG

		GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLT FGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 81	ДНК scFv	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACT GGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCGCTTGAGCTG CGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTACGCC ATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGG ACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGG CGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGG CCGCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGAA CACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAGGGC CGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACG GGAGTGGTGGGGAGAAAGCTGGCTGTTCGACT ACTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCCT CCGGTGGTGGTGGATCGGGGGGTGGTGGTTCGG GCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGAC ATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTCTCC GCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACGATCACGTGC AGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAA CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGA AGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGT CCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCT CAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGCC TGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTC AGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCC AAGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
SEQ ID NO: 82	Полная аминокислотная последовательность CAR	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRE WWGESWLFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLT FGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA

		CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 83	Полная последовательность ДНК CAR	GAAGTGCAGTTGCTGGAGTCAGGCGGAGGACT GGTGCAGCCCGGAGGATCGCTTCGCTTGAGCTG CGCAGCCTCAGGCTTTACCTTCTCCTCCTACGCC ATGTCCTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGG ACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGTTCCGG CGGAAGCACTTACTATGCCGACTCTGTGAAGGG CCGCTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGAA CACCCTGTATCTCCAAATGAATTCCCTGAGGGC CGAAGATACCGCGGTGTACTACTGCGCTAGACG GGAGTGGTGGGGAGAAAGCTGGCTGTTCGACT ACTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTCCT CCGGTGGTGGTGGATCGGGGGGTGGTGGTTCGG GCGGAGGAGGATCTGGAGGAGGAGGGTCGGAC ATTCAAATGACTCAGTCCCCGTCCTCCCTCTCC GCCTCCGTGGGAGATCGCGTCACGATCACGTGC AGGGCCAGCCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAA CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCGA AGCTCCTGATCTACGCCGCTAGCTCGCTGCAGT CCGGCGTCCCTTCACGGTTCTCGGGATCGGGCT CAGGCACCGACTTCACCCTGACCATTAGCAGCC TGCAGCCGGAGGACTTCGCGACATACTACTGTC AGCAGTCATACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCC AAGGGACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACC CCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACC ATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAG GCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCAT ACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTAC ATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTC CTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTA

		AGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTA AGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTC AAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCA GAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGT GAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTA CCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAAC TCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTG CTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAAT GGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAG AGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAG ATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAA AGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGAC GGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAA GGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCT GCCGCCTCGG

Таблица 3. CDR по Kabat иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из PALLAS

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	SYAMS (SEQ ID NO: 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (SEQ ID NO: 45)	REWVPYDV SWYFDY (SEQ ID NO: 46)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO: 54)	AASSL QS (SEQ ID NO: 55)	QQSYST PLT (SEQ ID NO: 56)
R1F2	SYAMS (SEQ ID NO: 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (SEQ ID NO: 45)	REWWYDD WYLDY (SEQ ID NO: 68)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO: 54)	AASSL QS (SEQ ID NO: 55)	QQSYST PLT (SEQ ID NO: 56)
R1G5	SYAMS (SEQ ID NO: 44)	AISGSGGSTY YADSVKG (SEQ ID NO: 45)	REWWGES WLFDY (SEQ ID NO: 76)	RASQSISS YLN (SEQ ID NO: 54)	AASSL QS (SEQ ID NO: 55)	QQSYST PLT (SEQ ID NO: 56)
Консенсусная	SYAMS (SEQ ID	AISGSGGSTY YADSVKG	REWX$_1$X$_2$X$_3$ X$_4$X$_5$X$_6$WX$_7$	RASQSISS YLN (SEQ	AASSL QS	QQSYST PLT

последовательность	NO: 44)	(SEQ ID NO: 45)	X_8DY, где X_1 отсутствует или представляет собой V; X_2 отсутствует или представляет собой P; X_3 представляет собой W или Y; X_4 представляет собой G, Y или D; X_5 представляет собой E, D или V; X_6 представляет собой S или D; X_7 представляет собой L или Y; и X_8 представляет собой F или L (SEQ ID NO: 84)	ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 56)

Таблица 4. CDR по Chothia иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из PALLAS

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SGSGGS (SEQ ID NO: 48)	REWVPYDV SWYFDY (SEQ ID NO: 46)	SQSISSY (SEQ ID NO: 57)	AAS (SEQ ID NO: 58)	SYSTPL (SEQ ID NO: 59)

R1F2	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SGSGGS (SEQ ID NO: 48)	REWWYDD WYLDY (SEQ ID NO: 68)	SQSISSY (SEQ ID NO: 57)	AAS (SEQ ID NO: 58)	SYSTPL (SEQ ID NO: 59)
R1G5	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SGSGGS (SEQ ID NO: 48)	REWWGES WLFDY (SEQ ID NO: 76)	SQSISSY (SEQ ID NO: 57)	AAS (SEQ ID NO: 58)	SYSTPL (SEQ ID NO: 59)
Консенсусная последовательность	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SGSGGS (SEQ ID NO: 48)	REW$X_1X_2X_3$ $X_4X_5X_6$WX_7 X_8DY, где X_1 отсутствует или представляет собой V; X_2 отсутствует или представляет собой P; X_3 представляет собой W или Y; X_4 представляет собой G, Y или D; X_5 представляет собой E, D или V; X_6 представляет собой S или D; X_7 представляет собой L или Y; и X_8 представляет	SQSISSY (SEQ ID NO: 57)	AAS (SEQ ID NO: 58)	SYSTPL (SEQ ID NO: 59)

			собой F или L (SEQ ID NO: 84)			

Таблица 5. CDR по IMGT иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из PALLAS

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
R1B6	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 49)	ISGSGGST (SEQ ID NO: 50)	ARREWVPYDVSWYFDY (SEQ ID NO: 51)	QSISSY (SEQ ID NO: 60)	AAS (SEQ ID NO: 58)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 56)
R1F2	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 49)	ISGSGGST (SEQ ID NO: 50)	ARREWWYDDWYLDY (SEQ ID NO: 69)	QSISSY (SEQ ID NO: 60)	AAS (SEQ ID NO: 58)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 56)
R1G5	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 49)	ISGSGGST (SEQ ID NO: 50)	ARREWWGESWLFDY (SEQ ID NO: 77)	QSISSY (SEQ ID NO: 60)	AAS (SEQ ID NO: 58)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 56)
Консенсусная последовательность	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 49)	ISGSGGST (SEQ ID NO: 50)	ARREW$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$WX_7X_8DY, где X_1 отсутствует или представляет собой V; X_2 отсутствует или представляет собой P; X_3 представляет собой W или Y; X_4 представляет собой G, Y	QSISSY (SEQ ID NO: 60)	AAS (SEQ ID NO: 58)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 56)

			или D; X_5 представляет собой E, D или V; X_6 представляет собой S или D; X_7 представляет собой L или Y; и X_8 представляет собой F или L (SEQ ID NO: 85)			

Таблица 6. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из B-клеток

SEQ ID NO	**Название/ описание**	**Последовательность**
PI61		
SEQ ID NO: 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
SEQ ID NO: 87	HCDR2 (Kabat)	VISYDGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 89	HCDR2 (Chothia)	SYDGSN
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
SEQ ID	HCDR2 (IMGT)	ISYDGSNK

NO: 91		
SEQ ID NO: 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 93	VH	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSG YALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 94	ДНК VH	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGT CGTGCAGCCTGGAAGGAGCCTGAGACTCTCATG CGCCGCGTCAGGGTTCACCTTTTCCTCCTACGG GATGCATTGGGTCAGACAGGCCCCCGGAAAGG GACTCGAATGGGTGGCTGTGATCAGCTACGACG GCTCCAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAAG GCCGGTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAATTCACTGCGCG CGGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGGTGGCT CCGGTTACGCCCTGCACGATGACTATTACGGCC TTGACGTCTGGGGCCAGGGAACCCTCGTGACTG TGTCCAGC
SEQ ID NO: 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
SEQ ID NO: 96	LCDR2 (Kabat)	DVSNRPS
SEQ ID NO: 97	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSTLYV
SEQ ID NO: 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY
SEQ ID NO: 99	LCDR2 (Chothia)	DVS
SEQ ID NO: 100	LCDR3 (Chothia)	YTSSSTLY
SEQ ID NO: 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY
SEQ ID	LCDR2 (IMGT)	DVS

NO: 99		
SEQ ID NO: 97	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSTLYV
SEQ ID NO: 102	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYV SWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKS GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGS GTKVTVL
SEQ ID NO: 103	ДНК VL	CAGAGCGCACTGACTCAGCCGGCATCCGTGTCC GGTAGCCCCGGACAGTCGATTACCATCTCCTGT ACCGGCACCTCCTCCGACGTGGGAGGGTACAA CTACGTGTCGTGGTACCAGCAGCACCCAGGAA AGGCCCCTAAGTTGATGATCTACGATGTGTCAA ACCGCCCGTCTGGAGTCTCCAACCGGTTCTCCG GCTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACCA TTAGCGGGCTGCAAGCCGAGGATGAGGCCGAC TACTACTGCTCGAGCTACACATCCTCGAGCACC CTCTACGTGTTCGGCTCGGGGACTAAGGTCACC GTGCTG
SEQ ID NO: 104	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 105	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSG YALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG GYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSST LYVFGSGTKVTVL
SEQ ID NO: 106	ДНК scFv	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGT CGTGCAGCCTGGAAGGAGCCTGAGACTCTCATG CGCCGCGTCAGGGTTCACCTTTTCCTCCTACGG GATGCATTGGGTCAGACAGGCCCCCGGAAAGG GACTCGAATGGGTGGCTGTGATCAGCTACGACG GCTCCAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAAG GCCGGTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGA

		ACACGCTGTATCTGCAAATGAATTCACTGCGCG CGGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGGTGGCT CCGGTTACGCCCTGCACGATGACTATTACGGCC TTGACGTCTGGGGCCAGGGAACCCTCGTGACTG TGTCCAGCGGTGGAGGAGGTTCGGGCGGAGGA GGATCAGGAGGGGGTGGATCGCAGAGCGCACT GACTCAGCCGGCATCCGTGTCCGGTAGCCCCGG ACAGTCGATTACCATCTCCTGTACCGGCACCTC CTCCGACGTGGGAGGGTACAACTACGTGTCGTG GTACCAGCAGCACCCAGGAAAGGCCCCTAAGT TGATGATCTACGATGTGTCAAACCGCCCGTCTG GAGTCTCCAACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCG GCAACACCGCCAGCCTGACCATTAGCGGGCTGC AAGCCGAGGATGAGGCCGACTACTACTGCTCG AGCTACACATCCTCGAGCACCCTCTACGTGTTC GGCTCGGGGACTAAGGTCACCGTGCTG
SEQ ID NO: 107	Полная аминокислотная последовательность CAR	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSG YALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG GYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNR FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSST LYVFGSGTKVTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 108	Полная последовательность ДНК CAR	CAAGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTGGCGGAGT CGTGCAGCCTGGAAGGAGCCTGAGACTCTCATG CGCCGCGTCAGGGTTCACCTTTTCCTCCTACGG GATGCATTGGGTCAGACAGGCCCCCGGAAAGG GACTCGAATGGGTGGCTGTGATCAGCTACGACG

		GCTCCAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAAG GCCGGTTCACTATCTCCCGGGACAACTCCAAGA ACACGCTGTATCTGCAAATGAATTCACTGCGCG CGGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGGTGGCT CCGGTTACGCCCTGCACGATGACTATTACGGCC TTGACGTCTGGGGCCAGGGAACCCTCGTGACTG TGTCCAGCGGTGGAGGAGGTTCGGGCGGAGGA GGATCAGGAGGGGGTGGATCGCAGAGCGCACT GACTCAGCCGGCATCCGTGTCCGGTAGCCCCGG ACAGTCGATTACCATCTCCTGTACCGGCACCTC CTCCGACGTGGGAGGGTACAACTACGTGTCGTG GTACCAGCAGCACCCAGGAAAGGCCCCTAAGT TGATGATCTACGATGTGTCAAACCGCCCGTCTG GAGTCTCCAACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCG GCAACACCGCCAGCCTGACCATTAGCGGGCTGC AAGCCGAGGATGAGGCCGACTACTACTGCTCG AGCTACACATCCTCGAGCACCCTCTACGTGTTC GGCTCGGGGACTAAGGTCACCGTGCTGACCACT ACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCT ACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCG GAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGT GCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATAT CTACATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGG GGTCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTAC TGTAAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATC TTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACT ACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTC CCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCG CGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGC CTACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACG AACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGAC GTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGA AATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCC AAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGAT AAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTAT

		GAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCAC GACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
B61-02		
SEQ ID NO: 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
SEQ ID NO: 109	HCDR2 (Kabat)	VISYKGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY
SEQ ID NO: 110	HCDR2 (Chothia)	SYKGSN
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
SEQ ID NO: 111	HCDR2 (IMGT)	ISYKGSNK
SEQ ID NO: 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 112	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSG YALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 113	ДНК VH	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGAGT GGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTCTCATG TGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGAGCTACGG CATGCACTGGGTCAGACAAGCCCCAGGAAAGG GCCTGGAATGGGTGGCTGTCATCTCGTACAAGG GCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATAACTCCAAG AATACCCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGG

		GCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGGGGT TCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGA TTGGACGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACC GTGTCCTCT
SEQ ID NO: 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
SEQ ID NO: 114	LCDR2 (Kabat)	EVSNRLR
SEQ ID NO: 115	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSALYV
SEQ ID NO: 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY
SEQ ID NO: 116	LCDR2 (Chothia)	EVS
SEQ ID NO: 117	LCDR3 (Chothia)	YTSSSALY
SEQ ID NO: 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY
SEQ ID NO: 116	LCDR2 (IMGT)	EVS
SEQ ID NO: 115	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSALYV
SEQ ID NO: 118	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYV SWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRLRGVSNRFSGSKS GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSALYVFGS GTKVTVL
SEQ ID NO: 119	ДНК VL	CAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGAGC GGTTCGCCGGGACAGTCCATTACCATTTCGTGC ACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCTACAA CTACGTGTCCTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAA GGCCCCGAAGCTGATGATCTACGAAGTGTCGA ACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTTTCCG GGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACC ATCAGCGGGCTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGA

		CTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCGC CCTCTACGTGTTCGGGTCCGGGACCAAAGTCAC TGTGCTG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 120	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSG YALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTG TSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRL RGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS YTSSSALYVFGSGTKVTVL
SEQ ID NO: 121	ДНК scFv	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGAGT GGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTCTCATG TGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGAGCTACGG CATGCACTGGGTCAGACAAGCCCCAGGAAAGG GCCTGGAATGGGTGGCTGTCATCTCGTACAAGG GCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATAACTCCAAG AATACCCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGGGGT TCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGA TTGGACGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACC GTGTCCTCTGGTGGAGGCGGATCAGGGGGTGG CGGATCTGGGGGTGGTGGTTCCGGGGGAGGAG GATCGCAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCG TGAGCGGTTCGCCGGGACAGTCCATTACCATTT CGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCT ACAACTACGTGTCCTGGTACCAGCAGCATCCCG GAAAGGCCCCGAAGCTGATGATCTACGAAGTG TCGAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTT TCCGGGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTG ACCATCAGCGGGCTCCAGGCAGAAGATGAGGC TGACTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTC

		CGCCCTCTACGTGTTCGGGTCCGGGACCAAAGT CACTGTGCTG
SEQ ID NO: 122	Полная аминокислотная последовательность CAR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSG YALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTG TSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRL RGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS YTSSSALYVFGSGTKVTVLTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
SEQ ID NO: 123	Полная последовательность ДНК CAR	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGAGT GGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTCTCATG TGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGAGCTACGG CATGCACTGGGTCAGACAAGCCCCAGGAAAGG GCCTGGAATGGGTGGCTGTCATCTCGTACAAGG GCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATAACTCCAAG AATACCCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGGGGT TCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGA TTGGACGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACC GTGTCCTCTGGTGGAGGCGGATCAGGGGGTGG CGGATCTGGGGGTGGTGGTTCCGGGGGAGGAG GATCGCAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCG TGAGCGGTTCGCCGGGACAGTCCATTACCATTT CGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCT ACAACTACGTGTCCTGGTACCAGCAGCATCCCG GAAAGGCCCCGAAGCTGATGATCTACGAAGTG

		TCGAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTT TCCGGGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTG ACCATCAGCGGGCTCCAGGCAGAAGATGAGGC TGACTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTC CGCCCTCTACGTGTTCGGGTCCGGGACCAAAGT CACTGTGCTGACCACTACCCCAGCACCGAGGCC ACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCC TCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGC AGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGA CTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCTCTG GCTGGTACTTGCGGGGTCCTGCTGCTTTCACTC GTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAG AAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATG AGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGG CTGTTCATGCCGGTTCCCAGAGGAGGAGGAAG GCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGC AGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCA GAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCG GAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGA GAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCG CGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAA CGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCT ATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGA AGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGG ACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACG CTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCCTCGG
B61-10		
SEQ ID NO: 86	HCDR1 (Kabat)	SYGMH
SEQ ID NO: 109	HCDR2 (Kabat)	VISYKGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Kabat)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 47	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSY

SEQ ID NO: 110	HCDR2 (Chothia)	SYKGSN
SEQ ID NO: 88	HCDR3 (Chothia)	SGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 90	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSYG
SEQ ID NO: 111	HCDR2 (IMGT)	ISYKGSNK
SEQ ID NO: 92	HCDR3 (IMGT)	GGSGYALHDDYYGLDV
SEQ ID NO: 112	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSG YALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 113	ДНК VH	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGAGT GGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTCTCATG TGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGAGCTACGG CATGCACTGGGTCAGACAAGCCCCAGGAAAGG GCCTGGAATGGGTGGCTGTCATCTCGTACAAGG GCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATAACTCCAAG AATACCCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGGGGT TCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGA TTGGACGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACC GTGTCCTCT
SEQ ID NO: 95	LCDR1 (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
SEQ ID NO: 114	LCDR2 (Kabat)	EVSNRLR
SEQ ID NO: 97	LCDR3 (Kabat)	SSYTSSSTLYV
SEQ ID NO: 98	LCDR1 (Chothia)	TSSDVGGYNY

SEQ ID NO: 116	LCDR2 (Chothia)	EVS
SEQ ID NO: 100	LCDR3 (Chothia)	YTSSSTLY
SEQ ID NO: 101	LCDR1 (IMGT)	SSDVGGYNY
SEQ ID NO: 116	LCDR2 (IMGT)	EVS
SEQ ID NO: 97	LCDR3 (IMGT)	SSYTSSSTLYV
SEQ ID NO: 124	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYV SWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRLRGVSNRFSGSKS GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGS GTKVTVL
SEQ ID NO: 125	ДНК VL	CAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGAGC GGTTCGCCGGGACAGTCCATTACCATTTCGTGC ACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCTACAA CTACGTGTCCTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAA GGCCCCGAAGCTGATGATCTACGAAGTGTCGA ACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTTTCCG GGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTGACC ATCAGCGGGCTCCAGGCAGAAGATGAGGCTGA CTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTCCAC CCTCTACGTGTTCGGGTCCGGGACCAAAGTCAC TGTGCTG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 126	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSG YALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTG TSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRL RGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS

		YTSSSTLYVFGSGTKVTVL
SEQ ID NO: 127	ДНК scFv	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGAGT GGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTCTCATG TGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGAGCTACGG CATGCACTGGGTCAGACAAGCCCCAGGAAAGG GCCTGGAATGGGTGGCTGTCATCTCGTACAAGG GCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATAACTCCAAG AATACCCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGGGGT TCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGA TTGGACGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACC GTGTCCTCTGGTGGAGGCGGATCAGGGGGTGG CGGATCTGGGGGTGGTGGTTCCGGGGGAGGAG GATCGCAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCG TGAGCGGTTCGCCGGGACAGTCCATTACCATTT CGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCT ACAACTACGTGTCCTGGTACCAGCAGCATCCCG GAAAGGCCCCGAAGCTGATGATCTACGAAGTG TCGAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTT TCCGGGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTG ACCATCAGCGGGCTCCAGGCAGAAGATGAGGC TGACTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTC CACCCTCTACGTGTTCGGGTCCGGGACCAAAGT CACTGTGCTG
SEQ ID NO: 128	Полная аминокислотная последовательность CAR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYKGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSG YALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTG TSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRL RGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSS YTSSSTLYVFGSGTKVTVLTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR

		PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
SEQ ID NO: 129	Полная последовательность ДНК CAR	CAAGTGCAGCTTGTCGAATCGGGAGGCGGAGT GGTGCAGCCTGGACGATCGCTCCGGCTCTCATG TGCCGCGAGCGGATTCACCTTCTCGAGCTACGG CATGCACTGGGTCAGACAAGCCCCAGGAAAGG GCCTGGAATGGGTGGCTGTCATCTCGTACAAGG GCTCAAACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATAACTCCAAG AATACCCTCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGGGGGT TCAGGCTACGCGCTGCACGACGACTACTACGGA TTGGACGTCTGGGGCCAAGGAACTCTTGTGACC GTGTCCTCTGGTGGAGGCGGATCAGGGGGTGG CGGATCTGGGGGTGGTGGTTCCGGGGGAGGAG GATCGCAGAGCGCGCTGACTCAGCCTGCCTCCG TGAGCGGTTCGCCGGGACAGTCCATTACCATTT CGTGCACCGGGACCTCCTCCGACGTGGGAGGCT ACAACTACGTGTCCTGGTACCAGCAGCATCCCG GAAAGGCCCCGAAGCTGATGATCTACGAAGTG TCGAACAGACTGCGGGGAGTCTCCAACCGCTTT TCCGGGTCCAAGTCCGGCAACACCGCCAGCCTG ACCATCAGCGGGCTCCAGGCAGAAGATGAGGC TGACTATTACTGCTCCTCCTACACGTCAAGCTC CACCCTCTACGTGTTCGGGTCCGGGACCAAAGT CACTGTGCTGACCACTACCCCAGCACCGAGGCC ACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCC TCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGC AGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGA CTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCTCTG GCTGGTACTTGCGGGGTCCTGCTGCTTTCACTC GTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAG

		AAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATG AGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGG CTGTTCATGCCGGTTCCCAGAGGAGGAGGAAG GCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGC AGCGCAGATGCTCCAGCCTACCAGCAGGGGCA GAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCG GAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGA GAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCG CGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAA CGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCT ATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGA AGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGG ACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACG CTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCCTCGG

Таблица 7. CDR по Kabat иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из B-клеток

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	SYGMH (SEQ ID NO: 86)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 87)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 95)	DVSNRPS (SEQ ID NO: 96)	SSYTSSSTLYV (SEQ ID NO: 97)
B61-02	SYGMH (SEQ ID NO: 86)	VISYKGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 109)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 95)	EVSNRLR (SEQ ID NO: 114)	SSYTSSSALYV (SEQ ID NO: 115)
B61-10	SYGMH (SEQ ID NO: 86)	VISYKGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 109)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 95)	EVSNRLR (SEQ ID NO: 114)	SSYTSSSTLYV (SEQ ID NO: 97)
Консенсусная последо	SYGMH (SEQ ID NO: 86)	VISYXGSNKYYADSVKG, где X	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ	X_1VSNRX_2X_3, где X_1 представляе	SSYTSSSXLYV, где X

вательность		представляет собой D или K (SEQ ID NO: 130)	NO: 88)	ID NO: 95)	т собой D или E; X_2 представляет собой P или L; и X_3 представляет собой S или R (SEQ ID NO: 131)	представляет собой T или A (SEQ ID NO: 132)

Таблица 8. CDR по Chothia иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из B-клеток

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SYDGSN (SEQ ID NO: 89)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TSSDVGGYNY (SEQ ID NO: 98)	DVS (SEQ ID NO: 99)	YTSSSTLY (SEQ ID NO: 100)
B61-02	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SYKGSN (SEQ ID NO: 110)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TSSDVGGYNY (SEQ ID NO: 98)	EVS (SEQ ID NO: 116)	YTSSSALY (SEQ ID NO: 117)
B61-10	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SYKGSN (SEQ ID NO: 110)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TSSDVGGYNY (SEQ ID NO: 98)	EVS (SEQ ID NO: 116)	YTSSSTLY (SEQ ID NO: 100)
Консенсусная последовательность	GFTFSSY (SEQ ID NO: 47)	SYXGSN, где X представляет собой D или K (SEQ ID NO: 133)	SGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 88)	TSSDVGGYNY (SEQ ID NO: 98)	XVS, где X представляет собой D или E (SEQ ID NO: 134)	YTSSSXLY, где X представляет собой T или A (SEQ ID NO: 135)

Таблица 9. CDR по IMGT иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из B-клеток

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PI61	GFTFSSY	ISYDGSN	GGSGYALHD	SSDVGGY	DVS	SSYTSSST

	G (SEQ ID NO: 90)	K (SEQ ID NO: 91)	DYYGLDV (SEQ ID NO: 92)	NY (SEQ ID NO: 101)	(SEQ ID NO: 99)	LYV (SEQ ID NO: 97)
B61-02	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 90)	ISYKGSNK (SEQ ID NO: 111)	GGSGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 92)	SSDVGGYNY (SEQ ID NO: 101)	EVS (SEQ ID NO: 116)	SSYTSSSALYV (SEQ ID NO: 115)
B61-10	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 90)	ISYKGSNK (SEQ ID NO: 111)	GGSGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 92)	SSDVGGYNY (SEQ ID NO: 101)	EVS (SEQ ID NO: 116)	SSYTSSSTLYV (SEQ ID NO: 97)
Консенсусная последовательность	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 90)	ISYXGSNK, где X представляет собой D или K (SEQ ID NO: 136)	GGSGYALHDDYYGLDV (SEQ ID NO: 92)	SSDVGGYNY (SEQ ID NO: 101)	XVS, где X представляет собой D или E (SEQ ID NO: 134)	SSYTSSSXLYV, где X представляет собой T или A (SEQ ID NO: 132)

Таблица 14. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, на основе PI61

Идентификация	**Последовательность белка**	**Последовательность ДНК (5'-3')**
Сигнальный пептид	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 2)	Atggccctccctgtcaccgctctgttgctgccgcttgctctgctgctccacgcagcgcgaccg (SEQ ID NO: 252)
ScFv PI61	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGGSGYALHDDYYGLDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSI	CaggtacaattgcaggagtctggaggcggtgtgGtgcaacccggtcgcagcttgcgcctgagttgtGctgcgtctggatttacatttttcatcttacggaAtgcattgggtacgccaggcaccgggggaaaggcCttgaatgggtggctgtaatttcatacgatggtTccaacaaatactatgctgactcagtcaagggtCgatttacaattagtcgggacaactccaagaacAccctttatcttcaaatgaattcccttagagcaGaggatacggcggtctattactgtggtggcagtGgttatgcacttcatgatgattactatggcttgGatgtctgggggcaagggacgcttgtaactgtaTcctctggtggtggtggtagtgg

	TISCTGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMIYDV SNRPSGVSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYY CSSYTSSSTLYVFGSGTK VTVL (SEQ ID NO: 105)	tgggggaggcTccggcggtggcggctctcaatctgctctga ctCaaccagcaagcgtatcagggtcaccgggacagAgtatt accataagttgcacggggacctctagcGatgtaggggggtat aattatgtatcttggtatCaacaacaccccgggaaagccccta aattgatgAtctacgacgtgagcaatcgacctagtggcgtaT caaatcgcttctctggtagcaagagtgggaatAcggcgtccc ttactattagcggattgcaagcaGaagatgaggccgattacta ctgcagctcctatActagctcttctacattgtacgtctttgggag cggaacaaaagtaacagtactc (SEQ ID NO: 253)
Трансмембранный домен и шарнирная область	TTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 202)	AcaacaacacctgccccgagaccgcctacaccaGccccg actattgccagccagcctctgagcctcAggcctgaggcctgt aggcccgcagcgggcggcGcagttcatacacggggcttgg atttcgcttgtGatatttatatttgggctcctttggcggggacaT gtggcgtgctgcttctgtcacttgttattacactgtactgt (SEQ ID NO: 254)
4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCEL (SEQ ID NO: 14)	AaacgcgggcgaaaaaaattgctgtatatttttAagcagcca tttatgaggcccgttcagacgacgCaggaggaggacggttg ctcttgcaggttcccagaagaggaagaaggggctgtgaatt g (SEQ ID NO: 255)
CD3-дзета	RVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR (SEQ ID NO: 20)	CgggttaaattttcaagatccgcagacgctccaGcataccaa cagggacaaaaccaactctataacGagctgaatcttggaaga agggaggaatatgatGtgctggataaacggcgcggtagaga tccggagAtgggcggaaaaccaaggcgaaaaaaccctcag GagggactctacaacgaactgcagaaagacaaaAtggcg gaggcttattccgaaataggcatgaagGgcgagcggaggc gagggaaagggcacgacggaCtgtatcaaggcctctcaac cgcgactaaggatAcgtacgacgccctgcacatgcaggcc ctgcctccgaga (SEQ ID NO: 256)
Полная конструкция CAR PI61	MALPVTALLLPLALLLHA ARPQVQLQESGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCGGSG	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCTCTGTTG CTGCCGCTTGCTCTGCTGCTCCACGCA GCGCGACCGCAGGTACAATTGCAGGA GTCTGGAGGCGGTGTGGTGCAACCCG GTCGCAGCTTGCGCCTGAGTTGTGCTG CGTCTGGATTTACATTTTCATCTTACG GAATGCATTGGGTACGCCAGGCACCG

	YALHDDYYGLDVWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQSALTQPASVSGS PGQSITISCTGTSSDVGGY NYVSWYQQHPGKAPKL MIYDVSNRPSGVSNRFSG SKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSYTSSSTLYVF GSGTKVTVLTTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR (SEQ ID NO: 257)	GGGAAAGGCCTTGAATGGGTGGCTGT AATTTCATACGATGGTTCCAACAAAT ACTATGCTGACTCAGTCAAGGGTCGA TTTACAATTAGTCGGGACAACTCCAA GAACACCCTTTATCTTCAAATGAATTC CCTTAGAGCAGAGGATACGGCGGTCT ATTACTGTGGTGGCAGTGGTTATGCA CTTCATGATGATTACTATGGCTTGGAT GTCTGGGGGCAAGGGACGCTTGTAAC TGTATCCTCTGGTGGTGGTGGTAGTGG TGGGGGAGGCTCCGGCGGTGGCGGCT CTCAATCTGCTCTGACTCAACCAGCA AGCGTATCAGGGTCACCGGGACAGAG TATTACCATAAGTTGCACGGGGACCT CTAGCGATGTAGGGGGGTATAATTAT GTATCTTGGTATCAACAACACCCCGG GAAAGCCCCTAAATTGATGATCTACG ACGTGAGCAATCGACCTAGTGGCGTA TCAAATCGCTTCTCTGGTAGCAAGAG TGGGAATACGGCGTCCCTTACTATTA GCGGATTGCAAGCAGAAGATGAGGCC GATTACTACTGCAGCTCCTATACTAGC TCTTCTACATTGTACGTCTTTGGGAGC GGAACAAAAGTAACAGTACTCACAAC AACACCTGCCCCGAGACCGCCTACAC CAGCCCCGACTATTGCCAGCCAGCCT CTGAGCCTCAGGCCTGAGGCCTGTAG GCCCGCAGCGGGCGGCGCAGTTCATA CACGGGGCTTGGATTTCGCTTGTGATA TTTATATTTGGGCTCCTTTGGCGGGGA CATGTGGCGTGCTGCTTCTGTCACTTG TTATTACACTGTACTGTAAACGCGGG CGAAAAAAATTGCTGTATATTTTTAA GCAGCCATTTATGAGGCCCGTTCAGA CGACGCAGGAGGAGGACGGTTGCTCT

		TGCAGGTTCCCAGAAGAGGAAGAAGG GGGCTGTGAATTGCGGGTTAAATTTTC AAGATCCGCAGACGCTCCAGCATACC AACAGGGACAAAACCAACTCTATAAC GAGCTGAATCTTGGAAGAAGGGAGGA ATATGATGTGCTGGATAAACGGCGCG GTAGAGATCCGGAGATGGGCGGAAA ACCAAGGCGAAAAAACCCTCAGGAG GGACTCTACAACGAACTGCAGAAAGA CAAAATGGCGGAGGCTTATTCCGAAA TAGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCG AGGGAAAGGGCACGACGGACTGTATC AAGGCCTCTCAACCGCGACTAAGGAT ACGTACGACGCCCTGCACATGCAGGC CCTGCCTCCGAGA (SEQ ID NO: 258)
Зрелый белок CAR PI61	QVQLQESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIS YDGSNKYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCGGSGYALH DDYYGLDVWGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGG SQSALTQPASVSGSPGQSI TISCTGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMIYDV SNRPSGVSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYY CSSYTSSSTLYVFGSGTK VTVLTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEE	

	EGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 107)	

Таблица 10. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из гибридомы

SEQ ID NO	**Название/описание**	**Последовательность**
Hy03		
SEQ ID NO: 137	HCDR1 (Kabat)	GFWMS
SEQ ID NO: 138	HCDR2 (Kabat)	NIKQDGSEKYYVDSVRG
SEQ ID NO: 139	HCDR3 (Kabat)	ALDYYGMDV
SEQ ID NO: 140	HCDR1 (Chothia)	GFTFSGF
SEQ ID NO: 141	HCDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO: 139	HCDR3 (Chothia)	ALDYYGMDV
SEQ ID NO: 142	HCDR1 (IMGT)	GFTFSGFW
SEQ ID NO: 143	HCDR2 (IMGT)	IKQDGSEK
SEQ ID NO: 144	HCDR3 (IMGT)	ARALDYYGMDV
SEQ ID NO: 145	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSGFWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQD GSEKYYVDSVRGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARALDYYGMDVW

		GQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 146	ДНК VH	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGG AGGGCTTGTCCAGCCCGGAGGATCGCT GCGGCTGTCCTGTGCTGCGTCCGGGTT CACCTTCTCCGGCTTCTGGATGTCCTG GGTCAGACAGGCACCGGGAAAGGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAG GATGGCTCCGAGAAGTACTACGTCGAC TCCGTGAGAGGCCGCTTCACCATCTCC CGGGACAACGCCAAGAACTCGCTGTA CCTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGG AAGATACTGCTGTGTATTACTGCGCAC GCGCCCTTGACTACTACGGCATGGACG TCTGGGGCCAAGGGACCACTGTGACC GTGTCTAGC
SEQ ID NO: 147	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLDSDDGNTYLD
SEQ ID NO: 148	LCDR2 (Kabat)	TLSYRAS
SEQ ID NO: 149	LCDR3 (Kabat)	TQRLEFPSIT
SEQ ID NO: 150	LCDR1 (Chothia)	SQSLLDSDDGNTY
SEQ ID NO: 151	LCDR2 (Chothia)	TLS
SEQ ID NO: 152	LCDR3 (Chothia)	RLEFPSI
SEQ ID NO: 153	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSDDGNTY
SEQ ID NO: 151	LCDR2 (IMGT)	TLS
SEQ ID NO: 149	LCDR3 (IMGT)	TQRLEFPSIT
SEQ ID NO:	VL	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLL

154		DSDDGNTYLDWYLQKPGQSPRLLIYTLS YRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGLYYCTQRLEFPSITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 155	ДНК VL	GATATCGTGATGACCCAGACTCCCCTG TCCCTGCCTGTGACTCCCGGAGAACCA GCCTCCATTTCCTGCCGGTCCTCCCAG TCCCTGCTGGACAGCGACGACGGCAA CACTTACCTGGACTGGTACTTGCAGAA GCCGGGCCAATCGCCTCGCCTGCTGAT CTATACCCTGTCATACCGGGCCTCAGG AGTGCCTGACCGCTTCTCGGGATCAGG GAGCGGGACCGATTTCACCCTGAAAAT TTCCCGAGTGGAAGCCGAGGACGTCG GACTGTACTACTGCACCCAGCGCCTCG AATTCCCGTCGATTACGTTTGGACAGG GTACCCGGCTTGAGATCAAG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 156	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSGFWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQD GSEKYYVDSVRGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARALDYYGMDVW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSS QSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPRLLI YTLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGLYYCTQRLEFPSITFGQGTRL EIK
SEQ ID NO: 157	ДНК scFv	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGG AGGGCTTGTCCAGCCCGGAGGATCGCT GCGGCTGTCCTGTGCTGCGTCCGGGTT CACCTTCTCCGGCTTCTGGATGTCCTG GGTCAGACAGGCACCGGGAAAGGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAG GATGGCTCCGAGAAGTACTACGTCGAC

		TCCGTGAGAGGCCGCTTCACCATCTCC CGGGACAACGCCAAGAACTCGCTGTA CCTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGG AAGATACTGCTGTGTATTACTGCGCAC GCGCCCTTGACTACTACGGCATGGACG TCTGGGGCCAAGGGACCACTGTGACC GTGTCTAGCGGAGGCGGAGGTTCAGG GGGCGGTGGATCAGGCGGAGGAGGAT CGGGGGGTGGTGGATCGGATATCGTG ATGACCCAGACTCCCCTGTCCCTGCCT GTGACTCCCGGAGAACCAGCCTCCATT TCCTGCCGGTCCTCCCAGTCCCTGCTG GACAGCGACGACGGCAACACTTACCT GGACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCC AATCGCCTCGCCTGCTGATCTATACCC TGTCATACCGGGCCTCAGGAGTGCCTG ACCGCTTCTCGGGATCAGGGAGCGGG ACCGATTTCACCCTGAAAATTTCCCGA GTGGAAGCCGAGGACGTCGGACTGTA CTACTGCACCCAGCGCCTCGAATTCCC GTCGATTACGTTTGGACAGGGTACCCG GCTTGAGATCAAG
SEQ ID NO: 158	Полная аминокислотная последовательность CAR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSGFWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQD GSEKYYVDSVRGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARALDYYGMDVW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSS QSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPRLLI YTLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGLYYCTQRLEFPSITFGQGTRL EIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELR

		VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
SEQ ID NO: 159	Полная последовательность ДНК CAR	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGG AGGGCTTGTCCAGCCCGGAGGATCGCT GCGGCTGTCCTGTGCTGCGTCCGGGTT CACCTTCTCCGGCTTCTGGATGTCCTG GGTCAGACAGGCACCGGGAAAGGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAG GATGGCTCCGAGAAGTACTACGTCGAC TCCGTGAGAGGCCGCTTCACCATCTCC CGGGACAACGCCAAGAACTCGCTGTA CCTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGG AAGATACTGCTGTGTATTACTGCGCAC GCGCCCTTGACTACTACGGCATGGACG TCTGGGGCCAAGGGACCACTGTGACC GTGTCTAGCGGAGGCGGAGGTTCAGG GGGCGGTGGATCAGGCGGAGGAGGAT CGGGGGGTGGTGGATCGGATATCGTG ATGACCCAGACTCCCCTGTCCCTGCCT GTGACTCCCGGAGAACCAGCCTCCATT TCCTGCCGGTCCTCCCAGTCCCTGCTG GACAGCGACGACGGCAACACTTACCT GGACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCC AATCGCCTCGCCTGCTGATCTATACCC TGTCATACCGGGCCTCAGGAGTGCCTG ACCGCTTCTCGGGATCAGGGAGCGGG ACCGATTTCACCCTGAAAATTTCCCGA GTGGAAGCCGAGGACGTCGGACTGTA CTACTGCACCCAGCGCCTCGAATTCCC GTCGATTACGTTTGGACAGGGTACCCG GCTTGAGATCAAGACCACTACCCCAGC ACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTAC

		CATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCG TCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTG GTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTG ACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGG CCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCC TGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTA CTGTAAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGC TGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGA GGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAG GACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCAGAG GAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCG CGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATG CTCCAGCCTACCAGCAGGGGCAGAAC CAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGT CGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGA CAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAA TGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAT CCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCT CCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCT ATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAA CGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGG ACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCAC CAAGGACACCTATGACGCTCTTCACAT GCAGGCCCTGCCGCCTCGG
Hy52		
SEQ ID NO: 160	HCDR1 (Kabat)	SFRMN
SEQ ID NO: 161	HCDR2 (Kabat)	SISSSSSYIYYADSVKG
SEQ ID NO: 162	HCDR3 (Kabat)	WLSYYGMDV
SEQ ID NO: 163	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSF
SEQ ID NO: 164	HCDR2 (Chothia)	SSSSSY

SEQ ID NO: 162	HCDR3 (Chothia)	WLSYYGMDV
SEQ ID NO: 165	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSFR
SEQ ID NO: 166	HCDR2 (IMGT)	ISSSSSYI
SEQ ID NO: 167	HCDR3 (IMGT)	ARWLSYYGMDV
SEQ ID NO: 168	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSFRMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARWLSYYGMDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO: 169	ДНК VH	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGG AGGGCTTGTCAAGCCCGGAGGATCGCT GCGGCTGTCCTGTGCTGCGTCCGGGTT CACCTTCTCCTCGTTCCGCATGAACTG GGTCAGACAGGCACCGGGAAAGGGCC TCGAATGGGTGTCCTCAATCTCATCGT CCTCGTCCTACATCTACTACGCCGACT CCGTGAAAGGCCGCTTCACCATCTCCC GGGACAACGCCAAGAACTCGCTGTAC CTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGGA AGATACTGCTGTGTATTACTGCGCACG CTGGCTTTCCTACTACGGCATGGACGT CTGGGGCCAAGGGACCACTGTGACCG TGTCTAGC
SEQ ID NO: 147	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLDSDDGNTYLD
SEQ ID NO: 170	LCDR2 (Kabat)	TLSFRAS
SEQ ID NO: 171	LCDR3 (Kabat)	MQRIGFPIT
SEQ ID NO:	LCDR1 (Chothia)	SQSLLDSDDGNTY

150		
SEQ ID NO: 151	LCDR2 (Chothia)	TLS
SEQ ID NO: 172	LCDR3 (Chothia)	RIGFPI
SEQ ID NO: 153	LCDR1 (IMGT)	QSLLDSDDGNTY
SEQ ID NO: 151	LCDR2 (IMGT)	TLS
SEQ ID NO: 171	LCDR3 (IMGT)	MQRIGFPIT
SEQ ID NO: 173	VL	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLL DSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLS FRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKIRRVEAE DVGVYYCMQRIGFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 174	ДНК VL	GATATCGTGATGACCCAGACTCCCCTG TCCCTGCCTGTGACTCCCGGAGAACCA GCCTCCATTTCCTGCCGGTCCTCCCAG TCCCTGCTGGACAGCGACGACGGCAA CACTTACCTGGACTGGTACTTGCAGAA GCCGGGCCAATCGCCTCAGCTGCTGAT CTATACCCTGTCATTCCGGGCCTCAGG AGTGCCTGACCGCTTCTCGGGATCAGG GAGCGGGACCGATTTCACCCTGAAAAT TAGGCGAGTGGAAGCCGAGGACGTCG GAGTGTACTACTGCATGCAGCGCATCG GCTTCCCGATTACGTTTGGACAGGGTA CCCGGCTTGAGATCAAG
SEQ ID NO: 63	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 175	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSFRMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARWLSYYGMDVWGQ

		GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSL LDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTL SFRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKIRRVEA EDVGVYYCMQRIGFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 176	ДНК scFv	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGG AGGGCTTGTCAAGCCCGGAGGATCGCT GCGGCTGTCCTGTGCTGCGTCCGGGTT CACCTTCTCCTCGTTCCGCATGAACTG GGTCAGACAGGCACCGGGAAAGGGCC TCGAATGGGTGTCCTCAATCTCATCGT CCTCGTCCTACATCTACTACGCCGACT CCGTGAAAGGCCGCTTCACCATCTCCC GGGACAACGCCAAGAACTCGCTGTAC CTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGGA AGATACTGCTGTGTATTACTGCGCACG CTGGCTTTCCTACTACGGCATGGACGT CTGGGGCCAAGGGACCACTGTGACCG TGTCTAGCGGAGGCGGAGGTTCAGGG GGCGGTGGATCAGGCGGAGGAGGATC GGGGGGTGGTGGATCGGATATCGTGA TGACCCAGACTCCCCTGTCCCTGCCTG TGACTCCCGGAGAACCAGCCTCCATTT CCTGCCGGTCCTCCCAGTCCCTGCTGG ACAGCGACGACGGCAACACTTACCTG GACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCCA ATCGCCTCAGCTGCTGATCTATACCCT GTCATTCCGGGCCTCAGGAGTGCCTGA CCGCTTCTCGGGATCAGGGAGCGGGA CCGATTTCACCCTGAAAATTAGGCGAG TGGAAGCCGAGGACGTCGGAGTGTAC TACTGCATGCAGCGCATCGGCTTCCCG ATTACGTTTGGACAGGGTACCCGGCTT GAGATCAAG
SEQ ID NO:	Полная аминокислотная	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT

177	последовательность CAR	FSSFRMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARWLSYYGMDVWGQ GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSL LDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTL SFRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKIRRVEA EDVGVYYCMQRIGFPITFGQGTRLEIKTT TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 178	Полная последовательность ДНК CAR	GAAGTGCAACTGGTGGAGAGCGGTGG AGGGCTTGTCAAGCCCGGAGGATCGCT GCGGCTGTCCTGTGCTGCGTCCGGGTT CACCTTCTCCTCGTTCCGCATGAACTG GGTCAGACAGGCACCGGGAAAGGGCC TCGAATGGGTGTCCTCAATCTCATCGT CCTCGTCCTACATCTACTACGCCGACT CCGTGAAAGGCCGCTTCACCATCTCCC GGGACAACGCCAAGAACTCGCTGTAC CTCCAAATGAATAGCCTCAGGGCGGA AGATACTGCTGTGTATTACTGCGCACG CTGGCTTTCCTACTACGGCATGGACGT CTGGGGCCAAGGGACCACTGTGACCG TGTCTAGCGGAGGCGGAGGTTCAGGG GGCGGTGGATCAGGCGGAGGAGGATC GGGGGGTGGTGGATCGGATATCGTGA TGACCCAGACTCCCCTGTCCCTGCCTG TGACTCCCGGAGAACCAGCCTCCATTT CCTGCCGGTCCTCCCAGTCCCTGCTGG

		ACAGCGACGACGGCAACACTTACCTG GACTGGTACTTGCAGAAGCCGGGCCA ATCGCCTCAGCTGCTGATCTATACCCT GTCATTCCGGGCCTCAGGAGTGCCTGA CCGCTTCTCGGGATCAGGGAGCGGGA CCGATTTCACCCTGAAAATTAGGCGAG TGGAAGCCGAGGACGTCGGAGTGTAC TACTGCATGCAGCGCATCGGCTTCCCG ATTACGTTTGGACAGGGTACCCGGCTT GAGATCAAGACCACTACCCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCAT CGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCC GGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTG GGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACT TCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCC CTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCCTGC TGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTG TAAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGT ACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGC CTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGAC GGCTGTTCATGCCGGTTCCCAGAGGAG GAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGT GAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCC AGCCTACCAGCAGGGGCAGAACCAGC TCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGA GAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAG CGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGG CGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCC AAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAA AAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAG CGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCA GAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTG TACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAA GGACACCTATGACGCTCTTCACATGCA GGCCCTGCCGCCTCGG

Таблица 11. CDR по Kabat иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из гибридомы

Kabat	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFWMS (SEQ ID NO: 137)	NIKQDGSEKYYVDSVRG (SEQ ID NO: 138)	ALDYYGMDV (SEQ ID NO: 139)	RSSQSLLDSDDGNTYLD (SEQ ID NO: 147)	TLSYRAS (SEQ ID NO: 148)	TQRLEFPSIT (SEQ ID NO: 149)
Hy52	SFRMN (SEQ ID NO: 160)	SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 161)	WLSYYGMDV (SEQ ID NO: 162)	RSSQSLLDSDDGNTYLD (SEQ ID NO: 147)	TLSFRAS (SEQ ID NO: 170)	MQRIGFPIT (SEQ ID NO: 171)
Консенсусная последовательность	$X_1FX_2MX_3$, где X_1 представляет собой G или S; X_2 представляет собой W или R; и X_3 представляет собой S или N (SEQ ID NO: 179)	$X_1IX_2X_3X_4X_5SX_6X_7YYX_8DSVX_9G$, где X_1 представляет собой N или S; X_2 представляет собой K или S; X_3 представляет собой Q или S; X_4 представляет собой D или S; X_5 представляет собой G или S; X_6 представляет собой E или Y; X_7 представляет собой K или	$X_1LX_2YYGMDV$, где X_1 представляет собой A или W; и X_2 представляет собой D или S (SEQ ID NO: 181)	RSSQSLLDSDDGNTYLD (SEQ ID NO: 147)	TLSXRAS, где X представляет собой Y или F (SEQ ID NO: 182)	$X_1QRX_2X_3FPX_4IT$, где X_1 представляет собой T или M; X_2 представляет собой L или I; X_3 представляет собой E или G; и X_4 представляет собой S или отсутствует (SEQ ID NO:

		I; X_8 представляет собой V или A; и X_9 представляет собой R или K (SEQ ID NO: 180)				183)

Таблица 12. CDR по Chothia иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из гибридомы

Chothia	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFTFSGF (SEQ ID NO: 140)	KQDGSE (SEQ ID NO: 141)	ALDYYGM DV (SEQ ID NO: 139)	SQSLLDS DDGNTY (SEQ ID NO: 150)	TLS (SEQ ID NO: 151)	RLEFPSI (SEQ ID NO: 152)
Hy52	GFTFSSF (SEQ ID NO: 163)	SSSSSY (SEQ ID NO: 164)	WLSYYGM DV (SEQ ID NO: 162)	SQSLLDS DDGNTY (SEQ ID NO: 150)	TLS (SEQ ID NO: 151)	RIGFPI (SEQ ID NO: 172)
Консенсусная последовательность	GFTFSXF, где X представляет собой G или S (SEQ ID NO: 184)	$X_1X_2X_3X_4SX_5$, где X_1 представляет собой K или S; X_2 представляет собой Q или S; X_3 представляет собой D или S; X_4 представляет собой G или S; и X_5 представляет собой E или	$X_1LX_2YYGMDV$, где X_1 представляет собой A или W; и X_2 представляет собой D или S (SEQ ID NO: 181)	SQSLLDS DDGNTY (SEQ ID NO: 150)	TLS (SEQ ID NO: 151)	$RX_1X_2FPX_3I$, где X_1 представляет собой L или I; X_2 представляет собой E или G; и X_3 представляет собой S или

		Y (SEQ ID NO: 185)				отсутствует (SEQ ID NO: 186)

Таблица 13. CDR по IMGT иллюстративных молекул, связывающихся с BCMA, полученных из гибридомы

IMGT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
Hy03	GFTFSGFW (SEQ ID NO: 142)	IKQDGSEK (SEQ ID NO: 143)	ARALDYYGMDV (SEQ ID NO: 144)	QSLLDSDDGNTY (SEQ ID NO: 153)	TLS (SEQ ID NO: 151)	TQRLEFPSIT (SEQ ID NO: 149)
Hy52	GFTFSSFR (SEQ ID NO: 165)	ISSSSSYI (SEQ ID NO: 166)	ARWLSYYGMDV (SEQ ID NO: 167)	QSLLDSDDGNTY (SEQ ID NO: 153)	TLS (SEQ ID NO: 151)	MQRIGFPIT (SEQ ID NO: 171)
Консенсусная последовательность	GFTFSX$_1$FX$_2$, где X$_1$ представляет собой G или S; и X$_2$ представляет собой W или R (SEQ ID NO: 187)	IX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$SX$_5$X$_6$, где X$_1$ представляет собой K или S; X$_2$ представляет собой Q или S; X$_3$ представляет собой D или S; X$_4$ представляет собой G или S; X$_5$ представляет собой E или Y; и X$_6$ представляет собой K или I (SEQ	ARX$_1$LX$_2$YYGMDV, где X$_1$ представляет собой A или W; и X$_2$ представляет собой D или S (SEQ ID NO: 189)	QSLLDSDDGNTY (SEQ ID NO: 153)	TLS (SEQ ID NO: 151)	X$_1$QRX$_2$X$_3$FPX$_4$IT, где X$_1$ представляет собой T или M; X$_2$ представляет собой L или I; X$_3$ представляет собой E или G; и X$_4$ представляет собой S или отсутствует (SEQ

		ID NO: 188)				ID NO: 183)

В некоторых вариантах осуществления CAR для BCMA можно получать с применением последовательностей VH и VL из WO2012/0163805 (содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления CAR для BCMA можно получать с применением CDR, VH, VL, scFv или полных последовательностей CAR из WO2019/241426 (содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Другие иллюстративные мишени

Дополнительные неограничивающие иллюстративные опухолевые антигены включают CD20, CD22, EGFR, CD123 и CLL-1.

CAR, которые связываются с CD20, известны из уровня техники. Например, они раскрыты в WO2018/067992 или WO2016/164731, включенных в данный документ посредством ссылки. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой известный CAR для CD20, например, антигенсвязывающий домен для CD20 из любого известного из уровня техники CAR для CD20. Иллюстративные последовательности, связывающие CD20, или последовательности CAR для CD20 раскрыты, например, в таблицах 1-5 в WO2018/067992, включенной посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD20 содержит CDR, вариабельную область, scFv или полноразмерную последовательность CAR для CD20, раскрытую в WO2018/067992 или WO2016/164731, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD20 содержат последовательность, например, CDR, VH, VL, scFv или полную последовательность CAR, раскрытую в таблице 23 ниже, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

Таблица 23. Аминокислотные последовательности иллюстративных молекул, связывающихся с CD20

SEQ ID NO:	**Область**	**Последовательность**
CD20-C3H2		
769	HCDR1 (Kabat)	NYNLH
770	HCDR2 (Kabat)	AIYPGNYDTSYNQKFKG
771	HCDR3 (Kabat)	VDFGHSRYWYFDV
772	HCDR1	GYTFTNY

	(Chothia)	
773	HCDR2 (Chothia)	YPGNYD
771	HCDR3 (Chothia)	VDFGHSRYWYFDV
774	HCDR1 (IMGT)	GYTFTNYN
775	HCDR2 (IMGT)	IYPGNYDT
776	HCDR3 (IMGT)	ARVDFGHSRYWYFDV
777	HCDR1 (комбинация)	GYTFTNYNLH
770	HCDR2 (комбинация)	AIYPGNYDTSYNQKFKG
771	HCDR3 (комбинация)	VDFGHSRYWYFDV
778	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYN LHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNYDTSYNQKFK GRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR VDFGHSRYWYFDVWGQGTTVTVSS
779	ДНК VH	CAAGTCCAACTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTC AAGAAACCTGGAGCATCCGTGAAAGTGTCTTGC AAAGCCTCCGGCTACACCTTCACCAACTACAAC CTCCATTGGGTCAGACAGGCCCCCGGACAAGG ACTCGAATGGATGGGAGCGATCTACCCGGGAA ACTACGACACCAGCTACAACCAGAAGTTCAAG GGCCGCGTGACTATGACCGCCGATAAGAGCAC CTCCACCGCCTACATGGAACTGTCCTCGCTGAG GTCCGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCG CGTGGACTTCGGACACTCACGGTATTGGTACTT CGACGTCTGGGGACAGGGCACTACCGTGACCG TGTCGAGC
780	LCDR1	RATSSVSSMN

	(Kabat)	
781	LCDR2 (Kabat)	ATSNLAS
782	LCDR3 (Kabat)	QQWTFNPPT
783	LCDR1 (Chothia)	TSSVSS
784	LCDR2 (Chothia)	ATS
785	LCDR3 (Chothia)	WTFNPP
786	LCDR1 (IMGT)	SSVSS
784	LCDR2 (IMGT)	ATS
782	LCDR3 (IMGT)	QQWTFNPPT
780	LCDR1 (комбинация)	RATSSVSSMN
781	LCDR2 (комбинация)	ATSNLAS
782	LCDR3 (комбинация)	QQWTFNPPT
787	VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRATSSVSSMNWY QQKPGKAPKPLIHATSNLASGVPSRFSGSGSGTEY TLTISSLQPEDFATYYCQQWTFNPPTFGQGTKLEI K
788	ДНК VL	GATATCCAGCTGACTCAGTCCCCGTCATTCCTG TCCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGGCCACTTCCTCCGTGTCAAGCATGAAC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGGAAGGCCCCAAA GCCGCTGATTCACGCGACGTCCAACCTGGCTTC CGGCGTGCCGAGCCGGTTCTCCGGCTCGGGGAG CGGGACTGAGTACACCCTGACTATTTCCTCGCT

		TCAACCCGAGGACTTTGCTACCTACTACTGCCA ACAGTGGACCTTCAATCCTCCGACATTCGGACA GGGTACCAAGTTGGAAATCAAG
789	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYN LHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNYDTSYNQKFK GRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR VDFGHSRYWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RATSSVSSMNWYQQKPGKAPKPLIHATSNLASGV PSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWTF NPPTFGQGTKLEIK
790	ДНК scFv (VH-линкер-VL)	caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacctggagcatccg tgaaagtgtcttgcaaagcctccggctacaccttcaccaactacaacctccattg ggtcagacaggcccccggacaaggactcgaatggatgggagcgatctaccc gggaaactacgacaccagctacaaccagaagttcaagggccgcgtgactatg accgccgataagagcacctccaccgcctacatggaactgtcctcgctgaggtc cgaggacactgcggtgtactactgcgcccgcgtggacttcggacactcacgg tattggtacttcgacgtctggggacagggcactaccgtgaccgtgtcgagcgg cggaggaggttcgggaggggcggatcaggggcggcggcagcggtgg aggggctcggatatccagctgactcagtccccgtcattcctgtccgcctccgt gggagacagagtgaccatcacctgtcgggccacttcctccgtgtcaagcatga actggtatcagcagaagcccgggaaggccccaaagccgctgattcacgcga cgtccaacctggcttccggcgtgccgagccggttctccggctcggggagcgg gactgagtacaccctgactatttcctcgcttcaacccgaggactttgctacctact actgccaacagtggaccttcaatcctccgacattcggacagggtaccaagttg gaaatcaag
791	Полная аминокислотная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTNYNLHWVRQAPGQGL EWMGAIYPGNYDTSYNQKFKGRVTMTADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARVDFGHSRYWYFDV WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QLTQSPSFLSASVGDRVTITCRATSSVSSMNWYQ QKPGKAPKPLIHATSNLASGVPSRFSGSGSGTEYT LTISSLQPEDFATYYCQQWTFNPPTFGQGTKLEIK TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH

		TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
792	Полная нуклеотидная последовательность CAR	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCG CTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCAA GTCCAACTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTCAAG AAACCTGGAGCATCCGTGAAAGTGTCTTGCAAA GCCTCCGGCTACACCTTCACCAACTACAACCTC CATTGGGTCAGACAGGCCCCCGGACAAGGACT CGAATGGATGGGAGCGATCTACCCGGGAAACT ACGACACCAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGC CGCGTGACTATGACCGCCGATAAGAGCACCTCC ACCGCCTACATGGAACTGTCCTCGCTGAGGTCC GAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTG GACTTCGGACACTCACGGTATTGGTACTTCGAC GTCTGGGGACAGGGCACTACCGTGACCGTGTCG AGCGGCGGAGGAGGTTCGGGAGGGGGCGGATC AGGGGGCGGCGGCAGCGGTGGAGGGGGCTCGG ATATCCAGCTGACTCAGTCCCCGTCATTCCTGT CCGCCTCCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCT GTCGGGCCACTTCCTCCGTGTCAAGCATGAACT GGTATCAGCAGAAGCCCGGGAAGGCCCCAAAG CCGCTGATTCACGCGACGTCCAACCTGGCTTCC GGCGTGCCGAGCCGGTTCTCCGGCTCGGGGAGC GGGACTGAGTACACCCTGACTATTTCCTCGCTT CAACCCGAGGACTTTGCTACCTACTACTGCCAA CAGTGGACCTTCAATCCTCCGACATTCGGACAG GGTACCAAGTTGGAAATCAAGACCACTACCCC AGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCAT CGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGC ATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATAC CCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACAT

		TTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCCT GCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAG CGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAG CAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAA GAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCAGA GGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGA AATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACC AGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTC AATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCT GGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGG GCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAG GGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGAT GGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAG GGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGG ACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGG ACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGC CGCCTCGG
CD20-C5H1		
793	HCDR1 (Kabat)	SYNMH
794	HCDR2 (Kabat)	AIYPGNGDTSYNPKFKG
795	HCDR3 (Kabat)	SYFYGSSSWYFDV
523	HCDR1 (Chothia)	GYTFTSY
796	HCDR2 (Chothia)	YPGNGD
795	HCDR3 (Chothia)	SYFYGSSSWYFDV
797	HCDR1 (IMGT)	GYTFTSYN
798	HCDR2	IYPGNGDT

	(IMGT)	
799	HCDR3 (IMGT)	ARSYFYGSSSWYFDV
800	HCDR1 (комбинация)	GYTFTSYNMH
794	HCDR2 (комбинация)	AIYPGNGDTSYNPKFKG
795	HCDR3 (комбинация)	SYFYGSSSWYFDV
801	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYN MHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNPKFK GRVTMTADKSTRTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR SYFYGSSSWYFDVWGQGTTVTVSS
802	ДНК VH	CAAGTGCAGCTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTC AAGAAACCCGGTGCTTCAGTGAAAGTGTCCTGC AAGGCCTCCGGTTACACCTTCACCTCCTACAAC ATGCACTGGGTCCGCCAAGCCCCGGGCCAGGG ACTCGAATGGATGGGAGCCATCTACCCTGGCAA CGGGGACACCTCATACAACCCTAAGTTCAAGG GCAGAGTGACCATGACTGCGGACAAGTCCACT AGAACAGCGTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCG GTCCGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCCG CTCCTACTTCTACGGAAGCTCGTCGTGGTACTT CGATGTCTGGGGACAGGGCACCACTGTGACTGT GTCCTCC
803	LCDR1 (Kabat)	RASSSVSSMH
781	LCDR2 (Kabat)	ATSNLAS
804	LCDR3 (Kabat)	QQWIFNPPT
805	LCDR1 (Chothia)	SSSVSS
784	LCDR2	ATS

	(Chothia)	
806	LCDR3 (Chothia)	WIFNPP
786	LCDR1 (IMGT)	SSVSS
784	LCDR2 (IMGT)	ATS
804	LCDR3 (IMGT)	QQWIFNPPT
803	LCDR1 (комбинация)	RASSSVSSMH
781	LCDR2 (комбинация)	ATSNLAS
804	LCDR3 (комбинация)	QQWIFNPPT
807	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSMHWY QQKPGQAPRPLIFATSNLASGIPARFSGSGSGTDY TLTISSLEPEDAAVYYCQQWIFNPPTFGGGTKVEI K
808	ДНК VL	GAAATTGTGCTGACTCAGAGCCCCGCCACCCTG AGCTTGTCCCCCGGGGAAAGGGCAACGCTGTC ATGCCGCGCCTCGTCATCCGTGTCCTCCATGCA TTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGGCCCCTC GGCCGCTGATCTTCGCCACCTCCAATCTCGCTT CCGGCATTCCGGCCCGGTTCTCGGGAAGCGGGT CGGGGACCGACTATACCCTGACCATCTCTAGCC TTGAACCTGAGGACGCCGCGGTGTACTATTGTC AACAGTGGATCTTTAACCCCCCAACCTTCGGTG GAGGCACCAAAGTGGAGATTAAG
809	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYN MHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNPKFK GRVTMTADKSTRTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR SYFYGSSSWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR

		ASSSVSSMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIPA RFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCQQWIFNP PTFGGGTKVEIK
810	ДНК scFv (VH-линкер-VL)	Caagtgcagctcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttcag tgaaagtgtcctgcaaggcctccggttacaccttcacctcctacaacatgcact gggtccgccaagccccgggccagggactcgaatggatgggagccatctacc ctggcaacggggacacctcatacaaccctaagttcaagggcagagtgaccat gactgcggacaagtccactagaacagcgtacatggagctgagcagcctgcg gtccgaggatactgccgtgtactactgcgcccgctcctacttctacggaagctc gtcgtggtacttcgatgtctggggacagggcaccactgtgactgtgtcctccgg tggcggaggctcgggcggaggcggaagcggcggcgggggatcgggagg aggagggtccgaaattgtgctgactcagagccccgccaccctgagcttgtccc ccggggaaagggcaacgctgtcatgccgcgcctcgtcatccgtgtcctccat gcattggtaccagcagaagccgggacaggcccctcggccgctgatcttcgcc acctccaatctcgcttccggcattccggcccggttctcgggaagcgggtcggg gaccgactataccctgaccatctctagccttgaacctgaggacgccgcggtgt actattgtcaacagtggatctttaacccccccaaccttcggtggaggcaccaaag tggagattaag
811	Полная аминокислотная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGL EWMGAIYPGNGDTSYNPKFKGRVTMTADKSTRT AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYFYGSSSWYFDV WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEI VLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSMHWYQ QKPGQAPRPLIFATSNLASGIPARFSGSGSGTDYTL TISSLEPEDAAVYYCQQWIFNPPTFGGGTKVEIKT TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR
812	Полная нуклеотидная	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCG CTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCCAA

	последовательность CAR	GTGCAGCTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTCAAG AAACCCGGTGCTTCAGTGAAAGTGTCCTGCAAG GCCTCCGGTTACACCTTCACCTCCTACAACATG CACTGGGTCCGCCAAGCCCCGGGCCAGGGACT CGAATGGATGGGAGCCATCTACCCTGGCAACG GGGACACCTCATACAACCCTAAGTTCAAGGGC AGAGTGACCATGACTGCGGACAAGTCCACTAG AACAGCGTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCGGT CCGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCCGCT CCTACTTCTACGGAAGCTCGTCGTGGTACTTCG ATGTCTGGGGACAGGGCACCACTGTGACTGTGT CCTCCGGTGGCGGAGGCTCGGGCGGAGGCGGA AGCGGCGGCGGGGGATCGGGAGGAGGAGGGTC CGAAATTGTGCTGACTCAGAGCCCCGCCACCCT GAGCTTGTCCCCCGGGGAAAGGGCAACGCTGT CATGCCGCGCCTCGTCATCCGTGTCCTCCATGC ATTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGGCCCCT CGGCCGCTGATCTTCGCCACCTCCAATCTCGCT TCCGGCATTCCGGCCCGGTTCTCGGGAAGCGGG TCGGGGACCGACTATACCCTGACCATCTCTAGC CTTGAACCTGAGGACGCCGCGGTGTACTATTGT CAACAGTGGATCTTTAACCCCCCAACCTTCGGT GGAGGCACCAAAGTGGAGATTAAGACCACTAC CCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTAC CATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGA GGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGC ATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCT ACATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGG TCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTG TAAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTT TAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTAC TCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCC AGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCG TGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCT ACCAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAA

		CTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGT GCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAA TGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAA GAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAA GATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGA AAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGA CGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCA AGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCC TGCCGCCTCGG
CD20-C3H1		
896	HCDR1 (Kabat)	NYNLH
897	HCDR2 (Kabat)	AIYPGNYDTSYNQKFKG
898	HCDR3 (Kabat)	VDFGHSRYWYFDV
899	HCDR1 (Chothia)	GYTFTNY
900	HCDR2 (Chothia)	YPGNYD
901	HCDR3 (Chothia)	VDFGHSRYWYFDV
903	HCDR1 (IMGT)	GYTFTNYN
904	HCDR2 (IMGT)	IYPGNYDT
905	HCDR3 (IMGT)	ARVDFGHSRYWYFDV
906	HCDR1 (комбинация)	GYTFTNYNLH
907	HCDR2 (комбинация)	AIYPGNYDTSYNQKFKG
908	HCDR3	VDFGHSRYWYFDV

	(комбинация)	
909	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYN LHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNYDTSYNQKFK GRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR VDFGHSRYWYFDVWGQGTTVTVSS
910	LCDR1 (Kabat)	RATSSVSSMN
911	LCDR2 (Kabat)	ATSNLAS
912	LCDR3 (Kabat)	QQWTFNPPT
913	LCDR1 (Chothia)	TSSVSS
914	LCDR2 (Chothia)	ATS
915	LCDR3 (Chothia)	WTFNPP
916	LCDR1 (IMGT)	SSVSS
917	LCDR2 (IMGT)	ATS
918	LCDR3 (IMGT)	QQWTFNPPT
919	LCDR1 (комбинация)	RATSSVSSMN
920	LCDR2 (комбинация)	ATSNLAS
921	LCDR3 (комбинация)	QQWTFNPPT
922	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATSSVSSMNWY QQKPGQAPRPLIHATSNLASGIPARFSGSGSGTDY TLTISSLEPEDAAVYYCQQWTFNPPTFGQGTKLEI K
923	scFv (VH-линкер-	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYN

	VL)	LHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNYDTSYNQKFK GRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR VDFGHSRYWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RATSSVSSMNWYQQKPGQAPRPLIHATSNLASGIP ARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCQQWTF NPPTFGQGTKLEIK
924	Полная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTNYNLHWVRQAPGQGL EWMGAIYPGNYDTSYNQKFKGRVTMTADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARVDFGHSRYWYFDV WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEI VLTQSPATLSLSPGERATLSCRATSSVSSMNWYQ QKPGQAPRPLIHATSNLASGIPARFSGSGSGTDYT LTISSLEPEDAAVYYCQQWTFNPPTFGQGTKLEIK TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR
CD20-3H3		
925	HCDR1 (Kabat)	NYNLH
926	HCDR2 (Kabat)	AIYPGNYDTSYNQKFKG
927	HCDR3 (Kabat)	VDFGHSRYWYFDV
928	HCDR1 (Chothia)	GYTFTNY
929	HCDR2 (Chothia)	YPGNYD
930	HCDR3	VDFGHSRYWYFDV

	(Chothia)	
931	HCDR1 (IMGT)	GYTFTNYN
932	HCDR2 (IMGT)	IYPGNYDT
933	HCDR3 (IMGT)	ARVDFGHSRYWYFDV
934	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYN LHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNYDTSYNQKFK GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARV DFGHSRYWYFDVWGQGTTVTVSS
935	LCDR1 (Kabat)	RATSSVSSMN
936	LCDR2 (Kabat)	ATSNLAS
937	LCDR3 (Kabat)	QQWTFNPPT
938	LCDR1 (Chothia)	TSSVSS
939	LCDR2 (Chothia)	ATS
940	LCDR3 (Chothia)	WTFNPP
941	LCDR1 (IMGT)	SSVSS
942	LCDR2 (IMGT)	ATS
943	LCDR3 (IMGT)	QQWTFNPPT
944	LCDR1 (комбинация)	RATSSVSSMN
945	LCDR2 (комбинация)	ATSNLAS
946	LCDR3	QQWTFNPPT

	(комбинация)	
947	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATSSVSSMNWY QQKPGQAPRPLIHATSNLASGIPARFSGSGSGTDY TLTISSLEPEDAAVYYCQQWTFNPPTFGQGTKLEI K
948	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYN LHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNYDTSYNQKFK GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARV DFGHSRYWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ATSSVSSMNWYQQKPGQAPRPLIHATSNLASGIP ARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCQQWTF NPPTFGQGTKLEIK
949	Полная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSCKASGYTFTNYNLHWVRQAPGQGL EWMGAIYPGNYDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARVDFGHSRYWYFDVW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRATSSVSSMNWYQQK PGQAPRPLIHATSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLEPEDAAVYYCQQWTFNPPTFGQGTKLEIKTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR
CD20-C3H4		
950	HCDR1 (Kabat)	NYNLH
951	HCDR2 (Kabat)	AIYPGNYDTSYNQKFKG

952	HCDR3 (Kabat)	VDFGHSRYWYFDV
953	HCDR1 (Chothia)	GYTFTNY
954	HCDR2 (Chothia)	YPGNYD
955	HCDR3 (Chothia)	VDFGHSRYWYFDV
956	HCDR1 (IMGT)	GYTFTNYN
957	HCDR2 (IMGT)	IYPGNYDT
958	HCDR3 (IMGT)	ARVDFGHSRYWYFDV
959	HCDR1 (комбинация)	GYTFTNYNLH
960	HCDR2 (комбинация)	AIYPGNYDTSYNQKFKG
961	HCDR3 (комбинация)	VDFGHSRYWYFDV
962	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYN LHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNYDTSYNQKFK GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARV DFGHSRYWYFDVWGQGTTVTVSS
963	LCDR1 (Kabat)	RATSSVSSMN
964	LCDR2 (Kabat)	ATSNLAS
965	LCDR3 (Kabat)	QQWTFNPPT
966	LCDR1 (Chothia)	TSSVSS
967	LCDR2 (Chothia)	ATS

968	LCDR3 (Chothia)	WTFNPP
969	LCDR1 (IMGT)	SSVSS
970	LCDR2 (IMGT)	ATS
971	LCDR3 (IMGT)	QQWTFNPPT
972	LCDR1 (комбинация)	RATSSVSSMN
973	LCDR2 (комбинация)	ATSNLAS
974	LCDR3 (комбинация)	QQWTFNPPT
975	VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRATSSVSSMNWYQQKPGKAPKPLIHATSNLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWTFNPPTFGQGTKLEIK
976	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYNLHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNYDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVDFGHSRYWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRATSSVSSMNWYQQKPGKAPKPLIHATSNLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWTFNPPTFGQGTKLEIK
977	Полная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYNLHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNYDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVDFGHSRYWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRATSSVSSMNWYQQKPGKAPKPLIHATSNLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWTFNPPTFGQGTKLEIKT

		TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR
CD20-C2H1		
978	HCDR1 (Kabat)	NYWMH
979	HCDR2 (Kabat)	FITPTTGYPEYNQKFKD
980	HCDR3 (Kabat)	RKVGKGVYYALDY
981	HCDR1 (Chothia)	GYTFTNY
982	HCDR2 (Chothia)	TPTTGY
983	HCDR3 (Chothia)	RKVGKGVYYALDY
984	HCDR1 (IMGT)	GYTFTNYW
985	HCDR2 (IMGT)	ITPTTGYP
986	HCDR3 (IMGT)	ARRKVGKGVYYALDY
987	HCDR1 (комбинация)	GYTFTNYWMH
988	HCDR2 (комбинация)	FITPTTGYPEYNQKFKD
989	HCDR3 (комбинация)	RKVGKGVYYALDY
990	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYW

		MHWVRQAPGQGLEWMGFITPTTGYPEYNQKFKD RVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARR KVGKGVYYALDYWGQGTTVTVSS
991	LCDR1 (Kabat)	RASGNIHNYLA
992	LCDR2 (Kabat)	NTKTLAD
993	LCDR3 (Kabat)	QHFWSSPWT
994	LCDR1 (Chothia)	SGNIHNY
995	LCDR2 (Chothia)	NTK
996	LCDR3 (Chothia)	FWSSPW
997	LCDR1 (IMGT)	GNIHNY
998	LCDR2 (IMGT)	NTK
999	LCDR3 (IMGT)	QHFWSSPWT
1000	LCDR1 (комбинация)	RASGNIHNYLA
1001	LCDR2 (комбинация)	NTKTLAD
1002	LCDR3 (комбинация)	QHFWSSPWT
1003	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLAW YQQKPGKVPKLLIYNTKTLADGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDVATYYCQHFWSSPWTFGGGTK VEIK
1004	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYW MHWVRQAPGQGLEWMGFITPTTGYPEYNQKFKD RVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARR

		KVGKGVYYALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASGNIHNYLAWYQQKPGKVPKLLIYNTKTLADG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQHFW SSPWTFGGGTKVEIK
1005	Полная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQG LEWMGFITPTTGYPEYNQKFKDRVTMTADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARRKVGKGVYYALDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLAWY QQKPGKVPKLLIYNTKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDVATYYCQHFWSSPWTFGGGTKV EIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CD20-C2H2		
1006	HCDR1 (Kabat)	NYWMH
1007	HCDR2 (Kabat)	FITPTTGYPEYNQKFKD
1008	HCDR3 (Kabat)	RKVGKGVYYALDY
1009	HCDR1 (Chothia)	GYTFTNY
1010	HCDR2 (Chothia)	TPTTGY
1011	HCDR3 (Chothia)	RKVGKGVYYALDY

1012	HCDR1 (IMGT)	GYTFTNYW
1013	HCDR2 (IMGT)	ITPTTGYP
1014	HCDR3 (IMGT)	ARRKVGKGVYYALDY
1015	HCDR1 (комбинация)	GYTFTNYWMH
1016	HCDR2 (комбинация)	FITPTTGYPEYNQKFKD
1017	HCDR3 (комбинация)	RKVGKGVYYALDY
1018	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYW MHWVRQAPGQGLEWMGFITPTTGYPEYNQKFKD RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRK VGKGVYYALDYWGQGTTVTVSS
1019	LCDR1 (Kabat)	RASGNIHNYLA
1020	LCDR2 (Kabat)	NTKTLAD
1021	LCDR3 (Kabat)	QHFWSSPWT
1022	LCDR1 (Chothia)	SGNIHNY
1023	LCDR2 (Chothia)	NTK
1024	LCDR3 (Chothia)	FWSSPW
1025	LCDR1 (IMGT)	GNIHNY
1026	LCDR2 (IMGT)	NTK
1027	LCDR3 (IMGT)	QHFWSSPWT

1028	LCDR1 (комбинация)	RASGNIHNYLA
1029	LCDR2 (комбинация)	NTKTLAD
1030	LCDR3 (комбинация)	QHFWSSPWT
1031	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLAW YQQKPGKVPKLLIYNTKTLADGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDVATYYCQHFWSSPWTFGGGTK VEIK
1032	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYW MHWVRQAPGQGLEWMGFITPTTGYPEYNQKFKD RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRK VGKGVYYALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASGNIHNYLAWYQQKPGKVPKLLIYNTKTLADG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQHFW SSPWTFGGGTKVEIK
1033	Полная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQG LEWMGFITPTTGYPEYNQKFKDRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARRKVGKGVYYALDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLAWY QQKPGKVPKLLIYNTKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDVATYYCQHFWSSPWTFGGGTKV EIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CD20-C2H3		

1034	HCDR1 (Kabat)	NYWMH
1035	HCDR2 (Kabat)	FITPTTGYPEYNQKFKD
1036	HCDR3 (Kabat)	RKVGKGVYYALDY
1037	HCDR1 (Chothia)	GYTFTNY
1038	HCDR2 (Chothia)	TPTTGY
1039	HCDR3 (Chothia)	RKVGKGVYYALDY
1040	HCDR1 (IMGT)	GYTFTNYW
1041	HCDR2 (IMGT)	ITPTTGYP
1042	HCDR3 (IMGT)	ARRKVGKGVYYALDY
1043	HCDR1 (комбинация)	GYTFTNYWMH
1044	HCDR2 (комбинация)	FITPTTGYPEYNQKFKD
1045	HCDR3 (комбинация)	RKVGKGVYYALDY
1046	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYW MHWVRQAPGQGLEWMGFITPTTGYPEYNQKFKD RVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARR KVGKGVYYALDYWGQGTTVTVSS
1047	LCDR1 (Kabat)	RASGNIHNYLA
1048	LCDR2 (Kabat)	NTKTLAD
1049	LCDR3 (Kabat)	QHFWSSPWT

1050	LCDR1 (Chothia)	SGNIHNY
1051	LCDR2 (Chothia)	NTK
1052	LCDR3 (Chothia)	FWSSPW
1053	LCDR1 (IMGT)	GNIHNY
1054	LCDR2 (IMGT)	NTK
1055	LCDR3 (IMGT)	QHFWSSPWT
1056	LCDR1 (комбинация)	RASGNIHNYLA
1057	LCDR2 (комбинация)	NTKTLAD
1058	LCDR3 (комбинация)	QHFWSSPWT
1059	VL	AIRMTQSPFSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLAW YQQKPAKAPKLFIYNTKTLADGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWSSPWTFGGGTK VEIK
1060	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYW MHWVRQAPGQGLEWMGFITPTTGYPEYNQKFKD RVTMTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARR KVGKGVYYALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSAIRMTQSPFSLSASVGDRVTITCR ASGNIHNYLAWYQQKPAKAPKLFIYNTKTLADG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFW SSPWTFGGGTKVEIK
1061	Полная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQG LEWMGFITPTTGYPEYNQKFKDRVTMTADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARRKVGKGVYYALDY

		WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAI RMTQSPFSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLAWY QQKPAKAPKLFIYNTKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCQHFWSSPWTFGGGTKV EIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CD20-C2H4		
1062	HCDR1 (Kabat)	NYWMH
1063	HCDR2 (Kabat)	FITPTTGYPEYNQKFKD
1064	HCDR3 (Kabat)	RKVGKGVYYALDY
1065	HCDR1 (Chothia)	GYTFTNY
1066	HCDR2 (Chothia)	TPTTGY
1067	HCDR3 (Chothia)	RKVGKGVYYALDY
1068	HCDR1 (IMGT)	GYTFTNYW
1069	HCDR2 (IMGT)	ITPTTGYP
1070	HCDR3 (IMGT)	ARRKVGKGVYYALDY
1071	HCDR1 (комбинация)	GYTFTNYWMH
1072	HCDR2	FITPTTGYPEYNQKFKD

	(комбинация)	
1073	HCDR3 (комбинация)	RKVGKGVYYALDY
1074	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYW MHWVRQAPGQGLEWMGFITPTTGYPEYNQKFKD RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRK VGKGVYYALDYWGQGTTVTVSS
1075	LCDR1 (Kabat)	RASGNIHNYLA
1076	LCDR2 (Kabat)	NTKTLAD
1077	LCDR3 (Kabat)	QHFWSSPWT
1078	LCDR1 (Chothia)	SGNIHNY
1079	LCDR2 (Chothia)	NTK
1080	LCDR3 (Chothia)	FWSSPW
1081	LCDR1 (IMGT)	GNIHNY
1082	LCDR2 (IMGT)	NTK
1083	LCDR3 (IMGT)	QHFWSSPWT
1084	LCDR1 (комбинация)	RASGNIHNYLA
1085	LCDR2 (комбинация)	NTKTLAD
1086	LCDR3 (комбинация)	QHFWSSPWT
1087	VL	AIRMTQSPFSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLAW YQQKPAKAPKLFIYNTKTLADGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWSSPWTFGGGTK

		VEIK
1088	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYW MHWVRQAPGQGLEWMGFITPTTGYPEYNQKFKD RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRK VGKGVYYALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSAIRMTQSPFSLSASVGDRVTITCRA SGNIHNYLAWYQQKPAKAPKLFIYNTKTLADGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWSS PWTFGGGTKVEIK
1089	Полная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQG LEWMGFITPTTGYPEYNQKFKDRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARRKVGKGVYYALDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAI RMTQSPFSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLAWY QQKPAKAPKLFIYNTKTLADGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCQHFWSSPWTFGGGTKV EIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CD20-C5H2		
1090	HCDR1 (Kabat)	SYNMH
1091	HCDR2 (Kabat)	AIYPGNGDTSYNPKFKG
1092	HCDR3 (Kabat)	SYFYGSSSWYFDV
1093	HCDR1 (Chothia)	GYTFTSY

1094	HCDR2 (Chothia)	YPGNGD
1095	HCDR3 (Chothia)	SYFYGSSSWYFDV
1096	HCDR1 (IMGT)	GYTFTSYN
1097	HCDR2 (IMGT)	IYPGNGDT
1098	HCDR3 (IMGT)	ARSYFYGSSSWYFDV
1099	HCDR1 (комбинация)	GYTFTSYNMH
1100	HCDR2 (комбинация)	AIYPGNGDTSYNPKFKG
1101	HCDR3 (комбинация)	SYFYGSSSWYFDV
1102	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYN MHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNPKFK GRVTMTADKSTRTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR SYFYGSSSWYFDVWGQGTTVTVSS
1103	LCDR1 (Kabat)	RASSSVSSMH
1104	LCDR2 (Kabat)	ATSNLAS
1105	LCDR3 (Kabat)	QQWIFNPPT
1106	LCDR1 (Chothia)	SSSVSS
1107	LCDR2 (Chothia)	ATS
1108	LCDR3 (Chothia)	WIFNPP
1109	LCDR1 (IMGT)	SSVSS

1110	LCDR2 (IMGT)	ATS
1111	LCDR3 (IMGT)	QQWIFNPPT
1112	LCDR1 (комбинация)	RASSSVSSMH
1113	LCDR2 (комбинация)	ATSNLAS
1114	LCDR3 (комбинация)	QQWIFNPPT
1115	VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSVSSMHWY QQKPGKAPKPLIFATSNLASGVPSRFSGSGSGTEY TLTISSLQPEDFATYYCQQWIFNPPTFGGGTKVEIK
1116	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYN MHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNPKFK GRVTMTADKSTRTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR SYFYGSSSWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASSSVSSMHWYQQKPGKAPKPLIFATSNLASGVP SRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWIFNP PTFGGGTKVEIK
1117	Полная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGL EWMGAIYPGNGDTSYNPKFKGRVTMTADKSTRT AYMELSSLRSEDTAVYYCARSYFYGSSSWYFDV WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSVSSMHWYQ QKPGKAPKPLIFATSNLASGVPSRFSGSGSGTEYT LTISSLQPEDFATYYCQQWIFNPPTFGGGTKVEIKT TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL

		QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR
CD20-C5H3		
1118	HCDR1 (Kabat)	SYNMH
1119	HCDR2 (Kabat)	AIYPGNGDTSYNPKFKG
1120	HCDR3 (Kabat)	SYFYGSSSWYFDV
1121	HCDR1 (Chothia)	GYTFTSY
1122	HCDR2 (Chothia)	YPGNGD
1123	HCDR3 (Chothia)	SYFYGSSSWYFDV
1124	HCDR1 (IMGT)	GYTFTSYN
1125	HCDR2 (IMGT)	IYPGNGDT
1126	HCDR3 (IMGT)	ARSYFYGSSSWYFDV
1127	HCDR1 (комбинация)	GYTFTSYNMH
1128	HCDR2 (комбинация)	AIYPGNGDTSYNPKFKG
1129	HCDR3 (комбинация)	SYFYGSSSWYFDV
1130	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYN MHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNPKFK GRVTITADKSTRTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS YFYGSSSWYFDVWGQGTTVTVSS
1131	LCDR1 (Kabat)	RASSSVSSMH

1132	LCDR2 (Kabat)	ATSNLAS
1133	LCDR3 (Kabat)	QQWIFNPPT
1134	LCDR1 (Chothia)	SSSVSS
1135	LCDR2 (Chothia)	ATS
1136	LCDR3 (Chothia)	WIFNPP
1137	LCDR1 (IMGT)	SSVSS
1138	LCDR2 (IMGT)	ATS
1139	LCDR3 (IMGT)	QQWIFNPPT
1140	LCDR1 (комбинация)	RASSSVSSMH
1141	LCDR2 (комбинация)	ATSNLAS
1142	LCDR3 (комбинация)	QQWIFNPPT
1143	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSMHWY QQKPGQAPRPLIFATSNLASGIPARFSGSGSGTDY TLTISSLEPEDAAVYYCQQWIFNPPTFGGGTKVEI K
1144	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYN MHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNPKFK GRVTITADKSTRTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS YFYGSSSWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SSSVSSMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCQQWIFNPP TFGGGTKVEIK

1145	Полная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGL EWMGAIYPGNGDTSYNPKFKGRVTITADKSTRTA YMELSSLRSEDTAVYYCARSYFYGSSSWYFDVW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSMHWYQQK PGQAPRPLIFATSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTIS SLEPEDAAVYYCQQWIFNPPTFGGGTKVEIKTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR
CD20-C5H4		
1146	HCDR1 (Kabat)	SYNMH
1147	HCDR2 (Kabat)	AIYPGNGDTSYNPKFKG
1148	HCDR3 (Kabat)	SYFYGSSSWYFDV
1149	HCDR1 (Chothia)	GYTFTSY
1150	HCDR2 (Chothia)	YPGNGD
1151	HCDR3 (Chothia)	SYFYGSSSWYFDV
1152	HCDR1 (IMGT)	GYTFTSYN
1153	HCDR2 (IMGT)	IYPGNGDT
1154	HCDR3	ARSYFYGSSSWYFDV

	(IMGT)	
1155	HCDR1 (комбинация)	GYTFTSYNMH
1156	HCDR2 (комбинация)	AIYPGNGDTSYNPKFKG
1157	HCDR3 (комбинация)	SYFYGSSSWYFDV
1158	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYN MHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNPKFK GRVTITADKSTRTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS YFYGSSSWYFDVWGQGTTVTVSS
1159	LCDR1 (Kabat)	RASSSVSSMH
1160	LCDR2 (Kabat)	ATSNLAS
1161	LCDR3 (Kabat)	QQWIFNPPT
1162	LCDR1 (Chothia)	SSSVSS
1163	LCDR2 (Chothia)	ATS
1164	LCDR3 (Chothia)	WIFNPP
1165	LCDR1 (IMGT)	SSVSS
1166	LCDR2 (IMGT)	ATS
1167	LCDR3 (IMGT)	QQWIFNPPT
1168	LCDR1 (комбинация)	RASSSVSSMH
1169	LCDR2 (комбинация)	ATSNLAS
1170	LCDR3	QQWIFNPPT

	(комбинация)	
1171	VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSVSSMHWY QQKPGKAPKPLIFATSNLASGVPSRFSGSGSGTEY TLTISSLQPEDFATYYCQQWIFNPPTFGGGTKVEIK
1172	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYN MHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNPKFK GRVTITADKSTRTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS YFYGSSSWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRA SSSVSSMHWYQQKPGKAPKPLIFATSNLASGVPS RFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQWIFNPP TFGGGTKVEIK
1173	Полная последовательность CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGL EWMGAIYPGNGDTSYNPKFKGRVTITADKSTRTA YMELSSLRSEDTAVYYCARSYFYGSSSWYFDVW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ LTQSPSFLSASVGDRVTITCRASSSVSSMHWYQQ KPGKAPKPLIFATSNLASGVPSRFSGSGSGTEYTLT ISSLQPEDFATYYCQQWIFNPPTFGGGTKVEIKTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR
CD20-C3		
1174	VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYN LHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNYDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARVD FGHSRYWYFDVWGAGTTVTVSS
1175	VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRATSSVSSMNWY QQKPGSFPRPWIHATSNLASGVPARFSGSGSGTSY SLTISRVEAEDAATYYCQQWTFNPPTFGAGAKLE

		LK
CD20-C5		
1176	VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYN MHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNPKFKG KATLTADKSSRTAYIHLSSLTSEDSVVYYCARSYF YGSSSWYFDVWGAGTTVTVSS
1177	VL	QIILSQSPAILSASPGEKVTLTCRASSSVSSMHWYQ QKPGSSPKPWIFATSNLASGVPARFTGSGSGTSYS LTISRVEAEDAATYYCQQWIFNPPTFGGGTSLEIK
CD20-C2		
1178	VH	QVHLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTNYW MHWVKQRPGQGLEWIGFITPTTGYPEYNQKFKD KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRK VGKGVYYALDYWGQGTSVTVSS
1179	VL	DILMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAW YQQKQGNSPQLLVYNTKTLADGVPSRFSGSGSGT QYSLKINSLQTEDFGTYYCQHFWSSPWTFGGGTK LEIK

CAR, которые связываются с CD22, известны из уровня техники. Например, они раскрыты в WO2018/067992 или WO2016/164731. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой известный CAR для CD22, например, антигенсвязывающий домен для CD22 из любого известного из уровня техники CAR для CD22.

Иллюстративные последовательности, связывающие CD22, или последовательности CAR для CD22 раскрыты, например, в таблицах 6A, 6B, 7A, 7B, 7C, 8A, 8B, 9A, 9B, 10A и 10B согласно WO2016164731 и таблицах 6-10 согласно WO2018067992. В некоторых вариантах осуществления последовательность CAR для CD22 содержит CDR, вариабельную область, scFv или полноразмерную последовательность CAR для CD22, раскрытую в WO2018067992 или WO2016164731.

В вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с CD22 (CAR для CD22). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен нацеливается на CD22 человека. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит последовательность одноцепочечного Fv, описанного в данном документе.

Последовательности CAR для CD22 человека представлены ниже. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD22 человека представляет собой CAR22-65.

Последовательность scFv CAR для CD22 человека

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTY HRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWS DAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSS DVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDE ADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL (SEQ ID NO: 753)

Вариабельная область тяжелой цепи CAR для CD22 человека

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTY HRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWS DAFDVWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 754)

Вариабельная область легкой цепи CAR для CD22 человека

QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVS NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL (SEQ ID NO: 755)

В некоторых вариантах осуществления CAR для CD22 содержат последовательность, например, CDR, VH, VL, scFv или полную последовательность CAR, раскрытую в таблицах 15-16 и таблице 24 ниже, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

Таблица 15. CDR вариабельного домена тяжелой цепи CAR для CD22 (CAR22-65)

Кандидат	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR22-65 согласно комбинированному определению	GDSMLSNSDTWN	744	RTYHRSTWYDDYASSVRG	746	VRLQDGNSWSDAFDV	748
CAR22-65 по Kabat	SNSDTWN	745	RTYHRSTWYDDYASSVRG	747	VRLQDGNSWSDAFDV	749
CD22-65 по Chothia	GDSMLSNSD	1180	YHRSTWY	1181	VRLQDGNSWSDAFDV	1182
CD22-65 по IMGT	GDSMLSNSDT	1183	TYHRSTWYD	1184	ARVRLQDGNSWSDAFDV	1185

Таблица 16. CDR вариабельного домена легкой цепи CAR для CD22 (CAR22-65). Последовательности CDR LC в данной таблице имеют одинаковую последовательность согласно определению по Kabat или комбинированному определению

Кандидат	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR22-65 согласно комбинированному определению	TGTSSDVGGYNYVS	750	DVSNRPS	751	SSYTSSSTLYV	752
CD22-65 по Kabat	TGTSSDVGGYNYVS	1186	DVSNRPS	1189	SSYTSSSTLYV	1192
CD22-65 по Chothia	TSSDVGGYNY	1187	DVS	1190	YTSSSTLY	1193
CD22-65 IMGT	SSDVGGYNY	1188	DVS	1191	SSYTSSSTLYV	1194

Таблица 24. Аминокислотные последовательности иллюстративных молекул, связывающихся с CD22

SEQ ID NO:	**Область**	**Последовательность**
CD22-65s		
1195	scFv (VH-линкер-VL) (линкер показан курсивом и нижним подчеркиванием)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALTQPAS ASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
CD22-65ss		
1196	scFv (VH-VL) (линкер между VH и VL отсутствует)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSQSALTQPASASGSP GQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
CD22-		

65sKD		
1197	VH	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRKSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
1198	VL	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVS WYQDHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQL TVL
1199	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRKSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALTQPA SASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQDHPGK APKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
CD22-64		
1200	CDR1 HC (Kabat)	SNSDTWN
1201	CDR2 HC (Kabat)	RTYHRSTWYDDYASSVRG
1202	CDR3 HC (Kabat)	VRLQDGNSWSDAFDV
1203	CDR1 HC (Chothia)	GDSVLSNSD
1204	CDR2 HC (Chothia)	YHRSTWY
1205	CDR3 HC (Chothia)	VRLQDGNSWSDAFDV
1206	CDR1 HC (IMGT)	GDSVLSNSDT
1207	CDR2 HC (IMGT)	TYHRSTWYD
1208	CDR3 HC	ARVRLQDGNSWSDAFDV

	(IMGT)	
1209	CDR1 HC (комбинация)	GDSVLSNSDTWN
1210	CDR2 HC (комбинация)	RTYHRSTWYDDYASSVRG
1211	CDR3 HC (комбинация)	VRLQDGNSWSDAFDV
1212	VH	EVQLQQSGPGLVKPSQTLPLTCAISGDSVLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
1213	CDR1 LC (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
1214	CDR2 LC (Kabat)	DVSNRPS
1215	CDR3 LC (Kabat)	SSYTSSSTLYV
1216	CDR1 LC (Chothia)	TSSDVGGYNY
1217	CDR2 LC (Chothia)	DVS
1218	CDR3 LC (Chothia)	YTSSSTLY
1219	CDR1 LC (IMGT)	SSDVGGYNY
1220	CDR2 LC (IMGT)	DVS
1221	CDR3 LC (IMGT)	SSYTSSSTLYV
1222	CDR1 LC (комбинация)	TGTSSDVGGYNYVS
1223	CDR2 LC (комбинация)	DVSNRPS
1224	CDR3 LC	SSYTSSSTLYV

	(комбинация)	
1225	VL	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQL TVL
1226	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLPLTCAISGDSVLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGG GPQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYV SWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQ LTVL
CD22-57		
1227	CDR1 HC (Kabat)	NNNAAWN
1228	CDR2 HC (Kabat)	RTYHRSTWYNDYVGSVKS
1229	CDR3 HC (Kabat)	ETDYGDYGAFDI
1230	CDR1 HC (Chothia)	GDSVSNNNA
1231	CDR2 HC (Chothia)	YHRSTWY
1232	CDR3 HC (Chothia)	ETDYGDYGAFDI
1233	CDR1 HC (IMGT)	GDSVSNNNAA
1234	CDR2 HC (IMGT)	TYHRSTWYN
1235	CDR3 HC (IMGT)	ARETDYGDYGAFDI
1236	CDR1 HC (комбинация)	GDSVSNNNAAWN

1237	CDR2 HC (комбинация)	RTYHRSTWYNDYVGSVKS
1238	CDR3 HC (комбинация)	ETDYGDYGAFDI
1239	VH	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSNNNAAW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYNDYVGSVKSRI TINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARETDYGD YGAFDIWGQGTTVTVSS
1240	CDR1 LC (Kabat)	TGSRNDIGAYESVS
1241	CDR2 LC (Kabat)	GVNNRPS
1242	CDR3 LC (Kabat)	SSHTTTSTLYV
1243	CDR1 LC (Chothia)	SRNDIGAYES
1244	CDR2 LC (Chothia)	GVN
1245	CDR3 LC (Chothia)	HTTTSTLY
1246	CDR1 LC (IMGT)	RNDIGAYES
1247	CDR2 LC (IMGT)	GVN
1248	CDR3 LC (IMGT)	SSHTTTSTLYV
1249	CDR1 LC (комбинация)	TGSRNDIGAYESVS
1250	CDR2 LC (комбинация)	GVNNRPS
1251	CDR3 LC (комбинация)	SSHTTTSTLYV
1252	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSRNDIGAYESVSW YQQHPGNAPKLIIHGVNNRPSGVFDRFSVSQSGNTA

		SLTISGLQAEDEADYYCSSHTTTSTLYVFGTGTKVTV L
1253	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSNNNAAW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYNDYVGSVKSRI TINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARETDYGD YGAFDIWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSA LTQPASVSGSPGQSITISCTGSRNDIGAYESVSWYQQ HPGNAPKLIIHGVNNRPSGVFDRFSVSQSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSHTTTSTLYVFGTGTKVTVL
CD22-58		
1254	CDR1 HC (Kabat)	SNSAAWN
1255	CDR2 HC (Kabat)	RTFYRSKWYNDYAVSVKG
1256	CDR3 HC (Kabat)	GDYYYGLDV
1257	CDR1 HC (Chothia)	GDSVSSNSA
1258	CDR2 HC (Chothia)	FYRSKWY
1259	CDR3 HC (Chothia)	GDYYYGLDV
1260	CDR1 HC (IMGT)	GDSVSSNSAA
1261	CDR2 HC (IMGT)	TFYRSKWYN
1262	CDR3 HC (IMGT)	AGGDYYYGLDV
1263	CDR1 HC (комбинация)	GDSVSSNSAAWN
1264	CDR2 HC (комбинация)	RTFYRSKWYNDYAVSVKG
1265	CDR3 HC (комбинация)	GDYYYGLDV

1266	VH	EVQLQQSGPGLVNPSQTLSITCAISGDSVSSNSAAWN WIRQSPSRGLEWLGRTFYRSKWYNDYAVSVKGRITI SPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAGGDYYYGL DVWGQGTTVTVSS
1267	CDR1 LC (Kabat)	TGSSSDVGGYNSVS
1268	CDR2 LC (Kabat)	EVINRPS
1269	CDR3 LC (Kabat)	SSYTSSSTYV
1270	CDR1 LC (Chothia)	SSSDVGGYNS
1271	CDR2 LC (Chothia)	EVI
1272	CDR3 LC (Chothia)	YTSSSTY
1273	CDR1 LC (IMGT)	SSDVGGYNS
1274	CDR2 LC (IMGT)	EVI
1275	CDR3 LC (IMGT)	SSYTSSSTYV
1276	CDR1 LC (комбинация)	TGSSSDVGGYNSVS
1277	CDR2 LC (комбинация)	EVINRPS
1278	CDR3 LC (комбинация)	SSYTSSSTYV
1279	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNSVSW YQQHPGKAPKLMIYEVINRPSGVSHRFSGSKSGNTA SLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTYVFGTGTKVTVL
1280	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLQQSGPGLVNPSQTLSITCAISGDSVSSNSAAWN WIRQSPSRGLEWLGRTFYRSKWYNDYAVSVKGRITI SPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAGGDYYYGL

		DVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQP ASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNSVSWYQQHPGK APKLMIYEVINRPSGVSHRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTSSSTYVFGTGTKVTVL
CD22-59		
1281	CDR1 HC (Kabat)	SNSDTWN
1282	CDR2 HC (Kabat)	RTYHRSTWYDDYASSVRG
1283	CDR3 HC (Kabat)	DRLQDGNSWSDAFDV
1284	CDR1 HC (Chothia)	GDSVLSNSD
1285	CDR2 HC (Chothia)	YHRSTWY
1286	CDR3 HC (Chothia)	DRLQDGNSWSDAFDV
1287	CDR1 HC (IMGT)	GDSVLSNSDT
1288	CDR2 HC (IMGT)	TYHRSTWYD
1289	CDR3 HC (IMGT)	ARDRLQDGNSWSDAFDV
1290	CDR1 HC (комбинация)	GDSVLSNSDTWN
1291	CDR2 HC (комбинация)	RTYHRSTWYDDYASSVRG
1292	CDR3 HC (комбинация)	DRLQDGNSWSDAFDV
1293	VH	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
1294	CDR1 LC	TGSSSDIGGFNYVS

	(Kabat)	
1295	CDR2 LC (Kabat)	EVTNRPS
1296	CDR3 LC (Kabat)	SSYASGSPLYV
1297	CDR1 LC (Chothia)	SSSDIGGFNY
1298	CDR2 LC (Chothia)	EVT
1299	CDR3 LC (Chothia)	YASGSPLY
1300	CDR1 LC (IMGT)	SSDIGGFNY
1301	CDR2 LC (IMGT)	EVT
1302	CDR3 LC (IMGT)	SSYASGSPLYV
1303	CDR1 LC (комбинация)	TGSSSDIGGFNYVS
1304	CDR2 LC (комбинация)	EVTNRPS
1305	CDR3 LC (комбинация)	SSYASGSPLYV
1306	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDIGGFNYVSWYQQHAGEAPKLMIYEVTNRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYASGSPLYVFGTGTKVTVL
1307	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDIGGFNYVSWYQQHAGEAPKLMIYEVTNRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYASGSPLYVFGTGTK

		VTVL
CD22-60		
1308	CDR1 HC (Kabat)	SNSDTWN
1309	CDR2 HC (Kabat)	RTYHRSTWYDDYASSVRG
1310	CDR3 HC (Kabat)	DRLQDGNSWSDAFDV
1311	CDR1 HC (Chothia)	GDSVLSNSD
1312	CDR2 HC (Chothia)	YHRSTWY
1313	CDR3 HC (Chothia)	DRLQDGNSWSDAFDV
1314	CDR1 HC (IMGT)	GDSVLSNSDT
1315	CDR2 HC (IMGT)	TYHRSTWYD
1316	CDR3 HC (IMGT)	ARDRLQDGNSWSDAFDV
1317	CDR1 HC (комбинация)	GDSVLSNSDTWN
1318	CDR2 HC (комбинация)	RTYHRSTWYDDYASSVRG
1319	CDR3 HC (комбинация)	DRLQDGNSWSDAFDV
1320	VH	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
1321	CDR1 LC (Kabat)	TGTSSDIGGYNYVS
1322	CDR2 LC (Kabat)	EVSNRPS

1323	CDR3 LC (Kabat)	SSYTSSSTLYV
1324	CDR1 LC (Chothia)	TSSDIGGYNY
1325	CDR2 LC (Chothia)	EVS
1326	CDR3 LC (Chothia)	YTSSSTLY
1327	CDR1 LC (IMGT)	SSDIGGYNY
1328	CDR2 LC (IMGT)	EVS
1329	CDR3 LC (IMGT)	SSYTSSSTLYV
1330	CDR1 LC (комбинация)	TGTSSDIGGYNYVS
1331	CDR2 LC (комбинация)	EVSNRPS
1332	CDR3 LC (комбинация)	SSYTSSSTLYV
1333	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITFSCTGTSSDIGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGTKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKLTVL
1334	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGSGGSQSALTQPASVSGSPGQSITFSCTGTSSDIGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGTKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKLTVL
CD22-61		
1335	CDR1 HC	SNSDTWN

	(Kabat)	
1336	CDR2 HC (Kabat)	RTYHRSTWYDDYASSVRG
1337	CDR3 HC (Kabat)	DRLQDGNSWSDAFDV
1338	CDR1 HC (Chothia)	GDSVLSNSD
1339	CDR2 HC (Chothia)	YHRSTWY
1340	CDR3 HC (Chothia)	DRLQDGNSWSDAFDV
1341	CDR1 HC (IMGT)	GDSVLSNSDT
1342	CDR2 HC (IMGT)	TYHRSTWYD
1343	CDR3 HC (IMGT)	ARDRLQDGNSWSDAFDV
1344	CDR1 HC (комбинация)	GDSVLSNSDTWN
1345	CDR2 HC (комбинация)	RTYHRSTWYDDYASSVRG
1346	CDR3 HC (комбинация)	DRLQDGNSWSDAFDV
1347	VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
1348	CDR1 LC (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
1349	CDR2 LC (Kabat)	EVSNRPS
1350	CDR3 LC (Kabat)	SSYTSSSTLYV
1351	CDR1 LC	TSSDVGGYNY

	(Chothia)	
1352	CDR2 LC (Chothia)	EVS
1353	CDR3 LC (Chothia)	YTSSSTLY
1354	CDR1 LC (IMGT)	SSDVGGYNY
1355	CDR2 LC (IMGT)	EVS
1356	CDR3 LC (IMGT)	SSYTSSSTLYV
1357	CDR1 LC (комбинация)	TGTSSDVGGYNYVS
1358	CDR2 LC (комбинация)	EVSNRPS
1359	CDR3 LC (комбинация)	SSYTSSSTLYV
1360	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVL
1361	scFv (VH-линкер-VL)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGSGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVL
CD22-62		
1362	CDR1 HC (Kabat)	SNSDTWN
1363	CDR2 HC (Kabat)	RTYHRSTWYDDYASSVRG

1364	CDR3 HC (Kabat)	DRLQDGNSWSDAFDV
1365	CDR1 HC (Chothia)	GDSVLSNSD
1366	CDR2 HC (Chothia)	YHRSTWY
1367	CDR3 HC (Chothia)	DRLQDGNSWSDAFDV
1368	CDR1 HC (IMGT)	GDSVLSNSDT
1369	CDR2 HC (IMGT)	TYHRSTWYD
1370	CDR3 HC (IMGT)	ARDRLQDGNSWSDAFDV
1371	CDR1 HC (комбинация)	GDSVLSNSDTWN
1372	CDR2 HC (комбинация)	RTYHRSTWYDDYASSVRG
1373	CDR3 HC (комбинация)	DRLQDGNSWSDAFDV
1374	VH	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
1375	CDR1 LC (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
1376	CDR2 LC (Kabat)	DVSNRPS
1377	CDR3 LC (Kabat)	SSYTSSSTLYV
1378	CDR1 LC (Chothia)	TSSDVGGYNY
1379	CDR2 LC (Chothia)	DVS

1380	CDR3 LC (Chothia)	YTSSSTLY
1381	CDR1 LC (IMGT)	SSDVGGYNY
1382	CDR2 LC (IMGT)	DVS
1383	CDR3 LC (IMGT)	SSYTSSSTLYV
1384	CDR1 LC (комбинация)	TGTSSDVGGYNYVS
1385	CDR2 LC (комбинация)	DVSNRPS
1386	CDR3 LC (комбинация)	SSYTSSSTLYV
1387	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVL
1388	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVL
CD22-63		
1389	CDR1 HC (Kabat)	SNSDTWN
1390	CDR2 HC (Kabat)	RTYHRSTWYDDYASSVRG
1391	CDR3 HC (Kabat)	DRLQDGNSWSDAFDV
1392	CDR1 HC	GDSVLSNSD

	(Chothia)	
1393	CDR2 HC (Chothia)	YHRSTWY
1394	CDR3 HC (Chothia)	DRLQDGNSWSDAFDV
1395	CDR1 HC (IMGT)	GDSVLSNSDT
1396	CDR2 HC (IMGT)	TYHRSTWYD
1397	CDR3 HC (IMGT)	ARDRLQDGNSWSDAFDV
1398	CDR1 HC (комбинация)	GDSVLSNSDTWN
1399	CDR2 HC (комбинация)	RTYHRSTWYDDYASSVRG
1400	CDR3 HC (комбинация)	DRLQDGNSWSDAFDV
1401	VH	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
1402	CDR1 LC (Kabat)	TGTSSDVGGYNYVS
1403	CDR2 LC (Kabat)	EVSNRPS
1404	CDR3 LC (Kabat)	SSYTSSSTLYI
1405	CDR1 LC (Chothia)	TSSDVGGYNY
1406	CDR2 LC (Chothia)	EVS
1407	CDR3 LC (Chothia)	YTSSSTLY
1408	CDR1 LC	SSDVGGYNY

	(IMGT)	
1409	CDR2 LC (IMGT)	EVS
1410	CDR3 LC (IMGT)	SSYTSSSTLYI
1411	CDR1 LC (комбинация)	TGTSSDVGGYNYVS
1412	CDR2 LC (комбинация)	EVSNRPS
1413	CDR3 LC (комбинация)	SSYTSSSTLYI
1414	VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSW YQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTA SLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYIFGTGTKVTV L
1415	scFv (VH-линкер-VL)	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYV SWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYIFGTGTKV TVL

CAR, которые связываются с EGFR, известны из уровня техники. Например, они раскрыты в WO2014/130657, включенной в данный документ посредством ссылки. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой известный CAR для EGFR, например, антигенсвязывающий домен для EGFR из любого известного из уровня техники CAR для EGFR. Иллюстративные CAR для EGFRvIII могут содержать CDR, вариабельную область, scFv или полноразмерную последовательность CAR, раскрытую в WO2014/130657, например, в таблице 2 в WO2014/130657, включенной в данный документ посредством ссылки.

CAR, которые связываются с CD123, известны из уровня техники. Например, они раскрыты в WO2014/130635 или WO2016/028896. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой известный CAR для CD123, например, антигенсвязывающий домен для CD123 из любого известного из уровня техники CAR для CD123. Например, CAR1 - CAR8, раскрытые в WO2014/130635; или CAR123-1 - CAR123-

4 и hzCAR123-1 - hzCAR123-32, раскрытые в WO2016/028896. Аминокислотные последовательности молекул и антигенсвязывающих доменов CAR для CD123 (например, содержащих одну, две, три CDR VH и одну, две, три CDR VL согласно Kabat или Chothia) и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, указаны в WO 2014/130635 и WO2016/028896.

CAR, которые связываются с CLL-1, известны из уровня техники. Например, они раскрыты в US2016/0051651A1, включенной в данный документ посредством ссылки. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой известный CAR для CLL-1, например, антигенсвязывающий домен для CLL-1 из любого известного из уровня техники CAR для CLL-1.

В некоторых вариантах осуществления CAR включает в себя CAR или антигенсвязывающий домен для CLL-1 согласно таблице 2 в WO2016/014535, включенной в данный документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности молекул и антигенсвязывающих доменов CAR для CLL-1 (например, содержащих одну, две, три CDR VH и одну, две, три CDR VL согласно Kabat или Chothia) и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, указаны в WO2016/014535.

CAR, которые связываются с CD33, известны из уровня техники. Например, они раскрыты в US2016/0096892A1 и WO2016/014576, включенных в данный документ посредством ссылки. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой известный CAR для CD33, например, антигенсвязывающий домен для CD33 из любого известного из уровня техники CAR для CD33. Например, CAR33-1 - CAR33-9, раскрытые в WO2016/014576.

В некоторых вариантах осуществления CAR включает в себя CAR или антигенсвязывающий домен для CD33 согласно таблицам 2 или 9 в WO2016/014576, включенной в данный документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности молекул и антигенсвязывающих доменов CAR для CD33 (например, содержащих одну, две, три CDR VH и одну, две, три CDR VL согласно Kabat или Chothia) и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, указаны в WO2016/014576.

CAR, которые связываются с мезотелином, известны из уровня техники. Например, они раскрыты в WO2015090230 и WO2017112741, например, в таблицах 2, 3, 4 и 5 в WO2017112741, включенной в данный документ посредством ссылки, где они связывают мезотелин человека. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой известный CAR для мезотелина, например, антигенсвязывающий домен для мезотелина из любого известного из уровня техники CAR для мезотелина.

CAR, которые связываются с GFR-альфа 4, известны из уровня техники. Например, они раскрыты в WO2016/025880. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой известный CAR для GFR-альфа 4, например, антигенсвязывающий домен для GFR-альфа 4 из любого известного из уровня техники CAR для GFR-альфа 4. Аминокислотные последовательности молекул и антигенсвязывающих доменов CAR для GFR-альфа 4 (например, содержащих одну, две, три CDR VH и одну, две, три CDR VL

согласно Kabat или Chothia) и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, указаны в WO2016/025880.

Структуры антигенсвязывающего домена

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен кодируемой молекулы CAR содержит антитело, фрагмент антитела, scFv, Fv, Fab, (Fab')2, однодоменное антитело (SDAB), VH- или VL-домен, VHH-домен верблюдовых или бифункциональное (например, биспецифическое) гибридное антитело (например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)).

В некоторых случаях scFv можно получить в соответствии со способом, известным из уровня техники (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426, и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Молекулы scFv можно получить путем связывания VH- и VL-областей друг с другом с помощью гибких полипептидных линкеров. Молекулы scFv содержат линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотным составом. Длина линкера может сильно влиять на укладку и взаимодействие вариабельных областей scFv. В действительности, если используют короткий полипептидный линкер (например, длиной 5-10 аминокислот), то предотвращается внутрицепочечная укладка. Межцепочечная укладка также необходима для объединения двух вариабельных областей вместе с образованием функционального эпитопсвязывающего участка. Примеры ориентации и размера линкеров см., например, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, публикациях заявок на патент США №№ 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 и публикациях согласно PCT №№ WO2006/020258 и WO2007/024715, включенных в данный документ посредством ссылки.

ScFv может содержать линкер из по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или больше аминокислотных остатков между его VL- и VH-областями. Линкерная последовательность может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В другом варианте осуществления линкерная последовательность содержит группы глициновых и сериновых повторов, таких как (Gly4Ser)n, где n представляет собой положительное целое число, равное 1 или больше (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой (Gly4Ser)4 (SEQ ID NO: 29) или (Gly4Ser)3 (SEQ ID NO: 30). При изменении длины линкера может сохраняться или усиливаться активность, что приводит к улучшению эффективности в исследованиях активности.

В другом аспекте антигенсвязывающий домен представляет собой Т-клеточный рецептор ("TCR") или его фрагмент, например, одноцепочечный TCR (scTCR). Способы получения таких TCR известны из уровня техники. См., например, Willemsen RA et al, Gene Therapy 7: 1369-1377 (2000); Zhang T et al, Cancer Gene Ther 11: 487-496 (2004); Aggen et al, Gene Ther. 19(4):365-74 (2012) (литературные источники включены в данный документ во всей своей полноте). Например, может быть сконструирован scTCR, который

содержит гены Vα и Vβ из клона Т-клеток, связанные с помощью линкера (например, гибкого пептида). Данный подход является весьма применимым для мишени, ассоциированной с раком, которая сама по себе является внутриклеточной, однако фрагмент такого антигена (пептида) презентируется на поверхности раковых клеток с помощью МНС.

В определенных вариантах осуществления кодируемый антигенсвязывающий домен характеризуется аффинностью связывания с KD, составляющей от 10^{-4} М до 10^{-8} М.

В некоторых вариантах осуществления кодируемая молекула CAR содержит антигенсвязывающий домен, который характеризуется аффинностью связывания с KD в отношении антигена-мишени, составляющей от 10^{-4} М до 10^{-8} М, например, от 10^{-5} М до 10^{-7} М, например, 10^{-6} М или 10^{-7} М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен характеризуется аффинностью связывания, в по меньшей мере пять раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 100 раз или 1000 раз меньшей, чем у эталонного антитела, например, антитела, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления кодируемый антигенсвязывающий домен характеризуется аффинностью связывания, в по меньшей мере 5 раз меньшей, чем у эталонного антитела (например, антитела, из которого получен антигенсвязывающий домен). В некоторых аспектах такие фрагменты антитела являются функциональными в том смысле, что они обеспечивают биологический ответ, который может включать без ограничения активацию иммунного ответа, ингибирование начала передачи сигнала от их антигена-мишени, ингибирование киназной активности и т. п., как будет понятно специалисту в данной области.

В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv-фрагмент антитела, который является гуманизированным по сравнению с мышиной последовательностью scFv, из которого он получен.

В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен CAR, описанный в данном документе (например, scFv), кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, последовательность которой была кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего. В некоторых аспектах целая конструкция CAR по настоящему изобретению кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, целая последовательность которой была кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего. Оптимизация кодонов относится к обнаружению того, что частота встречаемости синонимичных кодонов (т. е. кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту) в кодирующей ДНК смещена у разных видов. Такая вырожденность кодонов обеспечивает возможность кодирования идентичного полипептида различными нуклеотидными последовательностями. Из уровня техники известны различные способы оптимизации кодонов, и они включают, например, способы, раскрытые по меньшей мере в патентах США №№ 5786464 и 6114148.

Конкретные пары антиген-антитело известны из уровня техники. Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления пар антиген-антитело и их

компонентов представлены в данном документе выше в разделе под названием "Мишени" и ниже.

CD19

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с CD19 и характеризуется такой же или сходной специфичностью связывания по сравнению с scFv-фрагментом FMC63, описанным в Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с CD19 и включает в себя scFv-фрагмент, описанный в Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен (например, гуманизированный антигенсвязывающий домен) связывается с CD19 и содержит последовательность из таблицы 3 в WO2014/153270, включенной в данный документ посредством ссылки. В WO2014/153270 также описаны способы анализа связывания и эффективности различных конструкций CAR.

Гуманизация антитела к CD19 мыши необходима для клинических условий, когда специфические для мышей остатки могут индуцировать ответ с образованием антител человека к антигенам мыши (HAMA) у пациентов, которые получают лечение с помощью CART19, т. е. лечение с помощью Т-клеток, трансдуцированных конструкцией CAR19. Получение, определение характеристик и эффективность гуманизированных последовательностей CAR для CD19 описаны в международной заявке WO2014/153270, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, включая примеры 1-5 (стр. 115-159).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит исходную последовательность мышиного scFv из конструкции CAR19, представленной в WO2012/079000 (включенной в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывает CD19 и содержит scFv, описанный в WO2012/079000.

BCMA

Иллюстративные антигенсвязывающие домены, которые связывают BCMA, раскрыты в WO2012/0163805, WO 2017/021450, WO 2017/011804, WO 2017/025038, WO 2016/090327, WO 2016/130598, WO 2016/210293, WO 2016/090320, WO 2016/014789, WO 2016/094304, WO 2016/154055, WO 2015/166073, WO 2015/188119, WO 2015/158671, US 9243058, US 8920776, US 9273141, US 7083785, US 9034324, US 2007/0049735, US 2015/0284467, US 2015/0051266, US 2015/0344844, US 2016/0131655, US 2016/0297884, US 2016/0297885, US 2017/0051308, US 2017/0051252, US 2017/0051252, WO 2016/020332, WO 2016/087531, WO 2016/079177, WO 2015/172800, WO 2017/008169, US 9340621, US 2013/0273055, US 2016/0176973, US 2015/0368351, US 2017/0051068, US 2016/0368988 и US 2015/0232557, включенных в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления предусмотрен антигенсвязывающий домен из одного или нескольких антигенсвязывающих доменов для BCMA, раскрытых в

указанных документах.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает в себя антитело человека или фрагмент антитела человека, которые связывают BCMA. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит одну или несколько (например, все три) из CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC человеческого домена, связывающего BCMA, описанного в данном документе (например, в таблицах 2-14), и/или одну или несколько (например, все три) из CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC человеческого домена, связывающего BCMA, описанного в данном документе (например, в таблицах 2-14). В некоторых вариантах осуществления человеческий домен, связывающий BCMA, содержит VL человека, описанную в данном документе (например, в таблицах 2, 6 и 10), и/или VH человека, описанную в данном документе (например, в таблицах 2, 6 и 10). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, содержащий VL и VH с аминокислотной последовательностью из таблиц 2, 6 и 10. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен (например, scFv) содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности, представленной в таблицах 2, 6 и 10, или последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью из таблиц 2, 6 и 10; и/или VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены, например, консервативные замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен, например, консервативных замен) аминокислотной последовательности, представленной в таблицах 2, 6 и 10, или последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью из таблиц 2, 6 и 10.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, описанный в данном документе, содержит

(1) одну, две или три CDR легкой цепи (LC), выбранные из:

(i) CDR1 LC под SEQ ID NO: 54, CDR2 LC под SEQ ID NO: 55 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 56; и/или

(2) одну, две или три CDR тяжелой цепи (HC) из любой из следующих:

(i) CDR1 HC под SEQ ID NO: 44, CDR2 HC под SEQ ID NO: 45 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 84; (ii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 44, CDR2 HC под SEQ ID NO: 45 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 46; (iii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 44, CDR2 HC под SEQ ID NO: 45 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 68 или (iv) CDR1 HC под SEQ ID NO: 44, CDR2 HC под SEQ ID NO: 45 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 76.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, описанный в данном документе, содержит

(1) одну, две или три CDR легкой цепи (LC) из любой из следующих:

(i) CDR1 LC под SEQ ID NO: 95, CDR2 LC под SEQ ID NO: 131 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 132; (ii) CDR1 LC под SEQ ID NO: 95, CDR2 LC под SEQ ID NO: 96 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 97; (iii) CDR1 LC под SEQ ID NO: 95, CDR2 LC под SEQ ID NO: 114 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 115 или (iv) CDR1 LC под SEQ ID NO: 95, CDR2 LC под SEQ ID NO: 114 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 97; и/или

(2) одну, две или три CDR тяжелой цепи (HC) из любой из следующих:

(i) CDR1 HC под SEQ ID NO: 86, CDR2 HC под SEQ ID NO: 130 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 88; (ii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 86, CDR2 HC под SEQ ID NO: 87 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 88 или (iii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 86, CDR2 HC под SEQ ID NO: 109 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 88.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, описанный в данном документе, содержит

(1) одну, две или три CDR легкой цепи (LC) из любой из следующих:

(i) CDR1 LC под SEQ ID NO: 147, CDR2 LC под SEQ ID NO: 182 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 183; (ii) CDR1 LC под SEQ ID NO: 147, CDR2 LC под SEQ ID NO: 148 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 149 или (iii) CDR1 LC под SEQ ID NO: 147, CDR2 LC под SEQ ID NO: 170 и CDR3 LC под SEQ ID NO: 171; и/или

(2) одну, две или три CDR тяжелой цепи (HC) из любой из следующих:

(i) CDR1 HC под SEQ ID NO: 179, CDR2 HC под SEQ ID NO: 180 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 181; (ii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 137, CDR2 HC под SEQ ID NO: 138 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 139 или (iii) CDR1 HC под SEQ ID NO: 160, CDR2 HC под SEQ ID NO: 161 и CDR3 HC под SEQ ID NO: 162.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44, 45, 84, 54, 55 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44, 45, 46, 54, 55 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44, 45, 68, 54, 55 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 44, 45, 76, 54, 55 и 56 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 47, 48, 84, 57, 58 и 59 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 47, 48, 46, 57, 58 и 59 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 47, 48, 68, 57, 58 и 59 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC,

CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 47, 48, 76, 57, 58 и 59 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 49, 50, 85, 60, 58 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 49, 50, 51, 60, 58 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 49, 50, 69, 60, 58 и 56 соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 49, 50, 77, 60, 58 и 56 соответственно.

Другие иллюстративные мишени

Иллюстративные антигенсвязывающие домены, которые связывают CD20, описаны в WO2016/164731 и WO2018/067992, включенных в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления предусмотрен антигенсвязывающий домен из одного или нескольких антигенсвязывающих доменов для CD20, раскрытых в указанных документах.

Иллюстративные антигенсвязывающие домены, которые связывают CD22, описаны в WO2016/164731 и WO2018/067992, включенных в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC с любыми аминокислотными последовательностями тяжелой цепи связывающего домена, перечисленными в **таблице 15**. В вариантах осуществления антигенсвязывающий домен дополнительно содержит CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC. В вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит аминокислотные последовательности CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC, перечисленные в **таблице 16**.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит одну, две или все из CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC с любыми аминокислотными последовательностями легкой цепи связывающего домена, перечисленными в **таблице 16**, и одну, две или все из CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC с любыми аминокислотными последовательностями тяжелой цепи связывающего домена, перечисленными в **таблице 15**.

Иллюстративные антигенсвязывающие домены, которые связывают EGFRvIII, описаны в WO2014/130657.

Иллюстративные антигенсвязывающие домены, которые связывают CD123, описаны в WO 2014/130635 и WO2016/028896, включенных в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит

последовательность из таблиц 1-2 в WO2014/130635, включенной в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит последовательность из таблиц 2, 6 и 9 в WO2016/028896, включенной в данный документ посредством ссылки.

Иллюстративные антигенсвязывающие домены, которые связывают CLL-1, раскрыты в WO2016/014535, включенной в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит одну, две, три (например, все три) CDR тяжелой цепи - CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC - из антитела, описанного в данном документе (например, антитела, описанного в WO2015/142675, US-2015-0283178-A1, US-2016-0046724-A1, US2014/0322212A1, US2016/0068601A1, US2016/0051651A1, US2016/0096892A1, US2014/0322275A1 или WO2015/090230, включенных в данный документ посредством ссылки), и/или одну, две, три (например, все три) CDR легкой цепи - CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC - из антитела, описанного в данном документе (например, антитела, описанного в WO2015/142675, US-2015-0283178-A1, US-2016-0046724-A1, US2014/0322212A1, US2016/0068601A1, US2016/0051651A1, US2016/0096892A1, US2014/0322275A1 или WO2015/090230, включенных в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела, указанного выше.

В вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описанный в WO2015/142675, US-2015-0283178-A1, US-2016-0046724-A1, US2014/0322212A1, US2016/0068601A1, US2016/0051651A1, US2016/0096892A1, US2014/0322275A1 или WO2015/090230, включенных в данный документ посредством ссылки.

Иллюстративные антигены-мишени, на которые можно нацеливаться с помощью клеток, экспрессирующих CAR, включают без ограничения, среди прочих, CD19, CD123, EGFRvIII, CD33, мезотелин, BCMA и GFR-альфа 4, описанные, например, в WO2014/153270, WO 2014/130635, WO2016/028896, WO 2014/130657, WO2016/014576, WO 2015/090230, WO2016/014565, WO2016/014535 и WO2016/025880, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен любого из CAR, описанных в данном документе (например, для любого из CD19, CD123, EGFRvIII, CD33, мезотелина, BCMA и GFR-альфа 4), содержит одну, две, три (например, все три) CDR тяжелой цепи - CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC - из антитела, указанного выше, и/или одну, две, три (например, все три) CDR легкой цепи - CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC - из антигенсвязывающего домена, указанного выше. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела, указанного или описанного выше.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит одну, две, три (например, все три) CDR тяжелой цепи - CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC - из антитела, указанного выше, и/или одну, две, три (например, все три) CDR легкой цепи - CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC - из антитела, указанного выше. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела, указанного или описанного выше.

Биспецифические CAR

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой би- или полиспецифическую молекулу (например, молекулу полиспецифического антитела). В некоторых вариантах осуществления молекула полиспецифического антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело характеризуется специфичностью в отношении не более чем двух антигенов. Молекула биспецифического антитела характеризуется наличием первой последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, которая характеризуется специфичностью связывания с первым эпитопом, и второй последовательности вариабельного домена иммуноглобулина, которая характеризуется специфичностью связывания со вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В некоторых вариантах осуществления первый и второй эпитопы перекрываются. В некоторых вариантах осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются. В некоторых вариантах осуществления первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например, на разных белках (или на разных субъединицах мультимерного белка). В некоторых вариантах осуществления молекула биспецифического антитела содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые характеризуются специфичностью связывания с первым эпитопом, и последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые характеризуются специфичностью связывания со вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления молекула биспецифического антитела содержит полуантитело, характеризующееся специфичностью связывания с первым эпитопом, и полуантитело, характеризующееся специфичностью связывания со вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления молекула биспецифического антитела содержит полуантитело или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания с первым эпитопом, и полуантитело или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания со вторым эпитопом. В некоторых вариантах осуществления молекула биспецифического антитела содержит scFv или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания с первым эпитопом, и scFv или его фрагмент, характеризующиеся специфичностью связывания со вторым эпитопом.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела представляет собой

молекулу полиспецифического (например, биспецифического или триспецифического) антитела. Такие молекулы включают в себя биспецифические слитые белки, например, экспрессионную конструкцию, содержащую два scFv с гидрофильным спиральным пептидным линкером между ними и полной константной областью, как описано, например, в US5637481; конструкции миниантител со связанными VL- и VH-цепями, дополнительно соединенными пептидными спейсерами с шарнирной областью и CH3-областью антитела, которые могут димеризоваться с образованием биспецифических/поливалентных молекул, как описано, например, в US5837821; нить из VH-доменов (или VL-доменов у представителей семейства), соединенных пептидными связями со сшиваемыми группами на C-конце, дополнительно ассоциированных с VL-доменами с образованием последовательно соединенных Fv (или scFv), как описано, например, в US5864019; и одноцепочечные связывающие полипептиды как с VH-, так и с VL-доменами, связанными пептидным линкером, объединенные в поливалентные структуры посредством нековалентного или химического сшивания с образованием, например, гомобивалентных, гетеробивалентных, тривалентных и тетравалентных структур с использованием формата как типа scFv, так и типа диатела, как описано, например, в US5869620. Содержание вышеупомянутых заявок включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В каждом антителе или фрагменте антитела (например, scFv) в молекуле биспецифического антитела VH может находиться выше или ниже VL. В некоторых вариантах осуществления вышерасположенные антитело или фрагмент антитела (например, scFv) имеют такую организацию, при которой их VH (VH1) расположена выше их VL (VL1), а нижерасположенные антитело или фрагмент антитела (например, scFv) имеют такую организацию, при которой их VL (VL2) расположена выше их VH (VH2), так что молекула биспецифического антитела в целом имеет организацию VH1-VL1-VL2-VH2. В других вариантах осуществления вышерасположенные антитело или фрагмент антитела (например, scFv) имеют такую организацию, при которой их VL (VL1) расположена выше их VH (VH1), а нижерасположенные антитело или фрагмент антитела (например, scFv) имеют такую организацию, при которой их VH (VH2) расположена выше их VL (VL2), так что молекула биспецифического антитела в целом имеет организацию VL1-VH1-VH2-VL2. Линкер необязательно располагается между двумя антителами или фрагментами антител (например, scFv), например, между VL1 и VL2, если конструкция имеет организацию VH1-VL1-VL2-VH2, или между VH1 и VH2, если конструкция имеет организацию VL1-VH1-VH2-VL2. Линкер может представлять собой линкер, описанный в данном документе, например, линкер (Gly4-Ser)n, где n равняется 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 4 (SEQ ID NO: 691). Обычно линкер между двумя scFv должен иметь достаточную длину для предотвращения неправильного спаривания между доменами двух scFv. Линкер необязательно располагается между VL и VH первого scFv. Линкер необязательно располагается между VL и VH второго scFv. В конструкциях, которые имеют несколько линкеров, любые два или более линкера могут быть одинаковыми или

разными. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления биспецифический CAR содержит VL, VH и необязательно один или несколько линкеров, организованных согласно описанному в данном документе.

Трансмембранные домены

Что касается трансмембранного домена, в различных вариантах осуществления химерную молекулу, описанную в данном документе (например, CAR), можно разработать таким образом, чтобы она содержала трансмембранный домен, который присоединен к внеклеточному домену химерной молекулы. Трансмембранный домен может содержать одну или несколько дополнительных аминокислот, прилегающих к трансмембранной области, например, одну или несколько аминокислот, относящихся к внеклеточной области белка, из которого получен трансмембранный домен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и до 15 аминокислот внеклеточной области), и/или одну или несколько дополнительных аминокислот, относящихся к внутриклеточной области белка, из которого получен трансмембранный домен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и до 15 аминокислот внутриклеточной области). В некоторых аспектах трансмембранный домен представляет собой домен, ассоциированный с одним из остальных доменов химерного белка (например, CAR), например, в некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может быть получен из того же белка, из которого получен сигнальный домен, костимулирующий домен или шарнирный домен. В другом аспекте трансмембранный домен не получен из того же белка, из которого получен любой другой домен химерного белка (например, CAR). В некоторых случаях трансмембранный домен можно выбрать или модифицировать с помощью аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других поверхностных мембранных белков, например, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими элементами рецепторного комплекса. В некоторых аспектах трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим CAR на клеточной поверхности клетки, экспрессирующей CAR. В другом аспекте аминокислотную последовательность трансмембранного домена можно модифицировать или подвергнуть замене таким образом, чтобы свести к минимуму взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, присутствующего в той же самой клетке, экспрессирующей CAR.

Трансмембранный домен может быть получен из природного либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. В некоторых аспектах трансмембранный домен способен передавать сигнал внутриклеточному(внутриклеточным) домену(доменам) всякий раз, когда CAR связывается с мишенью. Трансмембранный домен, особенно применимый в настоящем изобретении, может включать в себя по меньшей мере трансмембранную(трансмембранные) область(области), например, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD27, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8,

CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может включать в себя по меньшей мере трансмембранную(трансмембранные) область(области), например, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R α, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D или NKG2C.

В некоторых случаях трансмембранный домен может быть присоединен к внеклеточной области CAR, например, антигенсвязывающему домену CAR, посредством шарнирной области, например, шарнирной области из белка человека. Например, в некоторых вариантах осуществления шарнирная область может представлять собой шарнирную область Ig (иммуноглобулина) человека (например, шарнирную область IgG4, шарнирную область IgD), линкер GS (например, линкер GS, описанный в данном документе), шарнирную область KIR2DS2 или шарнирную область CD8a. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 (например, состоят из нее). В некоторых аспектах трансмембранный домен включает в себя (например, состоит из него) трансмембранный домен под SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления кодируемый трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность трансмембранного домена CD8, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 12, или последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления кодируемый трансмембранный домен содержит последовательность под SEQ ID NO: 12.

В других вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, содержит нуклеотидную последовательность трансмембранного домена CD8, например, содержит последовательность под SEQ ID NO: 13 или последовательность с 95-99% идентичностью с ней.

В некоторых вариантах осуществления кодируемый антигенсвязывающий домен соединен с трансмембранным доменом с помощью шарнирной области. В некоторых вариантах осуществления кодируемая шарнирная область содержит аминокислотную последовательность шарнирной области CD8, например, SEQ ID NO: 4; или аминокислотную последовательность шарнирной области IgG4, например, SEQ ID NO: 6, или последовательность с 95-99% идентичностью с SEQ ID NO: 4 или 6. В других вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая

шарнирную область, содержит последовательность под SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7, соответствующую шарнирной области CD8 или шарнирной области IgG4 соответственно, или последовательность с 95-99% идентичностью с SEQ ID NO: 5 или 7.

В некоторых аспектах шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область IgG4. Например, в некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область с аминокислотной последовательностью
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область, кодируемую нуклеотидной последовательностью
GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCGGA
CCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC
CCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAG
GAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA
CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCA
GCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTAC
ACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCT
GGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC
CCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTC
CTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAG
CTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCC
TGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO: 7).

В некоторых аспектах шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область IgD. Например, в некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область с аминокислотной последовательностью
RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERET
KTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGG
VEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPV
KLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTT
FWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область, кодируемую нуклеотидной последовательностью
AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCA
GGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTG
GCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGAGA

GGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCT
TGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCG
TCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGAAAGGTAC
CCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGC
CAGCACTCAAGACTCACCCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTCACA
TGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCA
GCCGCCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCCA
GAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTG
CTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCG
GCCCCCACCCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCC
AGCACCACCTAGCCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAG
CAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT
(SEQ ID NO: 9).

В некоторых аспектах трансмембранный домен может быть рекомбинантным, и в этом случае он будет содержать главным образом гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах на каждом конце рекомбинантного трансмембранного домена может находиться триплет из фенилаланина, триптофана и валина.

Короткий олиго- или полипептидный линкер длиной от 2 до 10 аминокислот необязательно может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматической областью CAR. Глицин-сериновый дублет является особенно подходящим линкером. Например, в некоторых аспектах линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления линкер кодируется нуклеотидной последовательностью GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 877). В некоторых вариантах осуществления линкер кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 876.

В некоторых аспектах шарнирная область или спейсер включают в себя шарнирную область KIR2DS2.

Сигнальные домены

В вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых представлен внутриклеточный сигнальный домен, такой домен может содержать, например, один или несколько из первичного сигнального домена и/или костимулирующего сигнального домена. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность, кодирующую первичный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный сигнальный домен и костимулирующий сигнальный домен.

Внутриклеточные сигнальные последовательности в цитоплазматической части

CAR по настоящему изобретению могут быть связаны друг с другом в случайном или установленном порядке. Короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до 10 аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот), необязательно может образовывать связь между внутриклеточными сигнальными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления в качестве подходящего линкера может применяться глицин-сериновый дублет. В некоторых вариантах осуществления в качестве подходящего линкера может применяться одна аминокислота, например, аланин, глицин.

В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен разработан таким образом, что он содержит два или более, например, 2, 3, 4, 5 или более, костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления два или более, например, 2, 3, 4, 5 или более, костимулирующих сигнальных доменов разделены линкерной молекулой, например, линкерной молекулой, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит два костимулирующих сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления линкерная молекула представляет собой глициновый остаток. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой аланиновый остаток.

Первичные сигнальные домены

Первичный сигнальный домен регулирует первичную активацию комплекса TCR стимулирующим образом либо ингибирующим образом. Первичные внутриклеточные сигнальные домены, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. В CAR такие домены применяются с такой же целью.

Примеры первичных внутриклеточных сигнальных доменов, содержащих ITAM, которые являются особенно применимыми в настоящем изобретении, включают домены CD3-дзета, общей гамма-цепи FcR (FCER1G), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон R1b), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и DAP12. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный сигнальный домен CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления кодируемый первичный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен CD3-дзета. Кодируемый первичный сигнальный домен CD3-дзета может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20, или последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления кодируемый первичный сигнальный домен содержит последовательность под SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. В других вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первичный сигнальный домен, содержит последовательность под SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 21 или последовательность с 95-99% идентичностью с ней.

Костимулирующие сигнальные домены

В некоторых вариантах осуществления кодируемый внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. Например, внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный сигнальный домен и костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления кодируемый костимулирующий сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из одного или нескольких из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, который специфично связывается с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46 и NKG2D.

В некоторых вариантах осуществления кодируемый костимулирующий сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16, или последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления кодируемый костимулирующий сигнальный домен содержит последовательность под SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16. В других вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая костимулирующий сигнальный домен, содержит последовательность под SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17 или последовательность с 95-99% идентичностью с ней.

В других вариантах осуществления кодируемый внутриклеточный домен содержит последовательность под SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16 и последовательность под SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20, где последовательности, образующие внутриклеточный сигнальный домен, экспрессируются в одной и той же рамке считывания и в виде одной полипептидной цепи.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая внутриклеточный сигнальный домен, содержит последовательность под SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 17 или последовательность с 95-99% идентичностью с ней и последовательность под SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 21 или последовательность с 95-99% идентичностью с ней.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты

дополнительно кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность содержит последовательность под SEQ ID NO: 2.

В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен разработан таким образом, что он содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен разработан таким образом, что он содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB. В некоторых аспектах сигнальный домен 4-1BB представляет собой сигнальный домен под SEQ ID NO: 14. В некоторых аспектах сигнальный домен CD3-дзета представляет собой сигнальный домен под SEQ ID NO: 18.

В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен разработан таким образом, что он содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD27. В некоторых аспектах сигнальный домен CD27 содержит аминокислотную последовательность QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO: 16). В некоторых аспектах сигнальный домен CD27 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCG CCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGC CTATCGCTCC (SEQ ID NO: 17).

Ингибирующие домены

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует CAR, например, CAR, описанный в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует ингибирующую молекулу, содержащую цитоплазматический домен inhKIR; трансмембранный домен, например, трансмембранный домен KIR; и ингибирующий цитоплазматический домен, например, домен ITIM, например, домен ITIM inhKIR. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая молекула представляет собой встречающийся в природе inhKIR или последовательность, которая обладает по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией со встречающимся в природе inhKIR или которая отличается от него не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 остатками.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует ингибирующую молекулу, содержит цитоплазматический домен семейства SLAM; трансмембранный домен, например, трансмембранный домен семейства SLAM; и ингибирующий цитоплазматический домен, например, домен семейства SLAM, например, домен ITIM семейства SLAM. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая молекула является встречающимся в природе представителем семейства SLAM или последовательностью, которая обладает по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией со встречающимся в природе представителем семейства SLAM или которая отличается от него не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 остатками.

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой транскрибируемый in vitro вектор, например, вектор, который транскрибирует РНК молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит поли(А)-хвост, например, поли-А-хвост. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'-UTR, например, 3'-UTR, описанную в данном документе, например, содержит по меньшей мере один повтор 3'-UTR, полученный из бета-глобина человека. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит промотор, например, промотор T2A.

Промоторы

В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор выбран из промотора EF-1, промотора гена IE CMV, промотора EF-1α, промотора гена убиквитина C или промотора гена фосфоглицераткиназы (PGK). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор EF-1. В некоторых вариантах осуществления промотор EF-1 содержит последовательность под SEQ ID NO: 1.

В некоторых аспектах настоящего изобретения иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, можно получать из единицы крови, собранной у субъекта, с использованием любого количества методик, известных специалисту в данной области, таких как разделение с помощью Ficoll™. В некоторых аспектах клетки из циркулирующей крови организма индивидуума получают путем афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В некоторых аспектах клетки, собранные путем афереза, можно промыть, чтобы удалить фракцию плазмы крови, и необязательно суспендировать клетки в буфере или среде для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). В альтернативном варианте осуществления в растворе для промывания отсутствует кальций и может отсутствовать магний или могут отсутствовать многие, если не все, двухвалентные катионы.

Таблица 17. Последовательности различных компонентов CAR (а. к. - аминокислоты, н. к. - нуклеиновые кислоты, кодирующие соответствующий белок)

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Промотор EF-1	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACAT CGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGC AATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAA CTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCC GAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGC

		CGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAAC ACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCT CTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCC ACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGG GTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAA GGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCT GGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTT CGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTT AAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG TATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCG TGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCG AGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAG CTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGT GTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGG CACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCC CTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCG GGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAG GGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACG GAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCG AGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGG TTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAG ACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCC TTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTC TCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATT TCAGGTGTCGTGA
2	Лидерная последовательность (а. к.)	MALPVTALLLPLALLLHAARP
3	Лидерная последовательность (н. к.)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCT CTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCC
4	Шарнирная область CD8 (а. к.)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACD

5	Шарнирная область CD8 (н. к.)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCC CACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGC GTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGG GGCTGGACTTCGCCTGTGAT
6	Шарнирная область Ig4 (а. к.)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM
7	Шарнирная область Ig4 (н. к.)	GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCC CCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCC CCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCC GAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGA CCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGT TCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGC TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGT AAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAA AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCC AGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTC TACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGAC CGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTA GCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG
8	Шарнирная область IgD (а. к.)	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRG GEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQD LWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEG LLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQ RLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFS PPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVL RVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH

9	Шарнирная область IgD (н. к.)	AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCCAGGCATCTAGTGTT CCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAA AGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCG TGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAA GAACAGGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCC ATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCC GCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTT ACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCAT TTGACTTGGGAGGTTGCCGGAAAGGTACCCACAGGGGG GGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTC TCAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCCTTCCGAGATCCCT GTGGAACGCCGGGACCTCTGTCACATGTACTCTAAATCA TCCTAGCCTGCCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGA GCCAGCCGCCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCT GCTCGCCAGTAGTGATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCT CTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTT GCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCA GCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCCACCCCAGCCGGGTT CTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCCAG CACCACCTAGCCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTG TGTCCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTA GGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT
10	Шарнирная область/линкер GS (а. к.)	GGGGSGGGGS
11	Шарнирная область/линкер GS (н. к.)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
12	TM CD8 (а. к.)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
13	TM CD8 (н. к.)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTC CTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGC
14	Внутриклеточный домен 4-1BB (а. к)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE L

15	Внутриклеточный домен 4-1BB (н. к.)	AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACA ACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAG ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGA GGATGTGAACTG
16	CD27 (а. к.)	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKP EPACSP
17	CD27 (н. к.)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACAT GAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCA TTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTA TCGCTCC
18	CD3-дзета (а. к.)	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
19	CD3-дзета (н. к.)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTA CAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGAC GTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGG AAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
20	CD3-дзета (а. к.)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
21	CD3-дзета (н. к.)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTA CCAGCAGGGCCAG AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGA GGAGTACGATGTTT TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGA AAGCCGAGAAGGA AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAA GATAAGATGGCGG AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGC

		ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG ACACCTACGACGC CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
22	Линкер	GGGGS
23	Линкер	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
24	Внеклеточный домен PD-1 (а. к.)	Pgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaa fpedrsqpgqdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrv terraevptahpspsprpagqfqtlv
25	Внеклеточный домен PD-1 (н. к.)	Cccggatggtttctggactctccggatcgcccgtggaatcccccaaccttctcaccggcactc ttggttgtgactgagggcgataatgcgaccttcacgtgctcgttctccaacacctccgaatcatt cgtgctgaactggtaccgcatgagcccgtcaaaccagaccgacaagctcgccgcgtttccgg aagatcggtcgcaaccgggacaggattgtcggttccgcgtgactcaactgccgaatggcaga gacttccacatgagcgtggtccgcgctaggcgaaacgactccgggacctacctgtgcggag ccatctcgctggcgcctaaggcccaaatcaaagagagcttgagggccgaactgagagtgac cgagcgcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgcctcggcctgcggggcag tttcagaccctggtc
26	CAR на основе PD-1 с сигнальной последовательностью (а. к.)	Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesf vlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylc gaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqtlvtttpaprpptpaptiasq plslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqp fmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeyd vldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyq glstatkdtydalhmqalppr
27	CAR на основе PD-1 (н. к.)	Atggccctccctgtcactgccctgcttctccccctcgcactcctgctccacgccgctagacca cccggatggtttctggactctccggatcgcccgtggaatcccccaaccttctcaccggcactct tggttgtgactgagggcgataatgcgaccttcacgtgctcgttctccaacacctccgaatcattc gtgctgaactggtaccgcatgagcccgtcaaaccagaccgacaagctcgccgcgtttccgga agatcggtcgcaaccgggacaggattgtcggttccgcgtgactcaactgccgaatggcaga gacttccacatgagcgtggtccgcgctaggcgaaacgactccgggacctacctgtgcggag ccatctcgctggcgcctaaggcccaaatcaaagagagcttgagggccgaactgagagtgac cgagcgcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgcctcggcctgcggggcag tttcagaccctggtcacgaccactccggcgccgcgcccaccgactccggccccaactatcgc gagccagcccctgtcgctgaggccggaagcatgccgccctgccgccggaggtgctgtgcat acccggggattggacttcgcatgcgacatctacatttgggctcctctcgccggaacttgtggcg tgctccttctgtccctggtcatcaccctgtactgcaagcggggtcggaaaaagcttctgtacattt

		tcaagcagcccttcatgaggcccgtgcaaaccacccaggaggaggacggttgctcctgccg gttccccgaagaggaagaaggaggttgcgagctgcgcgtgaagttctcccggagcgccga cgccccgcctataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcg ggaagagtacgatgtgctggacaagcggcgcggccgggaccccgaaatgggcgggaagc ctagaagaaagaaccctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccg aggcctactccgaaattgggatgaagggagagcggcggaggggaaaggggcacgacgg cctgtaccaaggactgtccaccgccaccaaggacacatacgatgccctgcacatgcaggcc cttccccctcgc
28	Линкер	(Gly-Gly-Gly-Ser)n, where n=1-10
29	Линкер	(Gly4 Ser)4
30	Линкер	(Gly4 Ser)3
31	Линкер	(Gly3Ser)
39	CAR на основе PD1 (а. к.)	Pgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaa fpedrsqpgqdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrv terraevptahpspsprpagqfqtlvtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprr knpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalp pr

***Изготовление* CAR-T in vitro**

Тогда как способы, предусмотренные в данном документе, относятся к трансдукции клеток in vivo, также принимаются во внимание трудности, связанные с изготовлением in vitro.

В некоторых вариантах осуществления клетки, трансдуцированные с помощью вирусного вектора, описанного в данном документе, размножают, например, посредством способа, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетки размножают в культуре в течение периода от нескольких часов (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 часа) до приблизительно 14 дней (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней). В некоторых вариантах осуществления клетки размножают в течение периода от 4 до 9 дней. В некоторых вариантах осуществления клетки размножают в течение периода 8 дней или меньше, например, 7, 6 или 5 дней. В некоторых вариантах осуществления клетки размножают в культуре в течение 5 дней, и полученные клетки являются более активными, чем те же самые клетки, размножаемые в культуре в течение 9 дней при тех же условиях культивирования. Активность можно определить, например, по различным Т-клеточным функциям, например, пролиферации, уничтожению клеток-мишеней, продуцированию цитокинов, активации, миграции или их комбинациям. В некоторых вариантах

осуществления клетки, размножаемые в течение 5 дней, демонстрируют по меньшей мере одно-, двух-, трех- или четырехкратное увеличение скорости удвоения клеток после стимуляции антигеном по сравнению с теми же клетками, размножаемыми в культуре в течение 9 дней при тех же условиях культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки размножают в культуре в течение 5 дней, и полученные клетки демонстрируют более высокие уровни продуцирования провоспалительных цитокинов, например, уровни IFN-γ и/или GM-CSF, по сравнению с теми же клетками, размножаемыми в культуре в течение 9 дней при тех же условиях культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки, размножаемые в течение 5 дней, демонстрируют по меньшей мере одно-, двух-, трех-, четырех-, пяти-, десятикратное или большее увеличение продуцирования провоспалительных цитокинов в пг/мл, например, уровней IFN-γ и/или GM-CSF, по сравнению с теми же клетками, размножаемыми в культуре в течение 9 дней при тех же условиях культивирования.

Начальные стадии активации в отсутствие кальция могут приводить к усиленной активации. Для специалистов средней квалификации в данной области будет очевидно, что стадию промывания можно осуществлять с помощью способов, известных специалистам в данной области, как, например, с применением полуавтоматической "проточной" центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывания клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS, не содержащий Ca и не содержащий Mg, PlasmaLyte A или другой солевой раствор с буфером или без него. В качестве альтернативы нежелательные компоненты из образца, полученного путем афереза, можно удалить, и клетки можно ресуспендировать непосредственно в культуральной среде.

Признано, что в способах применения in vitro можно использовать условия для культуральных сред, включающих человеческую сыворотку крови AB с концентрацией, составляющей 5% или меньше, например, 2%, и использовать известные условия и составы культуральных сред, например, описанные в Smith et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31.

В некоторых аспектах Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови посредством лизиса эритроцитов и истощения по моноцитам, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL™ или посредством противоточного элютриационного центрифугирования. Выделенные Т-клетки можно дополнительно применять в способах, описанных в данном документе.

Способы, описанные в данном документе, могут включать, например, отбор конкретной субпопуляции иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которая представляет собой популяцию клеток, истощенную по регуляторным Т-клеткам с истощением по CD25+ клеткам, с применением, например, методики отрицательного отбора, например, описанной в данном документе. Популяция, истощенная по

регуляторным Т-клеткам, предпочтительно содержит менее 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% CD25+ клеток.

В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки, удаляют из популяции с помощью антитела к CD25 или его фрагмента или CD25-связывающего лиганда IL-2. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD25 или его фрагмент или CD25-связывающий лиганд конъюгированы с субстратом, например, гранулой, или иным образом покрывают субстрат, например, гранулу. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD25 или его фрагмент конъюгированы с субстратом, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки, удаляют из популяции с помощью реагента для истощения по CD25 от Miltenyi^{TM}. В некоторых вариантах осуществления соотношение клеток и реагента для истощения по CD25 составляет 1×10^7 клеток на 20 мкл, или 1×10^7 клеток на 15 мкл, или 1×10^7 клеток на 10 мкл, или 1×10^7 клеток на 5 мкл, или 1×10^7 клеток на 2,5 мкл, или 1×10^7 клеток на 1,25 мкл. В некоторых вариантах осуществления например, для истощения по регуляторным Т-клеткам, например, CD25+, используют более 500 миллионов клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию клеток, составляющую 600, 700, 800 или 900 миллионов клеток/мл.

В некоторых вариантах осуществления популяция иммунных эффекторных клеток, подлежащая истощению, содержит приблизительно 6×10^9 CD25+ Т-клеток. В других аспектах популяция иммунных эффекторных клеток, подлежащая истощению, содержит от приблизительно 1×10^9 до 1x 10^{10} CD25+ Т-клеток, включая любое целочисленное значение в этом промежутке. В некоторых вариантах осуществления полученная популяция, истощенная по регуляторным Т-клеткам, содержит 2×10^9 регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток, или меньше (например, 1×10^9, 5×10^8 , 1×10^8, 5×10^7, 1×10^7 или меньше CD25+ клеток).

В некоторых вариантах осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ клетки, удаляют из популяции с применением системы CliniMAC с набором трубок для истощения, таким как, например, трубки 162-01. В некоторых вариантах осуществления система CliniMAC работает с установленными параметрами для истощения, например, такими как DEPLETION2.1.

Без ограничения какой-либо конкретной теорией, посредством снижения уровня отрицательных регуляторов иммунных клеток (например, уменьшения количества нежелательных иммунных клеток, например, T_{REG}-клеток) у субъекта до афереза или в ходе изготовления продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, можно снизить риск рецидива у субъекта. Например, способы истощения по T_{REG}-клеткам известны из уровня техники. Способы уменьшения количества T_{REG}-клеток включают без ограничения применение циклофосфамида, антитела к GITR (антитела к GITR, описанного в данном документе), реагента для истощения по CD25 и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления способы изготовления включают снижение

количества (например, истощение популяции) T_{REG}-клеток до изготовления клетки, экспрессирующей CAR. Например, способы изготовления включают приведение образца, например, образца, полученного путем афереза, в контакт с антителом к GITR и/или антителом к CD25 (или его фрагментом или CD25-связывающим лигандом), например, для истощения по T_{REG}-клеткам до изготовления продукта на основе клеток (например, Т-клеток, NK-клеток), экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления субъект проходит предварительное лечение с помощью одного или нескольких средств терапии, которые обеспечивают снижение количества T_{REG}-клеток, перед сбором клеток для изготовления продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, за счет чего обеспечивается снижение риска рецидива у субъекта при лечении с помощью клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления способы уменьшения количества T_{REG}-клеток включают без ограничения введение субъекту одного или нескольких из циклофосфамида, антитела к GITR, реагента для истощения по CD25 или их комбинации. Введение одного или нескольких из циклофосфамида, антитела к GITR, реагента для истощения по CD25 или их комбинации может происходить до, во время или после инфузии продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления субъект получает предварительное лечение с помощью циклофосфамида перед сбором клеток для изготовления продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, за счет чего обеспечивается снижение риска рецидива у субъекта при лечении с помощью клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления субъект получает предварительное лечение с помощью антитела к GITR перед сбором клеток для изготовления продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, за счет чего обеспечивается снижение риска рецидива у субъекта при лечении с помощью клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, подлежащая удалению, не представляет собой ни регуляторные Т-клетки, ни опухолевые клетки, а представляет собой клетки, которые в иных отношениях отрицательно влияют на размножение и/или функцию CAR-Т-клеток, например, клетки, экспрессирующие CD14, CD11b, CD33, CD15 или другие маркеры, экспрессируемые потенциально иммуносупрессорными клетками. В некоторых вариантах осуществления предполагается, что такие клетки удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками и/или опухолевыми клетками, или после указанного истощения, или в другом порядке.

Способы, описанные в данном документе, могут включать более одной стадии отбора, например, более одной стадии истощения. Обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора можно осуществлять, например, с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для клеток, подвергаемых отрицательному отбору. Один из способов представляет собой сортировку и/или отбор клеток с помощью отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которых используется коктейль моноклональных антител, направленных на маркеры

клеточной поверхности, присутствующие на клетках, подвергаемых отрицательному отбору. Например, для обогащения CD4+ клетками путем отрицательного отбора коктейль моноклональных антител может содержать антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8.

Способы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать удаление из популяции клеток, экспрессирующих опухолевый антиген, например, опухолевый антиген, который не включает CD25, например, CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 или CD11b, за счет чего обеспечивается получение популяции клеток, истощенной по регуляторным Т-клеткам, например, истощенной по CD25+ клеткам и истощенной по клеткам с опухолевым антигеном, которые подходят для экспрессии CAR, например, CAR, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25+ клетками. Например, антитело к CD25 или его фрагмент и антитело к опухолевому антигену или его фрагмент могут быть присоединены к одному и тому же субстрату, например, микрогранулe, который можно использовать для удаления клеток, или антитело к CD25 или его фрагмент или антитело к опухолевому антигену или его фрагмент могут быть присоединены к отдельным микрогранулам, смесь которых можно использовать для удаления клеток. В других вариантах осуществления удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток, и удаление клеток, экспрессирующих опухолевый антиген, является последовательным и может происходить, например, в любом порядке.

Также предусмотрены способы, которые включают удаление из популяции клеток, экспрессирующих ингибитор контрольных точек иммунного ответа, например, ингибитор контрольных точек иммунного ответа, описанный в данном документе, например, одного или нескольких из PD1+ клеток, LAG3+ клеток и TIM3+ клеток, с получением таким образом популяции, истощенной по регуляторным Т-клеткам, например, истощенной по CD25+ клеткам и истощенной по клеткам с ингибитором контрольных точек иммунного ответа, например, истощенной по PD1+, LAG3+ и/или TIM3+ клеткам. Иллюстративные ингибиторы контрольных точек иммунного ответа включают B7-H1, B7-1, CD160, P1H, 2B4, PD1, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, TIGIT, CTLA-4, BTLA и LAIR1. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие ингибитор контрольных точек иммунного ответа, удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25+ клетками. Например, антитело к CD25 или его фрагмент и антитело к ингибитору контрольной точки иммунного ответа или его фрагмент могут быть присоединены к одной и той же грануле, которую можно использовать для удаления клеток, или антитело к CD25 или его фрагмент и антитело к ингибитору контрольной точки иммунного ответа или его фрагмент могут быть присоединены к отдельным гранулам, смесь которых можно использовать для удаления клеток. В других вариантах осуществления удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток, и удаление клеток, экспрессирующих ингибитор контрольных

точек иммунного ответа, является последовательным и может происходить, например, в любом порядке.

Способы, описанные в данном документе, могут включать стадию положительного отбора. Например, Т-клетки можно выделять путем инкубирования с микрогранулами, конъюгированными с антителом к CD3/антителом к CD28 (например, 3×28), такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, в течение периода времени, достаточного для положительного отбора требуемых Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет приблизительно 30 минут. В дополнительном варианте осуществления период времени находится в диапазоне от 30 минут до 36 часов или больше и включает все целочисленные значения в этом промежутке. В дополнительном варианте осуществления период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В еще одном варианте осуществления период времени составляет от 10 до 24 часов, например, 24 часа. Более длительное время инкубирования можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, при которой Т-клеток немного по сравнению с другими типами клеток, как, например, при выделении лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), из опухолевой ткани или у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, при использовании более длительного времени инкубирования может увеличиваться эффективность захвата CD8+ Т-клеток. Таким образом, просто сокращая или удлиняя время, в течение которого Т-клетки имеют возможность связываться с гранулами с антителами к CD3/CD28, и/или увеличивая или уменьшая соотношение гранул и Т-клеток (как дополнительно описано в данном документе), можно предпочтительно осуществлять положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие моменты времени в ходе процесса. Кроме того, путем увеличения или уменьшения соотношения антител к CD3 и/или антител к CD28 на гранулах или другой поверхности можно предпочтительно осуществлять положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие необходимые моменты времени. В некоторых вариантах осуществления можно выбрать популяцию Т-клеток, которые экспрессируют один или несколько из IFN-γ, TNFα, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзима B и перфорина или других соответствующих молекул, например, других цитокинов. Способы скрининга в отношении клеточной экспрессии можно определить, например, с помощью способов, описанных в публикации согласно PCT № WO 2013/126712.

Для выделения требуемой популяции клеток путем положительного или отрицательного отбора можно изменять концентрацию клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы). В некоторых аспектах может потребоваться значительно уменьшить объем, в котором гранулы и клетки смешиваются друг с другом (например, увеличить концентрацию клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и гранул. Например, в некоторых аспектах используют концентрацию, составляющую 10 миллиардов клеток/мл, 9 миллиардов/мл, 8 миллиардов/мл, 7 миллиардов/мл, 6 миллиардов/мл или 5 миллиардов/мл. В некоторых аспектах используют концентрацию,

составляющую 1 миллиард клеток/мл. В некоторых других аспектах используют концентрацию клеток, составляющую от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных аспектах можно использовать концентрации, составляющие 125 или 150 миллионов клеток/мл.

Использование высоких концентраций может приводить к увеличению выхода клеток, активации клеток и размножения клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток позволяет более эффективно захватывать клетки, которые могут характеризоваться слабой экспрессией антигенов-мишеней, представляющих интерес, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или клетки из образцов, в которых присутствует много опухолевых клеток (например, лейкозной крови, опухолевой ткани и т. д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность, и может потребоваться их получение. Например, использование высокой концентрации клеток позволяет проводить более эффективный отбор CD8+ Т-клеток, которые обычно характеризуются более слабой экспрессией CD28.

В некоторых вариантах осуществления может потребоваться использование более низких концентраций клеток. Путем значительного разбавления смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы), взаимодействия между частицами и клетками сводятся к минимуму. При этом отбираются клетки, которые экспрессируют необходимые антигены, подлежащие связыванию с частицами, в высоких количествах. Например, CD4+ Т-клетки экспрессируют CD28 на более высоких уровнях и захватываются в слабых концентрациях более эффективно, чем CD8+ Т-клетки. В некоторых аспектах используемая концентрация клеток составляет 5×10^6/мл. В других аспектах используемая концентрация может составлять от приблизительно 1×10^5/мл до 1×10^6/мл с включением любого целочисленного значения в этом промежутке.

В других аспектах клетки можно инкубировать на ротаторе в течение различных промежутков времени с различными скоростями при 2-10°C либо при комнатной температуре.

Т-клетки для стимуляции также можно замораживать после стадии промывания. Без ограничения какой-либо теорией, стадия замораживания и последующего размораживания обеспечивает получение более однородного продукта за счет удаления гранулоцитов и в некоторой степени моноцитов из популяции клеток. После стадии промывания, на которой удаляют плазму крови и тромбоциты, клетки можно суспендировать в замораживающем растворе. Хотя многие замораживающие растворы и параметры для замораживания известны из уровня техники и будут применимыми в данном случае, один способ предусматривает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% человеческий сывороточный альбумин, или культуральных сред, содержащих 10% декстран 40 в 5% декстрозе, 20% человеческий сывороточный альбумин и 7,5% DMSO или 31,25% PlasmaLyte-A, 31,25% раствор с 5% декстрозой в 0,45% NaCl, 10% декстран 40 в 5% декстрозе, 20% человеческий сывороточный альбумин и 7,5% DMSO, или других подходящих сред для замораживания клеток, содержащих, например,

Hespan и PlasmaLyte A, и затем клетки замораживают до -80°C со скоростью 1° в минуту и хранят в паровой фазе в резервуаре для хранения жидкого азота. Можно применять другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемого замораживания незамедлительно при -20°C или в жидком азоте.

В некоторых аспектах криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в данном документе, и оставляют на один час при комнатной температуре перед активацией посредством способов по настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения также предусмотрен сбор образцов крови или продукта афереза у субъекта в период времени до того, как могут понадобиться размножившиеся клетки, описанные в данном документе. Ввиду этого источник клеток, подлежащих размножению, можно собирать в любой необходимый момент времени, и необходимые клетки, такие как Т-клетки, можно выделять и замораживать для последующего применения в терапии с использованием иммунных эффекторных клеток для любых заболеваний или состояний, при которых будет благоприятной терапия с использованием иммунных эффекторных клеток, таких как описанные в данном документе. В некоторых аспектах образец крови или образец, полученный путем афереза, берут у в целом здорового субъекта. В некоторых аспектах образец крови или образец, полученный путем афереза, берут у в целом здорового субъекта, для которого существует риск развития заболевания, но у которого заболевание еще не развилось, и клетки, представляющие интерес, выделяют и замораживают для последующего применения. В некоторых аспектах Т-клетки можно размножать, замораживать и использовать позднее. В некоторых аспектах образцы собирают у пациента вскоре после диагностирования конкретного заболевания, описанного в данном документе, однако до проведения каких-либо видов лечения. В дополнительном аспекте клетки выделяют из образца крови или образца, полученного путем афереза, у субъекта до осуществления любого количества соответствующих способов лечения, в том числе без ограничения лечения такими средствами, как натализумаб, эфализумаб, противовирусные средства, химиотерапия, лучевая терапия, иммуносупрессивные средства, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолят и FK506, антитела или другие иммунодеструктивные средства, такие как CAMPATH, антитела к CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и облучение.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения Т-клетки получают от пациента непосредственно после лечения, при котором у субъекта остаются функциональные Т-клетки. В данном отношении наблюдалось, что после определенных видов лечения рака, в частности видов лечения лекарственными средствами, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты обычно восстанавливаются после лечения, качество полученных Т-клеток может быть оптимальным или улучшенным в отношении их способности размножаться ex vivo. Аналогично, после манипуляций ex vivo с применением способов, описанных в данном документе, эти клетки могут находиться в состоянии, предпочтительном для улучшенного

приживления и размножения in vivo. Таким образом, в контексте настоящего изобретения рассматривается сбор клеток крови, в том числе Т-клеток, дендритных клеток или других клеток гемопоэтической линии дифференцировки, во время этой фазы восстановления. Кроме того, в некоторых аспектах можно использовать мобилизацию (например, мобилизацию с помощью GM-CSF) и режимы кондиционирования для создания у субъекта состояния, благоприятного для репопуляции, рециркуляции, регенерации и/или размножения определенных типов клеток, в частности в течение определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток характеризуется дефицитом диацилглицеринкиназы (DGK). Клетки с дефицитом DGK включают клетки, которые не экспрессируют DGK в виде РНК или белка или характеризуются сниженной или ингибированной активностью DGK. Клетки с дефицитом DGK можно получить с помощью генетических подходов, например, путем введения средств для РНК-интерференции, например, siRNA, shRNA, miRNA, для снижения или предотвращения экспрессии DGK. В качестве альтернативы клетки с дефицитом DGK можно получить путем обработки ингибиторами DGK, описанными в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток характеризуется дефицитом Ikaros. Клетки с дефицитом Ikaros включают клетки, которые не экспрессируют Ikaros в виде РНК или белка или характеризуются сниженной или ингибированной активностью Ikaros; клетки с дефицитом Ikaros можно получить с помощью генетических подходов, например, путем введения средств для РНК-интерференции, например, siRNA, shRNA, miRNA, для снижения или предупреждения экспрессии Ikaros. В качестве альтернативы клетки с дефицитом Ikaros можно получить путем обработки ингибиторами Ikaros, например, леналидомидом.

В вариантах осуществления популяция Т-клеток характеризуется дефицитом DGK и дефицитом Ikaros, например, не экспрессирует DGK и Ikaros или характеризуется сниженной или ингибированной активностью DGK и Ikaros. Такие клетки с дефицитом DGK и Ikaros можно получить любым из способов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления NK-клетки получают от субъекта. В другом варианте осуществления NK-клетки представляют собой линию NK-клеток, например, линию клеток NK-92 (Conkwest).

В конкретном иллюстративном аспекте субъектов можно подвергать лейкаферезу, при этом лейкоциты собирают, обогащают или истощают ex vivo, чтобы отбирать и/или выделять клетки, представляющие интерес, например, Т-клетки. Данные изоляты Т-клеток можно размножать посредством способов, описанных в данном документе. Затем субъектов, нуждающихся в этом, можно подвергать стандартному лечению с помощью высокодозовой химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых аспектах после трансплантации или параллельно с ней субъекты получают инфузию размножившихся CAR-Т-клеток, полученных

посредством способов по настоящему изобретению. В дополнительном аспекте размножившиеся клетки вводят до или после хирургического вмешательства.

Дополнительные экспрессируемые средства

Совместная экспрессия средства, усиливающего активность CAR

В вариантах осуществления, предусмотренных в данном документе, понятно, что дополнительные средства могут кодироваться в векторах, описанных в данном документе выше. Соответственно, данные средства описаны ниже применительно к клетке, экспрессирующей CAR.

В другом варианте осуществления иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR, описанная в данном документе, может дополнительно экспрессировать другое средство, например, средство, которое усиливает активность клетки, экспрессирующей CAR. Например, в некоторых вариантах осуществления средство может представлять собой средство, которое ингибирует ингибирующую молекулу. Примеры ингибирующих молекул включают PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGF-бета, например, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления средство, которое ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, ассоциированный со вторым полипептидом, который передает положительный сигнал в клетку, например, внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления средство содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, такую как PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 или TGF-бета или фрагмент любого из них, и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе (например, содержащий костимулирующий домен (например, 41BB, CD27 или CD28, например, описанные в данном документе) и/или первичный сигнальный домен (например, сигнальный домен CD3-дзета, описанный в данном документе)). В некоторых вариантах осуществления средство содержит первый полипептид, представляющий собой PD-1 или его фрагмент, и второй полипептид, представляющий собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе (например, сигнальный домен CD28, CD27, OX40 или 4-IBB, описанные в данном документе, и/или сигнальный домен CD3-дзета, описанный в данном документе).

Совместная экспрессия второго CAR

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, может дополнительно содержать второй CAR, например, второй CAR, который содержит другой антигенсвязывающий домен, например, для той же мишени (например, CD19) или другой мишени (например, для мишени, отличной от CD19, например, мишени, описанной в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка,

экспрессирующая CAR, например, клетка, экспрессирующая CAR, изготовленная посредством способа, описанного в данном документе, содержит (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый CAR, который связывается с BCMA, и (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CAR, который связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления первый CAR содержит домен, связывающий BCMA, первый трансмембранный домен и первый внутриклеточный сигнальный домен, где домен, связывающий BCMA, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR3 HC), и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (CDR3 LC), где CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 86, 87, 88, 95, 96 и 97 соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй CAR содержит домен, связывающий CD19, второй трансмембранный домен и второй внутриклеточный сигнальный домен, где домен, связывающий CD19, содержит VH, содержащую CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC, и VL, содержащую CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC, где CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 760, 687, 762, 763, 764 и 765 соответственно. В некоторых вариантах осуществления (i) VH и VL домена, связывающего BCMA, содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 93 и 102 соответственно. В некоторых вариантах осуществления VH и VL домена, связывающего CD19, содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 250A и 251A соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий BCMA, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD19, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 758. В некоторых вариантах осуществления первый CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления второй CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 225.

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе клетка, экспрессирующая CAR, например, клетка, экспрессирующая CAR, изготовленная посредством способа, описанного в данном документе, содержит (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый CAR, который связывается с CD22, и (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CAR, который связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления CAR для CD22 содержит антигенсвязывающий домен для CD22, а также первый трансмембранный домен; первый костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен. В

некоторых вариантах осуществления CAR для CD19 содержит антигенсвязывающий домен для CD19, а также второй трансмембранный домен; второй костимулирующий сигнальный домен и/или второй первичный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (CDR3 LC) домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 15, 16, 30, 31 или 32; и/или одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющей комплементарность области 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 15, 16, 30, 31 или 32. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 15, 16, 30, 31 или 32; и/или CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 15, 16, 30, 31 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит одну или несколько (например, все три) из CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 1, 30, 31 и 32, и/или одну или несколько (например, все три) из CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 1, 30, 31 и 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 1, 30, 31 и 32; и/или CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 1, 30, 31 и 32.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 (например, scFv) содержит вариабельную область легкой цепи (VL) домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 30 или 32; и/или вариабельную область тяжелой цепи (VH) домена, связывающего CD22, описанного в данном документе, например, в таблицах 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит VL-область, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности VL-области CD22, представленной в таблице 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит VL-область, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в таблице 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с

любой из вышеуказанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит VH-область, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности VH-области CD22, представленной в таблице 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит VH-область, содержащую аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность VH-области для CD22, представленную в таблице 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 (например, scFv) содержит VL-область домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 1, 30 или 32; и/или VH-область домена, связывающего CD19, описанного в данном документе, например, в таблицах 1, 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит VL-область, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности VL-области CD19, представленной в таблицах 1, 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит VL-область, содержащую аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность VL-области для CD19, представленную в таблицах 1, 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит VH-область, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности VH-области CD19, представленной в таблицах 1, 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит VH-область, содержащую аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность VH-области для CD19, представленную в таблицах 1, 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD22 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности scFv для CD22, представленной в таблице 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен

для CD22 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность scFv для CD22, представленную в таблице 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен), в последовательности scFv для CD19, представленной в таблицах 1, 30 или 32. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD19 содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, представляющую собой последовательность scFv для CD19, представленную в таблицах 1, 30 или 32, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления молекула CAR для CD22 и/или молекула CAR для CD19 содержит дополнительный компонент, например, сигнальный пептид, шарнирную область, трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен и/или первый первичный сигнальный домен, сайт P2A и/или линкер, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в таблице 33, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей; или кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в таблице 33, или последовательностью, характеризующейся по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей.

Иллюстративные нуклеотидные и аминокислотные последовательности молекулы CAR, например, молекулы двойного CAR, содержащей (i) первый CAR, который связывается с CD22, и (ii) второй CAR, который связывается с CD19, раскрытой в данном документе, представлены в таблице 30.

Таблица 30. Последовательности двойных и тандемных CAR для CD19-CD22

Идентификатор	SEQ ID NO	Sequence
Тандемные CAR для CD19-CD22		
CG#c171	813	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcg gcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgc gcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaaca gaagccccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctgg

		aatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccctcactatcag ctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccc tacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggag gaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgg gtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctcc ccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggatt ggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcac catctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgca gccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaa tggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcttggcagaagccgccg cgaaagaagtgcagcttcaacaatcaggaccaggactcgtcaaaccatcacagacc ctctccctcacatgtgccatctccggggactccatgttgagcaattccgacacttggaa ttggattagacaaagcccgtcccggggtctggaatggttgggacgcacctaccaccg gtctacttggtacgacgactacgcgtcatccgtgcggggaagagtgtccatcaacgt ggacacctccaagaaccagtacagcctgcagcttaatgccgtgactcctgaggatac gggcgtctactactgcgcccgcgtccgcctgcaagacgggaacagctggagcgat gcattcgatgtctggggccagggaactatggtcaccgtgtcgtctgggggcggtgga tcgggtggcgggggttcgggggggcggcggctctcagtccgctcttacccaaccgg cctcagcctcggggagccccggccagagcgtgaccatttcctgcaccggcacttcat ccgacgtgggcggctacaactacgtgtcctggtaccaacagcacccgggaaaggc ccccaagctcatgatctacgacgtgtccaacaggccctcgggagtgtccaaccggtt ctcgggttcgaaatcgggaaacacagccagcctgaccatcagcggactgcaggctg aagatgaagccgactactactgctcctcctacacctcgtcatccacgctctacgtgttc ggcactggaactcagctgactgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccac cccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacc cgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatt tgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttact gtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaa ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacca gcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtac gacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcg cagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca gaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccac gacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttca

		catgcaggccctgccgcctcgg
	814	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRL HSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGN TLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQES GPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKG LEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTL VTVSSLAEAAAKEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS GDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGV YYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTS SDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTL YVFGTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR
CG#c182	815	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcg gcccgaagtgcagcttcaacaatcaggaccaggactcgtcaaaccatcacagaccc tctccctcacatgtgccatctccggggactccatgttgagcaattccgacacttggaatt ggattagacaaagcccgtcccggggtctggaatggttgggacgcacctaccaccgg tctacttggtacgacgactacgcgtcatccgtgcggggaagagtgtccatcaacgtg gacacctccaagaaccagtacagcctgcagcttaatgccgtgactcctgaggatacg ggcgtctactactgcgcccgcgtccgcctgcaagacgggaacagctggagcgatg cattcgatgtctggggccagggaactatggtcaccgtgtcgtctgggggcggtggat cgggtggcgggggttcgggggggcggcggctctcagtccgctcttacccaaccggc ctcagcctcggggagccccggccagagcgtgaccatttcctgcaccggcacttcatc cgacgtgggcggctacaactacgtgtcctggtaccaacagcacccgggaaaggcc cccaagctcatgatctacgacgtgtccaacaggccctcgggagtgtccaaccggttc tcgggttcgaaatcgggaaacacagccagcctgaccatcagcggactgcaggctga

		agatgaagccgactactactgctcctcctacacctcgtcatccacgctctacgtgttcg gcactggaactcagctgactgtgctgggaggggggagggagtgaaattgtgatgacc cagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagag cctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcc tcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagc ggtagcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagagga cttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctttggacagggca ccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggtg gaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcaga aactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttg gatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctg agactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactct aagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtac tattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagg gtactctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccacccccg gctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgca gctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg cccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaa gcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgca gactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggc ggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagca ggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgac gtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcag aaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgac ggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacat gcaggccctgccgcctcgg
	816	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQ TLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRT YHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAV TPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVT ISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSN RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSY TSSSTLYVFGTGTQLTVLGGGGSEIVMTQSPATLSLSP

		GERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTS RLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQ GNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQL QESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPG KGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVS LKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG TLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR
CG#c188	817	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcg gccccagtccgctcttacccaaccggcctcagcctcggggagccccggccagagc gtgaccatttcctgcaccggcacttcatccgacgtgggcggctacaactacgtgtcct ggtaccaacagcacccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtccaac aggccctcgggagtgtccaaccggttctcgggttcgaaatcgggaaacacagccag cctgaccatcagcggactgcaggctgaagatgaagccgactactactgctcctccta cacctcgtcatccacgctctacgtgttcggcactggaactcagctgactgtgctgggc ggaggaggctccgaagtgcagcttcaacaatcaggaccaggactcgtcaaaccatc acagaccctctccctcacatgtgccatctccggggactccatgttgagcaattccgac acttggaattggattagacaaagcccgtcccggggtctggaatggttgggacgcacc taccaccggtctacttggtacgacgactacgcgtcatccgtgcggggaagagtgtcc atcaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctgcagcttaatgccgtgactcct gaggatacgggcgtctactactgcgcccgcgtccgcctgcaagacgggaacagct ggagcgatgcattcgatgtctggggccagggaactatggtcaccgtgtcgtctggag ggggagggagtgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccg gtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattg gtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccct cactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaac accctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtgg cagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaag cggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcgga

		gtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctg gaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtc acgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatct gtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcggga gctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccacta ccccagcaccgaggccacccacccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtct tgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgct gctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctt taagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatg ccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgc agcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactca atcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacc cagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacg agctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaa cgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
	818	MALPVTALLLPLALLLHAARPQSALTQPASASGSPGQ SVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYD VSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY CSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQQSGPG LVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLE WLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSL QLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQ GTMVTVSSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCR ASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQ GTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVI WGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAA DTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG

		RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR
CG#c224	819	atggccctgcccgtgactgcgctcctgcttccgttggccctgctcctgcatgccgcca gacctcagtccgctctgactcagccggcctcagcttcggggtcccctggtcaaagcg tcactatttcctgtaccggaacctcatcagacgtgggcggctacaattacgtgtcctgg taccaacagcaccccggaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgtccaaccgg ccgtcaggagtgtccaacagattctccggctccaagagcggaaacactgccagcttg accattagcggcttgcaggccgaggacgaagccgactactactgctctagctacaca tcctcgtctaccctctacgtgtttggaacggggacccagctgactgtgctcgggggtg gaggatcagaggtgcaactccagcagtccggtcctggcctcgtgaaaccgtcccaa accctgtccctgacttgcgccatctcgggcgactccatgctgtccaattccgacacct ggaactggattagacaatcgcctagccggggactcgaatggctgggccggacctac caccggtccacgtggtatgacgactacgcaagctccgtccggggaagggtgtccatt aacgtcgatacctccaagaaccagtacagccttcagctgaacgctgtgacccccgag gataccggcgtctactactgtgcaagagtgcgattgcaggatggaaactcgtggtcg gacgcattcgatgtctggggacagggaactatggtgaccgtgtcctcgggcggagg cgggagcggaggaggaggctctggcggaggaggaagcgagattgtcatgactca gtccccggccacactctccctgtcacccggagaaagagcaaccctgagctgcagg gcgtcccaggacatctcgaagtacctgaactggtaccagcagaagcctggacaagc accccgcctcctgatctaccacacctcgcggctgcattcgggaatccccgccagatt ctcagggagcggatcaggaaccgactacaccctgactatctcgagcctgcaaccag aggatttcgccgtgtacttctgccagcaaggaaacaccctgccctacacctttggaca gggaaccaagctcgagattaaggggggtggtggatcgggaggggtggatcagg aggaggcggctcacaagtccagctgcaagaatccggtccgggacttgtgaagccgt ccgaaaccctgtcactgacttgcactgtgtccggggtgtcattgcccgactacggcgt gagctggattcggcagccccctggaaagggattggaatggatcggcgtgatctggg gttcggaaactacctactatcagtcctcactgaagtcccgcgtgaccatcagcaagga taattccaaaaaccaagtgtctctgaagctctccagcgtcactgccgccgatactgcc gtgtactactgcgccaagcactactattacggcggttcgtacgccatggactactggg gccaagggacactcgtgaccgtgtcatccaccactaccccagcaccgaggccacc caccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtag acccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatcta catttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctt tactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggc

		ctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggag gaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcct accagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagagga gtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagc cgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagat ggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg
	820	MALPVTALLLPLALLLHAARPQSALTQPASASGSPGQ SVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYD VSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY CSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQQSGPG LVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLE WLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSL QLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQ GTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLS PGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQ GNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQL QESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPG KGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVS LKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG TLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR
CG#c227	821	atggccctgcccgtgactgcgctcctgcttccgttggccctgctcctgcatgccgcca gacctcagtccgctctgactcagccggcctcagcttcggggtcccctggtcaaagcg tcactatttcctgtaccggaacctcatcagacgtgggcggctacaattacgtgtcctgg taccaacagcaccccggaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgtccaaccgg ccgtcaggagtgtccaacagattctccggctccaagagcggaaacactgccagcttg accattagcggcttgcaggccgaggacgaagccgactactactgctctagctacaca

		tcctcgtctaccctctacgtgtttggaacggggacccagctgactgtgctcgggggtg gaggatcagaggtgcaactccagcagtccggtcctggcctcgtgaaaccgtcccaa accctgtccctgacttgcgccatctcgggcgactccatgctgtccaattccgacacct ggaactggattagacaatcgcctagccggggactcgaatggctgggccggacctac caccggtccacgtggtatgacgactacgcaagctccgtccggggaagggtgtccatt aacgtcgatacctccaagaaccagtacagccttcagctgaacgctgtgacccccgag gataccggcgtctactactgtgcaagagtgcgattgcaggatggaaactcgtggtcg gacgcattcgatgtctggggacagggaactatggtcactgtgtcctccggcggtgga ggctcgggggggggcggctcaggaggaggcggctcacaagtccagctgcaaga atccggtccgggacttgtgaagccgtccgaaaccctgtcactgacttgcactgtgtcc ggggtgtcattgcccgactacggcgtgagctggattcggcagccccctggaaaggg attggaatggatcggcgtgatctggggttcggaaactacctactatcagtcctcactga agtcccgcgtgaccatcagcaaggataattccaaaaaccaagtgtctctgaagctctc cagcgtcactgccgccgatactgccgtgtactactgcgccaagcactactattacggc ggttcgtacgccatggactactggggacaaggcactcttgtgactgtgtcaagcggc ggtggagggagcggtgggggcggttcaggaggaggcggatcagagatcgtgatg acccaatccccagccaccctgtccctcagccctggagaaagagccaccctgagctg ccgggcctcccaggatatcagcaagtacttgaactggtaccaacaaaagccggggc aggcgccccggctcctgatctaccacacctcgcgcctccactcaggtatccccgcca gattctcagggagcggctccggtactgactacaccctgactatttcctcactgcagcc agaggactttgccgtgtacttctgccagcagggaaacactctgccgtacaccttcggg cagggaacgaagcttgaaattaagaccactaccccagcaccgaggccacccaccc cggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccg cagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttg ggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgt aagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaagg cggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagc aggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgac gtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcag aaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgac ggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacat gcaggccctgccgcctcgg
	822	MALPVTALLLPLALLLHAARPQSALTQPASASGSPGQ

		SVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYD VSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYY CSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVLGGGGSEVQLQQSGPG LVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLE WLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSL QLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQ GTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVI WGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAA DTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCR ASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQ GTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR
Двойные CAR для CD19-CD22		
CG#c201		
Нуклеиновая кислота, кодирующая полноразмерный двойной CAR для CD19-CD22	823	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcg gcccgaagtgcagctgcagcagtcagggcctggcctggtcaagccgtcgcagacc ctctccctgacatgcgccattagcggggactccatgctgagcaactcggacacctgg aactggattcggcagtccccttcccggggactcgagtggctcggacgcacctaccat cggagcacttggtacgacgactacgcctcctccgtgagaggtcgcgtgtcgatcaac gtggatacctcgaagaaccagtatagcttgcaactgaacgccgtgacccctgaggat accggagtgtactattgtgcgagagtcaggctgcaagacggaaactcctggtccgac gcatttgatgtctggggacagggtactatggtcacggtgtcatctggaggcggagga tcgcaaagcgccctgactcagccggcttcggctagcggttcaccggggcagtccgt gactatctcctgcaccgggacttcctccgacgtgggaggctacaattacgtgtcctgg taccagcaacaccccggcaaagccccaaagctgatgatctacgacgtcagcaacag acccagcggagtgtccaaccggttcagcggctccaagtccggcaacaccgcctccc tgaccatcagcgggcttcaggccgaagatgaggcggattactactgctcctcgtaca

		cctcaagctcaactctgtacgtgttcggcaccggtactcagctcaccgtgctgaccac taccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtc cctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggt cttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctg ctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatc tttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcat gccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccg cagcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactc aatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggac ccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggga acgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccac caaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcggggaagcggag ctactaacttcagcctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaaccctggacct atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgcca ggccggaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagc gcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaa cagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattct ggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccctcactatc agctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgc cctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcgga ggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccg ggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctc cccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggatt ggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcac catctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgca gccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaa tggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccacgacgccagcg ccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcc cagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgaggggggctgga cttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcct gtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattca aacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgcc gatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagc gcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatct

		aggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgag atgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgc agaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccg gaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggac acctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgc
Аминокислотная последовательность полноразмерного двойного CAR для CD19-CD22	824	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQ TLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRT YHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAV TPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVT VSSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVG GYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSG SKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGT GTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMAL PVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGI PARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPY TFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPG LVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWI GVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR
CAR для CD22 (с сайтом P2A)	825	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQ TLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRT

		YHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAV TPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVT VSSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVG GYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSG SKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGT GTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPG
CAR для CD19	826	PMALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSR LHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG NTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQ ESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGK GLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSL KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT LVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR
CG#c203		
Нуклеиновая кислота, кодирующая полноразмерный двойной CAR для CD19-CD22	827	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgcca ggccggaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagc gcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaa cagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattct ggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccctcactatc agctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgc cctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcgga ggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccg

		ggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctc cccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggatt ggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcac catctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgca gccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaa tggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagcaccacgacgccagcg ccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcc cagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtgcacacgaggggggctgga cttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcct gtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattca aacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgcc gatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagc gcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatct aggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgag atgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgc agaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccg gaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggac acctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgcggaagcggagctactaa cttcagcctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaaccctggacctatggccc tccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccga agtgcagctgcagcagtcagggcctggcctggtcaagccgtcgcagaccctctccc tgacatgcgccattagcggggactccatgctgagcaactcggacacctggaactgg attcggcagtccccttcccggggactcgagtggctcggacgcacctaccatcggag cacttggtacgacgactacgcctcctccgtgagaggtcgcgtgtcgatcaacgtgga tacctcgaagaaccagtatagcttgcaactgaacgccgtgacccctgaggataccgg agtgtactattgtgcgagagtcaggctgcaagacggaaactcctggtccgacgcattt gatgtctggggacagggtactatggtcacggtgtcatctggaggcggaggatcgca aagcgccctgactcagccggcttcggctagcggttcaccggggcagtccgtgactat ctcctgcaccgggacttcctccgacgtgggaggctacaattacgtgtcctggtaccag caacaccccggcaaagccccaaagctgatgatctacgacgtcagcaacagaccca gcggagtgtccaaccggttcagcggctccaagtccggcaacaccgcctccctgacc atcagcgggcttcaggccgaagatgaggcggattactactgctcctcgtacacctca agctcaactctgtacgtgttcggcaccggtactcagctcaccgtgctgaccactaccc cagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctg cgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttga

		cttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgct ttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaa gcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccg gttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagc gcagatgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatctt ggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccaga aatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagct ccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaag gacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
Аминокислотная последовательность полноразмерного двойного CAR для CD19-CD22	828	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRL HSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGN TLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQES GPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKG LEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTL VTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVT ALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTC AISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRST WYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDT GVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSG GGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYN YVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKS GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQ LTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD

		VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
CAR для CD19 (с сайтом P2A)	829	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRL HSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGN TLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQES GPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKG LEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTL VTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPG
CAR для CD22	830	PMALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPS QTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGR TYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNA VTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTM VTVSSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSD VGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVF GTGTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR
CG#c230		
Нуклеиновая кислота, кодирующая	831	atggcacttcccgtcaccgccctgctgctcccactcgccctccttctgcacgccgccc gccccgaagtgcagctgcagcagtcaggaccgggcctggtcaaaccttcgcagact ctgtccctgacttgcgctataagcggggactccatgctgagcaattcggacacttgga

полноразмерный двойной CAR для CD19-CD22		actggattcgccaaagccccagccggggtctggaatggctgggaaggacctaccat cgctctacttggtacgacgactacgccagctccgtgcgaggacgcgtgtccatcaac gtggacacctccaagaaccagtactcgcttcaactcaacgcagtgacccctgaagat accggagtctactattgcgcccgcgtgcggctccaggacgggaactcctggtcgga cgctttcgatgtctggggacagggcactatggtcaccgtcagctccggcggcggcg gtagccaatcggcgctgacacagccggcttccgcctcgggatcgcctggacagtcg gtgaccatctcgtgcactggaacctcctccgacgtgggcggctacaattatgtgtcat ggtaccagcagcacccgggaaaggcccctaagctgatgatctacgacgtgtccaat agacctagcggggtgtcaaacagattctccggatccaaatccggaaacactgcctcc ctgaccatttccggactgcaggccgaggacgaagccgattactactgctcctcttaca cctcctcatccaccctctacgtgtttgggactgggacccagctgaccgtcctcactacc accccggccccgcggcccccctacaccggcaccgactattgccagccagcctctctc gctgcggccggaggcctgccgcccagccgccggcggagccgtgcacacccgcg gtctggacttcgcgtgcgatatctacatctgggctccgctggccgggacttgtggcgt gctgctgctgtctctggtcatcacactgtactgcaagcgcggaagaaagaagctgctc tacatcttcaagcaacccttcatgcggcctgtgcagaccacccaggaagaggatggc tgctcctgccggttcccggaggaagaagagggcggatgcgaactgcgcgtgaagtt cagccgaagcgccgacgccccggcctaccagcagggccagaaccaactgtacaa cgaactcaacctgggtcggagagaagagtacgacgtgctggacaaaagacgcggc agggaccccgagatgggcggaaagcctcgccgcaagaacccgcaggagggcct ctacaacgagctgcagaaggacaagatggccgaagcctactcagagatcggcatg aaggggagcggaggcgcgggaagggccacgacggtttgtaccaaggactttcc actgcgaccaaggacacctacgatgccctccatatgcaagccctgccgccccgggg ttccggagctaccaacttctcgctgttgaagcaggccggagatgtcgaggaaaaccc gggacctatggccctgccagtgaccgcgctcctgctgcccctggctctgctgcttcac gcggcccggcctgagattgtgatgactcagagcccggcgaccctgtccctgtcccc cggggagagagcaaccctgtcgtgccgggcctcccaagacatctcaaagtacctca attggtatcagcagaagccaggacaggctccacggttgctgatctaccacacttcga gactgcactcaggaatccccgcgcggttttccggttccggctccgggaccgactaca ccctgaccatcagctcgctccagcctgaggatttcgcagtgtacttctgtcagcaagg aaacacccttccatacaccttcggacagggtaccaagctggaaatcaagggaggag gaggatctgggggcggtggttccggaggcggtggaagccaagtgcagctccagg aaagcggacccgggctggtcaagccgagcgaaaccctctcactgacttgtactgtgt ccggagtgtccctgcctgactatggagtgtcctggatccgacagccccccggaaag ggtctggagtggattggggtcatctggggctccgaaactacctactaccagagcagc

		ctcaagagccgggtcaccatttcaaaggataactccaagaatcaagtgtccctgaag ctgtcctcagtgacagccgcagacaccgccgtgtactactgcgccaagcactactac tacggaggctcctacgcaatggactactggggacaaggcactttggtcactgtgtca agcaccaccacccctgcgcctcggcctcctaccccggctcccactatcgcgagcca gccgctgagcctgcggcctgaggcttgccgaccggccgctggcggcgccgtgcat actcggggcctcgactttgcctgtgacatctacatctgggcccccctggccggaacgt gcggagtgctgctgctgtcgctggtcattaccctgtattgcaaacgcggaaggaaga agctgttgtacattttcaagcagcccttcatgcgcccggtgcaaactactcaggagga agatggctgttcctgtcggttccccgaagaggaagaaggcggctgcgagttgaggg tcaagttctcccggtccgccgatgctcccgcctaccaacaggggcagaaccagcttt ataacgaactgaacctgggcaggagggaggaatatgatgtgttggataagcgccgg ggccgggacccagaaatgggggaaagcccagaagaaagaaccctcaagaggg actttacaacgaattgcagaaagacaaaatggccgaggcctactccgagattgggat gaagggcgaaagacggagaggaaaggggcacgacgggctctaccagggactca gcaccgccaccaaagatacctacgacgccctgcatatgcaggcgctgccgccgcg c
Аминокислотная последовательность полноразмерного двойного CAR для CD19-CD22	824	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQ TLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRT YHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAV TPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVT VSSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVG GYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSG SKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGT GTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMAL PVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGI PARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPY TFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPG LVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWI

		GVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR
CAR для CD22 (с сайтом P2A)	825	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQ TLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRT YHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAV TPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVT VSSGGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVG GYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSG SKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGT GTQLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPG
CAR для CD19	826	PMALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSR LHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG NTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQ ESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGK GLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSL KLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT LVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM

		AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR

CDR для CD22 и CD19 из двойного CAR по настоящему изобретению (например, молекулы двойного CAR, содержащей (i) первый CAR, который связывается с CD22, и (ii) второй CAR, который связывается с CD19) представлены в таблице 31.

Таблица 31. Последовательности CDR для CD22 и CD19

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
CD22 CDRs		
HCDR1 (Kabat)	745	SNSDTWN
HCDR2 (Kabat)	746	RTYHRSTWYDDYASSVRG
HCDR3 (Kabat)	748	VRLQDGNSWSDAFDV
HCDR1 (Chothia)	832	GDSMLSNSD
HCDR2 (Chothia)	833	YHRSTWY
HCDR3 (Chothia)	748	VRLQDGNSWSDAFDV
HCDR1 (IMGT)	834	GDSMLSNSDT
HCDR2 (IMGT)	835	TYHRSTWYD
HCDR3 (IMGT)	836	ARVRLQDGNSWSDAFDV
LCDR1 (Kabat)	95	TGTSSDVGGYNYVS
LCDR2 (Kabat)	96	DVSNRPS
LCDR3 (Kabat)	97	SSYTSSSTLYV
LCDR1 (Chothia)	98	TSSDVGGYNY
LCDR2 (Chothia)	99	DVS
LCDR3 (Chothia)	100	YTSSSTLY
LCDR1 (IMGT)	101	SSDVGGYNY
LCDR2 (IMGT)	99	DVS
LCDR3 (IMGT)	97	SSYTSSSTLYV
CD19 CDRs		
HCDR1 (Kabat)	837	GVSLPDYGVS
HCDR2 (Kabat)	838	VIWGSETTYYSSSLKS
	687	VIWGSETTYYQSSLKS
	839	VIWGSETTYYNSSLKS
HCDR3 (Kabat)	762	HYYYGGSYAMDY
LCDR1	763	RASQDISKYLN

LCDR2	764	HTSRLHS
LCDR3	300	QQGNTLPYT

В таблице 32 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности доменов, связывающих CD19 и CD22, из двойного CAR или тандемного CAR, раскрытого в данном документе, например, двойного CAR или тандемного CAR, содержащего (i) первый CAR, который связывается с CD22, и (ii) второй CAR, который связывается с CD19.

Таблица 32. Домены, связывающие CD19 и CD22

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
scFv CAR19 в c201, c203 и тандемных CAR c171, c182, c188	840	gaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgc aaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacag aagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctgg aatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccctcactatca gctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctg ccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagc ggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcg gaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggag tgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctg gaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccctcaagt cacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcat ctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcg ggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagc
	758	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
scFv CAR19 в c224	841	gagattgtcatgactcagtccccggccacactctccctgtcacccggagaaagag caaccctgagctgcagggcgtcccaggacatctcgaagtacctgaactggtacca gcagaagcctggacaagcaccccgcctcctgatctaccacacctcgcggctgcat tcgggaatccccgccagattctcagggagcggatcaggaaccgactacaccctg actatctcgagcctgcaaccagaggatttcgccgtgtacttctgccagcaaggaaa

		caccctgccctacacctttggacagggaaccaagctcgagattaaggggggtggt ggatcgggaggggtggatcaggaggaggcggctcacaagtccagctgcaaga atccggtccgggacttgtgaagccgtccgaaaccctgtcactgacttgcactgtgtc cggggtgtcattgcccgactacggcgtgagctggattcggcagccccctggaaag gattggaatggatcggcgtgatctggggttcggaaactacctactatcagtcctca ctgaagtcccgcgtgaccatcagcaaggataattccaaaaaccaagtgtctctgaa gctctccagcgtcactgccgccgatactgccgtgtactactgcgccaagcactact attacggcggttcgtacgccatggactactggggccaagggacactcgtgaccgt gtcatcc
	758	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
scFv CAR19 в c227	842	caagtccagctgcaagaatccggtccgggacttgtgaagccgtccgaaaccctgt cactgacttgcactgtgtccggggtgtcattgcccgactacggcgtgagctggattc ggcagccccctggaaagggattggaatggatcggcgtgatctggggttcggaaa ctacctactatcagtcctcactgaagtcccgcgtgaccatcagcaaggataattcca aaaaccaagtgtctctgaagctctccagcgtcactgccgccgatactgccgtgtact actgcgccaagcactactattacggcggttcgtacgccatggactactggggacaa ggcactcttgtgactgtgtcaagcggcggtggagggagcggtgggggcggttca ggaggaggcggatcagagatcgtgatgacccaatccccagccaccctgtccctc agccctggagaaagagccaccctgagctgccgggcctcccaggatatcagcaag tacttgaactggtaccaacaaaagccggggcaggcgccccggctcctgatctacc acacctcgcgcctccactcaggtatccccgccagattctcagggagcggctccgg tactgactacaccctgactatttcctcactgcagccagaggactttgccgtgtacttct gccagcagggaaacactctgccgtacaccttcgggcagggaacgaagcttgaaa ttaag
	843	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNS KNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSP ATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAP

		RLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDF AVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK
scFv CAR19 в c230	844	gagattgtgatgactcagagcccggcgaccctgtccctgtcccccggggagaga gcaaccctgtcgtgccgggcctcccaagacatctcaaagtacctcaattggtatca gcagaagccaggacaggctccacggttgctgatctaccacacttcgagactgcac tcaggaatccccgcgcggttttccggttccggctccgggaccgactacaccctgac catcagctcgctccagcctgaggatttcgcagtgtacttctgtcagcaaggaaacac ccttccatacaccttcggacagggtaccaagctggaaatcaagggaggaggagg atctgggggcggtggttccggaggcggtggaagccaagtgcagctccaggaaa gcggacccgggctggtcaagccgagcgaaaccctctcactgacttgtactgtgtc cggagtgtccctgcctgactatggagtgtcctggatccgacagccccccggaaag ggtctggagtggattggggtcatctggggctccgaaactacctactaccagagca gcctcaagagccgggtcaccatttcaaaggataactccaagaatcaagtgtccctg aagctgtcctcagtgacagccgcagacaccgccgtgtactactgcgccaagcact actactacggaggctcctacgcaatggactactggggacaaggcactttggtcact gtgtcaagc
	758	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQ QKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQS SLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAK HYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
scFv CAR22 в c201 и c203	845	gaagtgcagctgcagcagtcagggcctggcctggtcaagccgtcgcagaccctc tccctgacatgcgccattagcggggactccatgctgagcaactcggacacctgga actggattcggcagtccccttcccggggactcgagtggctcggacgcacctacca tcggagcacttggtacgacgactacgcctcctccgtgagaggtcgcgtgtcgatca acgtggatacctcgaagaaccagtatagcttgcaactgaacgccgtgacccctga ggataccggagtgtactattgtgcgagagtcaggctgcaagacggaaactcctgg tccgacgcatttgatgtctggggacagggtactatggtcacggtgtcatctggagg cggaggatcgcaaagcgccctgactcagccggcttcggctagcggttcaccggg gcagtccgtgactatctcctgcaccgggacttcctccgacgtgggaggctacaatt acgtgtcctggtaccagcaacaccccggcaaagccccaaagctgatgatctacga cgtcagcaacagacccagcggagtgtccaaccggttcagcggctccaagtccgg caacaccgcctccctgaccatcagcgggcttcaggccgaagatgaggcggatta

		ctactgctcctcgtacacctcaagctcaactctgtacgtgttcggcaccggtactcag ctcaccgtgctg
	846	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALTQPA SASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
scFv CAR22 в 230	847	gaagtgcagctgcagcagtcaggaccgggcctggtcaaaccttcgcagactctgt ccctgacttgcgctataagcggggactccatgctgagcaattcggacacttggaac tggattcgccaaagccccagccggggtctggaatggctgggaaggacctaccat cgctctacttggtacgacgactacgccagctccgtgcgaggacgcgtgtccatcaa cgtggacacctccaagaaccagtactcgcttcaactcaacgcagtgacccctgaa gataccggagtctactattgcgcccgcgtgcggctccaggacgggaactcctggt cggacgctttcgatgtctggggacagggcactatggtcaccgtcagctccggcgg cggcggtagccaatcggcgctgacacagccggcttccgcctcgggatcgcctgg acagtcggtgaccatctcgtgcactggaacctcctccgacgtgggcggctacaatt atgtgtcatggtaccagcagcacccgggaaaggcccctaagctgatgatctacga cgtgtccaatagacctagcggggtgtcaaacagattctccggatccaaatccggaa acactgcctccctgaccatttccggactgcaggccgaggacgaagccgattacta ctgctcctcttacacctcctcatccaccctctacgtgtttgggactgggacccagctg accgtcctc
	846	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSQSALTQPA SASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
scFv CAR22 в 171, c182	848	gaagtgcagcttcaacaatcaggaccaggactcgtcaaaccatcacagaccctct ccctcacatgtgccatctccggggactccatgttgagcaattccgacacttggaatt ggattagacaaagcccgtcccggggtctggaatggttgggacgcacctaccacc ggtctacttggtacgacgactacgcgtcatccgtgcggggaagagtgtccatcaac gtggacacctccaagaaccagtacagcctgcagcttaatgccgtgactcctgagg

		atacgggcgtctactactgcgcccgcgtccgcctgcaagacgggaacagctgga gcgatgcattcgatgtctggggccagggaactatggtcaccgtgtcgtctggggg cggtggatcgggtggcgggggttcgggggggcggcggctctcagtccgctcttac ccaaccggcctcagcctcggggagccccggccagagcgtgaccatttcctgcac cggcacttcatccgacgtgggcggctacaactacgtgtcctggtaccaacagcac ccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtccaacaggccctcggga gtgtccaaccggttctcgggttcgaaatcgggaaacacagccagcctgaccatca gcggactgcaggctgaagatgaagccgactactactgctcctcctacacctcgtca tccacgctctacgtgttcggcactggaactcagctgactgtgctg
	753	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTW NWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRV SINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQD GNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYV SWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQ LTVL
scFv CAR22 в c188	849	cagtccgctcttacccaaccggcctcagcctcggggagccccggccagagcgtg accatttcctgcaccggcacttcatccgacgtgggcggctacaactacgtgtcctg gtaccaacagcacccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgacgtgtccaa caggccctcgggagtgtccaaccggttctcgggttcgaaatcgggaaacacagcc agcctgaccatcagcggactgcaggctgaagatgaagccgactactactgctcct cctacacctcgtcatccacgctctacgtgttcggcactggaactcagctgactgtgc tgggcggaggaggctccgaagtgcagcttcaacaatcaggaccaggactcgtca aaccatcacagaccctctccctcacatgtgccatctccggggactccatgttgagca attccgacacttggaattggattagacaaagcccgtcccggggtctggaatggttg ggacgcacctaccaccggtctacttggtacgacgactacgcgtcatccgtgcggg gaagagtgtccatcaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctgcagcttaat gccgtgactcctgaggatacgggcgtctactactgcgcccgcgtccgcctgcaag acgggaacagctggagcgatgcattcgatgtctggggccagggaactatggtcac cgtgtcgtct
	850	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQL TVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDS

		MLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDD YASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYY CARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
scFv CAR22 в c224	851	cagtccgctctgactcagccggcctcagcttcggggtcccctggtcaaagcgtcac tatttcctgtaccggaacctcatcagacgtgggcggctacaattacgtgtcctggtac caacagcaccccggaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgtccaaccggc cgtcaggagtgtccaacagattctccggctccaagagcggaaacactgccagctt gaccattagcggcttgcaggccgaggacgaagccgactactactgctctagctac acatcctcgtctaccctctacgtgtttggaacggggacccagctgactgtgctcggg ggtggaggatcagaggtgcaactccagcagtccggtcctggcctcgtgaaaccgt cccaaaccctgtccctgacttgcgccatctcgggcgactccatgctgtccaattccg acacctggaactggattagacaatcgcctagccggggactcgaatggctgggcc ggacctaccaccggtccacgtggtatgacgactacgcaagctccgtccggggaa gggtgtccattaacgtcgatacctccaagaaccagtacagccttcagctgaacgct gtgacccccgaggataccggcgtctactactgtgcaagagtgcgattgcaggatg gaaactcgtggtcggacgcattcgatgtctggggacagggaactatggtgaccgt gtcctcg
	850	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQL TVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDS MLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDD YASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYY CARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS
scFv CAR22 в c227	852	cagtccgctctgactcagccggcctcagcttcggggtcccctggtcaaagcgtcac tatttcctgtaccggaacctcatcagacgtgggcggctacaattacgtgtcctggtac caacagcaccccggaaaggctcctaagcttatgatctacgacgtgtccaaccggc cgtcaggagtgtccaacagattctccggctccaagagcggaaacactgccagctt gaccattagcggcttgcaggccgaggacgaagccgactactactgctctagctac acatcctcgtctaccctctacgtgtttggaacggggacccagctgactgtgctcggg ggtggaggatcagaggtgcaactccagcagtccggtcctggcctcgtgaaaccgt cccaaaccctgtccctgacttgcgccatctcgggcgactccatgctgtccaattccg acacctggaactggattagacaatcgcctagccggggactcgaatggctgggcc ggacctaccaccggtccacgtggtatgacgactacgcaagctccgtccggggaa gggtgtccattaacgtcgatacctccaagaaccagtacagccttcagctgaacgct

		gtgacccccgaggataccggcgtctactactgtgcaagagtgcgattgcaggatg gaaactcgtggtcggacgcattcgatgtctggggacagggaactatggtcactgtg tcctcc
	850	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQL TVLGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDS MLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWYDD YASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYY CARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSS

В таблице 33 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности дополнительных компонентов CAR, например, сигнального пептида, линкеров и сайтов P2A, которые могут использоваться в молекуле CAR, например, в молекуле двойного CAR, описанной в данном документе (например, молекуле двойного CAR, содержащей (i) первый CAR, который связывается с CD22, и (ii) второй CAR, который связывается с CD19).

Таблица 33. Дополнительные компоненты CAR

Идентификатор	SEQ ID NO	Последовательность
Сигнальный пептид CAR22 в c201, c203 и тандемных CAR c171, c182, c188	853	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgct cggccc
	2	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Сигнальный пептид в тандемных CAR c224, c227	854	atggccctgcccgtgactgcgctcctgcttccgttggccctgctcctgcatgccgcc agacct
	2	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Сигнальный пептид CAR19 в c201 и c203	855	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgc caggccg
	2	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Сигнальный пептид CAR22 в c230	856	atggcacttcccgtcaccgccctgctgctcccactcgccctccttctgcacgccgcc cgcccc
	2	MALPVTALLLPLALLLHAARP
Сигнальный пептид CAR19 в c230	857	atggccctgccagtgaccgcgctcctgctgcccctggctctgctgcttcacgcggc ccggcct
	2	MALPVTALLLPLALLLHAARP

Шарнирный и трансмембранный домены CD8 CAR22 в c201 и c203 и в тандемных CAR c171, c182, c188, c224, c227	858	accactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccag cctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcata cccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttg cggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgt
	202	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
Шарнирный и трансмембранный домены CD8 CAR22 в c230	859	actaccaccccggccccgcggcccccctacaccggcaccgactattgccagccag cctctctcgctgcggccggaggcctgccgcccagccgccggcggagccgtgca cacccgcggtctggacttcgcgtgcgatatctacatctgggctccgctggccggga cttgtggcgtgctgctgctgtctctggtcatcacactgtactgc
	202	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
Шарнирный и трансмембранный домены CD8 CAR19 в c201 и c203	860	accacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgca gcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgcagtg cacacgaggggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccg ggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccctttactgc
	202	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
Шарнирный и трансмембранный домены CD8 CAR19 в c230	861	accaccacccctgcgcctcggcctcctaccccggctcccactatcgcgagccagc cgctgagcctgcggcctgaggcttgccgaccggccgctggcggcgccgtgcata ctcggggcctcgactttgcctgtgacatctacatctgggcccccctggccggaacg tgcggagtgctgctgctgtcgctggtcattaccctgtattgc
	202	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
4-1BB CAR22 в c201 и c203 и в тандемных CAR c171, c182, c188, c224, c227	862	aagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagga aggcggctgcgaactg
	14	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL
4-1BB CAR19 в c201 и c203	15	aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagta caaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaag gaggatgtgaactg
	14	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE

		GGCEL
4-1BB CAR22 в c230	863	aagcgcggaagaaagaagctgctctacatcttcaagcaacccttcatgcggcctgt gcagaccacccaggaagaggatggctgctcctgccggttcccggaggaagaag agggcggatgcgaactg
	14	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL
4-1BB CAR19 в c230	864	aaacgcggaaggaagaagctgttgtacattttcaagcagcccttcatgcgcccggt gcaaactactcaggaggaagatggctgttcctgtcggttccccgaagaggaagaa ggcggctgcgagttg
	14	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL
CD3-дзета CAR22 в c201 и c203 и в тандемных CAR 171, c182, c188, c224, c227	865	cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggaca agcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatc cccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctata gcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactg taccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg
	20	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
CD3-дзета CAR19 в c201 и c203	21	agagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaa ccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggaca agagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccc tcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagt gagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttta ccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggc cctgcccccctcgc
	20	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
CD3-дзета	866	cgcgtgaagttcagccgaagcgccgacgccccggcctaccagcagggccagaa

CAR22 в c230		ccaactgtacaacgaactcaacctgggtcggagagaagagtacgacgtgctgga caaaagacgcggcagggaccccgagatgggcggaaagcctcgccgcaagaac ccgcaggagggcctctacaacgagctgcagaaggacaagatggccgaagccta ctcagagatcggcatgaaggggagcggaggcgcgggaagggccacgacggt ttgtaccaaggactttccactgcgaccaaggacacctacgatgccctccatatgcaa gccctgccgccccgg
	20	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
CD3-дзета CAR19 в c230	867	agggtcaagttctcccggtccgccgatgctcccgcctaccaacaggggcagaac cagctttataacgaactgaacctgggcaggagggaggaatatgatgtgttggataa gcgccggggccgggacccagaaatgggggaaagcccagaagaaagaaccct caagagggactttacaacgaattgcagaaagacaaaatggccgaggcctactccg agattgggatgaagggcgaaagacggagaggaaaggggcacgacgggctcta ccagggactcagcaccgccaccaaagatacctacgacgccctgcatatgcaggc gctgccgccgcgc
	20	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
Линкер между scFv в c171	868	ttggcagaagccgccgcgaaa
	869	LAEAAAK
Линкер между scFv в c182, c188	870	ggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagc
	104	GGGGSGGGGSGGGGS
Линкер между scFv в c224	871	ggcggaggcgggagcggaggaggaggctctggcggaggaggaagc
	104	GGGGSGGGGSGGGGS
Линкер между scFv в c227	872	ggcggtggaggctcgggggggggcggctcaggaggaggcggctca
	104	GGGGSGGGGSGGGGS
P2A в c201, c203	873	ggaagcggagctactaacttcagcctgctgaagcaggctggagacgtggaggag aaccctggacct
	874	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
P2A в c230	875	ggttccggagctaccaacttctcgctgttgaagcaggccggagatgtcgaggaaa acccgggacct

	874	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
Линкер Gly4Ser	876	Ggtggaggtggcagc
	877	GGGGS

В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR, описанная в данном документе, может дополнительно содержать второй CAR, например, второй CAR, который содержит другой антигенсвязывающий домен, например, для той же самой мишени (например, мишени, описанной выше) или другой мишени. В некоторых вариантах осуществления второй CAR содержит антигенсвязывающий домен для мишени, экспрессируемой на раковой клетке того же типа, что и мишень для первого CAR. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR, содержит первый CAR, который нацеливается на первый антиген и содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий костимулирующий сигнальный домен, а не первичный сигнальный домен, и второй CAR, который нацеливается на второй, другой, антиген и содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий первичный сигнальный домен, а не костимулирующий сигнальный домен. Без ограничения какой-либо теорией, размещение костимулирующего сигнального домена, например, 4-1BB, CD28, CD27 или OX-40, на первом CAR и первичного сигнального домена, например, CD3-дзета, на втором CAR может ограничивать активность CAR клетками, где экспрессируются обе мишени. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR, содержит первый CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, который нацеливается, например, на мишень, описанную выше, трансмембранный домен и костимулирующий домен, и второй CAR, который нацеливается на антиген, отличный от антигена, на который нацеливается первый CAR (например, антиген, экспрессируемый на раковой клетке того же типа, что и первая мишень), и содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен. В другом варианте осуществления иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR, содержит первый CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, например, который нацеливается на мишень, описанную выше, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен, и второй CAR, который нацеливается на антиген, отличный от антигена, на который нацеливается первый CAR (например, антиген, экспрессируемый на раковой клетке того же типа, что и первая мишень), и содержит антигенсвязывающий домен для антигена, трансмембранный домен и костимулирующий сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR, содержит CAR, описанный в данном документе, например, CAR для мишени, описанной выше, и ингибирующий CAR. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген, обнаруживаемый на нормальных клетках, а не раковых клетках, например, нормальных клетках, которые также экспрессируют мишень. В некоторых

вариантах осуществления ингибирующий CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен ингибирующей молекулы. Например, внутриклеточный домен ингибирующего CAR может представлять собой внутриклеточный домен PD1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 или TGFR-бета.

В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка (например, Т-клетка, NK-клетка) содержит первый CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с опухолевым антигеном, описанным в данном документе, и второй CAR, содержащий внеклеточный домен PD1 или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит ингибирующую молекулу, описанную выше.

В некоторых вариантах осуществления второй CAR в клетке представляет собой ингибирующий CAR, где ингибирующий CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен ингибирующей молекулы. Ингибирующая молекула может быть выбрана из одного или нескольких из PD1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, TGFR-бета, CEACAM-1, CEACAM-3 и CEACAM-5. В некоторых вариантах осуществления вторая молекула CAR содержит внеклеточный домен PD1 или его фрагмент.

В вариантах осуществления вторая молекула CAR в клетке дополнительно содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий первичный сигнальный домен и/или внутриклеточный сигнальный домен.

В других вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен в клетке содержит первичный сигнальный домен, содержащий функциональный домен CD3-дзета, и костимулирующий сигнальный домен, содержащий функциональный домен 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен первой молекулы CAR содержит scFv, и антигенсвязывающий домен второй молекулы CAR не содержит scFv. Например, антигенсвязывающий домен первой молекулы CAR содержит scFv, и антигенсвязывающий домен второй молекулы CAR содержит VHH-домен верблюдовых.

Конформация CAR

В вариантах осуществления, предусмотренных в данном документе, понятно, что конформацию одного или нескольких CAR можно модулировать с помощью векторов, описанных в данном документе выше. Соответственно, данные конформации описаны ниже применительно к клетке, экспрессирующей CAR.

Разделенный CAR

В некоторых вариантах осуществления в клетке, экспрессирующей CAR, используется разделенный CAR. Подход с разделенным CAR более подробно описан в публикациях WO2014/055442 и WO2014/055657. Вкратце, система разделенного CAR содержит клетку, экспрессирующую первый CAR, имеющий первый

антигенсвязывающий домен и костимулирующий домен (например, 41BB), и эта клетка также экспрессирует второй CAR, имеющий второй антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен (например, CD3-дзета). Когда клетка встречается с первым антигеном, то активируется костимулирующий домен, и клетка пролиферирует. Когда клетка встречается со вторым антигеном, то активируется внутриклеточный сигнальный домен, и запускается активность уничтожения клеток. Таким образом, клетка, экспрессирующая CAR, полностью активируется только в присутствии обоих антигенов.

Множество CAR

В некоторых аспектах клетка, экспрессирующая CAR, описанная в данном документе, может дополнительно содержать второй CAR, например, второй CAR, который содержит другой антигенсвязывающий домен, например, для той же мишени или другой мишени (например, для мишени, отличной от антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе, или другого антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе). В некоторых вариантах осуществления второй CAR содержит антигенсвязывающий домен для мишени, экспрессируемой на раковой клетке того же типа, что и антиген, ассоциированный с раком. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, содержит первый CAR, который нацеливается на первый антиген и содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий костимулирующий сигнальный домен, а не первичный сигнальный домен, и второй CAR, который нацеливается на второй, другой, антиген и содержит внутриклеточный сигнальный домен, имеющий первичный сигнальный домен, а не костимулирующий сигнальный домен. Без ограничения какой-либо теорией, размещение костимулирующего сигнального домена, например, 4-1BB, CD28, CD27 или OX-40, на первом CAR и первичного сигнального домена, например, CD3-дзета, на втором CAR может ограничивать активность CAR клетками, где экспрессируются обе мишени. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, содержит первый CAR для антигена, ассоциированного с раком, который содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген-мишень, описанный в данном документе, трансмембранный домен и костимулирующий домен, и второй CAR, который нацеливается на другой антиген-мишень (например, антиген, экспрессируемый на раковой клетке того же типа, на которой экспрессируется первый антиген-мишень) и содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен. В другом варианте осуществления клетка, экспрессирующая CAR, содержит первый CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, связывающий антиген-мишень, описанный в данном документе, трансмембранный домен и первичный сигнальный домен, и второй CAR, который нацеливается на антиген, отличный от первого антигена-мишени (например, на антиген, экспрессируемый на раковой клетке того же типа, что и клетка, на которой экспрессируется первый антиген-мишень), и содержит антигенсвязывающий домен для антигена, трансмембранный домен и костимулирующий сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления в заявляемом изобретении предусмотрены

первый и второй CAR, где антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR представляет собой scFv, а другой не представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюдовых, акулы или миноги или одиночный VH-домен, полученный из последовательности человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR содержит нанотело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CAR и указанного второго CAR содержит VHH-домен верблюдовых.

После выполнения способов, описанных в данном документе, можно применять различные анализы для оценивания активности, например, способности Т-клеток размножаться после стимуляции антигеном, устойчивого размножения Т-клеток при отсутствии повторной стимуляции и видов противораковой активности в соответствующих моделях in vitro и животных моделях. Анализы для оценивания эффектов CAR по настоящему изобретению известны специалистам в данной области и в целом описаны ниже.

Анализ экспрессии CAR в первичных Т-клетках посредством вестерн-блоттинга можно применять для выявления присутствия мономеров и димеров. См., например, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Вкратце, Т-клетки (смесь $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток в соотношении 1:1), экспрессирующие CAR, размножают in vitro в течение более 10 дней с последующим лизисом и проведением SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. CAR, содержащие полноразмерный цитоплазматический домен TCR-ζ и эндогенную цепь TCR-ζ, выявляют с помощью вестерн-блоттинга с применением антитела к цепи TCR-ζ. Те же субпопуляции Т-клеток применяют для анализа посредством SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях для обеспечения оценивания образования ковалентных димеров.

Размножение CAR^+ Т-клеток in vitro после стимуляции антигеном можно измерить с помощью проточной цитометрии.

Также можно измерять уровень устойчивости размножения CAR^+ Т-клеток при отсутствии повторной стимуляции. См., например, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Вкратце, измеряют средний объем Т-клеток (фл) в день 8 культивирования с использованием счетчика частиц Multisizer III от Coulter, Cellometer Vision от Nexcelom или Scepter от Millipore после стимуляции с помощью магнитных гранул, покрытых αCD3/αCD28, в день 0 и трансдукции с помощью указанного CAR в день 1.

Для измерения активности клеток CART также можно использовать животные

модели. Например, можно использовать ксенотрансплантатную модель с использованием CAR^+ Т-клеток человека, специфичных в отношении антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе, для лечения первичного пре-В-клеточного ALL человека у мышей с иммунодефицитом. См., например, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009).

Можно оценивать дозозависимый ответ на обработку с помощью CAR. См., например, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Например, периферическую кровь собирают через 35-70 дней после развития лейкоза у мышей, которым в день 21 инъецировали CAR-Т-клетки, эквивалентное количество ложнотрансдуцированных Т-клеток или не инъецировали Т-клетки. У мышей из каждой группы, выбранных случайным образом, собирают кровь для определения в периферической крови количества бластных клеток ALL, положительных+по антигену, ассоциированному с раком, описанному в данном документе, а затем их умерщвляют в дни 35 и 49. Остальных животных оценивают в дни 57 и 70.

Оценка клеточной пролиферации и продуцирования цитокинов была описана ранее, например, в Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009).

Цитотоксичность можно оценивать с помощью стандартного анализа высвобождения 51Cr. См., например, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009).

Для оценивания специфической миграции и пролиферации CAR в моделях на животных, несущих опухоль, можно использовать технологии визуализации. Такие анализы были описаны, например, в Barrett et al., Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011).

Также можно применять другие анализы, включая анализы, описанные в данном документе в разделе "Примеры", а также анализы, которые известны из уровня техники, для оценивания CAR, описанных в данном документе.

Молекулы антител к CD28

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD28, например, антитело к CD28, которое подлежит применению в полиспецифической связывающей молекуле, описанной в данном документе, содержит по меньшей мере одну антигенсвязывающую область, например, вариабельную область или ее антигенсвязывающий фрагмент, из антитела к CD28 (2), описанного в **таблице 19.** В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к CD28 содержит одну или две вариабельные области из антитела к CD28 (2), описанного в **таблице 19**. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD28 содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 538, 539, 540, 530, 531 и 532 соответственно; HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат

аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 541, 539, 540, 530, 531 и 532 соответственно; HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 542, 543, 540, 533, 534 и 535 соответственно; или HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 544, 545, 546, 536, 534 и 532 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к CD28 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 547 или 548 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 547 или 548. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD28 содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 537 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD28 содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 547 и 537 соответственно или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD28 содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 548 и 537 соответственно или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с любой из вышеуказанных последовательностей.

Понятно, что антитело к CD28, описанное в данном документе, может применяться в контексте полиспецифической связывающей молекулы, например, с дополнительным связывающим доменом, например, доменом, связывающим CD3, описанным в данном документе. Также понятно, что антитело к CD28, описанное в данном документе, может применяться в других контекстах, например, в качестве моноспецифического антитела.

Средства для активации клеток

В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток представляет собой соединение, стимулирующее Т-клетки, антиидиотипическое антитело к антигенсвязывающему домену CAR и/или опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления соединение, стимулирующее Т-клетки, представляет собой IL-2, IL-15, mAb к CD2, mAb к CD3, mAb к CD28, неоантигенные пептиды, пептиды из общих антигенов, таких как TRP2, gp100, лизат опухолевых клеток, CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелин, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипид F77, EGFRvIII, GD-2, TCR NY-ESO-1 и/или TCR MAGEA3. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток включает в себя комплекс CD3/TCR и/или средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, где необязательно средство для активации клеток представляет собой полиспецифическую связывающую молекулу,

включающую в себя средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, представляет собой средство, которое стимулирует CD3. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует CD3, содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов для CD3 или TCR, как, например, без ограничения, антитело или фрагмент антитела к CD3 или к TCR, содержащие одну или несколько их CDR, тяжелых цепей и/или легких цепей.

Последовательности антител к CD3 и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к CD3 наряду с соответствующими последовательностями CDR, тяжелой цепи и легкой цепи представлены в **таблице 19**. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 437 и 427 соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 456 и 445 соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 457 и 446 соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 475 и 467 соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 476 и 468 соответственно. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий CD3, содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 494 и 484 соответственно.

Последовательности антител к TCR и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к TCR наряду с соответствующими последовательностями CDR, тяжелой цепи и легкой цепи представлены в **таблице 19.**

В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, представляет собой средство, которое стимулирует CD28, ICOS, CD27, CD25, 4-1BB, IL6RA, IL6RB или CD2. В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов для CD28, ICOS, CD27, CD25, 4-1BB, IL6RB и/или CD2, как, например, без ограничения, антитело или фрагмент антитела к CD28, к ICOS, к CD27, к CD25, к 4-1BB, к IL6RA, к IL6RB или к CD2, содержащие одну или несколько их CDR, тяжелых цепей и/или легких цепей.

Последовательности антител к CD28 и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к CD28 наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH, VL, HC и LC представлены

в **таблице 19**.

Последовательности антител к ICOS и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к ICOS наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH, VL и LC представлены в **таблице 19**.

Последовательности антител к CD27 и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к CD27 наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH и VL представлены в **таблице 19**.

Последовательности антител к CD25 и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к CD25 наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH, VL, HC и LC представлены в **таблице 19**.

Последовательности антител к 4-1BB и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к 4-1BB наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH и VL представлены в **таблице 19**.

Последовательности антител к IL6RA и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к IL6RA наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH и VL представлены в **таблице 19**.

Последовательности антител к IL6RB и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к IL6RB наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH и VL представлены в **таблице 19**.

Последовательности антител к CD2 и способы получения таких антител известны из уровня техники. Неограничивающие примеры последовательностей антител к CD2 наряду с соответствующими последовательностями CDR, VH, VL, HC и LC представлены в **таблице 19**.

В некоторых вариантах осуществления молекула антитела, описанная в данном документе, содержит CDR, VH, VL, HC и/или LC, раскрытые в **таблице 19**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с ней.

Таблица 19 - Иллюстративные последовательности антитела, CDR, вариабельной области тяжелой цепи (VH), вариабельной области легкой цепи (VL), тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) по антигену-мишени

SEQ ID NO	Описание	Аминокислотная последовательность
Антитело к CD3 (1)		

SEQ ID NO: 420 (комбинация)	LCDR1	SASSSVSYMN
SEQ ID NO: 421 (комбинация)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 422 (комбинация)	LCDR3	QQWSSNPFT
SEQ ID NO: 420 (Kabat)	LCDR1	SASSSVSYMN
SEQ ID NO: 421 (Kabat)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 422 (Kabat)	LCDR3	QQWSSNPFT
SEQ ID NO: 423 (Chothia)	LCDR1	SSSVSY
SEQ ID NO: 424 (Chothia)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 425 (Chothia)	LCDR3	WSSNPF
SEQ ID NO: 426 (IMGT)	LCDR1	SSVSY
SEQ ID NO: 424 (IMGT)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 422 (IMGT)	LCDR3	QQWSSNPFT
SEQ ID NO: 427	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNW YQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSG TDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGT KLQIT
SEQ ID NO: 428 (комбинация)	HCDR1	GYTFTRYTMH
SEQ ID NO: 429 (комбинация)	HCDR2	YINPSRGYTNYNQKVKD
SEQ ID NO: 430 (комбинация)	HCDR3	YYDDHYSLDY

SEQ ID NO: 431 (Kabat)	HCDR1	RYTMH
SEQ ID NO: 429 (Kabat)	HCDR2	YINPSRGYTNYNQKVKD
SEQ ID NO: 430 (Kabat)	HCDR3	YYDDHYSLDY
SEQ ID NO: 432 (Chothia)	HCDR1	GYTFTRY
SEQ ID NO: 433 (Chothia)	HCDR2	NPSRGY
SEQ ID NO: 430 (Chothia)	HCDR3	YYDDHYSLDY
SEQ ID NO: 434 (IMGT)	HCDR1	GYTFTRYT
SEQ ID NO: 435 (IMGT)	HCDR2	INPSRGYT
SEQ ID NO: 436 (IMGT)	HCDR3	ARYYDDHYSLDY
SEQ ID NO: 437	VH	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYT MHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVK DRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCAR YYDDHYSLDYWGQGTPVTVSS
Антитело к CD3 (2)		
SEQ ID NO: 438 (комбинация)	LCDR1	GSSTGAVTSGNYPN
SEQ ID NO: 439 (комбинация)	LCDR2	GTKFLAP
SEQ ID NO: 440 (комбинация)	LCDR3	VLWYSNRWV
SEQ ID NO: 438 (Kabat)	LCDR1	GSSTGAVTSGNYPN
SEQ ID NO: 439 (Kabat)	LCDR2	GTKFLAP

SEQ ID NO: 440 (Kabat)	LCDR3	VLWYSNRWV
SEQ ID NO: 441 (Chothia)	LCDR1	STGAVTSGNY
SEQ ID NO: 442 (Chothia)	LCDR2	GTK
SEQ ID NO: 443 (Chothia)	LCDR3	WYSNRW
SEQ ID NO: 444 (IMGT)	LCDR1	TGAVTSGNY
SEQ ID NO: 442 (IMGT)	LCDR2	GTK
SEQ ID NO: 440 (IMGT)	LCDR3	VLWYSNRWV
SEQ ID NO: 445	VL	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGN YPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 446	VL	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGN YPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGCGTKLTVL
SEQ ID NO: 447 (комбинация)	HCDR1	GFTFNKYAMN
SEQ ID NO: 448 (комбинация)	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO: 449 (комбинация)	HCDR3	HGNFGNSYISYWAY
SEQ ID NO: 450 (Kabat)	HCDR1	KYAMN
SEQ ID NO: 448 (Kabat)	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO: 449 (Kabat)	HCDR3	HGNFGNSYISYWAY

SEQ ID NO: 451 (Chothia)	HCDR1	GFTFNKY
SEQ ID NO: 452 (Chothia)	HCDR2	RSKYNNYA
SEQ ID NO: 449 (Chothia)	HCDR3	HGNFGNSYISYWAY
SEQ ID NO: 453 (IMGT)	HCDR1	GFTFNKYA
SEQ ID NO: 454 (IMGT)	HCDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO: 455 (IMGT)	HCDR3	VRHGNFGNSYISYWAY
SEQ ID NO: 456	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 457	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS
Антитело к CD3 (3)		
SEQ ID NO: 458 (комбинация)	LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO: 459 (комбинация)	LCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO: 460 (комбинация)	LCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO: 458 (Kabat)	LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO: 459 (Kabat)	LCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO: 460 (Kabat)	LCDR3	ALWYSNLWV

SEQ ID NO: 461 (Chothia)	LCDR1	STGAVTTSNY
SEQ ID NO: 462 (Chothia)	LCDR2	GTN
SEQ ID NO: 463 (Chothia)	LCDR3	WYSNLW
SEQ ID NO: 464 (IMGT)	LCDR1	TGAVTTSNY
SEQ ID NO: 465 (IMGT)	LCDR2	GGT
SEQ ID NO: 466 (IMGT)	LCDR3	ALWYSNL
SEQ ID NO: 467	VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSN YANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFS GSLLGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNL WVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 468	VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSN YANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFS GSLLGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNL WVFGCGTKLTVL
SEQ ID NO: 469 (комбинация)	HCDR1	GFTFNTYAMN
SEQ ID NO: 448 (комбинация)	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO: 470 (комбинация)	HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 471 (Kabat)	HCDR1	TYAMN
SEQ ID NO: 448 (Kabat)	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO: 470 (Kabat)	HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 472 (Chothia)	HCDR1	GFTFNTY

SEQ ID NO: 452 (Chothia)	HCDR2	RSKYNNYA
SEQ ID NO: 470 (Chothia)	HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 473 (IMGT)	HCDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO: 454 (IMGT)	HCDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO: 474 (IMGT)	HCDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 475	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 476	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYA MNWVRQASGKCLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
Антитело к CD3 (4)		
SEQ ID NO: 477 (комбинация)	LCDR1	RSSQSLVRSEGTTYFN
SEQ ID NO: 478 (комбинация)	LCDR2	RVSNRFS
SEQ ID NO: 479 (комбинация)	LCDR3	LQSSHFPWT
SEQ ID NO: 477 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVRSEGTTYFN
SEQ ID NO: 478 (Kabat)	LCDR2	RVSNRFS
SEQ ID NO: 479 (Kabat)	LCDR3	LQSSHFPWT
SEQ ID NO: 480 (Chothia)	LCDR1	SQSLVRSEGTTY

SEQ ID NO: 481 (Chothia)	LCDR2	RVS
SEQ ID NO: 482 (Chothia)	LCDR3	SSHFPW
SEQ ID NO: 483 (IMGT)	LCDR1	QSLVRSEGTTY
SEQ ID NO: 481 (IMGT)	LCDR2	RVS
SEQ ID NO: 479 (IMGT)	LCDR3	LQSSHFPWT
SEQ ID NO: 484	VL	DILVTQTPVSLPVSLGGHVSISCRSSQSLVRSEGT TYFNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCLQSSHFPWT FGGGTKLELK
SEQ ID NO: 485 (комбинация)	HCDR1	GFTFSKQGMH
SEQ ID NO: 486 (комбинация)	HCDR2	MIYYDSSKMYYADTVKG
SEQ ID NO: 487 (комбинация)	HCDR3	FWWDLDFDH
SEQ ID NO: 488 (Kabat)	HCDR1	KQGMH
SEQ ID NO: 486 (Kabat)	HCDR2	MIYYDSSKMYYADTVKG
SEQ ID NO: 487 (Kabat)	HCDR3	FWWDLDFDH
SEQ ID NO: 489 (Chothia)	HCDR1	GFTFSKQ
SEQ ID NO: 490 (Chothia)	HCDR2	YYDSSK
SEQ ID NO: 487 (Chothia)	HCDR3	FWWDLDFDH
SEQ ID NO: 491 (IMGT)	HCDR1	GFTFSKQG

SEQ ID NO: 492 (IMGT)	HCDR2	IYYDSSKM
SEQ ID NO: 493 (IMGT)	HCDR3	ASFWWDLDFDH
SEQ ID NO: 494	VH	EVKLVESGGDLVQPGDSLTLSCVASGFTFSKQG MHWIRQAPKKGLEWIAMIYYDSSKMYYADTVK GRFTISRDNSKNTLYLEMNSLRSEDTAMYYCAS FWWDLDFDHWGQGVMVTVSS
Антитело к TCR		
SEQ ID NO: 495 (комбинация)	LCDR1	SATSSVSYMH
SEQ ID NO: 421 (комбинация)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 496 (комбинация)	LCDR3	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 495 (Kabat)	LCDR1	SATSSVSYMH
SEQ ID NO: 421 (Kabat)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 496 (Kabat)	LCDR3	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 497 (Chothia)	LCDR1	TSSVSY
SEQ ID NO: 424 (Chothia)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 498 (Chothia)	LCDR3	WSSNPL
SEQ ID NO: 426 (IMGT)	LCDR1	SSVSY
SEQ ID NO: 424 (IMGT)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 496 (IMGT)	LCDR3	QQWSSNPLT
SEQ ID NO: 499	VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSATSSVSYMH

		WYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGS GTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGA GTKLELK
SEQ ID NO: 500 (комбинация)	HCDR1	GYKFTSYVMH
SEQ ID NO: 501 (комбинация)	HCDR2	YINPYNDVTKYNEKFKG
SEQ ID NO: 502 (комбинация)	HCDR3	GSYYDYDGFVY
SEQ ID NO: 503 (Kabat)	HCDR1	SYVMH
SEQ ID NO: 501 (Kabat)	HCDR2	YINPYNDVTKYNEKFKG
SEQ ID NO: 502 (Kabat)	HCDR3	GSYYDYDGFVY
SEQ ID NO: 504 (Chothia)	HCDR1	GYKFTSY
SEQ ID NO: 505 (Chothia)	HCDR2	NPYNDV
SEQ ID NO: 502 (Chothia)	HCDR3	GSYYDYDGFVY
SEQ ID NO: 506 (IMGT)	HCDR1	GYKFTSYV
SEQ ID NO: 507 (IMGT)	HCDR2	INPYNDVT
SEQ ID NO: 508 (IMGT)	HCDR3	ARGSYYDYDGFVY
SEQ ID NO: 509	VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSY VMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKF KGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVHYCA RGSYYDYDGFVYWGQGTLVTVSA
Антитело к CD28 (1)		
SEQ ID NO: 510	LCDR1	HASQNIYVWLN

(комбинация)		
SEQ ID NO: 511 (комбинация)	LCDR2	KASNLHT
SEQ ID NO: 512 (комбинация)	LCDR3	QQGQTYPYT
SEQ ID NO: 510 (Kabat)	LCDR1	HASQNIYVWLN
SEQ ID NO: 511 (Kabat)	LCDR2	KASNLHT
SEQ ID NO: 512 (Kabat)	LCDR3	QQGQTYPYT
SEQ ID NO: 513 (Chothia)	LCDR1	SQNIYVW
SEQ ID NO: 514 (Chothia)	LCDR2	KAS
SEQ ID NO: 515 (Chothia)	LCDR3	GQTYPY
SEQ ID NO: 516 (IMGT)	LCDR1	QNIYVW
SEQ ID NO: 514 (IMGT)	LCDR2	KAS
SEQ ID NO: 512 (IMGT)	LCDR3	QQGQTYPYT
SEQ ID NO: 517	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLN WYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGG TKVEIK
SEQ ID NO: 518	LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLN WYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 519 (комбинация)	HCDR1	GYTFTSYYIH
SEQ ID NO: 520 (комбинация)	HCDR2	CIYPGNVNTNYNEKFKD
SEQ ID NO: 521 (комбинация)	HCDR3	SHYGLDWNFDV
SEQ ID NO: 522 (Kabat)	HCDR1	SYYIH
SEQ ID NO: 520 (Kabat)	HCDR2	CIYPGNVNTNYNEKFKD
SEQ ID NO: 521 (Kabat)	HCDR3	SHYGLDWNFDV
SEQ ID NO: 523 (Chothia)	HCDR1	GYTFTSY
SEQ ID NO: 524 (Chothia)	HCDR2	YPGNVN
SEQ ID NO: 521 (Chothia)	HCDR3	SHYGLDWNFDV
SEQ ID NO: 525 (IMGT)	HCDR1	GYTFTSYY
SEQ ID NO: 526 (IMGT)	HCDR2	IYPGNVNT
SEQ ID NO: 527 (IMGT)	HCDR3	TRSHYGLDWNFDV
SEQ ID NO: 528	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY YIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKF KDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCT RSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 529	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY YIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKF KDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCT RSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL

		GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
Антитело к CD28 (2)		
SEQ ID NO: 530 (комбинация)	LCDR1	SGSSSNIVSNYVN
SEQ ID NO: 531 (комбинация)	LCDR2	DNNKRPS
SEQ ID NO: 532 (комбинация)	LCDR3	QSYAIGSYSVV
SEQ ID NO: 530 (Kabat)	LCDR1	SGSSSNIVSNYVN
SEQ ID NO: 531 (Kabat)	LCDR2	DNNKRPS
SEQ ID NO: 532 (Kabat)	LCDR3	QSYAIGSYSVV
SEQ ID NO: 533 (Chothia)	LCDR1	SSSNIVSNY
SEQ ID NO: 534 (Chothia)	LCDR2	DNN
SEQ ID NO: 535 (Chothia)	LCDR3	YAIGSYSV
SEQ ID NO: 536 (IMGT)	LCDR1	SSNIVSNY
SEQ ID NO: 534 (IMGT)	LCDR2	DNN
SEQ ID NO: 532 (IMGT)	LCDR3	QSYAIGSYSVV
SEQ ID NO: 537	VL	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIVSNYVN WYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYAIGSYSVVFG GGTKLTVL
SEQ ID NO: 538 (комбинация)	HCDR1	GFTFSTYGMS
SEQ ID NO: 539	HCDR2	SIFYTGSSTYYADSVKG

(комбинация)		
SEQ ID NO: 540 (комбинация)	HCDR3	IGYAGDSKYAI
SEQ ID NO: 541 (Kabat)	HCDR1	TYGMS
SEQ ID NO: 539 (Kabat)	HCDR2	SIFYTGSSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 540 (Kabat)	HCDR3	IGYAGDSKYAI
SEQ ID NO: 542 (Chothia)	HCDR1	GFTFSTY
SEQ ID NO: 543 (Chothia)	HCDR2	FYTGSS
SEQ ID NO: 540 (Chothia)	HCDR3	IGYAGDSKYAI
SEQ ID NO: 544 (IMGT)	HCDR1	GFTFSTYG
SEQ ID NO: 545 (IMGT)	HCDR2	IFYTGSST
SEQ ID NO: 546 (IMGT)	HCDR3	ARIGYAGDSKYAI
SEQ ID NO: 547	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYG MSWVRQAPGKGLEWVSSIFYTGSSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR IGYAGDSKYAIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 548	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYG MSWVRQAPGKGLEWVSSIFYTGSSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR IGYAGDSKYAIWGQGTLVTVSS
Антитело к ICOS		
SEQ ID NO: 549 (комбинация)	LCDR1	KSSQSLLSGSFNYLT
SEQ ID NO: 550 (комбинация)	LCDR2	YASTRHT

SEQ ID NO: 551 (комбинация)	LCDR3	HHHYNAPPT
SEQ ID NO: 549 (Kabat)	LCDR1	KSSQSLLSGSFNYLT
SEQ ID NO: 550 (Kabat)	LCDR2	YASTRHT
SEQ ID NO: 551 (Kabat)	LCDR3	HHHYNAPPT
SEQ ID NO: 552 (Chothia)	LCDR1	SQSLLSGSFNY
SEQ ID NO: 553 (Chothia)	LCDR2	YAS
SEQ ID NO: 554 (Chothia)	LCDR3	HYNAPP
SEQ ID NO: 555 (IMGT)	LCDR1	QSLLSGSFNY
SEQ ID NO: 553 (IMGT)	LCDR2	YAS
SEQ ID NO: 551 (IMGT)	LCDR3	HHHYNAPPT
SEQ ID NO: 556	VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSGSF NYLTWYQQKPGQPPKLLIFYASTRHTGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHHHYNAPP TFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 557	LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSGSF NYLTWYQQKPGQPPKLLIFYASTRHTGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHHHYNAPP TFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 558 (комбинация)	HCDR1	GFTFSDYWMD
SEQ ID NO: 559	HCDR2	NIDEDGSITEYSPFVKG

(комбинация)		
SEQ ID NO: 560 (комбинация)	HCDR3	WGRFGFDS
SEQ ID NO: 561 (Kabat)	HCDR1	DYWMD
SEQ ID NO: 559 (Kabat)	HCDR2	NIDEDGSITEYSPFVKG
SEQ ID NO: 560 (Kabat)	HCDR3	WGRFGFDS
SEQ ID NO: 562 (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO: 563 (Chothia)	HCDR2	DEDGSI
SEQ ID NO: 560 (Chothia)	HCDR3	WGRFGFDS
SEQ ID NO: 564 (IMGT)	HCDR1	GFTFSDYW
SEQ ID NO: 565 (IMGT)	HCDR2	IDEDGSIT
SEQ ID NO: 566 (IMGT)	HCDR3	TRWGRFGFDS
SEQ ID NO: 567	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYW MDWVRQAPGKGLVWVSNIDEDGSITEYSPFVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR WGRFGFDSWGQGTLVTVSS
Антитело к CD27		
SEQ ID NO: 568 (комбинация)	LCDR1	RASQGISRWLA
SEQ ID NO: 55 (комбинация)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 569 (комбинация)	LCDR3	QQYNTYPRT
SEQ ID NO: 568 (Kabat)	LCDR1	RASQGISRWLA

SEQ ID NO: 55 (Kabat)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 569 (Kabat)	LCDR3	QQYNTYPRT
SEQ ID NO: 570 (Chothia)	LCDR1	SQGISRW
SEQ ID NO: 58 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 571 (Chothia)	LCDR3	YNTYPR
SEQ ID NO: 572 (IMGT)	LCDR1	QGISRW
SEQ ID NO: 58 (IMGT)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 569 (IMGT)	LCDR3	QQYNTYPRT
SEQ ID NO: 573	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 574 (комбинация)	HCDR1	GFTFSSYDMH
SEQ ID NO: 575 (комбинация)	HCDR2	VIWYDGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 576 (комбинация)	HCDR3	GSGNWGFFDY
SEQ ID NO: 577 (Kabat)	HCDR1	SYDMH
SEQ ID NO: 575 (Kabat)	HCDR2	VIWYDGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 576 (Kabat)	HCDR3	GSGNWGFFDY
SEQ ID NO: 47 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY

SEQ ID NO: 578 (Chothia)	HCDR2	WYDGSN
SEQ ID NO: 576 (Chothia)	HCDR3	GSGNWGFFDY
SEQ ID NO: 579 (IMGT)	HCDR1	GFTFSSYD
SEQ ID NO: 580 (IMGT)	HCDR2	IWYDGSNK
SEQ ID NO: 581 (IMGT)	HCDR3	ARGSGNWGFFDY
SEQ ID NO: 582	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYD MHWVRQAPGGLEWVAVIWYDGSNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGSGNWGFFDYWGQGTLVTVSS
Антитело к CD25 (1)		
SEQ ID NO: 583 (комбинация)	LCDR1	SASSSRSYMQ
SEQ ID NO: 421 (комбинация)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 584 (комбинация)	LCDR3	HQRSSYT
SEQ ID NO: 583 (Kabat)	LCDR1	SASSSRSYMQ
SEQ ID NO: 421 (Kabat)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 584 (Kabat)	LCDR3	HQRSSYT
SEQ ID NO: 585 (Chothia)	LCDR1	SSSRSY
SEQ ID NO: 424 (Chothia)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 586 (Chothia)	LCDR3	RSSY

SEQ ID NO: 587 (IMGT)	LCDR1	SSRSY
SEQ ID NO: 424 (IMGT)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 584 (IMGT)	LCDR3	HQRSSYT
SEQ ID NO: 588	VL	QIVSTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSRSYMQ WYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGS GTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYTFGGGT KLEIK
SEQ ID NO: 589 (комбинация)	HCDR1	GYSFTRYWMH
SEQ ID NO: 590 (комбинация)	HCDR2	AIYPGNSDTSYNQKFEG
SEQ ID NO: 591 (комбинация)	HCDR3	DYGYYFDF
SEQ ID NO: 592 (Kabat)	HCDR1	RYWMH
SEQ ID NO: 590 (Kabat)	HCDR2	AIYPGNSDTSYNQKFEG
SEQ ID NO: 591 (Kabat)	HCDR3	DYGYYFDF
SEQ ID NO: 593 (Chothia)	HCDR1	GYSFTRY
SEQ ID NO: 594 (Chothia)	HCDR2	YPGNSD
SEQ ID NO: 591 (Chothia)	HCDR3	DYGYYFDF
SEQ ID NO: 595 (IMGT)	HCDR1	GYSFTRYW
SEQ ID NO: 596 (IMGT)	HCDR2	IYPGNSDT
SEQ ID NO: 597 (IMGT)	HCDR3	SRDYGYYFDF

SEQ ID NO: 598	VH	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTRY WMHWIKQRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQKF EGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHEDSAVYYCS RDYGYYFDFWGQGTTLTVSS
Антитело к CD25 (2)		
SEQ ID NO: 599 (комбинация)	LCDR1	KASQSVDYDGDSYMN
SEQ ID NO: 600 (комбинация)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 601 (комбинация)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 599 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDYDGDSYMN
SEQ ID NO: 600 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 601 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 602 (Chothia)	LCDR1	SQSVDYDGDSY
SEQ ID NO: 58 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 603 (Chothia)	LCDR3	SNEDPY
SEQ ID NO: 604 (IMGT)	LCDR1	QSVDYDGDSY
SEQ ID NO: 58 (IMGT)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 601 (IMGT)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 605	VL	DIVLTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSVDYDGD SYMNWYQQRPGQSPRLLIYAASNLESGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQSNEDPY TFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 606	LC	DIVLTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQSVDYDGD SYMNWYQQRPGQSPRLLIYAASNLESGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQSNEDPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 607 (комбинация)	HCDR1	GYAFTNYLIE
SEQ ID NO: 608 (комбинация)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 609 (комбинация)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 610 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 608 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 609 (Kabat)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 611 (Chothia)	HCDR1	GYAFTNY
SEQ ID NO: 612 (Chothia)	HCDR2	NPGSGG
SEQ ID NO: 609 (Chothia)	HCDR3	WRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 613 (IMGT)	HCDR1	GYAFTNYL
SEQ ID NO: 614 (IMGT)	HCDR2	INPGSGGT
SEQ ID NO: 615 (IMGT)	HCDR3	ARWRGDGYYAYFDV
SEQ ID NO: 616	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFTNYLI EWVRQMPGKGLEWMGVINPGSGGTNYNEKFK GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR

		WRGDGYYAYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 617	HC	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYAFTNYLI EWVRQMPGKGLEWMGVINPGSGGTNYNEKFK GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR WRGDGYYAYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
Антитело к 4-1BB		
SEQ ID NO: 618 (комбинация)	LCDR1	RASQSVSSYLA
SEQ ID NO: 619 (комбинация)	LCDR2	DASNRAT
SEQ ID NO: 620 (комбинация)	LCDR3	QQRSNWPPALT
SEQ ID NO: 618 (Kabat)	LCDR1	RASQSVSSYLA
SEQ ID NO: 619 (Kabat)	LCDR2	DASNRAT
SEQ ID NO: 620 (Kabat)	LCDR3	QQRSNWPPALT
SEQ ID NO: 621 (Chothia)	LCDR1	SQSVSSY
SEQ ID NO: 622 (Chothia)	LCDR2	DAS
SEQ ID NO: 623 (Chothia)	LCDR3	RSNWPPAL
SEQ ID NO: 624 (IMGT)	LCDR1	QSVSSY
SEQ ID NO: 622 (IMGT)	LCDR2	DAS
SEQ ID NO: 620 (IMGT)	LCDR3	QQRSNWPPALT
SEQ ID NO: 625	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA

		WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFC GGTKVEIK
SEQ ID NO: 626 (комбинация)	HCDR1	GGSFSGYYWS
SEQ ID NO: 627 (комбинация)	HCDR2	EINHGGYVTYNPSLES
SEQ ID NO: 628 (комбинация)	HCDR3	DYGPGNYDWYFDL
SEQ ID NO: 629 (Kabat)	HCDR1	GYYWS
SEQ ID NO: 627 (Kabat)	HCDR2	EINHGGYVTYNPSLES
SEQ ID NO: 628 (Kabat)	HCDR3	DYGPGNYDWYFDL
SEQ ID NO: 630 (Chothia)	HCDR1	GGSFSGY
SEQ ID NO: 631 (Chothia)	HCDR2	NHGGY
SEQ ID NO: 628 (Chothia)	HCDR3	DYGPGNYDWYFDL
SEQ ID NO: 632 (IMGT)	HCDR1	GGSFSGYY
SEQ ID NO: 633 (IMGT)	HCDR2	INHGGYV
SEQ ID NO: 634 (IMGT)	HCDR3	ARDYGPGNYDWYFDL
SEQ ID NO: 635	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGY YWSWIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPSLES RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD YGPGNYDWYFDLWGRGTLVTVSS
Антитело к IL6RA		
SEQ ID NO: 636 (комбинация)	LCDR1	RASQDISSYLN

SEQ ID NO: 637 (комбинация)	LCDR2	YTSRLHS
SEQ ID NO: 300 (комбинация)	LCDR3	QQGNTLPYT
SEQ ID NO: 636 (Kabat)	LCDR1	RASQDISSYLN
SEQ ID NO: 637 (Kabat)	LCDR2	YTSRLHS
SEQ ID NO: 300 (Kabat)	LCDR3	QQGNTLPYT
SEQ ID NO: 638 (Chothia)	LCDR1	SQDISSY
SEQ ID NO: 639 (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO: 640 (Chothia)	LCDR3	GNTLPY
SEQ ID NO: 641 (IMGT)	LCDR1	QDISSY
SEQ ID NO: 639 (IMGT)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO: 300 (IMGT)	LCDR3	QQGNTLPYT
SEQ ID NO: 642	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPYTFGQG TKVEIK
SEQ ID NO: 643 (комбинация)	HCDR1	GYSITSDHAWS
SEQ ID NO: 644 (комбинация)	HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS
SEQ ID NO: 645 (комбинация)	HCDR3	SLARTTAMDY
SEQ ID NO: 646 (Kabat)	HCDR1	SDHAWS

SEQ ID NO: 644 (Kabat)	HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS
SEQ ID NO: 645 (Kabat)	HCDR3	SLARTTAMDY
SEQ ID NO: 647 (Chothia)	HCDR1	GYSITSDH
SEQ ID NO: 648 (Chothia)	HCDR2	SYSGI
SEQ ID NO: 645 (Chothia)	HCDR3	SLARTTAMDY
SEQ ID NO: 649 (IMGT)	HCDR1	GYSITSDHA
SEQ ID NO: 650 (IMGT)	HCDR2	ISYSGIT
SEQ ID NO: 651 (IMGT)	HCDR3	ARSLARTTAMDY
SEQ ID NO: 652	VH	QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGYSITSDHA WSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYNPSLKSRV TMLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARSLA RTTAMDYWGQGSLVTVSS
Антитело к IL6RB		
SEQ ID NO: 54 (комбинация)	LCDR1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 55 (комбинация)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 653 (комбинация)	LCDR3	QQSYSTPPIT
SEQ ID NO: 54 (Kabat)	LCDR1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 55 (Kabat)	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 653 (Kabat)	LCDR3	QQSYSTPPIT
SEQ ID NO: 57	LCDR1	SQSISSY

(Chothia)		
SEQ ID NO: 58 (Chothia)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 654 (Chothia)	LCDR3	SYSTPPI
SEQ ID NO: 60 (IMGT)	LCDR1	QSISSY
SEQ ID NO: 58 (IMGT)	LCDR2	AAS
SEQ ID NO: 653 (IMGT)	LCDR3	QQSYSTPPIT
SEQ ID NO: 655	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQG TRLEIK
SEQ ID NO: 656 (комбинация)	HCDR1	GFTFSDYYMT
SEQ ID NO: 657 (комбинация)	HCDR2	YISSSGTNKYNADSVKG
SEQ ID NO: 658 (комбинация)	HCDR3	DPPWGMDV
SEQ ID NO: 659 (Kabat)	HCDR1	DYYMT
SEQ ID NO: 657 (Kabat)	HCDR2	YISSSGTNKYNADSVKG
SEQ ID NO: 658 (Kabat)	HCDR3	DPPWGMDV
SEQ ID NO: 562 (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO: 660 (Chothia)	HCDR2	SSSGTN
SEQ ID NO: 658 (Chothia)	HCDR3	DPPWGMDV
SEQ ID NO: 661	HCDR1	GFTFSDYY

(IMGT)		
SEQ ID NO: 662 (IMGT)	HCDR2	ISSSGTNK
SEQ ID NO: 663 (IMGT)	HCDR3	VRDPPWGMDV
SEQ ID NO: 664	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYY MTWIRQTPGKGLDWVSYISSSGTNKYNADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR DPPWGMDVWGQGTTVTVSS
Антитело к CD2 (1)		
SEQ ID NO: 665 (комбинация)	LCDR1	RSSQSLLHSSGNTYLN
SEQ ID NO: 666 (комбинация)	LCDR2	LVSKLES
SEQ ID NO: 667 (комбинация)	LCDR3	MQFTHYPYT
SEQ ID NO: 665 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLLHSSGNTYLN
SEQ ID NO: 666 (Kabat)	LCDR2	LVSKLES
SEQ ID NO: 667 (Kabat)	LCDR3	MQFTHYPYT
SEQ ID NO: 668 (Chothia)	LCDR1	SQSLLHSSGNTY
SEQ ID NO: 669 (Chothia)	LCDR2	LVS
SEQ ID NO: 670 (Chothia)	LCDR3	FTHYPY
SEQ ID NO: 671 (IMGT)	LCDR1	QSLLHSSGNTY
SEQ ID NO: 669 (IMGT)	LCDR2	LVS
SEQ ID NO: 667	LCDR3	MQFTHYPYT

(IMGT)		
SEQ ID NO: 672	VL	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSG NTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFS GSGSGTDFTLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPY TFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 673	LC	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSG NTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFS GSGSGTDFTLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPY TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 674 (комбинация)	HCDR1	GYIFTEYYMY
SEQ ID NO: 675 (комбинация)	HCDR2	RIDPEDGSIDYVEKFKK
SEQ ID NO: 676 (комбинация)	HCDR3	GKFNYRFAY
SEQ ID NO: 677 (Kabat)	HCDR1	EYYMY
SEQ ID NO: 675 (Kabat)	HCDR2	RIDPEDGSIDYVEKFKK
SEQ ID NO: 676 (Kabat)	HCDR3	GKFNYRFAY
SEQ ID NO: 678 (Chothia)	HCDR1	GYIFTEY
SEQ ID NO: 679 (Chothia)	HCDR2	DPEDGS
SEQ ID NO: 676 (Chothia)	HCDR3	GKFNYRFAY
SEQ ID NO: 680 (IMGT)	HCDR1	GYIFTEYY
SEQ ID NO: 681 (IMGT)	HCDR2	IDPEDGSI

SEQ ID NO: 682 (IMGT)	HCDR3	ARGKFNYRFAY
SEQ ID NO: 683	VH	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYY MYWVRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFK KKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCAR GKFNYRFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 684	HC	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYY MYWVRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFK KKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCAR GKFNYRFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

В некоторых вариантах осуществления средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, содержатся в полиспецифической связывающей молекуле. Таким образом, в данном документе рассматриваются полиспецифические связывающие молекулы, содержащие средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, такие как, без ограничения, полиспецифическая связывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий домен для CD3 и один или несколько из антигенсвязывающих доменов для CD28, ICOS, CD27, CD25, 4-1BB, IL6RA, IL6RB и/или CD2. Неограничивающие примеры таких связывающих доменов, как указано выше, представлены выше, например, в **таблице 19** и в публикациях, включенных в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит антигенсвязывающий домен для CD3 и антигенсвязывающий домен для CD28 или CD2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD3 представляет собой антитело к CD3, необязательно антитело к CD3 (1), антитело к CD3 (2), антитело к CD3 (3) или антитело к CD3 (4), представленное в **таблице 19**, или фрагмент антитела, содержащие одну или несколько их CDR, VH и/или VL. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD28 представляет собой антитело к CD28, необязательно антитело к CD28 (1) или антитело к CD28 (2), представленное в **таблице 19**, или фрагмент антитела, содержащие одну или несколько их CDR, тяжелых цепей VH, VL и/или легких цепей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD2 представляет собой антитело к CD2, необязательно антитело к CD2 (1), представленное в **таблице 19**, или фрагмент антитела, содержащие одну или несколько их CDR, VH, тяжелых цепей, VL и/или легких цепей.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические связывающие молекулы содержат одну или несколько тяжелых и/или легких цепей. Неограничивающие иллюстративные последовательности тяжелых и легких цепей, которые могут содержаться в этих полиспецифических связывающих молекулах, представлены в **таблице 20** ниже. Неограничивающие иллюстративные их комбинации предложены в **таблице 20** на основании отнесения перечисленных тяжелых и/или легких цепей к составляющим конструкции. В данной организации в виде конструкции представлены примеры конфигураций тяжелых и/или легких цепей, но также возможны их дополнительные комбинации и перестановки. Неограничивающие примеры формата любых из данных конструкций представлены на **фигурах 37A-B, 48A-B, 49A-B и 50A-B**.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит одну или несколько последовательностей тяжелой и/или легкой цепи, раскрытых в **таблице 20**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью с ними.

Таблица 20 - Иллюстративные последовательности Fc, тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC)

SEQ ID NO:	Цепь	Аминокислотная последовательность
701	Fc дикого типа	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
702	Fc DANAPA	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
879	Вариант Fc IgG1 человека L234A/L235A/P 329A (LALAPA)	apeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhna ktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalaapiektiskakgqprep qvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffl yskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
880	Вариант Fc IgG1 человека	apeaagapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhna ktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprep

	L234A/L235A/ G237A (LALAGA)	qvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffl yskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
881	Вариант Fc IgG1 человека L234A/L235A/P 329G (LALAPG)	apeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhna ktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalgapiektiskakgqprep qvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffl yskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
882	Fc LALAPG (L234A/L235A/ P329G)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRREEMKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
883	Вариант Fc IgG1 человека D265A/P329A (DAPA)	apellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvavshedpevkfnwyvdgvevhnak tkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalaapiektiskakgqprepq vytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffly skltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
884	Fc DAPA (D265A/P329A)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
885	Вариант Fc IgG1 человека L234A/L235A/S 267K/P329A (LALASKPA)	apeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvkhedpevkfnwyvdgvevhna ktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalaapiektiskakgqprep qvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffl yskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
886	Fc LALASKPA (L234A/L235A/ S267K/P329A)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

887	Вариант Fc IgG1 человека D265A/P329A/S267K (DAPASK)	apellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvavkhedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalaapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyknttppvldsdgsffllyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
888	Вариант Fc IgG1 человека G237A/D265A/P329A (GADAPA)	apellgapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvavshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalaapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyknttppvldsdgsffllyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
889	Вариант Fc IgG1 человека G237A/D265A/P329A/S267K (GADAPASK)	apellgapsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvavkhedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalaapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyknttppvldsdgsffllyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
890	Fc GADAPASK (G237A/D265A/P329A/S267K)	DKTHTCPPCPAPELLGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
891	Вариант Fc IgG1 человека D265A/N297A/P329A (DANAPA)	apellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvavshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqyastyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalaapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyknttppvldsdgsffllyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk
673	LC NEG2042	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNWLLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
703	HC NEG2042	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYWVRQAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTV

		SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQL VQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPG KGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQ MDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSR FSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGT KLQIT
518	LC NEG2043	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQK PGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
704	HC NEG2043	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVR QAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQA

		PGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAF LQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGV PSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFG QGTKLQIT
705	LC NEG2044	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIVSNYVNWYQQLP GTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSE DEADYYCQSYAIGSYSVVFGGGTKLTVLGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
706	HC NEG2044	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQ APGKGLEWVSSIFYTGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARIGYAGDSKYAIWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQA PGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAF LQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGV PSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFG QGTKLQIT
673	LC NEG2050	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNW LLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS GVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL

		QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
707	HC NEG2050	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYWVR QAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSST AYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK CLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAY LQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGCGTKLTVL
673	LC NEG2051	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNW LLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS GVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
708	HC NEG2051	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYWVR QAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSST AYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW

		LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGK CLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRA PWTPARFSGSLLGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSN LWVFGCGTKLTVL
518	LC NEG2052	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQK PGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
709	HC NEG2052	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVR QAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLT VSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC

		VLWYSNRWVFGCGTKLTVL
518	LC NEG2053	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQK PGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
710	HC NEG2053	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVR QAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAS GKCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKST LYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPWTPARFSGSLLGDKAALTLSGAQPEDEAEYFCALWY SNLWVFGCGTKLTVL
673	Легкая цепь конструкции 1	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNW LLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS GVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
711	Тяжелая цепь конструкции 1	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT

		VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSG AEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYWVRQAPGQGLE LVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSL TSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
518	Легкая цепь конструкции 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQK PGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
712	Тяжелая цепь конструкции 2	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLE WIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL

		FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
673	Легкая цепь конструкции 3	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNW LLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS GVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
713	Тяжелая цепь конструкции 3	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYWVR QAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSST AYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQL VQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPG KGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQ MDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSR FSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGT KLQIT
518	Легкая цепь конструкции 4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQK PGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS

		QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
714	Тяжелая цепь конструкции 4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVR QAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQ LVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFL QMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQG TKLQIT
673	Легкая цепь конструкции 5	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNW LLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS GVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
715	Тяжелая цепь конструкции 5	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYWVR QAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSST AYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSQVQLV QSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQ

		MDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSR FSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGT KLQITGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
518	Легкая цепь конструкции 6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQK PGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
716	Тяжелая цепь конструкции 6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVR QAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSQVQ LVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFL QMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPS RFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQG TKLQITGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH

		EALHNHYTQKSLSLSPGK
673	Легкая цепь конструкции 7	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNW LLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS GVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
717	Тяжелая цепь конструкции 7	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVQRPGA SVKVSCKASGYIFTEYYMYWVRQAPGQGLELVGRIDPED GSIDYVEKFKKKVTLTADTSSSTAYMELSSLTSDDTAVYY CARGKFNYRFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSC
518	Легкая цепь конструкции 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQK PGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
718	Тяжелая цепь конструкции 8	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT

		VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGN VNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVY FCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSC
673	Легкая цепь конструкции 9	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNW LLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS GVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
719	Тяжелая цепь 1 конструкции 9	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYWVR QAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSST AYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNRFTQKSLSLSPGK
720	Тяжелая цепь 2	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR

	конструкции 9	QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK			
518	Легкая цепь конструкции 10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQK PGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
721	Тяжелая цепь 1 конструкции 10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVR QAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRFTQKSLSLSPGK
720	Тяжелая цепь 2 конструкции 10	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS

		GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
722	Тяжелая цепь 1 конструкции 11	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
720	Тяжелая цепь 2 конструкции 11	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
673	Легкая цепь конструкции 12	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNW LLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS GVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
719	Тяжелая цепь 1 конструкции 12	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYWVR QAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSST

		AYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNRFTQKSLSLSPGK
723	Тяжелая цепь 2 конструкции 12	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSEEDPCACESLVKFQAKVEG LLQALTRKLEAVSKRLAILENTVV
518	Легкая цепь конструкции 13	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQK PGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
721	Тяжелая цепь 1 конструкции 13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVR QAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG

		TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRFTQKSLSLSPGK
723	Тяжелая цепь 2 конструкции 13	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSEEDPCACESLVKFQAKVEG LLQALTRKLEAVSKRLAILENTVV
722	Тяжелая цепь 1 конструкции 14	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
723	Тяжелая цепь 2 конструкции 14	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

		NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSEEDPCACESLVKFQAKVEG LLQALTRKLEAVSKRLAILENTVV
673	Легкая цепь конструкции 15	DVVMTQSPPSLLVTLGQPASISCRSSQSLLHSSGNTYLNW LLQRPGQSPQPLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS GVEAEDVGVYYCMQFTHYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
719	Тяжелая цепь 1 конструкции 15	QVQLVQSGAEVQRPGASVKVSCKASGYIFTEYYMYWVR QAPGQGLELVGRIDPEDGSIDYVEKFKKKVTLTADTSSST AYMELSSLTSDDTAVYYCARGKFNYRFAYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNRFTQKSLSLSPGK
724	Тяжелая цепь 2 конструкции 15	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG

		SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSDLGPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVR EITFLKNTVMECDACGMQQ
518	Легкая цепь конструкции 16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQK PGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
721	Тяжелая цепь 1 конструкции 16	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVR QAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRFTQKSLSLSPGK
724	Тяжелая цепь 2 конструкции 16	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSDLGPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVR EITFLKNTVMECDACGMQQ

722	Тяжелая цепь 1 конструкции 17	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
724	Тяжелая цепь 2 конструкции 17	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFT FGQGTKLQITGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSDLGPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVR EITFLKNTVMECDACGMQQ
SEQ ID NO: 726	Тяжелая цепь биспецифического антитела к CD3 (4)/CD28 (2)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQ APGKGLEWVSSIFYTGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARIGYAGDSKYAIWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV KLVESGGDLVQPGDSLTLSCVASGFTFSKQGMHWIRQAP KKGLEWIAMIYYDSSKMYYADTVKGRFTISRDNSKNTLY LEMNSLRSEDTAMYYCASFWWDLDFDHWGQGVMVTVS

		SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDILVTQTPVSLPVSLGGH VSISCRSSQSLVRSEGTTYFNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCLQSSHFP WTFGGGTKLELK
SEQ ID NO: 1416	Альтернативная тяжелая цепь биспецифического антитела к CD3 (4)/CD28 (2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQ APGKGLEWVSSIFYTGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARIGYAGDSKYAIWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV KLVESGGDLVQPGDSLTLSCVASGFTFSKQGMHWIRQAP KKGLEWIAMIYYDSSKMYYADTVKGRFTISRDNSKNTLY LEMNSLRSEDTAMYYCASFWWDLDFDHWGQGVMVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDILVTQTPVSLPVSLGGH VSISCRSSQSLVRSEGTTYFNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCLQSSHFP WTFGGGTKLELK
SEQ ID NO: 728	Легкая цепь 1 биспецифического антитела к CD3 (4)/CD28 (2)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIVSNYVNWYQQLP GTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSE DEADYYCQSYAIGSYSVVFGGGTKLTVLGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 730	Легкая цепь 2 биспецифического антитела к CD3 (4)/CD28 (2)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIVSNYVNWYQQLP GTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSE DEADYYCQSYAIGSYSVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS

892	Легкая цепь антитела к CD3 (2)/CD28 (2)	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIVSNYVNWYQQLP GTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSE DEADYYCQSYAIGSYSVVFGGGTKLTVLGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
893	Тяжелая цепь антитела к CD3 (2)/CD28 (2)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQ APGKGLEWVSSIFYTGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARIGYAGDSKYAIWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQA PGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGCGTKLTVL
SEQ ID NO: 1417	Альтернативная тяжелая цепь антитела к CD3 (2)/CD28 (2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMSWVRQ APGKGLEWVSSIFYTGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARIGYAGDSKYAIWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

		YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQA PGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSL TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGCGTKLTVL
894	Легкая цепь антитела к CD3 (4)/CD28 (1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQK PGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
895	Тяжелая цепь антитела к CD3 (4)/CD28 (1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVR QAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGSEVKLVESGGDLVQPGDSLTL SCVASGFTFSKQGMHWIRQAPKKGLEWIAMIYYDSSKMY YADTVKGRFTISRDNSKNTLYLEMNSLRSEDTAMYYCAS FWWDLDFDHWGQGVMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDILVTQTPVSLPVSLGGHVSISCRSSQSLVRSEGTTYF NWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEPEDLGVYYCLQSSHFPWTFGGGTKLELK

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления

биспецифическое антитело имеет конфигурацию согласно любой из схем, представленных на **фиг. 37A-37B**, **фиг. 48A-48B**, **фиг. 49A-49C** и **фиг. 50A-50B**. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело является одновалентным или двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область биспецифического антитела подвергнута сайленсингу.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит множество биспецифических антител. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител являются одновалентными. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител содержат Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область одного или нескольких из множества биспецифических антител подвергнута сайленсингу. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из множества биспецифических антител конъюгированы друг с другом в виде мультимера. В некоторых вариантах осуществления мультимер имеет конфигурацию согласно любой из схем полиспецифических молекул, представленных на **фиг. 37B** и **фиг. 48B**.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит Fc-область, например, где Fc-область характеризуется сайленсингом Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутацию в одном или нескольких из (например, всех) положений D265, N297 и P329, пронумерованных в соответствии с системой нумерации Eu. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутации D265A, N297A и P329A (DANAPA), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит первый связывающий домен и второй связывающий домен. Например, первый связывающий домен может представлять собой домен, связывающий CD3, а второй связывающий домен может представлять собой домен, связывающий костимулирующую молекулу, или первый связывающий домен может представлять собой домен, связывающий костимулирующую молекулу, а второй связывающий домен может представлять собой домен, связывающий CD3. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, связывается с CD2, CD28, CD25, CD27, IL6Rb, ICOS или 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, активирует CD2, CD28, CD25, CD27, IL6Rb, ICOS или 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит Fc-область, подвергнутую мутации таким образом, чтобы она характеризовалась сниженным связыванием с Fc-рецептором или сниженной активностью ADCC, ADCP или CDC, например, Fc-область, содержащую мутации D265A, N297A и P329A (DANAPA), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu.

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен (например,

scFv) расположен с N-концевой стороны от VH второго связывающего домена (например, Fab-фрагмента), например, связанного посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула дополнительно содержит одну или несколько (например, все) из CH1, CH2 и CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH первого связывающего домена, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29)), VL первого связывающего домена, второй пептидный линкер (например, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29)), VH второго связывающего домена, CH1, CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VL второго связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит Fc-область, подвергнутую мутации таким образом, чтобы она характеризовалась сниженным связыванием с Fc-рецептором или сниженной активностью ADCC, ADCP или CDC, например, Fc-область, содержащую мутации D265A, N297A и P329A (DANAPA), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий фрагмент содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2, например, Fab для CD2, например, содержащий последовательность антитела к CD2, раскрытую в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD28, например, Fab для CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD28, раскрытую в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий фрагмент содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2 или CD28, например, scFv для CD2 или CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD2 или CD28, раскрытую в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, Fab для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 19. Примеры таких полиспецифических связывающих молекул изображены в виде верхней левой конструкции на **фиг. 37A**; конструкции 1 или конструкции 2 на **фиг. 48A** и конструкции 1 или конструкции 2 в таблице 20.

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен (например, Fab-фрагмент) расположен с N-концевой стороны от второго связывающего домена (например, scFv), например, где между первым и вторым связывающими доменами расположена Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область подвергнута мутации таким образом, чтобы она характеризовалась сниженным связыванием с Fc-

рецептором или сниженной активностью ADCC, ADCP или CDC, например, Fc-область содержит мутации D265A, N297A и P329A (DANAPA), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутации L234A, L235A, S267K и P329A (LALASKPA), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутации L234A, L235A и P329G (LALAPG), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутации G237A, D265A, P329A и S267K (GADAPASK), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула дополнительно содержит одну или несколько (например, все) из CH1, CH2 и CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH первого связывающего домена, CH1, CH2, CH3, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29)), VH второго связывающего домена, второй пептидный линкер (например, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29)) и VL второго связывающего домена. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VL первого связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2, например, Fab для CD2, например, содержащий последовательность антитела к CD2, раскрытую в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD28, например, Fab для CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD28, раскрытую в таблице 19, например, антитело к CD28 (1) или антитело к CD28 (2). В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 19, например, антитело к CD3 (1), антитело к CD3 (2), антитело к CD3 (3) или антитело к CD3 (4). В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, Fab для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 19, например, антитело к CD3 (1), антитело к CD3 (2), антитело к CD3 (3) или антитело к CD3 (4). В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2 или CD28, например, scFv для CD2 или CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD2 или CD28, раскрытую в таблице 19. Примеры таких полиспецифических связывающих молекул изображены в виде второй конструкции слева в верхнем ряду на **фиг. 37A**; конструкции 3 или конструкции 4 на **фиг. 48A** и конструкции 3 или конструкции 4 в таблице 20.

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен (например,

Fab-фрагмент) расположен с N-концевой стороны от второго связывающего домена (например, scFv), например, посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула дополнительно содержит одну или несколько (например, все) из CH1, CH2 и CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH первого связывающего домена, CH1, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S)2 (SEQ ID NO: 767)), VH второго связывающего домена, второй пептидный линкер (например, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29)), VL второго связывающего домена, третий пептидный линкер (например, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29)), CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VL первого связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит Fc-область, подвергнутую мутации таким образом, чтобы она характеризовалась сниженным связыванием с Fc-рецептором или сниженной активностью ADCC, ADCP или CDC, например, Fc-область, содержащую мутации D265A, N297A и P329A (DANAPA), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2, например, Fab для CD2, например, содержащий последовательность антитела к CD2, раскрытую в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD28, например, Fab для CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD28, раскрытую в таблице 19, например, антитело к CD28 (1) или антитело к CD28 (2). В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD25 (например, Fab для CD25), домен, связывающий CD27 (например, Fab для CD27), домен, связывающий IL6Rb (например, Fab для IL6Rb), домен, связывающий ICOS (например, Fab для ICOS), или домен, связывающий 4-1BB (например, Fab для 4-1BB). В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 19, например, антитело к CD3 (1), антитело к CD3 (2), антитело к CD3 (3) или антитело к CD3 (4). В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, Fab для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 19, например, антитело к CD3 (1), антитело к CD3 (2), антитело к CD3 (3) или антитело к CD3 (4). В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2 (например, scFv для CD2), домен, связывающий CD28 (например, scFv для CD28), домен, связывающий CD25 (например, scFv для CD25), домен, связывающий CD27 (например,

scFv для CD27), домен, связывающий IL6Rb (например, scFv для IL6Rb), домен, связывающий ICOS (например, scFv для ICOS), или домен, связывающий 4-1BB (например, scFv для 4-1BB). Примеры таких полиспецифических связывающих молекул изображены в виде третьей конструкции слева в верхнем ряду на **фиг. 37A**; конструкции 5 или конструкции 6 на **фиг. 48A** и конструкции 5 или конструкции 6 в таблице 20.

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен (например, scFv) расположен с N-концевой стороны от второго связывающего домена (например, Fab-фрагмента), например, где между первым и вторым связывающими доменами расположена Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область подвергнута мутации таким образом, чтобы она характеризовалась сниженным связыванием с Fc-рецептором или сниженной активностью ADCC, ADCP или CDC, например, Fc-область содержит мутации D265A, N297A и P329A (DANAPA), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула дополнительно содержит одну или несколько (например, все) из CH2, CH3 и CH1, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH первого связывающего домена, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S)4) (SEQ ID NO: 29), VL первого связывающего домена, второй пептидный линкер (например, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768)), CH2, CH3, третий пептидный линкер (например, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29)), VH второго связывающего домена и CH1. В некоторых вариантах осуществления полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VL второго связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2, например, Fab для CD2, например, содержащий последовательность антитела к CD2, раскрытую в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD28, например, Fab для CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD28, раскрытую в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2 или CD28, например, scFv для CD2 или CD28, например, содержащий последовательность антитела к CD2 или CD28, раскрытую в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, Fab для CD3, например, содержащий последовательность антитела к CD3, раскрытую в таблице 19. Примеры таких полиспецифических связывающих молекул изображены в виде крайней справа конструкции в верхнем ряду на **фиг. 37A**; конструкции

7 или конструкции 8 на **фиг. 48A** и конструкции 7 или конструкции 8 в таблице 20.

В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен (например, Fab-фрагмент) расположен с N-концевой стороны от первой Fc-области. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит одну или несколько (например, все) из первой CH1, первой CH2 и первой CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен (например, scFv) расположен с N-концевой стороны от второй Fc-области, например, во второй полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит, например, во второй полипептидной цепи, одну или несколько (например, обе) из второй CH2 и второй CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит гетеродимерную молекулу антитела, как, например, где первая и вторая Fc-области содержат мутации типа "выступ во впадину". В некоторых вариантах осуществления первая Fc-область связана со второй Fc-областью сильнее, чем первая Fc-область связана с другой копией первой Fc-области. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH первого связывающего домена, первую CH1, первую CH2 и первую CH3. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH второго связывающего домена, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768)), VL второго связывающего домена, вторую CH2 и вторую CH3. В некоторых вариантах осуществления третий полипептид полиспецифической связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VL первого связывающего домена и CL. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид полиспецифической связывающей молекулы дополнительно содержит гомомультимеризационный домен, например, белок матрилин 1 или суперспиральный домен олигомерного матриксного белка хряща (COMPcc), расположенный с C-концевой стороны от второй CH3, например, посредством пептидного линкера (например, линкера (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), линкера (G4S) (SEQ ID NO: 768) или линкера (G4S)3 (SEQ ID NO: 30)). В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит две, три, четыре или пять копий первого связывающего домена и такое же количество копий второго связывающего домена, например, как изображено на **фиг. 37B**. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD2 (например, Fab для CD2). В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит домен, связывающий костимулирующую молекулу, например, домен, связывающий CD28 (например, Fab для CD28). В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3. Примеры таких полиспецифических связывающих молекул изображены в виде крайней слева

конструкции в нижнем ряду на **фиг. 37A**; конструкций на **фиг. 37B**, конструкции 9, конструкции 10, конструкции 12, конструкции 13, конструкции 15 и конструкции 16 на **фиг. 48B** и конструкции 9, конструкции 10, конструкции 12, конструкции 13, конструкции 15 и конструкции 16 в таблице 20.

В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен (например, scFv) расположен с N-концевой стороны от Fc-области. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит гетеродимерную молекулу антитела, как, например, где первая и вторая Fc-области содержат мутации типа "выступ во впадину". В некоторых вариантах осуществления первая Fc-область связана со второй Fc-областью сильнее, чем первая Fc-область связана с другой копией первой Fc-области. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит одну или несколько (например, все) из CH2 и CH3, например, в порядке от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид связывающей молекулы содержит следующие последовательности от N-конца к C-концу: VH связывающего домена, первый пептидный линкер (например, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29)), VL связывающего домена, второй пептидный линкер (например, линкер (G4S)4 (SEQ ID NO: 29) или линкер (G4S) (SEQ ID NO: 768)), CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид связывающей молекулы дополнительно содержит гомомультимеризационный домен, например, белок матрилин 1 или суперспиральный домен олигомерного матриксного белка хряща (COMPcc), расположенный с C-концевой стороны от второй CH3, например, посредством пептидного линкера (например, линкера (G4S)4 (SEQ ID NO: 29), линкера (GS4)3 (SEQ ID NO: 878) или линкера (G4S) (SEQ ID NO: 768)). В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула содержит две, три, четыре или пять копий связывающего домена, например, как изображено на **фиг. 37B**. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен содержит домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, отсутствует. Примеры таких связывающих молекул изображены в виде крайней справа конструкции в нижнем ряду на **фиг. 37A**; конструкции 11, конструкции 14 и конструкции 17 на **фиг. 48B** и конструкции 11, конструкции 14 и конструкции 17 в таблице 20.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит связывающий домен для CD28, например, Fab для CD28, например, содержащий последовательность, связывающую CD28 (2), из таблицы 19 (или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней), и scFv для CD3, например, содержащий последовательность, связывающую CD3 (4), из таблицы 19 (или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней). В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит Fc-область,

где Fab для CD28 слит с Fc-областью, которая дополнительно слита с scFv для CD3. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутации L234A, L235A, S267K и P329A (LALASKPA), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 726 или 1416 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 726 или 1416. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 728 или 730 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 728 или 730. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 726 или 1416 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 726 или 1416, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 728 или 730 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 728 или 730. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 726 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 728 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 726 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 730 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1416 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 728 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1416 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,

95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 730 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит связывающий домен для CD28, например, Fab для CD28, например, содержащий последовательность, связывающую CD28 (2), из таблицы 19 (или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней), и scFv для CD3, например, содержащий последовательность, связывающую CD3 (2), из таблицы 19 (или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней). В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит Fc-область, где Fab для CD28 слит с Fc-областью, которая дополнительно слита с scFv для CD3. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутации L234A, L235A, S267K и P329A (LALASKPA), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 893 или 1417 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO: 893 или 1417. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 892 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 893 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 892 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1417 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 892 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит связывающий домен для CD28, например, Fab для CD28, например, содержащий последовательность, связывающую CD28 (1), из таблицы 19 (или последовательность,

характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней), и scFv для CD3, например, содержащий последовательность, связывающую CD3 (4), из таблицы 19 (или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней). В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит Fc-область, где Fab для CD28 слит с Fc-областью, которая дополнительно слита с scFv для CD3. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит мутации L234A, L235A, S267K и P329A (LALASKPA), пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 895 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 894 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический связывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 895 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 894 или аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

Понятно, что во многих вариантах осуществления в данном документе полиспецифическая связывающая молекула содержит две или более полипептидные цепи, которые ковалентно связаны друг с другом, например, посредством дисульфидного мостика. Однако в некоторых вариантах осуществления две или более полипептидные цепи полиспецифической связывающей молекулы могут быть нековалентно связаны друг с другом.

Также понятно, что Fab-фрагмент может присутствовать в качестве части более крупного белка, например, Fab-фрагмент может быть слит с CH2 и CH3 и, таким образом, являться частью полноразмерного антитела.

Полиспецифическая связывающая молекула, содержащая средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, раскрытые в данном документе, предусмотрена для применения в качестве средства для активации клеток, раскрытого в данном документе.

Варианты Fc

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит Fc-область, например, описанную в

данном документе. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область дикого типа, например, Fc-область человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает в себя вариант, например, Fc-область, содержащую добавление, замену или делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в Fc-области, которые приводят к, например, снижению или устранению аффинности к по меньшей мере одному Fc-рецептору. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит аминокислотную последовательность Fc-области, представленную в **таблице 20**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела взаимодействует с рядом рецепторов или лигандов, в том числе Fc-рецепторами (например, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA), белком CIq системы комплемента и другими молекулами, такими как белки A и G. Эти взаимодействия стимулируют различные эффекторные функции и события нисходящей передачи сигнала, в том числе антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Неограничивающие иллюстративные Fc-области, содержащие эти и другие модификации, обеспечивающие сайленсинг, раскрытые в данном документе, представлены в **таблице 20** выше.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержащая вариант Fc-области, характеризуется сниженной, например, устраненной, аффинностью к Fc-рецептору, например, Fc-рецептору, описанному в данном документе. В некоторых вариантах осуществления аффинность снижена по сравнению с в остальном сходным антителом с Fc-областью дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержащая вариант Fc-области, обладает одним или несколькими из следующих свойств: (1) сниженной эффекторной функцией (например, сниженными ADCC, ADCP и/или CDC); (2) сниженным связыванием с одним или несколькими Fc-рецепторами и/или (3) сниженным связыванием с компонентом C1q системы комплемента. В некоторых вариантах осуществления снижение любого или всех из свойств (1)-(3) имеет место по сравнению с в остальном сходным антителом с Fc-областью дикого типа.

Иллюстративные варианты Fc-области представлены в **таблице 34** и также раскрыты в Saunders O, (2019) Frontiers in Immunology; том 10, статья 1296, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит любые или все из вариантов Fc-области, например, мутаций, раскрытых в **таблице 34**, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления Fc-область полиспецифической связывающей

молекулы, описанной в данном документе, подвергнута сайленсингу. В некоторых вариантах осуществления Fc-область полиспецифического связывающего белка, описанного в данном документе, подвергнута сайленсингу с помощью комбинации аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из LALA, DAPA, DANAPA, LALADANAPS, LALAGA, LALASKPA, DAPASK, GADAPA, GADAPASK, LALAPG и LALAPA (пронумерованных в соответствии с системой нумерации Eu).

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит любые или все из мутантного варианта, содержащего L234, например, L234A, и/или L235, например, мутацию L234A (LALA), в аминокислотной последовательности Fc IgG1, пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; D265, например, D265A и/или P329, например, P329A (DAPA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; N297, например, N297A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; DANAPA (D265A, N297A и P329A), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; и/или L234, например L234A, L235, например, L235A, D265, например, D265A, N297, например, N297A, и P331, например, P331S (LALADANAPS), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, содержит вариант Fc IgG1 человека Fc-области IgG1 человека дикого типа, где вариант Fc содержит любые или все из мутации L234 (например, L234A), L235 (например, L235A) и/или G237 (например, G237A) (LALAGA), пронумерованной в соответствии с системой нумерации Eu; мутации L234 (например, L234A), L235 (например, L235A), S267 (например, S267K) и/или P329 (например, P329A) (LALASKPA), пронумерованной в соответствии с системой нумерации Eu; мутации D265 (например, D265A), P329 (например, P329A) и/или S267 (например, S267K) (DAPASK), пронумерованной в соответствии с системой нумерации Eu; мутации G237 (например, G237A), D265 (например, D265A) и/или P329 (например, P329A) (GADAPA), пронумерованной в соответствии с системой нумерации Eu; мутации G237 (например, G237A), D265 (например, D265A), P329 (например, P329A) и/или S267 (например, S267K) (GADAPASK), пронумерованной в соответствии с системой нумерации Eu; мутации L234 (например, L234A), L235 (например, L235A) и/или P329 (например, P329G) (LALAPG), пронумерованной в соответствии с системой нумерации Eu; или мутации L234 (например, L234A), L235 (например, L235A) и/или P329 (например, P329A) (LALAPA), где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с системой нумерации Eu.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область полиспецифического связывающего белка, описанного в данном документе, содержит мутацию, которая приводит к сниженному связыванию с Fc-рецептором или сниженной активности ADCC, ADCP или CDC, например, Fc-область содержит мутацию D265 (например, D265A), N297 (например, N297A) и P329 (например, P329A) (DANAPA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; мутацию L234 (например, L234A), L235

(например, L235A) и G237 (G237A) (LALAGA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; мутацию L234 (L234A), L235 (например, L235A), S267 (например, S267K) и P329 (например, P329A) (LALASKPA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; мутацию D265 (например, D265A), P329 (например, P329A) и S267 (например, S267K) (DAPASK), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; мутацию G237 (например, G237A), D265 (например, D265A) и P329 (P329A) (GADAPA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; мутацию G237 (например, G237A), D265 (например, D265A), P329 (например, P329A) и S267 (например, S267K) (GADAPASK), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; мутацию L234 (например, L234A), L235 (например, L235A) и P329 (например, P329G) (LALAPG), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; или мутацию L234 (например, L234A), L235 (например, L235A) и P329 (например, P329A) (LALAPA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu.

Понятно, что термины "LALA", "DAPA", "DANAPA", "LALADANAPS", "LALAGA", "LALASKPA", "DAPASK", "GADAPA", "GADAPASK", "LALAPG" и "LALAPA" представляют собой сокращенную терминологию для различных комбинаций замен, описанных в данном документе, а не непрерывных аминокислотных последовательностей.

Таблица 34. Иллюстративные модификации Fc

Модификация или мутация	**Измененная эффекторная функция**
Leu235Glu	ADCC
Leu234Ala/Leu235Ala (LALA)	ADCC; ADCP; CDC
Ser228Pro/Leu235Glu	
Leu234Ala/Leu235Ala/Pro329Gly	ADCP
Pro331Ser/Leu234Glu/Leu235Phe	CDC
Asp265Ala	ADCC, ADCP
Gly237Ala	ADCP
Glu318Ala	ADCP
Glu233Pro	
Gly236Arg/Leu328Arg	ADCC
His268Gln/Val309Leu/Ala330Ser/Pro331Ser	ADCC; ADCP; CDC
Val234Ala/Gly237Ala/Pro238Ser/His268Ala/Val309Leu/Ala330Ser/ Pro331Ser	ADCC; ADCP; CDC
Leu234Ala/L235Ala/Gly237Ala/P238Ser/His268Ala/Ala330Ser/Pro	ADCC; CDC

331Ser	
Ala330Leu	CDC
Asp270Ala	CDC
Lys322Ala	CDC
Pro329Ala	CDC
Pro331Ala	CDC
Val264Ala	CDC
Высокоманнозное гликозилирование	CDC
Phe241Ala	CDC
Asn297Ala, или Gly, или Gln	ADCC; ADCP; CDC
S228P/Phe234Ala/Leu235Ala	ADCC; CDC

Композиции, содержащие мезопористые частицы кремнезема, вирусные векторы и средства для активации клеток

В данном документе также описана композиция, содержащая средство, обеспечивающее длительное высвобождение, например, популяцию мезопористых частиц кремнезема, и вирусный вектор. В данном документе также описана композиция, содержащая первую популяцию мезопористых частиц кремнезема и вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления MSP (например, MSR) дополнительно содержат множество функциональных групп, адсорбированных на поверхностях, выстилающих поры и/или наноканалы, или на поверхности или ковалентно связанных с ними. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа представляет собой -OH (гидроксил), амин, карбоновую кислоту, фосфонат, галогенид, азид, алкин, эпоксид, сульфгидрил, дисульфид, полиэтиленимин, гидрофобный фрагмент или его соли. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа (т. е. -OH (гидроксил), амин, карбоновая кислота, фосфонат, галогенид, азид, алкин, эпоксид, сульфгидрил, дисульфид, полиэтиленимин, гидрофобный фрагмент или его соли) может быть непосредственно присоединена к поверхности MSP. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа ковалентно связана с поверхностью MSP (например, MSR) посредством C_1-C_{20}алкильного линкера. В других вариантах осуществления функциональная группа ковалентно связана с поверхностью MSP посредством полиэтиленгликолевого линкера. В конкретных вариантах осуществления полиэтиленгликолевый линкер имеет формулу (-O(CH2-CH_2-)$_{1-25}$. В конкретных вариантах осуществления модификация поверхности представляет собой C_1-C_{20}алкильный пергалогеналкил или C_1-C_{20}алкильный перфторалкил.

В некоторых вариантах осуществления MSP (например, MSR) подвергнуты модификации поверхности с помощью первичного, вторичного, третичного или четвертичного амина. В конкретных вариантах осуществления мезопористые частицы кремнезема модифицированы полиэтиленимином. В конкретных вариантах

осуществления полиэтиленимин является разветвленным или неразветвленным. В альтернативных вариантах осуществления полиэтилениминовая группа имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 1000 до 20 000 дальтонов (Да) согласно измерению посредством гель-проникающей хроматографии (GPC). В некоторых вариантах осуществления полиэтилениминовая группа имеет среднюю молекулярную массу, составляющую от приблизительно 1200 до 15000 Да, от приблизительно 1500 до 12000 Да, приблизительно 2000 Да, приблизительно 3000 Да, приблизительно 4000 Да, приблизительно 5000 Да, приблизительно 6000 Да, приблизительно 7000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 9000 Да или приблизительно 10000 Да согласно измерению посредством гель-проникающей хроматографии (GPC).

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор конъюгирован с мезопористыми частицами кремнезема. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор электростатически или ковалентно конъюгирован с мезопористыми частицами кремнезема. В некоторых вариантах осуществления электростатическая конъюгация между мезопористыми частицами кремнезема и вирусным вектором обусловлена противоположными зарядами поверхности вирусных векторов и мезопористых частиц кремнезема. В качестве примера и без ограничения какой-либо теорией, мезопористые частицы кремнезема, которые подвергнуты модификации поверхности с помощью групп полиэтиленимина или первичного, вторичного, третичного или четвертичного аммония, которые являются положительно заряженными, можно конъюгировать с вирусными векторами с отрицательно заряженной поверхностью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вирусный вектор является отрицательно заряженным, а мезопористые частицы кремнезема являются положительно заряженными. В некоторых вариантах осуществления ковалентная конъюгация между мезопористыми частицами кремнезема и вирусным вектором достигается посредством способов, известных специалистам в данной области, с использованием линкеров либо без использования линкеров. В качестве примера и без ограничения линкеры могут представлять собой полиэтиленгликоль, алкильные группы, полимеры, полиамидные связи и т. д.

В некоторых аспектах в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие мезопористые частицы кремнезема, описанные в данном документе, составленные для применения в изготовлении популяции иммунных эффекторных клеток, например, клеток, представляющих собой Т-лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты подвергнуты трансдукции с помощью CAR. В некоторых вариантах осуществления MSP конъюгированы с вирусным вектором, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления MSP конъюгированы со средством для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток адсорбировано на MSP. В некоторых вариантах осуществления MSP для применения в изготовлении популяции иммунных эффекторных клеток, например, клеток, представляющих собой Т-лимфоциты, могут быть подвергнуты модификации поверхности, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления композиция является подходящей для применения в качестве инъекционной композиции, содержащей мезопористые частицы кремнезема, вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток, где вирусный вектор включает в себя вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор конъюгирован с мезопористыми частицами кремнезема, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток адсорбировано на мезопористых частицах кремнезема или конъюгировано с ними, как описано в данном документе. Адсорбция на поверхности MSP (например, MSR) в ее обычном понимании представляет собой прилипание молекулы к поверхности.

Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления композиция на основе вируса на MSP, например, композиция, содержащая MSP и вирусный вектор, например, вирусный вектор, кодирующий CAR, ограничивает отток вирусного вектора в дренирующий лимфатический узел, за счет чего уменьшается потенциальная трансдукция за пределами заданного участка, по сравнению с в остальном сходной композицией, в которой отсутствует MSP.

В композициях на основе мезопористых частиц кремнезема, описанных в данном документе, MSP (например, MSR) могут присутствовать в концентрации от 0,01 до 1000 мкг/мл. В альтернативных вариантах осуществления концентрация MSP или MSR в композициях, описанных в данном документе, может составлять от 0,1 до 500 мкг/мл, от 0,5 до 100 мкг/мл, от 1 до 90 мкг/мл, от 1 до 80 мкг/мл, от 1 до 70 мкг/мл, от 1 до 60 мкг/мл, от 1 до 50 мкг/мл или от 1 до 40 мкг/мл.

В конкретных вариантах осуществления MSP (например, MSR) могут присутствовать в концентрации, составляющей приблизительно 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 30 мкг/мл, 40 мкг/мл, 50 мкг/мл, 60 мкг/мл, 70 мкг/мл, 80 мкг/мл, 90 мкг/мл, 100 мкг/мл, 110 мкг/мл, 120 мкг/мл, 130 мкг/мл, 140 мкг/мл или 150 мкг/мл.

Обычно композиции, описанные в данном документе, могут вводиться в терапевтически эффективных количествах, как описано выше, посредством любого из обычных и приемлемых способов, известных из уровня техники, по отдельности либо в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами.

Инъекционные композиции могут представлять собой водные изотонические суспензии. Композиции могут быть стерилизованы и/или могут содержать вспомогательные средства, такие как консервирующие, стабилизирующие, смачивающие или эмульгирующие средства, ускорители растворения, соли для регуляции осмотического давления и/или буферы. Кроме того, они могут также содержать другие терапевтически эффективные вещества.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить с помощью способа, соответствующего заболеванию, подлежащему лечению (или

предупреждению). Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и тяжесть заболевания пациента, хотя соответствующие дозы могут быть определены с помощью клинических испытаний.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит загрязнителя, например, выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, репликационно-компетентного лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, gag HIV, остаточных количеств микрогранул, покрытых антителами к CD3/антителами к CD28, антител мыши, смешанной человеческой сыворотки крови, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки крови, компонентов культуральных сред, клеточных или плазмидных компонентов для упаковки векторов, бактерии и гриба, например, в ней отсутствуют его поддающиеся выявлению уровни. В некоторых вариантах осуществления бактерия представляет собой по меньшей мере одну бактерию, выбранную из группы, состоящей из Alcaligenes faecalis, Candida albicans, Escherichia coli, Haemophilus influenza, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia и Streptococcus pyogenes группы A.

Фармацевтическая композиция (или состав) для применения может быть упакована различными способами в зависимости от способа, применяемого для введения композиций, описанных в данном документе. Как правило, изделие для распределения включает контейнер, в который помещен фармацевтический состав в соответствующей форме. Подходящие контейнеры хорошо известны специалистам в данной области и включают такие материалы, как бутылки (пластиковые и стеклянные), саше, ампулы, пластиковые пакеты, металлические цилиндры и т. п. Контейнер также может предусматривать сборку с индикацией вскрытия для предотвращения несанкционированного доступа к содержимому упаковки. Кроме того, на контейнер нанесена этикетка, на которой описывается содержимое контейнера. Этикетка также может содержать соответствующие предупреждения.

В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, дополнительно содержат средство для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток представляет собой соединение, стимулирующее Т-клетки, антиидиотипическое антитело к антигенсвязывающему домену CAR и/или опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток конъюгировано с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема или адсорбировано на ней. В дополнительных или альтернативных вариантах осуществления соединение, стимулирующее Т-клетки, или опухолевый антиген конъюгированы со второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или адсорбированы на ней. В дополнительных вариантах осуществления соединение, стимулирующее Т-клетки, или опухолевый антиген представляют собой IL-2, IL-15, GM-CSF, mAb к CD2, mAb к CD3, mAb к CD28, неоантигенные пептиды, пептиды из общих антигенов, таких как TRP2, gp100, лизат опухолевых клеток, CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелин, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипид F77, EGFRvIII, GD-2, TCR NY-ESO-1

и/или TCR MAGEA3. В некоторых вариантах осуществления средство для активации клеток включает в себя комплекс CD3/TCR и/или средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста, где необязательно средство для активации клеток представляет собой полиспецифическую связывающую молекулу, включающую в себя средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста.

В вариантах осуществления, где средство для активации клеток конъюгировано со второй популяцией мезопористых частиц кремнезема, соединение, стимулирующее Т-клетки, или опухолевый антиген могут быть конъюгированы с липидным бислоем на поверхности второй популяции мезопористых частиц кремнезема. Известны способы получения липидных бислоев на мезопористых частицах кремнезема. См., например, публикацию международной заявки № WO 2018/013797. Вкратце, липосомы, содержащие предварительно определенные количества метки, такой как биотин, используют для покрытия MSP. Затем метки можно использовать для прикрепления к соединению, стимулирующему Т-клетки, где используется комплементарная метка, например, стрептавидин. Липиды, применяемые для получения липосом, известны специалистам в данной области и включают без ограничения липиды, образующие везикулы, содержащие две углеводородные цепи, как правило, ацильные цепи, и группу полярной головки. В данный класс включены фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин (PC), фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидная кислота (PA), фосфатидилинозитол (PI) и сфингомиелин (SM), где две углеводородные цепи обычно имеют длину приблизительно 14-22 атома углерода и характеризуются различными степенями ненасыщенности. В некоторых вариантах осуществления липид представляет собой относительно ненасыщенный фосфолипид (имеющий одну, две или три двойные связи в углеводородной цепи). В некоторых вариантах осуществления липид представляет собой фосфатидилхолин. Фосфатидилхолин представляет собой фосфолипид, который содержит холин в качестве группы головки и комбинацию глицерофосфорной кислоты с двумя жирными кислотами. В некоторых вариантах осуществления фосфатидилхолин представляет собой пальмитоилфосфатидилхолин, или олеоилфосфатидилхолин, или 1-пальмитоил,2-олеоилфосфатидилхолин. Более чем один тип липида можно применять при получении липосомной композиции. Выбор липидов и соотношения можно варьировать для достижения требуемой степени текучести или жесткости и/или для регуляции стабильности. Если при получении липосомной композиции применяется более чем один тип липида, то для образования стабильных липосом следует применять подходящее количество относительно ненасыщенного липида (такого как PC). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 45-50 мол. % липидов, применяемых в составе, представляют собой PC. Липосомы также могут содержать липиды, дериватизированные с помощью гидрофильного полимера, такого как полиэтиленгликоль (PEG). Подходящие гидрофильные полимеры включают поливинилпирролидон, поливинилметиловый эфир, полиметилоксазолин, полиэтилоксазолин, полигидроксипропилоксазолин,

полигидроксипропилметакриламид, полиметакриламид, полидиметилакриламид, полигидроксипропилметакрилат, полигидроксиэтилакрилат, гидроксиметилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, полиэтиленгликоль, полиаспартамид и гидрофильные пептидные последовательности. Известны способы получения липидов, дериватизированных с помощью гидрофильных полимеров (см., например, патент США № 5395619, который включен в данный документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления первая популяция или вторая популяция мезопористых частиц кремнезема дополнительно содержит цитокин. Цитокин может представлять собой без ограничения IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21 или трансформирующий фактор роста бета (TGF-β) или их агонист, их миметик, их вариант, их функциональный фрагмент или их комбинацию. В конкретных вариантах осуществления цитокин конъюгирован с первой или второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или адсорбирован на ней. В вариантах осуществления, где цитокин адсорбирован на второй популяции мезопористых частиц кремнезема, вторая популяция MSP (например, MSR) может быть дополнительно покрыта липидным бислоем, как описано выше.

Способы

Аспекты, раскрытые в данном документе, относятся к способу трансдукции клеток in vivo, включающему введение субъекту биологического материала, содержащего фактор привлечения клеток; средства, обеспечивающего длительное высвобождение, например, первой популяции мезопористых частиц кремнезема; вирусного вектора и необязательно средства для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления компоненты вводят одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления биологический материал, содержащий фактор привлечения клеток, вводят в первую очередь. В некоторых вариантах осуществления первую популяцию мезопористых стержней из кремнезема, вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток вводят одновременно и необязательно после биологического материала.

Аспекты, раскрытые в данном документе, относятся к способу трансдукции клеток in vivo, включающему введение субъекту биологического материала и фактора привлечения клеток; средства, обеспечивающего длительное высвобождение, например, первой популяции мезопористых частиц кремнезема; вирусного вектора и необязательно средства для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления компоненты вводят одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления биологический материал и фактор привлечения клеток вводят в первую очередь. В некоторых вариантах осуществления первую популяцию мезопористых стержней из кремнезема, вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток вводят одновременно и необязательно после биологического материала и фактора привлечения клеток.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение Т-лимфоцитов в контакт с композицией, содержащей первую популяцию

мезопористых частиц кремнезема (например, MSR), вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток; где вирусный вектор включает в себя вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления описываемых в настоящем изобретении способов способы приводят к увеличению доли Т-лимфоцитов в популяции. В некоторых вариантах осуществления способ включает доставку вирусного вектора в требуемое место действия у субъекта.

Дополнительные аспекты относятся к способу лечения субъекта, у которого имеется заболевание, нарушение или состояние, включающему введение субъекту биологического материала, содержащего фактор привлечения клеток; средства, обеспечивающего длительное высвобождение, например, первой популяции мезопористых частиц кремнезема; вирусного вектора и необязательно средства для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления компоненты вводят одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления биологический материал, содержащий фактор привлечения клеток, вводят в первую очередь. В некоторых вариантах осуществления первую популяцию мезопористых стержней из кремнезема, вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток вводят одновременно и необязательно после биологического материала.

Дополнительные аспекты относятся к способу лечения субъекта, у которого имеется заболевание, нарушение или состояние, включающему введение субъекту биологического материала и фактора привлечения клеток; средства, обеспечивающего длительное высвобождение, например, первой популяции мезопористых частиц кремнезема; вирусного вектора и необязательно средства для активации клеток. В некоторых вариантах осуществления компоненты вводят одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления биологический материал и фактор привлечения клеток вводят в первую очередь. В некоторых вариантах осуществления первую популяцию мезопористых стержней из кремнезема, вирусный вектор и необязательно средство для активации клеток вводят одновременно и необязательно после биологического материала и фактора привлечения клеток.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак, характеризующийся экспрессией одного или нескольких опухолевых антигенов, выбранных из группы, состоящей из TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Ag Tn, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5,

HMWMAA, о-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, E6, E7 HPV, MAGE-A1, ETV6-AML, белка 17 сперматозоидов, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутантного p53, простеина, сурвивина и теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутантного Ras, hTERT, антигенов саркомы с точечными разрывами при транслокации, ML-IAP, ERG (продукта слитого гена TMPRSS2 и ETS), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1 и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту композиции, содержащей первую популяцию мезопористых частиц кремнезема и вирусный вектор; где вирусный вектор включает в себя вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген.

В некоторых вариантах осуществления способа композиция дополнительно содержит соединение, стимулирующее Т-клетки, или опухолевый антиген, конъюгированные с первой популяцией мезопористых частиц кремнезема, или второй популяцией мезопористых частиц кремнезема, или обеими популяциями MSP (например, MSR) или адсорбированные на них. В качестве альтернативы способ включает введение второго средства, обеспечивающего длительное высвобождение, например, второй популяции мезопористых частиц кремнезема, в комбинации с введением первой популяции MSP (например, MSR), например, одновременно с ним или вскоре после него. В качестве альтернативы вторую популяцию MSP (например, MSR) можно вводить по прошествии продолжительного периода времени после введения первой популяции MSP.

В некоторых вариантах осуществления средство, обеспечивающее длительное высвобождение, включает в себя первую популяцию MSP, и второе средство, обеспечивающее длительное высвобождение, включает в себя вторую популяцию MSP.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение средства для активации клеток, где средство для активации клеток конъюгировано с первой или второй популяцией мезопористых частиц кремнезема или адсорбировано на ней.

В некоторых вариантах осуществления вторую популяцию MSP (например, MSR) вводят субъекту одновременно (например, вводят в тот же день) или вскоре после введения (например, вводят через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней после введения) первой популяции MSP. В других вариантах осуществления цитокин

вводят субъекту по прошествии продолжительного периода времени (например, по меньшей мере 2 недель, 3 недель, 4 недель, 6 недель, 8 недель, 10 недель или больше) после введения первой популяции MSP.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных способов или путей применения заболевание, нарушение или состояние, ассоциированное с опухолевым антигеном, например, опухолевым антигеном, описанным в данном документе, выбрано из пролиферативного заболевания, такого как рак или злокачественное новообразование, или предракового состояния, такого как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз, или представляет собой не связанное с раком показание, ассоциированное с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак, описанный в данном документе, например, рак, описанный в данном документе как ассоциированный с мишенью, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления гематологический рак представляет собой лейкоз. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из одной или нескольких форм острого лейкоза, в том числе без ограничения В-клеточного острого лимфоидного лейкоза ("BALL"), Т-клеточного острого лимфоидного лейкоза ("TALL"), острого лимфоидного лейкоза (ALL); одной или нескольких форм хронического лейкоза, в том числе без ограничения хронического миелогенного лейкоза (CML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL); дополнительных форм гематологического рака или гематологических состояний, в том числе без ограничения В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, MALT-лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы из клеток маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии и миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, плазмобластной лимфомы, новообразования из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема и "предлейкоза", который представляет собой разнообразную группу гематологических состояний, объединенных неэффективным образованием (или дисплазией) миелоидных клеток крови, и заболевания, ассоциированного с экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе, в том числе без ограничения атипичных и/или неклассических форм рака, злокачественных новообразований, предраковых состояний или пролиферативных заболеваний, характеризующихся экспрессией опухолевого антигена, описанного в данном документе; а также любой их комбинации. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с опухолевым антигеном, описанным в данном документе, представляет собой солидную опухоль.

В вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака ободочной

кишки, рака прямой кишки, почечноклеточной карциномы, рака печени, немелкоклеточной карциномы легкого, рака тонкого кишечника, рака пищевода, меланомы, рака костей, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака матки, рака яичника, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичка, рака матки, карциномы фаллопиевых труб, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карциномы вульвы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, солидных опухолей детского возраста, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, карциномы почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, ангиогенеза опухоли, опухоли спинного мозга, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-клеточной лимфомы, форм рака, вызванных влиянием окружающей среды, комбинаций указанных форм рака и метастатических поражений при указанных формах рака.

В некоторых вариантах осуществления рак, который можно лечить с помощью клетки, экспрессирующей CAR, по настоящему изобретению, представляет собой множественную миелому. Как правило, полагают, что клетки миеломы являются отрицательными в отношении экспрессии антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе, при проточной цитометрии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления CAR для CD19, например, описанный в данном документе, можно применять для нацеливания на клетки миеломы. В некоторых вариантах осуществления терапию с помощью CAR по настоящему изобретению можно применять в комбинации с одним или несколькими дополнительными видами терапии, например, лечением с помощью леналидомида.

В различных аспектах иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки), полученные посредством способов, описанных в данном документе, и введенные пациенту, или их потомство персистируют у пациента в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения пациенту Т-клетки или NK-клетки.

Настоящее изобретение также включает тип клеточной терапии, где иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) модифицируют, например, с помощью РНК, транскрибированной in vitro или in vivo, для транзиентной экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). Полученные клетки способны уничтожать опухолевые клетки у субъекта или пациента. Таким образом, в различных аспектах

иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) присутствуют в течение менее чем одного месяца, например, в течение трех недель, двух недель, одной недели, после введения композиций, описанных в данном документе.

Без ограничения какой-либо конкретной теорией, противоопухолевый иммунный ответ, вызванный с помощью CAR-модифицированных иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или NK-клеток), может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ или в качестве альтернативы может быть обусловлен прямым или непрямым иммунным ответом. В некоторых аспектах трансдуцированные с помощью CAR иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) демонстрируют секрецию специфических провоспалительных цитокинов и сильную цитолитическую активность в ответ на раковые клетки человека, экспрессирующие антиген, ассоциированный с раком, описанный в данном документе, противодействуют ингибированию со стороны растворимого антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе, опосредуют неспецифический цитолиз и опосредуют регрессию развившейся опухоли у человека. Например, не содержащие антиген опухолевые клетки в гетерогенной среде опухоли, экспрессирующей антиген, ассоциированный с раком, описанный в данном документе, могут быть восприимчивы к непрямому разрушению иммунными эффекторными клетками (например, Т-клетками, NK-клетками), перенаправленными антигеном, ассоциированным с раком, описанным в данном документе, которые ранее вступали в реакцию против соседних антиген-положительных раковых клеток.

В некоторых аспектах иммунные эффекторные клетки, модифицированные полностью человеческим CAR (например, Т-клетки, NK-клетки), по настоящему изобретению могут представлять собой тип вакцины для иммунизации ex vivo и/или терапии in vivo у млекопитающего. В некоторых аспектах млекопитающее является человеком.

В некоторых аспектах клетки, экспрессирующие CAR, по настоящему изобретению можно применять для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак или злокачественное новообразование, или предракового состояния, такого как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз. Дополнительные заболевания, ассоциированные с экспрессией антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе, включают без ограничения, например, атипичные и/или неклассические формы рака, злокачественные новообразования, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, характеризующиеся экспрессией антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе. Не связанные с раком показания, ассоциированные с экспрессией антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе, включают без ограничения, например, аутоиммунное заболевание (например, волчанку), воспалительные нарушения (аллергию и астму) и трансплантацию.

В некоторых аспектах клетки, экспрессирующие CAR, по настоящему изобретению

можно применять для лечения аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания или состояния, обусловленного трансплантацией. Иллюстративные аутоиммунные заболевания включают без ограничения болезнь Аддисона, агаммаглобулинемию, гнездную алопецию, амилоидоз, анкилозирующий спондилит, нефрит, обусловленный антителами к GBM/антителами к TBM, антифосфолипидный синдром (APS), аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аксональную и нейрональную невропатию (AMAN), болезнь Бехчета, буллезный пемфигоид, болезнь Кастлемана (CD), целиакию, болезнь Шагаса, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIDP), хронический рецидивирующий многоочаговый остеомиелит (CRMO), болезнь Чарга-Стросс, рубцующий пемфигоид/доброкачественный пемфигоид слизистых оболочек, синдром Когана, болезнь холодовых агглютининов, врожденную блокаду сердца, миокардит Коксаки, CREST-синдром, болезнь Крона, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, болезнь Девика (нейромиелит зрительного нерва), дискоидную красную волчанку, синдром Дресслера, эндометриоз, эозинофильный эзофагит (EoE), эозинофильный фасциит, узловатую эритему, первичную криоглобулинемию смешанного типа, синдром Эванса, фибромиалгию, фиброзирующий альвеолит, гигантоклеточный артериит (височный артериит), гигантоклеточный миокардит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, гранулематоз с полиангиитом, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, гемолитическую анемию, пурпуру Шенлейна-Геноха (HSP), герпес беременных или пемфигоид беременных (PG), гипогаммаглобулинемию, IgA-нефропатию, связанное с IgG4 склерозирующее заболевание, миозит с тельцами включения (IBM), интерстициальный цистит (IC), ювенильный артрит, ювенильный сахарный диабет (сахарный диабет 1 типа), ювенильный миозит (JM), болезнь Кавасаки, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склероатрофический лишай, деревянистый конъюнктивит, IgA-зависимый линейный дерматоз (LAD), волчанку, хроническую болезнь Лайма, болезнь Меньера, микроскопический полиангиит (MPA), смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), язву Мурена, болезнь Мухи-Габерманна, рассеянный склероз (MS), тяжелую миастению, миозит, нарколепсию, нейромиелит зрительного нерва, нейтропению, глазной рубцующий пемфигоид, неврит зрительного нерва, палиндромный ревматизм (PR), PANDAS (детские аутоиммунные нервно-психические расстройства, ассоциированные со стрептококковыми инфекциями), паранеопластическую дегенерацию мозжечка (PCD), пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), синдром Парри-Ромберга, парспланит (периферический увеит), синдром Персонейджа-Тернера, пузырчатку, периферическую нейропатию, околовенозный энцефаломиелит, пернициозную анемию (PA), POEMS-синдром (полинейропатия, органомегалия, эндокринопатия, моноклональная гаммапатия, кожные изменения), узелковый полиартериит, ревматическую полимиалгию, полимиозит, постинфарктный синдром, постперикардиотомный синдром, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, псориаз,

псориатический артрит, истинную эритроцитарную аплазию (PRCA), гангренозную пиодермию, феномен Рейно, реактивный артрит, рефлекторную симпатическую дистрофию, синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног (RLS), ретроперитонеальный фиброз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит (RA), саркоидоз, синдром Шмидта, склерит, склеродермию, синдром Шегрена, спермальный и тестикулярный аутоиммунитет, синдром скованного человека (SPS), подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, симпатическую офтальмию (SO), артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбоцитопеническую пурпуру (TTP), синдром Толоса-Ханта (THS), поперечный миелит, сахарный диабет 1 типа, язвенный колит (UC), недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), увеит, васкулит, витилиго или гранулематоз Вегенера (гранулематоз с полиангиитом (GPA)). В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с B-клеточным антигеном, например, CD19, CD20, CD22, CD123, FcRn5, FcRn2, BCMA, CS-1 и CD138.

CAR-модифицированные иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) по настоящему изобретению можно вводить в отдельности либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток.

Гематологический рак

Гематологические раковые состояния представляют собой типы рака, такие как лейкоз, лимфома и злокачественные лимфопролиферативные состояния, при которых поражается кровь, костный мозг и лимфатическая система.

Лейкоз может быть классифицирован как острый лейкоз и хронический лейкоз. Острый лейкоз может быть дополнительно классифицирован как острый миелогенный лейкоз (AML) и острый лимфоидный лейкоз (ALL). Хронический лейкоз включает хронический миелогенный лейкоз (CML) и хронический лимфоидный лейкоз (CLL). Другие связанные состояния включают миелодиспластические синдромы (MDS, ранее известные как "предлейкоз"), которые представляют собой разнообразную группу гематологических состояний, объединенных неэффективным образованием (или дисплазией) миелоидных клеток крови и риском трансформации в AML.

Лимфома представляет собой группу опухолей из клеток крови, которые развиваются из лимфоцитов. Иллюстративные формы лимфомы включают неходжкинскую лимфому и лимфому Ходжкина.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы ингибирования пролиферации или снижения уровня антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе, при этом способы включают приведение популяции клеток, содержащих антиген, ассоциированный с раком, описанный в данном документе, в контакт с композицией, содержащей мезопористые частицы кремнезема и вирусный вектор. В конкретном аспекте MSP подвергнуты модификации поверхности, как описано в данном документе. В других вариантах осуществления вирусный вектор включает в себя

вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Иллюстративные нуклеотидные последовательности экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный TCR, цитокины, хемокины, shRNA для блокирования ингибирующей молекулы или мРНК для индуцирования экспрессии белка. В некоторых аспектах Т-клетка или NK-клетка, экспрессирующая CAR, по настоящему изобретению обеспечивает снижение количества, числа, численности или процентной доли клеток и/или раковых клеток на по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% у субъекта или в животной модели с миелоидным лейкозом или другим раком, ассоциированным с клетками, экспрессирующими антиген, ассоциированный с раком, описанный в данном документе, по сравнению с отрицательным контролем. В некоторых аспектах субъект является человеком.

Виды комбинированной терапии

Как используется в данном документе, "вводимый в комбинации" означает, что два (или более) различных средства для лечения доставляются субъекту во время периода, когда субъект страдает нарушением, например, два или более средства для лечения доставляются после того, как у субъекта было диагностировано нарушение, и перед тем, как нарушение будет излечено или устранено или лечение будет прекращено по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства для лечения по-прежнему происходит, когда начинается доставка второго, так что в отношении введения имеет место перекрывание. Это иногда упоминается в данном документе как "одновременная" или "параллельная" доставка. В других вариантах осуществления доставка одного средства для лечения заканчивается до начала доставки другого средства для лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом из случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство для лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второго средства для лечения, или второе средство для лечения обеспечивает снижение интенсивности симптомов в большей степени, чем наблюдалось бы при введении второго средства для лечения в отсутствие первого средства для лечения, или аналогичная ситуация наблюдается с первым средством для лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка является такой, при которой снижение интенсивности симптома или другого параметра, связанного с нарушением, является большим, чем наблюдалось бы при доставке одного средства для лечения в отсутствие другого. Эффект двух средств для лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или превышающим аддитивный. Доставка может быть такой, что эффект от первого доставленного средства для лечения все еще поддается выявлению при доставке второго.

В некоторых вариантах осуществления способы или пути применения

осуществляют в комбинации со средством, которое увеличивает эффективность иммунной эффекторной клетки, например, средством, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, композицию на основе мезопористых стержней из кремнезема вводят в комбинации со средством, которое увеличивает эффективность иммунной эффекторной клетки, например, одним или несколькими из ингибитора протеинфосфатазы, ингибитора киназы, цитокина, ингибитора иммунной ингибирующей молекулы; или средством, которое снижает уровень или активность T_{REG}-клетки.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, ингибитор протеинфосфатазы представляет собой ингибитор SHP-1 и/или ингибитор SHP-2.

В других вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, ингибитор киназы выбран из одного или нескольких из ингибитора CDK4, ингибитора CDK4/6 (например, палбоциклиба), ингибитора BTK (например, ибрутиниба или RN-486), ингибитора mTOR (например, рапамицина или эверолимуса (RAD001)), ингибитора MNK или двойного ингибитора P13K/mTOR. В некоторых вариантах осуществления ингибитор BTK не снижает или не ингибирует киназную активность интерлейкин-2-индуцируемой киназы (ITK).

В других вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, средство, которое ингибирует иммунную ингибирующую молекулу, включает в себя антитело или фрагмент антитела, ингибирующую нуклеиновую кислоту, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или эндонуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), которые ингибируют экспрессию ингибирующей молекулы.

В других вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, средство, которое снижает уровень или активность TREG-клеток, выбрано из циклофосфамида, антитела к GITR, реагента для истощения по CD25 или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, иммунная ингибирующая молекула выбрана из группы, состоящей из PD1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, TGFR-бета, CEACAM-1, CEACAM-3 и CEACAM-5.

В других вариантах осуществления средство, которое ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, содержащий ингибирующую молекулу или ее фрагмент, и второй полипептид, который передает положительный сигнал в клетку, и где первый и второй полипептиды экспрессируются на иммунных клетках, содержащих CAR, где (i) первый полипептид включает в себя PD1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, TGFR-бета, CEACAM-1, CEACAM-3 и CEACAM-5 или их фрагмент; и/или (ii) второй полипептид содержит внутриклеточный сигнальный

домен, содержащий первичный сигнальный домен и/или костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления первичный сигнальный домен содержит функциональный домен CD3-дзета, и/или костимулирующий сигнальный домен содержит функциональный домен белка, выбранного из 41BB, CD27 и CD28.

В других вариантах осуществления цитокин выбран из IL-7, IL-15 или IL-21 или их комбинаций.

В других вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, содержащая молекулу CAR, и второе средство, например, любое из средств комбинированной терапии, раскрытых в данном документе (например, средство, которое увеличивает эффективность иммунной эффекторной клетки), вводят по существу одновременно или последовательно.

В других вариантах осуществления иммунную клетку, содержащую молекулу CAR, вводят в комбинации с молекулой, которая нацеливается на GITR и/или модулирует функцию GITR. В некоторых вариантах осуществления молекулу, нацеливающуюся на GITR и/или модулирующую функцию GITR, вводят до клетки или популяции клеток, экспрессирующих CAR, или до афереза.

В некоторых вариантах осуществления инфузию лимфоцитов, например, инфузию аллогенных лимфоцитов, применяют в лечении рака, при этом инфузия лимфоцитов предусматривает по меньшей мере одну клетку, экспрессирующую CAR, по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления инфузию аутологичных лимфоцитов применяют в лечении рака, при этом инфузия аутологичных лимфоцитов предусматривает по меньшей мере одну клетку, экспрессирующую CAR, описанную в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, и Т-клетка характеризуется дефицитом диацилглицеринкиназы (DGK). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, и Т-клетка характеризуется дефицитом Ikaros. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, и Т-клетка характеризуется дефицитом как DGK, так и Ikaros.

В вариантах осуществления любого из вышеуказанных способов или путей применения может осуществляться дополнительное введение средства, которое лечит заболевание, ассоциированное с экспрессией опухолевого антигена, например, любого второго или третьего терапевтического средства, раскрытого в данном документе. Дополнительные иллюстративные комбинации включают одну или несколько из следующих.

В другом варианте осуществления может осуществляться дополнительное введение другого средства, например, ингибитора киназы и/или ингибитора контрольной точки иммунного ответа, описанного в данном документе. Например, может осуществляться дополнительное введение средства, которое усиливает активность клетки, экспрессирующей CAR.

Например, в некоторых вариантах осуществления средство, которое усиливает активность клетки, экспрессирующей CAR, может представлять собой средство, которое

ингибирует ингибирующую молекулу (например, иммунную ингибирующую молекулу). Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR-бета.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое ингибирует ингибирующую молекулу, представляет собой ингибирующую нуклеиновую кислоту dsRNA, siRNA или shRNA. В вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота связана с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент молекулы CAR. Например, ингибирующая молекула может экспрессироваться в клетке, экспрессирующей CAR.

В другом варианте осуществления средство, которое ингибирует ингибирующую молекулу, представляет собой, например, молекулу, описанную в данном документе, например, средство, которое содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, ассоциированный со вторым полипептидом, который передает положительный сигнал в клетку, например, внутриклеточным сигнальным доменом, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления средство содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, такую как PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, или TGFR-бета, или фрагмент любого из них (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любого из них), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе (например, содержащий костимулирующий домен (например, 41BB, CD27 или CD28, например, описанный в данном документе) и/или первичный сигнальный домен (например, сигнальный домен CD3-дзета, описанный в данном документе)). В некоторых вариантах осуществления средство содержит первый полипептид PD1 или его фрагмент (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена PD1) и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе (например, сигнальный домен CD28, описанный в данном документе, и/или сигнальный домен CD3-дзета, описанный в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления иммунную эффекторную клетку, экспрессирующую CAR, по настоящему изобретению, например, Т-клетку или NK-клетку, вводят субъекту, которому ранее проводили трансплантацию стволовых клеток, например, трансплантацию аутологичных стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления иммунную эффекторную клетку, экспрессирующую CAR, по настоящему изобретению, например, Т-клетку или NK-клетки, вводят субъекту, который ранее получил дозу мелфалана.

В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в данном документе, вводят в комбинации со средством, которое увеличивает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу CAR,

например, со средством, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в данном документе, вводят в комбинации со средством, которое облегчает один или несколько побочных эффектов, ассоциированных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR, например, со средством, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую молекулу CAR, например, молекулу CAR, описанную в данном документе, вводят в комбинации со средством, которое лечит заболевание, ассоциированное с антигеном, ассоциированным с раком, описанным в данном документе, например, со средством, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую две или более молекулы CAR, например, описанных в данном документе, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, содержащую клетку, экспрессирующую CAR, например, описанную в данном документе, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, молекулу CAR вводят в комбинации с другим средством. В некоторых вариантах осуществления средство может представлять собой ингибитор киназы, например, ингибитор CDK4/6, ингибитор BTK, ингибитор mTOR, ингибитор MNK или двойной ингибитор PI3K/mTOR и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, например, ингибитор CDK4, описанный в данной документе, например, ингибитор CD4/6, такой как гидрохлорид 6-ацетил-8-циклопентил-5-метил-2-(5-пиперазин-1-илпиридин-2-иламино)-8H-пиридо[2,3-d]пиримидин-7-она (также называемый палбоциклибом или PD0332991). В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор BTK, например, ингибитор BTK, описанный в данном документе, такой как, например, ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например, ингибитор mTOR, описанный в данном документе, такой как, например, рапамицин, аналог рапамицина, OSI-027. Ингибитор mTOR может представлять собой, например, ингибитор mTORC1 и/или ингибитор mTORC2, например, ингибитор mTORC1 и/или ингибитор mTORC2, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор MNK, например, ингибитор MNK, описанный в данном документе, такой как, например, 4-амино-5-(4-фторанилино)-пиразоло[3,4-d]пиримидин. Ингибитор MNK может представлять собой, например, ингибитор MNK1a, MNK1b, MNK2a и/или MNK2b. Двойной ингибитор PI3K/mTOR может представлять собой, например, PF-04695102.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, выбранный из алоизина A; флавопиридола или HMR-1275, 2-(2-хлорфенил)-5,7-

дигидрокси-8-[(3S,4R)-3-гидрокси-1-метил-4-пиперидинил]-4-хроменона; кризотиниба (PF-02341066; гидрохлорида 2-(2-хлорфенил)-5,7-дигидрокси-8-[(2R,3S)-2-(гидроксиметил)-1-метил-3-пирролидинил]-4H-1-бензопиран-4-она (P276-00); 1-метил-5-[[2-[5-(трифторметил)-1H-имидазол-2-ил]-4-пиридинил]окси]-N-[4-(трифторметил)фенил]-1H-бензимидазол-2-амина (RAF265); индисулама (E7070); росковитина (CYC202); палбоциклиба (PD0332991); динациклиба (SCH727965); N-[5-[[(5-*трет*-бутилоксазол-2-ил)метил]тио]тиазол-2-ил]пиперидин-4-карбоксамида (BMS 387032); 4-[[9-хлор-7-(2,6-дифторфенил)-5H-пиримидо[5,4-d][2]бензазепин-2-ил]амино]-бензойной кислоты (MLN8054); 5-[3-(4,6-дифтор-1H-бензимидазол-2-ил)-1H-индазол-5-ил]-N-этил-4-метил-3-пиридинметанамина (AG-024322); N-(пиперидин-4-ил)амида 4-(2,6-дихлорбензоиламино)-1H-пиразол-3-карбоновой кислоты (AT7519); 4-[2-метил-1-(1-метилэтил)-1H-имидазол-5-ил]-N-[4-(метилсульфонил)фенил]-2-пиримидинамина (AZD5438) и XL281 (BMS908662).

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, например, палбоциклиб (PD0332991), и палбоциклиб вводят в дозе, составляющей приблизительно 50 мг, 60 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 105 мг, 110 мг, 115 мг, 120 мг, 125 мг, 130 мг, 135 мг (например, 75 мг, 100 мг или 125 мг), ежедневно в течение определенного периода времени, например, ежедневно в течение 14-21 дней 28-дневного цикла или ежедневно в течение 7-12 дней 21-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше циклов палбоциклиба.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, ингибитор киназы представляет собой ингибитор BTK, выбранный из ибрутиниба (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774 и LFM-A13. В некоторых вариантах осуществления ингибитор BTK не снижает и не ингибирует киназную активность интерлейкин-2-индуцируемой киназы (ITK) и выбран из GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774 и LFM-A13.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, ингибитор киназы представляет собой ингибитор BTK, например, ибрутиниб (PCI-32765), и ибрутиниб вводят в дозе, составляющей приблизительно 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 420 мг, 440 мг, 460 мг, 480 мг, 500 мг, 520 мг, 540 мг, 560 мг, 580 мг, 600 мг (например, 250 мг, 420 мг или 560 мг), ежедневно в течение определенного периода времени, например, ежедневно в течение 21-дневного цикла или ежедневно в течение 28-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше циклов ибрутиниба.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, ингибитор киназы представляет собой ингибитор BTK, который не ингибирует киназную активность ITK, например, RN-486, и RN-486 вводят в дозе, составляющей приблизительно 100 мг, 110 мг, 120 мг, 130 мг, 140 мг, 150 мг, 160 мг,

170 мг, 180 мг, 190 мг, 200 мг, 210 мг, 220 мг, 230 мг, 240 мг, 250 мг (например, 150 мг, 200 мг или 250 мг), ежедневно в течение определенного периода времени, например, ежедневно в течение 28-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или больше циклов RN-486.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, выбранный из темсиролимуса; ридафоролимуса (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30.3.1.$0^{4,9}$]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексилдиметилфосфината, также известного как AP23573 и MK8669; эверолимуса (RAD001); рапамицина (AY22989); симапимода; (5-{2,4-бис[(3S)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил)метанола (AZD8055); 2-амино-8-[*транс*-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-она (PF04691502) и N^2-[1,4-диоксо-4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4H-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил]-L-аргинилглицил-L-α-аспартил-L-серина- (SEQ ID NO: 692) - внутренней соли (SF1126); а также XL765.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например, рапамицин, и рапамицин вводят в дозе, составляющей приблизительно 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг (например, 6 мг), ежедневно в течение определенного периода времени, например, ежедневно в течение 21-дневного цикла или ежедневно в течение 28-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше циклов рапамицина. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например, эверолимус, и эверолимус вводят в дозе, составляющей приблизительно 2 мг, 2,5 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг (например, 10 мг), ежедневно в течение определенного периода времени, например, ежедневно в течение 28-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше циклов эверолимуса.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, ингибитор киназы представляет собой ингибитор MNK, выбранный из CGP052088; 4-амино-3-(п-фторфениламино)-пиразоло[3,4-d]пиримидина (CGP57380); церкоспорамида; ETC-1780445-2 и 4-амино-5-(4-фторанилино)-пиразоло[3,4-d]пиримидина.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, ингибитор киназы представляет собой двойной ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и mTOR, выбранный из 2-амино-8-[*транс*-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метилпиридо[2,3-

d]пиримидин-7(8H)-она (PF-04691502); N-[4-[[4-(диметиламино)-1-пиперидинил]карбонил]фенил]-N'-[4-(4,6-ди-4-морфолинил-1,3,5-триазин-2-ил)фенил]мочевины (PF-05212384, PKI-587); 2-метил-2-{4-[3-метил-2-оксо-8-(хинолин-3-ил)-2,3-дигидро-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-1-ил]фенил}пропаннитрила (BEZ-235); апитолизиба (GDC-0980, RG7422); 2,4-дифтор-N-{2-(метилокси)-5-[4-(4-пиридазинил)-6-хинолинил]-3-пиридинил}бензолсульфонамида (GSK2126458); малеиновокислой соли 8-(6-метоксипиридин-3-ил)-3-метил-1-(4-(пиперазин-1-ил)-3-(трифторметил)фенил)-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-2(3H)-она (NVP-BGT226); 3-[4-(4-морфолинилпиридо[3',2':4,5]фуро[3,2-d]пиримидин-2-ил]фенола (PI-103); 5-(9-изопропил-8-метил-2-морфолино-9H-пурин-6-ил)пиримидин-2-амина (VS-5584, SB2343) и N-[2-[(3,5-диметоксифенил)амино]хиноксалин-3-ил]-4-[(4-метил-3-метоксифенил)карбонил]аминофенилсульфонамида (XL765).

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, может осуществляться дополнительное введение ингибитора протеинтирозинфосфатазы, например, ингибитора протеинтирозинфосфатазы, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ингибитор протеинтирозинфосфатазы представляет собой ингибитор SHP-1, например, ингибитор SHP-1, описанный в данном документе, такой как, например, стибоглюконат натрия. В некоторых вариантах осуществления ингибитор протеинтирозинфосфатазы представляет собой ингибитор SHP-2.

В некоторых вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, может осуществляться дополнительное введение другого средства, и средство представляет собой цитокин. Цитокин может представлять собой, например, IL-7, IL-15, IL-21 или их комбинацию. В другом варианте осуществления молекулу CAR вводят в комбинации с ингибитором контрольной точки иммунного ответа, например, ингибитором контрольной точки иммунного ответа, описанным в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольной точки иммунного ответа ингибирует ингибирующую молекулу, выбранную из PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR-бета.

В других вариантах осуществления способов или путей применения, описанных в данном документе, может осуществляться дополнительное введение средства, которое облегчает один или несколько побочных эффектов, ассоциированных с клеткой, экспрессирующей молекулу CAR. Побочные эффекты, ассоциированные с клеткой, экспрессирующей CAR, могут быть выбраны из синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH).

В настоящем изобретении также предусмотрены способы предупреждения, лечения и/или контроля заболевания, ассоциированного с клетками, экспрессирующими антиген, ассоциированный с раком, описанный в данном документе (например, гематологическим раком или атипичным раком, характеризующимся экспрессией

антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе), при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей первую популяцию мезопористых частиц кремнезема и вирусный вектор, и где вирусный вектор включает в себя вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген. В некоторых аспектах субъект является человеком. Неограничивающие примеры нарушений, ассоциированных с клетками, экспрессирующими антиген, ассоциированный с раком, описанный в данном документе, включают аутоиммунные нарушения (такие как волчанка), воспалительные нарушения (такие как формы аллергии и астма) и формы рака (такие как формы гематологического рака или атипичные формы рака, характеризующиеся экспрессией антигена, ассоциированного с раком, описанного в данном документе).

В настоящем изобретении также предусмотрены способы предупреждения, лечения и/или контроля заболевания, ассоциированного с клетками, экспрессирующими антиген, ассоциированный с раком, описанный в данном документе, при этом способы включают введение субъекту композиции, содержащей первую популяцию мезопористых частиц кремнезема и вирусный вектор, и где вирусный вектор включает в себя вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген. В некоторых аспектах субъект является человеком.

В настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения рецидива рака, ассоциированного с клетками, экспрессирующими антиген, ассоциированный с раком, описанный в данном документе, при этом способы включают введение субъекту композиции, содержащей первую популяцию мезопористых частиц кремнезема и вирусный вектор, и где вирусный вектор включает в себя вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген.

В случае, если указано "иммунологически эффективное количество", "противоопухолевое эффективное количество", "количество, эффективное для ингибирования опухоли" или "терапевтическое количество", точное количество композиций по настоящему изобретению, подлежащих введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, размере опухоли, степени инфицирования или метастазирования и состояния пациента (субъекта).

В некоторых аспектах субъекту может потребоваться введение активированных иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) и последующий

повторный сбор крови (или осуществление афереза), активация и размножение иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) в соответствии с настоящим изобретением и проведение повторной инфузии данных активированных и размножившихся иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток) пациенту. Этот процесс можно осуществлять несколько раз каждые несколько недель. В некоторых аспектах иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) можно активировать из собранных образцов крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В некоторых аспектах иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки, NK-клетки) активируют из собранных образцов 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 рассматриваемых композиций можно осуществлять с помощью любого подходящего способа, в том числе аэрозольной ингаляции, инъекции, приема внутрь, трансфузии, имплантации или трансплантации. Композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутридермально, интратуморально, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, с помощью внутривенной (i.v.) инъекции или внутрибрюшинно. В некоторых аспектах композиции на основе MSP (например, MSR) по настоящему изобретению вводят пациенту путем внутридермальной или подкожной инъекции. В некоторых аспектах композиции на основе Т-клеток по настоящему изобретению вводят парентерально. Термин "парентеральное" введение композиции на основе Т-клеток включает, например, методики интратекальной, эпидуральной, внутричерепной, подкожной (s.c.), внутривенной (i.v.), внутримышечной (i.m.) или внутригрудинной инъекции, интратуморального введения или инфузии. В конкретных вариантах осуществления композицию на основе Т-клеток вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления композиции на основе MSP (например, MSR) и вирусные векторы можно вводить путем инъекции непосредственно в опухоль, лимфатический узел или очаг инфекции.

ПРИМЕРЫ

Пример А.Синтез и постфункционализация мезопористых частиц кремнезема

Если не указано иное, все реагенты получали из коммерческих источников и использовали как есть.

1. Иллюстративный синтез мезопористых частиц кремнезема

Поверхностно-активное вещество поли(этиленгликоль)-*блок*-поли(пропиленгликоль)-*блок*-поли(этиленгликоль) со средней Mn ~ 5800 (Pluronic P-123, 80,0 г, 487 ммоль; Sigma) растворяли в 3 л 1,6 М HCl при комнатной температуре, нагревали до 40 градусов Цельсия в колбе с рубашкой объемом 5 л и механически перемешивали с помощью верхнеприводной мешалки со скоростью 0-600 об./мин (но чаще всего 300 об./мин). Тетраэтилортосиликат (TEOS, 184 мл, 826 ммоль; Sigma) добавляли в одну часть в течение < 5 мин. и нагревали при 40 градусах Цельсия, продолжая перемешивать, в течение по меньшей мере 2 часов, но чаще всего в течение 20

часов. Полученную взвесь нагревали до 80-130 градусов Цельсия (чаще всего до 100 градусов Цельсия) в течение 6-72 часов (но чаще всего в течение 24 часов) для гидротермической обработки перед охлаждением до комнатной температуры. Взвесь фильтровали через воронку Бюхнера, и промывали деионизированной водой и затем этанолом, и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Полученный кремнеземный материал обжигали в печи при медленном наращивании температуры от комнатной температуры до 550 градусов Цельсия в течение 8 часов и затем поддерживали при 550 градусах Цельсия в течение еще 8 часов перед охлаждением до комнатной температуры с получением 47 г мезопористых частиц кремнезема.

Изменения в скорости перемешивания могут обуславливать изменения в соотношении размеров микрочастицы. Варьирование условий температуры и продолжительности гидротермической обработки представляет собой часто используемый способ регулирования размера пор для мезопористых материалов. Для получения дополнительной информации см. J. Chem. Educ. **2017**, 94, 91−94 и ссылки в ней.

Характеристики конечных мезопористых материалов определяли с помощью световой микроскопии, Malvern Morphologi G3, сканирующей электронной микроскопии (SEM), термогравиметрического анализа (TGA).

2. Постмодификация микрочастиц кремнезема

Пример 2(a). Микрочастицы, функционализированные с помощью диэтилэтилфосфоната

Микрочастицы кремнезема, функционализированные с помощью диэтилэтилфосфоната, получали посредством модифицированного способа, описанного в New J. Chem., **2014**, 38, 3853, с некоторыми модификациями. Диэтилфосфатоэтилтриэтоксисилан (4,15 мл, 13,03 ммоль) добавляли к взвеси 2,0 г мезопористых микрочастиц кремнезема, суспендированных в 300 мл толуола. Взвесь перемешивали, и нагревали с обратным холодильником при 110 градусах Цельсия в течение 14 часов перед охлаждением до комнатной температуры, и фильтровали. Частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 20 часов с получением частиц, функционализированных с помощью диэтилэтилфосфоната.

Пример 2(b). Микрочастицы, функционализированные с помощью этилфосфоновой кислоты

Микрочастицы, функционализированные с помощью этилфосфоновой кислоты, получали посредством модифицированного способа осуществления процедуры, описанной в New J. Chem., **2014**, 38, 3853. Триметилсилилхлорсилан (1,388 мл, 10,86 ммоль) добавляли к взвеси 2,0 г микрочастиц, функционализированных с помощью диэтилэтилфосфоната, суспендированных в 150 мл толуола, и нагревали до 110 градусов Цельсия в течение 24 часов. Взвесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали с промыванием деионизированной водой и этанолом перед высушиванием в печи при 100 градусах Цельсия в течение 24 часов. Затем мезопористые частицы кремнезема

суспендировали в 100 мл 12 М HCl и нагревали до 100 градусов Цельсия в течение 18 часов. Взвесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали и промывали деионизированной водой и этанолом перед высушиванием в печи при 100 градусах Цельсия в течение 24 часов с получением микрочастиц, функционализированных с помощью этилфосфоновой кислоты.

Пример 2(c). Микрочастицы, функционализированные с помощью пропиламина

Микрочастицы, функционализированные с помощью пропиламина, получали посредством модифицированного способа осуществления процедуры, описанной в Langmuir **2015**, 31, 6457-6462. (3-Аминопропил)триметоксисилан (3,05 мл, 19,54 ммоль; APTMS, Sigma) добавляли к взвеси 3,0 грамма мезопористых микрочастиц кремнезема в 150 мл этанола, чистого для анализа. Взвесь нагревали с обратным холодильником при 75 градусах Цельсия в течение 7 часов. После охлаждения до комнатной температуры взвесь фильтровали, и частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 24 часов.

Пример 2(d). Микрочастицы, функционализированные с помощью биотина

N-сукцинимидиловый сложный эфир (+)-биотина (246 мг, 0,720 ммоль) добавляли к взвеси 1,0 г микрочастиц, функционализированных с помощью пропиламина, в 10,0 мл доведенного до pH 7,4 буфера PBS и перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Взвесь фильтровали и промывали деионизированной водой и этанолом перед высушиванием в печи при 100 градусах Цельсия в течение 24 часов с получением микрочастиц, функционализированных с помощью биотина.

Пример 2(e). Микрочастицы, функционализированные с помощью PEG4-биотина

PEG4-биотин-N-гидроксисукцинимид (106 мг, 0,180 ммоль; NHS-PEG4-биотин ThermoFisher EZ-Link) добавляли к взвеси 0,25 г микрочастиц, функционализированных с помощью пропиламина, в 2,5 мл доведенного до pH 7,4 буфера PBS и перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Взвесь фильтровали и промывали деионизированной водой и этанолом перед высушиванием в печи при 100 градусах Цельсия в течение 24 часов с получением микрочастиц, функционализированных с помощью PEG4-биотина.

Пример 2(f). Микрочастицы, функционализированные с помощью 3(2-пиридилдитио)пропионамидогексаноата

Сукцинимидил-6-(3(2-пиридилдитио)пропионамидо)гексаноат (112 мг, 0,360 ммоль; LC-SPDP, ThermoFisher) добавляли к взвеси 0,50 г микрочастиц, функционализированных с помощью пропиламина, в 2,5 мл доведенного до pH 7,4 буфера PBS и перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Взвесь фильтровали и промывали деионизированной водой и этанолом перед высушиванием в печи при 100 градусах Цельсия в течение 24 часов с получением микрочастиц, функционализированных с помощью 3(2-пиридилдитио)пропионамидогексаноата.

Пример 2(g). Микрочастицы, функционализированные с помощью 4-оксо-4-(пропиламино)бутановой кислоты

Ангидрид янтарной кислоты (4 г, 40,0 ммоль) добавляли к взвеси 1,0 г микрочастиц, функционализированных с помощью пропиламина, в безводном DMF и перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Взвесь фильтровали и промывали деионизированной водой и этанолом перед высушиванием в печи при 100 градусах Цельсия в течение 24 часов с получением микрочастиц, функционализированных с помощью 4-оксо-4-(пропиламино)бутановой кислоты.

Пример 2(h). Микрочастицы, функционализированные с помощью пропилдиэтилентриамина

Триметоксисилилпропилдиэтилентриамин (1,678 мл, 6,51 ммоль) добавляли к 1,0 г мезопористых микрочастиц кремнезема, суспендированных в 150 мл этанола, чистого для анализа. Взвесь перемешивали при 75 градусах Цельсия в течение 7 часов. После охлаждения до комнатной температуры взвесь фильтровали, и частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 20 часов с получением микрочастиц, функционализированных с помощью пропилдиэтилентриамина.

Пример 2(i). Микрочастицы, функционализированные с помощью 3-пропилдигидрофуран-2,5-диона (ангидрид янтарной кислоты)

3-(3-(Триэтоксисилил)пропил)дигидрофуран-2,5-дион (4,94 мл, 17,37 ммоль) добавляли к взвеси 3,0 г мезопористых микрочастиц кремнезема в 300 мл толуола. Взвесь нагревали до 110 градусов Цельсия в течение 20 часов и затем охлаждали до комнатной температуры, фильтровали и промывали деионизированной водой и этанолом. Функционализированные микрочастицы высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 24 часов.

Пример 2(j). Микрочастицы, функционализированные с помощью разветвленного полиэтиленимина

Полиэтиленимин (25,1 г, 47,0 ммоль; разветвленный, средняя Mw ~ 25000, Sigma) растворяли в 600 мл безводного DMF, и 6,0 г микрочастиц, функционализированных с помощью 3-пропилдигидрофуран-2,5-диона, добавляли и перемешивали при комнатной температуре в течение 20 часов. Взвесь фильтровали, и частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 20 часов с получением микрочастиц, функционализированных с помощью разветвленного полиэтиленимина.

Пример 2(k). Микрочастицы, функционализированные с помощью N, N,N-триметилпропан-1-аммония

Хлорид триметоксисилилпропилтриметиламмония (3,61 мл, 6,51 ммоль; 50% раствор в метаноле) добавляли к взвеси 1,0 г мезопористых микрочастиц кремнезема в 150 мл этанола, чистого для анализа, и нагревали до 75 градусов Цельсия в течение 7 часов. После охлаждения до комнатной температуры взвесь фильтровали, и частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 20 часов с получением микрочастиц, функционализированных с

помощью N, N,N-триметилпропан-1-аммония.

Процедуру, описанную выше, повторяли с использованием различных соотношений хлорида триметоксисилилпропилтриметиламмония и микрочастиц кремнезема (0,25 ммоль хлорида триметоксисилилпропилтриметиламмония на грамм микрочастиц) для достижения различных соотношений функциональной плотности.

Пример 2(l). Октил-функционализированные микрочастицы

Триэтокси(октил)силан (2,05 мл, 6,51 ммоль) добавляли к взвеси 1,0 г мезопористых микрочастиц кремнезема в 150 мл этанола, чистого для анализа, и нагревали до 75 градусов Цельсия в течение 7 часов. После охлаждения до комнатной температуры взвесь фильтровали, и частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 20 часов с получением октил-функционализированных микрочастиц.

Пример 2(m). Гексадецил-функционализированные микрочастицы

Гексадецилтриметоксисилан (2,54 мл, 6,51 ммоль) добавляли к взвеси 1,0 г мезопористых микрочастиц кремнезема в 150 мл этанола, чистого для анализа, и нагревали до 75 градусов Цельсия в течение 7 часов. После охлаждения до комнатной температуры взвесь фильтровали, и частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 20 часов с получением гексадецил-функционализированных микрочастиц.

Пример 2(n). 11-Азидоундецил-функционализированные микрочастицы

(11-Азидоундецил)триметоксисилан (1,0 г, 3,15 ммоль) добавляли к взвеси 1,0 г мезопористых микрочастиц кремнезема в 150 мл этанола, чистого для анализа, и нагревали до 75 градусов Цельсия в течение 7 часов. После охлаждения до комнатной температуры взвесь фильтровали, и частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 20 часов с получением 11-азидоундецил-функционализированных микрочастиц.

Пример 2(o). 3-Азидопропил-функционализированные микрочастицы

(3-Азидопропил)триметоксисилан (1,0 г, 4,87 ммоль) добавляли к взвеси 1,0 г мезопористых микрочастиц кремнезема в 150 мл этанола, чистого для анализа, и нагревали до 75 градусов Цельсия в течение 7 часов. После охлаждения до комнатной температуры взвесь фильтровали, и частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 20 часов с получением 3-азидопропил-функционализированных микрочастиц.

Пример 2(p). 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-тридекафтороктил-функционализированные микрочастицы

Триэтокси(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-тридекафтороктил)силан (2,499 мл, 6,51 ммоль) добавляли к взвеси 1,0 г мезопористых микрочастиц кремнезема в 150 мл этанола, чистого для анализа, и нагревали до 75 градусов Цельсия в течение 7 часов. После охлаждения до комнатной температуры взвесь фильтровали, и частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение

20 часов с получением 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-тридекафтороктил-функционализированных микрочастиц.

Пример B. Тестирование модификаций поверхности MSR в отношении связывания вируса

Для тестирования связывания лентивируса с MSP получали ряд MSP с различными химическими характеристиками поверхности **(фиг. 1)**. Партии сухих MSR ресуспендировали при 10 мг/мл в ледяном буфере Tris-NaCl-EDTA с pH 7,5 (буфере NTE). Исходный раствор лентивируса, экспрессирующего зеленый флуоресцентный белок (GFP) (FCT067, Kerafast), разбавляли в ледяном буфере NTE до получения титра 3×10^6/мл. Суспензию MSR и разбавленный вирус объединяли в соотношениях 1:1 об./об. и инкубировали на льду в течение 30 минут. Контрольные частицы инкубировали в соотношении 1:1 об./об. с буфером NTE без вируса. После инкубирования образцы промывали один раз с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) при 4°C и затем с помощью PBS при 4°C. Затем образцы фиксировали с помощью 4,2% параформальдегида в PBS. Образцы окрашивали с помощью антитела к вирусной оболочке (антитела к VSV-G от Kerafast, 8G5F11; разведение 1:50) и затем с помощью антитела к IgG мыши, меченного с помощью DyLight-488 (Invitrogen). Образцы дважды промывали с помощью PBS и визуализировали с применением флуоресцентного микроскопа Evos, оборудованного световым кубом GFP LED **(фиг. 2)**. Визуализация не продемонстрировала выявляемого связывания окрашивающих реагентов с MSR, не несущими вирус. Конъюгированные с вирусом стержни демонстрируют различные уровни количественного связывания, при этом максимальный уровень связывания демонстрируют функциональные группы триметиламмония и амина.

Пример C. Анализ трансдукции Т-клеток с помощью лентивируса GFP с использованием MSR in vitro

Схематическое изображение применения MSR для вирусной трансдукции Т-клеток показано на **фиг. 3**. Необученные Т-клетки человека стимулировали с помощью гранул Dynabead, активирующих Т-клетки, в соотношении гранулы:клетки 3:1 в течение двух дней. Гранулы удаляли с помощью магнита, и клетки переносили в свежую культуральную среду. Конъюгированные с вирусом MSR получали, как указано выше, и ресуспендировали при 80 мкг/мл в среде для культивирования клеток. Серийные разведения данного материала получали, как указано на фиг. 3. Данную суспензию объединяли в соотношении 1:1 с Т-клетками при 5×10^5/мл и инкубировали в течение четырех дней. Экспрессию GFP оценивали в живых одиночных клетках в культуре для оценки эффективности трансдукции. Результаты **(фиг. 4)** указывают на то, что трансдукция для конъюгированного с MSR вируса происходила на более высоких уровнях по сравнению с вирусом, вводимым только в культуральной среде. MSR, функционализированные с помощью триметиламмония, обеспечивали наиболее высокий уровень трансдукции.

Пример D. Взаимодействие Т-клеток с MSR, презентирующими агонистические антитела к CD3/CD28, пептиды EGFRvIII или белок BCMA

MSR с иммобилизованными на поверхности лигандами получали, как описано в Cheung, A. S., et al., Scaffolds that mimic antigen-presenting cells enable ex vivo expansion of primary T cells. Nature Biotechnology, 36(2), 160-169. Схема данного процесса показана на **фиг. 5**.

Вкратце, липосомы, состоящие главным образом из POPC с 1 мол. % PE-биотина, формировали с применением способа тонкопленочной регидратации и экструзии через поликарбонатную мембрану с размером пор 100 нм. Гидроксил-функционализированные MSR инкубировали с липосомами для обеспечения возможности образования липидного бислоя на подложке на поверхности MSR (**фиг. 6**). Для функционализации MSR с помощью агонистических антител к CD3 и CD28 MSR несколько раз промывали с помощью PBS, инкубировали со стрептавидином, а затем связывали с биотинилированными антителами к CD3 и CD28. Для иммобилизации на MSR пептидов, связывающих CAR для EGFRvIII, использовали биотинилированный пептид, связывающий CAR для EGFRvIII (**фиг. 7**). Для стимуляции клеток CART для BCMA рекомбинантный белок BCMA-Fc биотинилировали с помощью биотина-NHS и аналогичным образом подвергали сочетанию с поверхностью MSR.

После инкубирования с требуемыми лигандами MSR несколько раз промывали с помощью PBS, и ресуспендировали в культуральной среде в различных концентрациях, и инкубировали с Т-клетками. Пролиферацию Т-клеток считывали с использованием мечения Т-клеток с помощью CFSE и оценки разбавления красителя посредством проточной цитометрии. Продуцирование цитокинов оценивали с помощью мультиплексного способа анализа цитокинов (MesoScale Delivery V-Plex).

EGFRvIII-CAR-Т-клетки продуцировали интерферон-гамма и IL-2 в ответ на пептид, связывающий CAR для EGFRvIII, связанный с поверхностью MSR, тогда как пептид, связывающий CAR для EGFRvIII, в растворе, нестимулирующий пептид (OVA), презентируемый на MSR, или недекорированные MSR не вызывали ответа со стороны клеток CART (**фиг. 8**). В ходе другого эксперимента осуществляли мониторинг пролиферации EGFRvIII-CAR-Т-клеток в ответ на различные стимулы с применением подсчета клеток **(фиг. 9)**.

Для дополнительного анализа размножения фенотипа в различных субпопуляциях Т-клеток оценивали пролиферацию EGFRvIII-CAR-Т-клеток с применением проточной цитометрии. Клетки CART окрашивали с помощью CFSE, и осуществляли мониторинг разбавления красителя, указывающего на пролиферацию, посредством проточной цитометрии **(фиг. 10)**. Аналогичные эксперименты проводили с использованием MSR, функционализированных с помощью белкового антигена BCMA-Fc, присутствующего на поверхности MSR **(фиг. 11)**.

Для тестирования одновременной стимуляции и трансдукции Т-клеток вирусом с использованием двух типов MSR (MSR, несущих стимулирующие раздражители, и MSR,

смешанных с лентивирусом) была использована схема эксперимента, показанная на **фиг. 12**. Одна популяция MSR была покрыта липидным бислоем и содержала привитые антитела к CD3/CD28, как описано выше. Вторую популяцию MSR инкубировали с лентивирусом. Результаты, показанные на **фиг. 13**, указывали на более высокий уровень трансдукции в случае, когда Т-клетки стимулировали с помощью агонистических антител к CD3/CD28 и подвергали воздействию вируса, который был инкубирован с PEI-MSR, по сравнению со свободным вирусом в растворе.

Для тестирования одновременной стимуляции и трансдукции Т-клеток с помощью обоих раздражителей на одной и той же популяции MSR Т-клетки подвергали воздействию (1) несущих агонистические антитела к CD3/CD28 стимулирующих MSR, покрытых липидами, и вируса в среде, либо (2) несущих агонистические антитела к CD3/CD28 стимулирующих MSR, покрытых липидами, и PEI-MSR, предварительно инкубированных с вирусом, либо (3) PEI-MSR, на которых адсорбированы агонистические антитела к CD3/CD28, затем инкубированных с вирусом. Спустя три дня культивирования Т-клетки оценивали в отношении эффективности трансдукции. На **фиг. 14** показано влияние концентрации стимулирующих MSR на MSR из условий (1) и (2), описанных выше, при различных количествах вируса. Как показано на **фиг. 14**, общий уровень трансдукции повышался в условии (2), где PEI-MSR инкубировали с вирусом.

На **фиг. 15** сравниваются все три условия, при этом условия (1) и (2) характеризуются наиболее высокой концентрацией стимулирующих MSR. Как видно на фиг. 15, условие (3), где стимулирующие раздражители связаны с PEI-MSR, обеспечивает наиболее высокую относительную эффективность трансдукции. Такие же составы применяли для изучения опосредованной MSR трансдукции с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека. На **фиг. 16** трансдукция в различных популяциях клеток в зависимости от концентрации вируса показана при наиболее высоком уровне стимуляции для условий (1) и (2). На **фиг. 17** показана доля каждой популяции клеток, присутствующей в общей GFP+ трансдуцированной фракции клеток и в общей популяции клеток, собранной при наиболее высоком уровне стимуляции для условий (1) и (2).

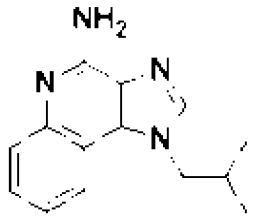
Пример E. Исследование индуцированной MSR трансдукции Т-клеток in vivo

Композицию на основе мезопористых частиц кремнезема, конъюгированных с вирусными векторами, инъецируют под кожу мышей. Через примерно 5-7 дней MSR, на которых адсорбирован вирус, кодирующий CAR для CD19 мыши, инъецируют в данный участок. Будет проводиться мониторинг истощения популяции CD19+ B-клеток в крови мышей в качестве указания на то, что были получены клетки CART для CD19. Подтверждается присутствие этих клеток CART в крови и костном мозге. Подробную гистологическую оценку участка инъекции, а также дренирующих лимфатических узлов, селезенки и печени с применением гибридизации in situ для трансгена CAR проводят для оценки утечки вируса в нежелательные участки.

Пример F. Загрузка лекарственного средства на мезопористые микрочастицы

кремнезема

Различные лекарственные средства можно загружать на мезопористые микрочастицы кремнезема.



Имиквимод

1. Пример 1. Загрузка агониста TLR7 на мезопористые микрочастицы кремнезема

Раствор имиквимода в хлороформе добавляют к взвеси 100 мг микрочастиц кремнезема в 2,0 мл хлороформа (концентрация 100-500 мкг имиквимода на 10 мг мезопористых частиц кремнезема) и встряхивают при 500 об./мин при 40 градусах Цельсия в течение 72 часов. MSP центрифугируют при 1000 об./мин в течение 3 мин, и оставшийся раствор удаляют. MSP промывают с помощью 2,0 мл хлороформа с последующим центрифугированием и удалением надосадочной жидкости. Стадии промывания повторяют с использованием этанола для удаления избытка и неадсорбированного имиквимода. Конечные микрочастицы суспендируют в воде и лиофилизируют.

2. Пример 2. Высвобождение лекарственного средства из мезопористых частиц кремнезема in vitro

10,0 мг (или эквивалент 300 мкг материала, нагруженного лекарственным средством) MSP, нагруженных лекарственным средством, суспендируют в 1,0 мл фосфатного буфера с pH 7,4 (0,0067 M) и оставляют при 37 градусах Цельсия. Образцы собирают через 1 ч., 3 ч., 6 ч., 24 ч., 2 дня и 5 дней; анализ этих образцов выполняют посредством UPLC, и его данные откладывают на графике в виде стандартной аналитической кривой. Надосадочную жидкость удаляют и заменяют на свежий буфер в каждый момент времени.

Вышеуказанное письменное описание считается достаточным для того, чтобы дать специалисту в данной области возможность осуществить на практике настоящее изобретение. Объем настоящего изобретения не предназначен для ограничения представленными конструкциями, поскольку предполагается, что представленные варианты осуществления иллюстрируют только определенные аспекты настоящего изобретения, и любые конструкции, которые являются функционально эквивалентными, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Представленный в данном документе материал не является признанием того, что письменное описание, содержащееся в данном документе, неспособно обеспечить возможность осуществления на практике любого аспекта настоящего изобретения, включая лучший способ его осуществления, а также его не следует толковать как ограничивающий объем формулы

настоящего изобретения. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к показанным и описанным в данном документе станут очевидными специалистам в данной области из вышеприведенного описания и будут находиться в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Понятно, что применение идей настоящего изобретения в отношении конкретной задачи или ситуации будет находиться в пределах способностей специалиста средней квалификации в данной области в свете идей, содержащихся в данном документе.

Раскрытие всех без исключения цитируемых источников в настоящем описании явным образом включено в данный документ посредством ссылки.

Пример G. Исследование индуцированного MSR получения CAR-T in vivo

Мышей с привитыми Т-клетками и В-клетками человека (мышей, гуманизированных с помощью CD34+ стволовых клеток человека, или мышей, которым инъецировали мононуклеарные клетки периферической крови человека) получают с применением известных способов. Композицию на основе мезопористых частиц кремнезема, конъюгированных с лентивирусом CAR19, инъецируют под кожу мышей для трансдукции Т-клеток. Мониторинг присутствия Т-клеток, экспрессирующих CAR19 (с использованием окрашивания с помощью антиидиотипического антитела к CAR19), и истощения популяции CD19+ В-клеток в крови мышей, обработанных конъюгатами MSR-лентивирус с CAR19, осуществляют с применением проточной цитометрии на последовательно собранных образцах крови (в день 0 до инъекции и два раза в неделю в промежутке от дня 1 до дня 21 после инъекции вируса на MSR), и проводят сравнение с контрольными мышами, которым инъецировали лентивирус с GFP на MSR, в качестве указания на то, что клетки CART для CD19 были получены и функционируют для уничтожения своей мишени. Концентрацию интерферона-гамма и фактора некроза опухоли-альфа человека определяют в тех же образцах крови, что и второй биомаркер для получения и активации CD19-CAR-Т-клеток. Подробную гистологическую оценку участка инъекции, а также лимфатических узлов, костного мозга, селезенки и печени с применением гибридизации in situ для трансгена CAR проводят для оценки утечки вируса в нежелательные участки и исследования миграции полученных CAR19-Т-клеток в эти участки.

В другом эксперименте мышам, содержащим Т- и В-клетки человека, внутривенно инъецируют лейкозные опухолевые клетки Nalm6, экспрессирующие CD19, которые экспрессируют репортерный ген люциферазы. Когорты мышей получают однократную подкожную инъекцию композиции на основе мезопористых частиц кремнезема, конъюгированных с лентивирусом с CAR19 или GFP, в промежутке от 7 дней до инъекции опухолевых клеток до 7 дней после нее для трансдукции Т-клеток. Мониторинг опухолевой нагрузки Nalm6 осуществляют по сигналу люциферазы с использованием системы визуализации IVIS для исследования противоопухолевой эффективности полученных клеток CART для CD19. Мониторинг присутствия Т-клеток, экспрессирующих CAR19, и истощения популяции CD19+ В-клеток в крови мышей,

обработанных конъюгатами MSR-лентивирус с CAR19, осуществляют на последовательно собранных образцах крови (в день 0 до инъекции и два раза в неделю в промежутке от дня 1 до дня 21 после инъекции вируса на MSR), и проводят сравнение с контрольными мышами, которым инъецировали лентивирус с GFP на MSR. Концентрацию интерферона-гамма и фактора некроза опухоли-альфа человека определяют в тех же образцах крови, что и второй биомаркер для получения и активации CD19-CAR-T-клеток.

Эти исследования повторяют с использованием конъюгатов MSR-лентивирус с другими раковыми/опухолевыми мишенями, включающими без ограничения BCMA, CD20, CD22, CD123, EGFRvIII, CLL-1 и их комбинации (друг с другом и/или с CD19).

ПРИМЕР H. Функциональный анализ композиций, содержащих криогель, содержащий VEGF-C, и MSR с конъюгированным вирусным вектором и адсорбированным средством для активации клеток

Пример 1. Получение VEGF-C

Получение в HEK

ДНК синтезировали в GeneArt (Регенсбург, Германия) и клонировали в вектор экспрессии для млекопитающих с применением методик клонирования на основе лигирования с использованием рестрикционных ферментов. Полученную плазмиду вводили путем трансфекции в клетки HEK293T. Для транзиентной экспрессии белков векторы для вариантов дикого типа или сконструированных вариантов вводили путем трансфекции в адаптированные к суспензионному культивированию клетки HEK293T с использованием полиэтиленимина (PEI; кат. № 24765, Polysciences, Inc.). Затем рекомбинантные векторы экспрессии вводили в клетки-хозяева, и конструкцию получали посредством дальнейшего культивирования клеток в течение периода 7 дней для обеспечения секреции в культуральную среду.

Затем полученные конструкции очищали от бесклеточной надосадочной жидкости с применением аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металлов (IMAC).

Белки с His-меткой захватывались с помощью IMAC. Смолу промывали перед элюированием белка.

В конечном итоге осуществляли тонкую очистку элюированных фракций посредством эксклюзионной хроматографии (обеспечивающей разделение агрегатов, мономеров и димеров). Анализ очистки проводили с помощью SDS-PAGE, и содержание агрегатов определяли с помощью способа аналитической эксклюзионной хроматографии.

Таблица 21. Выход продукта для вариантов VEGF-C в линии клеток HEK293T

Вариант	**Физическое состояние**	**Конечный выход после IMAC и SEC (мкг/л)**
1	Димер	117
2	Димер	405
	Мономер	714
7	Димер	1120

	Мономер	623
8	Димер	1190
9	Димер	869
	Мономер	125

Получение в CHO

Систему экспрессии для изготовления на основе CHO MaKo применяли для получения варианта 8 VEGF-C. Ген, кодирующий целевой белок, вводили в экспрессионную кассету под управлением промотора CMV в плазмидном векторе экспрессии. Вектор вводили путем трансфекции в клетки CHO MaKo в трех повторностях. Для каждой трансфекции 0,5 мкг плазмиды вводили путем трансфекции в жизнеспособные клетки в среде. Трансфицированные клетки высевали в среду для культивирования клеток с низкой концентрацией фолиевой кислоты во встряхиваемых колбах. Клетки выращивали в увлажненном шейкере-инкубаторе. В день 3 после трансфекции начинали отбор стабильных трансфектантов. Клетки входили в кризис отбора и восстанавливались в течение 21 дня. Затем флаконы с отобранными стабильными пулами замораживали.

Для получения варианта 8 VEGF-C применяли подход с подпиткой. Флакон с замороженными клетками размораживали. После восстановления после размораживания клетки высевали в среду для культивирования продуцирующих клеток во встряхиваемых колбах. Культуры выращивали в увлажненном шейкере-инкубаторе. Температуру выращивания снижали в день 5 после высевания культуры. Растворы для подпитки добавляли в дни 3, 4, 5, 6, 7 и 10 после высевания. Культуру собирали в день 11 после высевания. Клетки отделяли от среды для культивирования клеток посредством центрифугирования и стерилизующей фильтрации. Целевой белок очищали от осветленной надосадочной жидкости культуры клеток, и определяли его характеристики, как описано выше.

Таблица 22. Выход продукта для варианта 8 VEGF-C в линии клеток CHO MaKo

Вариант	**Физическое состояние**	**Конечный выход после IMAC и SEC (мг/л)**
8	Димер	17,5

Пример 2. Получение криогеля

Конъюгаты с альгинатом составляли на основе ранее описанного протокола (Koshy et al. 2018).

Норборнен-альгинат (Alg-Nb)

Один грамм альгината Pronova UP MVG растворяли в 100 мл 0,1 М буфера на основе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES) в течение ночи при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Затем к раствору альгината добавляли 280 мкл 5-норборнен-2-метиламина (норборнена). 1464 мг гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) и 1085 мг N-гидроксисукцинимида (NHS) по

отдельности растворяли в 20 мл буфера MES и добавляли к раствору альгината-норборнена, и обеспечивали протекание реакции в течение 24 часов при комнатной температуре. Через 24 часа раствор подвергали диализу в последовательных солевых банях объемом 5 л (7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0, 0, 0 г/л NaCl) в течение 3 часов при каждой концентрации. Затем раствор дважды фильтровали (вакуум-фильтрация, 0,22 мкм) и замораживали при -80°C в течение ночи. Затем замороженные растворы лиофилизировали в течение 5 дней и хранили при -20°C до применения в экспериментах.

Тетразин-альгинат (Alg-Tz)

Один грамм альгината Pronova UP MVG растворяли в 0,1 M буфера на основе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES) в течение ночи при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Затем к раствору альгината добавляли 126 мг гидрохлорида (4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенилметанамина (тетразина). 1464 мг гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) и 1085 мг N-гидроксисукцинимида (NHS) по отдельности растворяли в 20 мл буфера MES и добавляли к раствору альгината-тетразина, и обеспечивали протекание реакции в течение 24 часов при комнатной температуре. Через 24 часа раствор гасили с помощью 311 мг гидроксиламина в течение 30 мин и центрифугировали при максимальном значении об./мин в течение 10 минут. Затем раствор фильтровали (фильтр с размером пор 0,22 мкм) и подвергали диализу в последовательных солевых банях объемом 5 л (7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0, 0, 0 г/л NaCl) в течение 3 часов при каждой концентрации. Затем раствор дважды фильтровали (фильтр с размером пор 0,22 мкм) и замораживали при -80°C в течение ночи. Затем замороженные растворы лиофилизировали в течение 5 дней и хранили при -20°C до применения в экспериментах.

Составление криогеля (фигура 21A)

Alg-Tz и Alg-Nb растворяли в DIH_2O в концентрации 20 мг/мл с помощью ThermoMixer (37°C, 2000 об./мин) в течение 1 часа. Лапонит отдельно растворяли в течение 1 часа в концентрации 5 мг/мл в DI-H_2O при постоянном перемешивании при комнатной температуре. Затем растворы фильтровали (фильтр с размером пор 0,22 мкм) в стерильных условиях. Растворы VEGF-C (исходный раствор 3 мг/мл) и лапонита (Laponite XLG) (исходный раствор 5 мг/мл) совместно инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем добавляли раствор Alg-Tz и растворы Alg-Nb в соотношении 1:1 и разбавляли до конечной концентрации 10 мг/мл (конечная концентрация лапонита 0,25 мг/мл, 10 мкг VEGF-C/гель). 50 мкл смеси немедленно вносили пипеткой в формы из PEEK и замораживали при -20°C в течение ночи. Перед инъекцией гели размораживали при комнатной температуре в формах и затем помещали в иглы для шприца 16 калибра. Затем иглы с гелями помещали в шприцы объемом 1 мл со 100 мкл стерильного PBS.

Пример 3. Анализ высвобождения VEGF-C

Анализ высвобождения VEGF-C из альгинатных криогелей in vitro (фигура 21)

Криогели с VEGF-C (10 мкг белка+0,25 мг/мл лапонита) инкубировали при 37°C в 1 мл буфера для высвобождения (1% раствор BSA в PBS). Буфер для высвобождения

полностью удаляли и заменяли в различные моменты времени в ходе всего эксперимента. Образцы буфера для высвобождения хранили при -80°C до размораживания для использования в ELISA VEGF-C.

Пример 4. Синтез MSR

Поверхностно-активное вещество поли(этиленгликоль)-блок-поли(пропиленгликоль)-блок-поли(этиленгликоль) со средней Mn ~ 5800 (Pluronic P-123, 80,0 г, 487 ммоль; Sigma) растворяли в 3 л 1,6 M HCl при комнатной температуре, нагревали до 40°C в колбе с рубашкой объемом 5 л и механически перемешивали с помощью верхнеприводной мешалки со скоростью 0-600 об./мин. Тетраэтилортосиликат (TEOS, 184 мл, 826 ммоль; Sigma) добавляли в одну часть в течение < 5 мин. и нагревали при 40°C, продолжая перемешивать, в течение по меньшей мере 2 часов, но чаще всего в течение 20 часов. Полученную взвесь нагревали до 80-130°C в течение 6-72 часов для гидротермической обработки перед охлаждением до комнатной температуры. Взвесь фильтровали через воронку Бюхнера, и промывали деионизированной водой и затем этанолом, и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Полученный кремнеземный материал обжигали в печи при медленном наращивании температуры от комнатной температуры до 550°C в течение 8 часов и затем поддерживали при 550°C в течение еще 8 часов перед охлаждением до комнатной температуры с получением 47 г мезопористых частиц кремнезема.

Изменения в скорости перемешивания могут обуславливать изменения в соотношении размеров микрочастицы. Варьирование условий температуры и продолжительности гидротермической обработки представляет собой часто используемый способ регулирования размера пор для мезопористых материалов.

Характеристики конечных мезопористых материалов определяли с помощью световой микроскопии, Malvern Morphologi G3, сканирующей электронной микроскопии (SEM), термогравиметрического анализа (TGA).

Микрочастицы, функционализированные с помощью N, N,N-триметилпропан-1-аммония

Хлорид триметоксисилилпропилтриметиламмония (3,61 мл, 6,51 ммоль; 50% раствор в метаноле) добавляли к взвеси 1,0 г мезопористых микрочастиц кремнезема в 150 мл этанола, чистого для анализа, и нагревали до 75 градусов Цельсия в течение 7 часов. После охлаждения до комнатной температуры взвесь фильтровали, и частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 20 часов с получением микрочастиц, функционализированных с помощью N, N,N-триметилпропан-1-аммония, называемых в данном документе "MSR с триметиламмонием".

Уменьшение размера MSR

Длина исходных вариантов MSR составляла примерно 100-200 мкм после синтеза. Для улучшения инъекционной способности при прохождении через шприц для инсулина 28,5 калибра сухие MSR гомогенизировали в ударной мельнице с гранулами MP FastPrep-

24 5G и системе для лизиса в течение 80 секунд **(фигура 30)**. Затем MSR автоклавировали и хранили при комнатной температуре до применения в экспериментах.

Загрузка лентивируса на MSR и определение характеристик комплекса

Партии гомогенизированных MSR ресуспендировали при 10 мг/мл в ледяном буфере Tris-NaCl-EDTA с pH 7,5 (буфере NTE). Требуемый исходный раствор лентивируса разбавляли в ледяном буфере NTE до получения требуемого общего количества трансдуцирующих единиц (TU) для загрузки. Суспензию MSR и разбавленный вирус объединяли в соотношениях 1:1 об./об. и инкубировали на льду в течение 30 минут. По меньшей мере две стадии промывания в избытке DPBS осуществляли для удаления избытка вируса до проведения функциональных тестов in vitro или применения in vivo. Для исследований загрузки и удерживания (**фигуры 27-28**) суспензию 2,5 мг/мл MSR смешивали в соотношении 1:1 с раствором, содержащим указанное на фигурах количество вируса, и инкубировали в течение 30 минут на льду. Показатели количества вируса в загрузочных растворах, связанного с MSR и высвобождаемого из MSR, количественно определяли с помощью коммерчески доступного набора. Для исследований высвобождения комплекс MSR-лентивирус инкубировали в средах при 37°C, и надосадочную жидкость собирали в указанные моменты времени для анализа методом qPCR.

Загрузка вируса и STARTERS на MSR для применения in vivo

Конструкцию 2 (**таблица 20, фиг. 48A-48B**) и MSR с триметиламмонием совместно инкубировали для обеспечения адсорбции средства для активации клеток на поверхности MSR. Конструкцию 2 добавляли к 1 суспензии 8 мг/мл MSR с триметиламмонием и инкубировали в течение 1 часа при 4°C. Нагруженные MSR промывали три раза и ресуспендировали в DPBS до получения конечной концентрации 15 мг/мл MSR.

Буферный раствор NTE, содержащий лентивирус, кодирующий CAR для CD19 (также называемый CAR19), смешивали с суспензией 10 мг/мл MSR с триметиламмонием и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. MSR промывали два раза и ресуспендировали в DPBS до получения конечной концентрации 15 мг/мл MSR.

Наконец, MSR энергично пипетировали движениями вверх и вниз, загружали обратно в шприцы для инсулина и немедленно инъецировали мышам внутридермально.

Пример 5. Трансдукция клеток и функциональное тестирование

Трансдукция Т-клеток in vitro

Т-клетки человека выделяли из лейкоцитарных масс с помощью набора для выделения общей популяции Т-клеток человека Miltenyi и замораживали перед применением. Клетки размораживали и высевали в полную среду OpTmizer в присутствии конструкции формата 4 (**таблица 20, фиг. 48A-48B**). Вирус, кодирующий CAR для CD19 (также называемый CAR19), в виде свободного вируса либо комплексов MSR-вирус добавляли в культуру с последующим инкубированием в течение одного дня. Клетки промывали и высевали на дополнительные три дня перед применением для определения

характеристик и функциональных тестов (**фиг. 29-30**).

Определение характеристик и функциональное тестирование CAR-Т-*клеток* (***фигура 29***)

CAR-Т-клетки анализировали в отношении экспрессии рецептора CAR посредством окрашивания с помощью антиидиотипического антитела к CAR для CD19, конъюгированного с PE, и анализа методом проточной цитометрии. Nalm6 (RRID: CVCL_0092) представляет собой линию клеток острого лимфобластного лейкоза (ALL) человека. Клетки выращивали в среде RPMI, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, и в обоих случаях выращивали в суспензии. Клетки модифицировали таким образом, чтобы они экспрессировали люциферазу (Nalm6-Luc), так чтобы их присутствие в совместных культурах можно было оценить с помощью сигнала люциферазы. Клетки Nalm6-Luc совместно культивировали при различных соотношениях клеток с клетками CD19-CART, полученными с применением свободного вируса из комплексов MSR-вирус (**фигура 29**). Сигнал люциферазы в конце 1-дневного совместного культивирования использовали для расчета процентной доли вводимых Nalm6, которые были уничтожены клетками CART. Уровни интерферона-гамма в надосадочной жидкости в конце совместного культивирования количественно определяли с помощью коммерчески доступного набора.

Пример 6. Анализ результатов

Анализ трубкообразования (***фигура 20***)

Дермальные лимфатические эндотелиальные клетки человека (HDLEC) высевали (p0) и пассировали при 75% конфлюэнтности до p4 или до момента получения достаточного количества клеток для экспериментов. Затем аликвоту объемом один мл помещали в пробирки Eppendorf, обрабатывали с помощью 600 мкг белка VEGF-C и перемешивали вихревым способом. Каждый обработанный материал добавляли к подогретым средам в 6-луночном планшете и инкубировали в течение ночи при 37°C (5% CO_2). Для анализа посредством визуализации клетки промывали и затем фиксировали с помощью раствора 3,7% формалина с 0,05% Triton X-100 (фиксирующий буфер), затем промывали и покрывали с помощью 0,1% раствора Triton X-100 (буфер для пермеабилизации). После двукратного промывания с помощью PBS клетки покрывали с помощью 0,05% Triton X-100 в 1% растворе BSA (блокирующий буфер). Окрашивание с помощью DAPI и фаллоидина осуществляли согласно известным протоколам. После окрашивания клетки дважды промывали с помощью PBS и визуализировали.

Анализ пролиферации (***фигура 20***)

Среду WST-8 получали посредством разбавления раствора WST-8 в соотношении 1:10 в среде MV. Культуральную среду удаляли, и клетки инкубировали в среде WST-8. После инкубирования среду удаляли в трех повторностях из каждой лунки и добавляли в 96-луночный планшет. Оптическое поглощение для каждой лунки при 450 нм считывали с помощью спектрофотометра.

Обработка ткани после экспериментов in vivo

Ткани собирали от мышей, взвешивали и нарезали на очень мелкие кусочки с помощью ножниц. Затем образцы подвергали ферментативному расщеплению при постоянном перемешивании в среде для расщепления, содержащей коллагеназу 4 типа и ДНКазу 1. Затем образцы пипетировали движениями вверх и вниз. После пипетирования к образцам добавляли среду для расщепления, содержащую коллагеназу D и ДНКазу 1. Образцы пипетировали движениями вверх и вниз в течение 3 циклов. Добавляли EDTA (5 мМ), и клетки фильтровали через фильтры с размером пор 70 мкм и сито с размером ячеек 40 мкм и ресуспендировали в Fc-блокирующем буфере. Клетки промывали и окрашивали для FACS-анализа.

*Окрашивание с помощью H&E и для ISH (**фигуры 32-33**)*

Ткани кожи с криогелем, прилегающую кожу и дренирующий лимфатический узел собирали при аутопсии, фиксировали путем погружения в 10% нейтральный забуференный формалин и обрабатывали с получением парафиновых блоков. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для проведения гистологической оценки. Гибридизацию in situ для выявления транскрипта CAR, а также генов Hs-PPIB (положительный контроль и контроль качества ткани) и DAPB (отрицательный контроль) проводили в срезах ткани, фиксированных формалином и заключенных в парафин. Наборы зондов для положительного контроля PPIB и отрицательного контроля DAPB включали для оптимизации предварительного кондиционирования и обеспечения качества и специфичности мРНК соответственно. Способ гибридизации осуществляли согласно известным протоколам с использованием хромогена 3,3'-диаминобензидина (DAB). Вкратце, срезы ткани толщиной 5 мкм помещали на предметные стекла, подвергали термической обработке в течение 60 минут и использовали для гибридизации. Протокол депарафинизации и регидратации выполняли с использованием устройства для окрашивания. Проводили автономную ручную предварительную обработку в 1X буфере для демаскировки. Оптимизацию осуществляли посредством первоначального оценивания сигнала гибридизации для PPIB и DAPB и последующего применения одинаковых условий для всех предметных стекол. После предварительной обработки предметные стекла переносили в устройство для автоматического окрашивания для завершения процедуры гибридизации, включающей предварительную обработку протеазой; гибридизацию с последующей амплификацией и выявление с помощью HRP и контрастного окрашивания гематоксилином. Предметные стекла оцифровывали с помощью сканера для предметных стекол, и получали иллюстративные снимки.

Дополнительные результаты

Криогели (0,25 мг/мл лапонита), содержащие 10 мкг разных конструкций VEGF-C, инъецировали мышам в поверхностные слои дермы (N=5/группа) в день 0. В день 14 мышей умерщвляли, и кожу с криогелем (объединенные образцы) нарезали для расщепления и FACS-анализа. Иллюстративные графики FACS для LEC ($CD31^+$, $PDPN^+$) предварительно гейтируют по FSC-A/SSC-A и $CD45^-$(**фигура 22**).

Результаты на **фигуре 23** относятся к доставке VEGF-C. Мышам инъецировали

VEGF-C (N=12) или чистые криогели (N=10), синтезированные, как упоминалось ранее. Кожу с гелями от мышей собирали в моменты времени, представляющие собой дни 7, 14 и 21, расщепляли и окрашивали для FACS. LEC гейтировали по $CD45^-$ $CD31^+$ $PDPN^+$. BEC гейтировали по $CD45^-$ $CD31^+$ $PDPN^-$. CD4 и CD8 Т-клетки гейтировали по $CD45^+$ $CD11b^-$ $CD11c^-$ $Thy1^+$.

Как показано на **фигуре 25A,** мышам C57Bl6 инъецировали криогели с VEGF-C (N=5) либо чистые криогели (N=5), и их оценивали в отношении лимфангиогенеза в день 14. Кроме того, мышам NSG инъецировали криогели с VEGF-C (N=5) для сравнения пролиферации LEC между иммунокомпетентными мышами (C57Bl6) и мышами с ослабленным иммунитетом (NSG). Что касается **фигуры 25B**, мышам NSG в день 0 инъецировали криогели с VEGF-C (N=5) либо чистые криогели (N=5). В день 10 всем мышам инъецировали PBMC через их латеральную хвостовую вену. Через семь дней после инъекции PBMC ткань кожи с гелем собирали для расщепления и FACS-анализа. LEC гейтировали по CD45 человека$^-$ CD11b мыши$^-$ CD31 мыши$^+$ PDPN мыши$^+$. CD4 и CD8 Т-клетки гейтировали по CD45 человека$^+$ CD11b мыши$^-$ CD3 человека$^+$. B-клетки гейтировали по CD45 человека$^+$ CD11b мыши$^-$ CD3 человека$^-$ CD19+ человека.

Как показано на **фигуре 34**, мышам NSG (N=45) инъецировали криогели с VEGF-C в день 0 и PBMC в день 10 путем инъекции в хвостовую вену. В день 17 мышам интрадермально инъецировали 1) PBS (N=15 в общей сложности/5 для FACS-анализа конечных точек), либо 2) MSR с конструкцией 2 (инъекция объемом 10 мкл 15 мг/мл эквивалента MSR) и затем свободного лентивируса, кодирующего CAR для CD19 (инъекция объемом 10 мкл, содержащая 4,26e6 TU вируса, через 1 час после инъекции STARTERS) (N=15 в общей сложности/6 для FACS-анализа конечных точек), либо 3) связанный с MSR лентивирус, кодирующий CAR для CD19, смешанный в соотношении 1:1 с MSR с конструкцией 2 (однократная инъекция объемом 20 мкл 15 мг/мл MSR) (N=15 в общей сложности/5 для FACS-анализа конечных точек). В день 14 3 или 4 мыши из группы умерщвляли и анализировали в отношении лимфангиогенеза в области кожи с гелем, тогда как в день 20 и 35 мышей умерщвляли и собирали кожу с гелем и селезенку для гистологического анализа с целью поиска клеток, подвергнутых локальной и системной трансдукции (N=3/группа/момент времени). У мышей периодически собирали кровь для FACS-анализа циркулирующих CD19-CAR+ клеток (D25, 30, 35). Наконец, мышей умерщвляли в день 35 для FACS-анализа кожи с гелем и селезенки с целью поиска размножения CART и истощения популяции B-клеток.

ПРИМЕР I. Функциональный анализ изготовления CART in vivo

Краткое описание

В данном примере описывается процесс изготовления CART in vivo, включающий локальную доставку фактора привлечения клеток для индуцирования лимфангиогенеза и/или привлечения Т-клеток, например, необученных Т-клеток, которые можно впоследствии активировать и трансдуцировать вирусным вектором, кодирующим CAR, с получением функциональных CAR-Т-клеток in vivo (**фиг. 18**). В некоторых вариантах

осуществления субъекту вводят (например, локально) фактор привлечения клеток с помощью криогеля, где фактор привлечения клеток представляет собой VEGF-C (например, состав на основе криогеля с медленным высвобождением белка VEGF-C). Без ограничения какой-либо теорией, высвобождение VEGF-C индуцирует лимфангиогенез уже существующих кожных лимфатических капилляров, активируя лимфатические эндотелиальные клетки (LEC). Активированные LEC секретируют хемокины, такие как CCL21, которые, в свою очередь, осуществляют привлечение иммунных клеток, например, необученных Т-клеток, в участок введения, например, в участок в дерме над гелем. В некоторых вариантах осуществления по прошествии периода от 7 до 21 дня, например, 14 дней, субъекту вводят (например, локально) вирусный вектор, кодирующий CAR, и средство для активации клеток, доставляемые с помощью мезопористых стержней из кремнезема (MSR), для трансдукции Т-клеток и получения CAR-Т-клеток in vivo. Без ограничения какой-либо теорией, кратковременная активация CD3 и CD28, например, с помощью антител к CD3/CD28 (например, биспецифического антитела), стимулирует эффективную трансдукцию Т-клеток. Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления данные трансдуцированные Т-клетки будут возвращаться в системный кровоток через кожные лимфатические сосуды, лимфатические узлы и грудной проток и будут дополнительно размножаться в ответ на опухолевый антиген.

Пример 1. Получение и определение характеристик белка VEGF-C и его функциональных вариантов

В данном примере описывается получение и определение характеристик различных факторов привлечения клеток, включая VEGF-C и его функциональные варианты. Факторы привлечения клеток, описанные в данном примере могут, например, применяться в криогелях для стимуляции лимфангиогенеза в участке у субъекта до введения вирусного вектора, кодирующего CAR.

Как показано на фиг. 19A, VEGF-C может существовать в природной и модифицированной формах. Незрелый VEGF-C (**фиг. 19A**, #1) обычно встречается внутриклеточно с N-концевыми и C-концевыми пропептидными последовательностями. После высвобождения белок VEGF-C подвергается протеолитическому расщеплению и присутствует во внеклеточном пространстве в виде основной или минорной зрелой формы (**фиг. 19A,** #2 (SEQ ID NO: 731) или #7 (SEQ ID NO: 733) соответственно), которая представляет собой димер либо мономер. Стабилизированные димеры основной зрелой (**фиг. 19A,** #9 (SEQ ID NO: 737)) и минорной зрелой (**фиг. 19A,** #8 (SEQ ID NO: 735)) формы VEGF-C были сконструированы посредством вставки мутации C137A в последовательности. По сравнению с основными зрелыми формами VEGF-C минорные зрелые формы содержат дополнительную короткую пропептидную последовательность (TEETIKFAA (SEQ ID NO: 740)) на N-конце минорной зрелой формы. Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления этот дополнительный короткий пропептид стимулирует образование димера, а также экспрессию белка как в клетках HEK293T, так и в клетках CHO MaKo.

Получение белка VEGF-C и функциональных вариантов в HEK

ДНК синтезировали в GeneArt (Регенсбург, Германия) и клонировали в вектор экспрессии для млекопитающих с применением методик клонирования на основе лигирования с использованием рестрикционных ферментов. Полученную плазмиду вводили путем трансфекции в клетки HEK293T. Для транзиентной экспрессии белков векторы для вариантов дикого типа или сконструированных вариантов вводили путем трансфекции в адаптированные к суспензионному культивированию клетки HEK293T с использованием полиэтиленимина (PEI; кат. № 24765, Polysciences, Inc.). Затем рекомбинантные векторы экспрессии вводили в клетки-хозяева, и конструкцию получали посредством дальнейшего культивирования клеток в течение периода 7 дней для обеспечения секреции в культуральную среду. Затем полученные конструкции очищали от бесклеточной надосадочной жидкости с применением аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металлов (IMAC). Белки с His-меткой захватывались с помощью IMAC. Смолу промывали перед элюированием белка. В конечном итоге осуществляли тонкую очистку элюированных фракций посредством эксклюзионной хроматографии (обеспечивающей разделение агрегатов, мономеров и димеров). Анализ очистки проводили с помощью SDS-PAGE (**фиг. 19B-19C**) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, и содержание агрегатов определяли с помощью способа аналитической эксклюзионной хроматографии.

Как показано на **фиг. 19B-19C**, незрелый VEGF-C с полноразмерным пропептидом (**фиг. 19A**, #1 (SEQ ID NO: 727)) получали в виде димера (лунки 2 и 3), и удаление пропептида приводило к получению двух основных зрелых форм VEGF-C (#2 (SEQ ID NO: 731)) - одной нековалентной димерной формы (лунки 5, 6) и мономерной формы (лунки 8, 9). Короткий N-концевой пропептид оставляли присоединенным к белку для получения минорной зрелой формы VEGF-C дикого типа (#7 (SEQ ID NO: 733)) в нековалентной димерной (лунки 11, 12) или в мономерной форме (лунки 15, 16). Добавление мутации C137A в основную зрелую форму #2 VEGF-C с получением основной зрелой формы #9 VEGF-C с мутацией (SEQ ID NO: 737) приводило к получению ковалентной димерной (лунки 21, 22) и мономерной формы (лунки 24, 25). Введение мутации C137A в минорную зрелую форму #7 VEGF-C с получением минорной зрелой формы #8 VEGF-C с мутацией (SEQ ID NO: 735) приводило к выявляемому получению только димера VEGF-C (лунки 18, 19). Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления эта минорная зрелая форма #8 VEGF-C с мутацией (SEQ ID NO: 736 или 735) может являться подходящей для крупномасштабного получения.

Общий выход продукта при использовании клеток HEK был рассчитан и обобщенно представлен в **таблице 21**.

Таблица 21. Выход продукта для вариантов VEGF-C в линии клеток HEK293T

Вариант	**Физическое состояние**	**Конечный выход после IMAC и SEC (мкг/л)**

1	Димер	117
2	Димер	405
	Мономер	714
7	Димер	1120
	Мономер	623
8	Димер	1190
9	Димер	869
	Мономер	125

Получение минорного зрелого варианта #8 VEGF-C в CHO

Систему экспрессии для изготовления на основе CHO MaKo затем применяли для получения варианта #8 VEGF-C (минорной зрелой формы с мутацией, SEQ ID NO: 736 или 735). Ген, кодирующий целевой белок, вводили в экспрессионную кассету под управлением промотора CMV в плазмидном векторе экспрессии. Вектор вводили путем трансфекции в клетки CHO MaKo в трех повторностях. Для каждой трансфекции 0,5 мкг плазмиды вводили путем трансфекции в жизнеспособные клетки в среде. Трансфицированные клетки высевали в среду для культивирования клеток с низкой концентрацией фолиевой кислоты во встряхиваемых колбах. Клетки выращивали в увлажненном шейкере-инкубаторе. В день 3 после трансфекции начинали отбор стабильных трансфектантов. Клетки входили в кризис отбора и восстанавливались в течение 21 дня. Затем флаконы с отобранными стабильными пулами замораживали.

Для получения варианта #8 VEGF-C (минорной зрелой формы с мутацией, SEQ ID NO: 736 или 735) применяли подход с подпиткой. Флакон с замороженными клетками размораживали. После восстановления после размораживания клетки высевали в среду для культивирования продуцирующих клеток во встряхиваемых колбах. Культуры выращивали в увлажненном шейкере-инкубаторе. Температуру выращивания снижали в день 5 после высевания культуры. Растворы для подпитки добавляли в дни 3, 4, 5, 6, 7 и 10 после высевания. Культуру собирали в день 11 после высевания. Клетки отделяли от среды для культивирования клеток посредством центрифугирования и стерилизующей фильтрации. Целевой белок очищали от осветленной надосадочной жидкости культуры клеток, и определяли его характеристики, как описано выше. Выход продукта для варианта #8 VEGF-C (минорной зрелой формы с мутацией, SEQ ID NO: 736 или 735) обобщенно представлен в **таблице 22**.

Таблица 22. Выход продукта для варианта 8 VEGF-C в линии клеток CHO MaKo

Вариант	**Физическое состояние**	**Конечный выход после IMAC и SEC (мг/л)**
8	Димер	17,5

Исследование активности VEGF-C in vitro

Исследовали биологическую активность VEGF-C и вариантных форм, полученных выше, in vitro. Измеряли влияние VEGF-C на дермальные лимфатические эндотелиальные клетки человека (HDLEC), включая разрастание и пролиферацию (**фиг. 20A-20C**). Различные варианты VEGF-C, исследуемые в данном примере, включают незрелый VEGF-C с полноразмерным пропептидом (#1); основную зрелую форму #2 в виде мономера (2M) или димера (2D); минорную зрелую форму #7 в виде мономера (7M) или димера (7D); основную зрелую форму #9 с мутацией (C137A) в виде мономера (9M) или димера (9D) и минорную зрелую форму #8 с мутацией (C137A) в виде мономера (8M) или димера (8D).

Обзор экспериментальной модели анализа разрастания in vitro с использованием HDLEC для тестирования биологической активности вариантов VEGF-C показан на **фиг. 20A**. HDLEC сначала высевали (p0) и пассировали при 75% конфлюэнтности до p4 или до момента получения достаточного количества клеток для экспериментов. Затем аликвоту HDLEC объемом приблизительно 1 мл помещали в пробирки Eppendorf, обрабатывали с помощью 600 мкг белка VEGF-C и перемешивали вихревым способом. Каждый обработанный материал добавляли к подогретым средам в 6-луночном планшете и инкубировали в течение ночи при 37°C (5% CO_2). Для анализа посредством визуализации клетки промывали и затем фиксировали с помощью раствора 3,7% формалина с 0,05% Triton X-100 (фиксирующий буфер), затем промывали и покрывали с помощью 0,1% раствора Triton X-100 (буфер для пермеабилизации). После двукратного промывания с помощью PBS клетки покрывали с помощью 0,05% Triton X-100 в 1% растворе BSA (блокирующий буфер). Окрашивание с помощью DAPI и фаллоидина осуществляли согласно известным протоколам. После окрашивания фаллоидином клетки дважды промывали с помощью PBS и визуализировали в отношении трубкообразования.

С целью измерения пролиферации осуществляли анализ WST-8 (**фиг. 20B**), где сначала получали среду WST-8 посредством разбавления раствора WST-8 в соотношении 1:10 в среде MV. Культуральную среду удаляли, и клетки инкубировали в среде WST-8. После инкубирования среду удаляли в трех повторностях из каждой лунки и добавляли в 96-луночный планшет. Оптическое поглощение для каждой лунки при 450 нм считывали с помощью спектрофотометра.

Как показано на **фиг. 20B**, все зрелые формы VEGF-C (основные и минорные зрелые формы дикого типа или мутантные) приводили к сходным уровням пролиферации HDLEC, которые являлись улучшенными по сравнению с пролиферацией HDLEC, инкубированных с незрелым VEGF-C с полноразмерным пропептидом (#1). Как показано на **фиг. 20C**, на изображениях трубкообразования показано, что основные и минорные зрелые формы, относящиеся к дикому типу (#2 и #7 соответственно) или содержащие мутацию C137A (#9 и #8 соответственно), стимулируют лучшее разрастание HDLEC, чем незрелая форма (#1). Более того, оказалось, что димерные формы (D) различных форм VEGF-C демонстрировали хорошую активность in vitro (**фиг. 20B-20C**). Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления димерные формы основных и

минорных зрелых форм, относящиеся к дикому типу (#2D и #7D соответственно) или содержащие мутацию C137A (#9D и #8D соответственно), характеризуются усиленной активностью разрастания по сравнению с мономерными формами.

Пример 2. Получение и определение характеристик криогеля, содержащего VEGF-C

Получали и исследовали криогель, содержащий VEGF-C или его функциональные варианты. Лапонит добавляли к составу на основе криогеля для обеспечения медленного более контролируемого высвобождения VEGF-C.

Для образования криогеля конъюгаты с альгинатом составляли на основе ранее описанного протокола (Koshy et al., Acta Biomater. 2018 Jan;65:36-43) и смешивали.

Норборнен-альгинат (Alg-Nb)

Один грамм альгината Pronova UP MVG растворяли в 100 мл 0,1 М буфера на основе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES) в течение ночи при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Затем к раствору альгината добавляли 280 мкл 5-норборнен-2-метиламина (норборнена). 1464 мг гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) и 1085 мг N-гидроксисукцинимида (NHS) по отдельности растворяли в 20 мл буфера MES и добавляли к раствору альгината-норборнена, и обеспечивали протекание реакции в течение 24 часов при комнатной температуре. Через 24 часа раствор подвергали диализу в последовательных солевых банях объемом 5 л (7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0, 0, 0 г/л NaCl) в течение 3 часов при каждой концентрации. Затем раствор дважды фильтровали (вакуум-фильтрация, 0,22 мкм) и замораживали при -80°C в течение ночи. Затем замороженные растворы лиофилизировали в течение 5 дней и хранили при -20°C до применения в экспериментах.

Тетразин-альгинат (Alg-Tz)

Один грамм альгината Pronova UP MVG растворяли в 0,1 М буфера на основе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES) в течение ночи при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Затем к раствору альгината добавляли 126 мг гидрохлорида (4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенилметанамина (тетразина). 1464 мг гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) и 1085 мг N-гидроксисукцинимида (NHS) по отдельности растворяли в 20 мл буфера MES и добавляли к раствору альгината-тетразина, и обеспечивали протекание реакции в течение 24 часов при комнатной температуре. Через 24 часа раствор гасили с помощью 311 мг гидроксиламина в течение 30 мин и центрифугировали при максимальном значении об./мин в течение 10 минут. Затем раствор фильтровали (фильтр с размером пор 0,22 мкм) и подвергали диализу в последовательных солевых банях объемом 5 л (7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0, 0, 0 г/л NaCl) в течение 3 часов при каждой концентрации. Затем раствор дважды фильтровали (фильтр с размером пор 0,22 мкм) и замораживали при -80°C в течение ночи. Затем замороженные растворы лиофилизировали в течение 5 дней и хранили при -20°C до применения в экспериментах.

Составление криогеля

Alg-Tz и Alg-Nb затем растворяли в DIH_2O в концентрации 20 мг/мл с помощью ThermoMixer (37°C, 2000 об./мин) в течение 1 часа. Лапонит отдельно растворяли в течение 1 часа в концентрации 5 мг/мл в DI-H_2O при постоянном перемешивании при комнатной температуре. Затем растворы фильтровали (фильтр с размером пор 0,22 мкм) в стерильных условиях.

Для получения криогелей, не содержащих лапонит, раствор Alg-Tz и растворы Alg-Nb затем добавляли вместе в соотношении 1:1 наряду с требуемым количеством VEGF-C и разбавляли до получения конечной концентрации 10 мг/мл (10 мкг VEGF-C/гель).

Для получения составов на основе криогеля, содержащих лапонит, растворы VEGF-C (исходный раствор 3 мг/мл) и лапонита (Laponite XLG) (исходный раствор 5 мг/мл) совместно инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем добавляли раствор Alg-Tz и растворы Alg-Nb в соотношении 1:1 и разбавляли до конечной концентрации 10 мг/мл (конечная концентрация лапонита 0,25 мг/мл, 10 мкг VEGF-C/гель). 50 мкл смеси криогеля и VEGF-C, содержащей или не содержащей лапонит, немедленно вносили пипеткой в формы из PEEK и замораживали при -20°C в течение ночи. Перед инъекцией гели размораживали при комнатной температуре в формах и затем помещали в иглы для шприца 16 калибра. Затем иглы с гелями помещали в шприцы объемом 1 мл со 100 мкл стерильного PBS.

Высвобождение VEGF-C из альгинатных криогелей in vitro

Исследовали скорость высвобождения VEGF-C из составов на основе альгинатного криогеля, содержащих лапонит, in vitro. Как описано выше, альгинатный жидкий форполимер смешивают с лапонитом и VEGF-C, затем замораживают и снова размораживают перед инъекцией с получением пористой матрицы (**фиг. 21A**).

Сначала измеряли высвобождение VEGF-C из альгинатных криогелей, содержащих и не содержащих лапонит. Различные типы альгинатных гелей, содержащих VEGF-C (10 мкг белка), получали для применения в анализе высвобождения VEGF-C: нанопористый альгинат (гелификация происходит без криогелирования, поэтому макромасштабные поры не образуются), альгинатный криогель (после замораживания и криогелирования, пористый) и альгинатный криогель с 0,25% лапонитом. Для осуществления анализа высвобождения криогели с VEGF-C (10 мкг белка ± 0,25 мг/мл лапонита) инкубировали при 37°C в 1 мл буфера для высвобождения (1% раствор BSA в PBS). Буфер для высвобождения полностью удаляли и заменяли в различные моменты времени в ходе всего эксперимента в диапазоне от 0 до более чем 500 часов после добавления буфера для высвобождения. Образцы буфера для высвобождения, которые были собраны, хранили при -80°C до размораживания для использования в ELISA VEGF-C. Как показано на **фиг. 21B**, альгинатный криогель с 0,25% лапонитом демонстрировал наиболее контролируемое и наиболее длительное высвобождение VEGF-C in vitro.

Затем измеряли модулирование высвобождения VEGF-C in vitro из альгинатного криогеля с 0,25% лапонитом, нагруженного 10 мкг или 50 мкг VEGF-C, или альгинатного криогеля с 0,5% лапонитом, нагруженного 50 мкг VEGF-C. Как продемонстрировано на

фиг. 21C, приблизительно 30% общего VEGF-C высвобождалось из гелей, и альгинатный криогель с 0,25% лапонитом демонстрировал наиболее контролируемый профиль высвобождения.

Криогель инъецировали мышам подкожно с помощью иглы 16G. На **фиг. 21D** продемонстрирована успешная имплантация криогеля в кожу мыши.

*Исследование криогелей с VE*GF-C in vivo

Способность VEGF-C, доставляемого с помощью криогеля (0,25 мг/мл лапонита), имплантироваться и индуцировать лимфангиогенез, а также осуществлять привлечение Т-клеток in vivo исследовали у мышей. В данных сериях экспериментов исследуют способность различных вариантов VEGF-C, включая содержащие мутацию C137A, и вариантов VEGF-C, полученных различными способами, индуцировать лимфангиогенез. Также исследовали способность различных количеств криогеля с VEGF-C индуцировать лимфангиогенез и осуществлять привлечение Т-клеток у мышей дикого типа и мышей NSG с ослабленным иммунитетом, которым инъецировали мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека.

Сначала криогели (0,25 мг/мл лапонита), содержащие 10 мкг различных форм VEGF-C, включая димерные формы основных и минорных зрелых форм дикого типа (#2 и #7 соответственно) и основных и минорных зрелых форм, которые содержат мутацию C137A (#9 и #8 соответственно), инъецировали мышам в поверхностные слои дермы (N=5/группа) в день 0. В день 14 мышей умерщвляли, и кожу с криогелем (объединенные образцы) нарезали для расщепления и FACS-анализа (**фиг. 22A**). В частности, ткани собирали от мышей, взвешивали и нарезали на очень мелкие кусочки с помощью ножниц. Затем образцы подвергали ферментативному расщеплению при постоянном перемешивании в среде для расщепления, содержащей коллагеназу 4 типа и ДНКазу 1. Затем образцы пипетировали движениями вверх и вниз. После пипетирования к образцам добавляли среду для расщепления, содержащую коллагеназу D и ДНКазу 1. Образцы пипетировали движениями вверх и вниз в течение 3 циклов. Добавляли EDTA (5 мМ), и клетки фильтровали через фильтры с размером пор 70 мкм и сито с размером ячеек 40 мкм и ресуспендировали в Fc-блокирующем буфере. Клетки промывали и окрашивали для FACS-анализа.

Иллюстративные графики FACS для лимфатических эндотелиальных клеток (LEC) ($CD31^+$, $PDPN^+$), выделенных в день 14 после инъекции криогеля, предварительно гейтировали по FSC-A/SSC-A и $CD45^-$ (**фиг. 22B**), и на них показано, что индуцировался лимфангиогенез in vivo. Величину лимфангиогенеза в коже мыши количественно определяли в виде количества LEC на мг ткани, как показано на **фиг. 22C**. Использование ковалентных димеров основных и минорных зрелых форм, которые содержат мутацию C137A (#9 и #8 соответственно), приводило к большему количеству LEC по сравнению с димерами основных и минорных зрелых форм, относящихся к дикому типу (#2 и #7 соответственно), и, таким образом, приводило к более высоким уровням лимфангиогенеза in vivo после имплантации криогеля (**фиг. 22C**).

Кроме того, исследовали функциональные свойства варианта #8 VEGF-C (минорной зрелой формы с мутацией C137A), полученного в клетках CHO MaKo, как описано выше, in vivo и сравнивали с такой же мутантной формой, полученной в клетках HEK. Оба варианта #8 демонстрировали сопоставимую активность в анализе разрастания HDLEC in vitro, несмотря на то, что были получены в разных типах клеток. Вариант #8 VEGF-C, полученный в клетках CHO MaKo, обладал способностью индуцировать лимфангиогенез in vivo, как показано на **фиг. 24B**, по сравнению с контролем с чистым криогелем, который не содержит VEGF-C. Затем сопоставимую биологическую активность двух вариантов #8, полученных в различных типах клеток, также подтверждали in vivo посредством окрашивания LEC после расщепления кожи через 14 дней после доставки криогеля (**фиг. 24C**). Лимфангиогенез количественно определяли в виде общего количества LEC/мг ткани у мышей, которым инъецировали чистый криогель (без VEGF-C) или криогель, нагруженный вариантом #8 VEGF-C, полученным в клетках HEK (8HEK), или вариантом #8 VEGF-C, полученным в клетках MaKo (#8CHO). На клетки эндотелия кровеносных сосудов (BEC) (CD45- CD31+ PDPN-) не влияла доставка варианта #8 VEGF-C независимо от того, в каком типе клеток он был получен. Также наблюдали, что пик лимфангиогенеза соответствовал повышению уровней LEC и пику иммунной инфильтрации CD4 и CD8 Т-клеток (CD45+) в коже над криогелями в день 14 после доставки криогеля с вариантом #8 VEGF-C независимо от того, в каком типе клеток он был получен.

Кроме того, измеряли ответ кожных лимфатических сосудов на 10 мкг VEGF-C, доставляемых с помощью альгинатных криогелей. Мышам инъецировали альгинатные криогели с VEGF-C (N=12) или чистые криогели (не содержащие VEGF-C) (N=10), синтезированные, как упоминалось ранее. Кожу с гелями от мышей собирали, как описано выше, в моменты времени, представляющие собой дни 7, 14 и 21, расщепляли и окрашивали для FACS. LEC гейтировали по $CD45^-$ $CD31^+$ $PDPN^+$. BEC гейтировали по $CD45^-$ $CD31^+$ $PDPN^-$. CD4 и CD8 Т-клетки гейтировали по $CD45^+$ $CD11b^-$ $CD11c^-$ $Thy1^+$. Также количественно определяли число клеток на мг ткани.

На **фиг. 23A** изображены дозозависимый эффект VEGF-C, загруженного в альгинатные криогели (1, 10, 20, 50 мкг), in vivo и индуцирование лимфангиогенеза (представленное в виде показателей общего количества лимфатических эндотелиальных клеток (LEC)/мг ткани, верхний график), а также динамика лимфангиогенеза после доставки 10 мкг VEGF-C (нижний график). Данные результаты указывали на то, что 10 мкг VEGF-C индуцировали высокий уровень лимфангиогенеза in vivo, и что пик лимфангиогенеза наблюдался через 14 дней после подкожной доставки криогеля. Иллюстративные графики результатов окрашивания LEC (CD45- CD31+ PDPN+) и клеток эндотелия кровеносных сосудов (BEC, CD45- CD31+ PDPN-), выделенных после расщепления кожи мышей C57/BL6 через 14 дней после имплантации геля (**фиг. 23B**), а также количественное определение эндотелиальных клеток в виде показателей общего количества клеток/мг ткани (**фиг. 23C**) также указывали на то, что 10 мкг VEGF-C

индуцировали высокий уровень лимфангиогенеза in vivo по сравнению с контролями с чистым гелем, которые не содержали VEGF-C. Более того, результат количественного определения, представленный в виде показателей общего количества клеток/мг ткани, для CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток демонстрировал, что инфильтрация Т-клетками также увеличивалась после доставки альгинатного криогеля с 10 мкг VEGF-C, и количество LEC коррелировало с Т-клеточными инфильтратами, особенно необученного фенотипа (CD62L+, CD44-). Как показано на **фиг. 23E**, пик лимфангиогенеза наблюдался через 14 дней после подкожной доставки альгинатного криогеля с VEGF-C, и пиковое количество Т-клеточных инфильтратов также наблюдалось в день 14.

Исследовали способность VEGF-C индуцировать лимфангиогенез у мышей NSG с ослабленным иммунитетом и способность LEC мыши эффективно осуществлять привлечение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека. Как показано на **фиг. 25A,** мышам C57B6 инъецировали криогели с VEGF-C/0,25% лапонитом (N=5) либо чистые криогели (N=5), и их оценивали в отношении лимфангиогенеза в день 14. Кроме того, мышам NSG инъецировали криогели с VEGF-C (N=5) для сравнения пролиферации LEC между иммунокомпетентными мышами (C57Bl6) и мышами с ослабленным иммунитетом (NSG). Иллюстративные графики проточной цитометрии для окрашивания LEC кожи и BEC у мышей NSG, C57/BL6 через 14 дней после доставки VEGF-C или чистых криогелей демонстрировали увеличение количества LEC и, таким образом, более высокий уровень лимфангиогенеза in vivo после доставки криогелей с VEGF-C у мышей NSG и C57B6 (**фиг. 25A**). Как показано на **фиг. 25B**, мышам NSG в день 0 инъецировали криогели VEGF-C (N=5) либо чистые криогели (N=5). В день 10 всем мышам инъецировали PBMC через их латеральную хвостовую вену. Через семь дней после инъекции PBMC ткань кожи с гелем собирали для расщепления и FACS-анализа. LEC гейтировали по CD45 человека$^-$ CD11b мыши$^-$ CD31 мыши$^+$ PDPN мыши$^+$. CD4 и CD8 Т-клетки гейтировали по CD45 человека$^+$ CD11b мыши$^-$ CD3 человека$^+$. B-клетки гейтировали по CD45 человека$^+$ CD11b мыши$^-$ CD3 человека$^-$ CD19+ человека. Эти данные демонстрируют, что количество всех из CD3+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток и B-клеток увеличивалось в коже мышей NSG, которым вводили криогели с VEGF-C, по сравнению с контролями с чистым криогелем (без VEGF-C), и что Т-клетки представляли собой основной тип клеток PBMC, привлекаемых у мышей NSG.

В совокупности эти данные указывают на то, что альгинатные криогели, содержащие VEGF-C с лапонитом или без него, обладали способностью локально индуцировать лимфангиогенез и привлечение Т-клеток в участке введения криогеля in vivo.

Пример 3. Синтез MSR для трансдукции Т-клеток с получением CAR-Т-клеток

В данном примере описывается синтез мезопористых стержней из кремнезема (MSR). Мезопористые частицы кремнезема (MSP), такие как MSR, можно применять, например, для содействия доставке вирусного вектора, кодирующего CAR, в участок у пациента, который подвергался лимфангиогенезу, обусловленному введением криогеля с

VEGF-C, описанного выше.

Синтез MSR осуществляли посредством первоначального растворения поверхностно-активного вещества поли(этиленгликоль)-блок-поли(пропиленгликоль)-блок-поли(этиленгликоля) со средней Mn ~ 5800 (Pluronic P-123, 80,0 г, 487 ммоль; Sigma) в 3 л 1,6 M HCl при комнатной температуре, которое затем нагревали до 40°C в колбе с рубашкой объемом 5 л и механически перемешивали с помощью верхнеприводной мешалки со скоростью 0-600 об./мин. Тетраэтилортосиликат (TEOS, 184 мл, 826 ммоль; Sigma) добавляли в одну часть в течение < 5 мин. и нагревали при 40°C, продолжая перемешивать, в течение по меньшей мере 2 часов, но чаще всего в течение 20 часов. Полученную взвесь нагревали до 80-130°C в течение 6-72 часов для гидротермической обработки перед охлаждением до комнатной температуры. Взвесь фильтровали через воронку Бюхнера, и промывали деионизированной водой и затем этанолом, и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Полученный кремнеземный материал обжигали в печи при медленном наращивании температуры от комнатной температуры до 550°C в течение 8 часов и затем поддерживали при 550°C в течение еще 8 часов перед охлаждением до комнатной температуры с получением 47 г мезопористых частиц кремнезема.

Изменения в скорости перемешивания могут обуславливать изменения в соотношении размеров микрочастицы. Варьирование условий температуры и продолжительности гидротермической обработки представляет собой часто используемый способ регулирования размера пор для мезопористых материалов.

Характеристики конечных мезопористых материалов определяли с помощью световой микроскопии, Malvern Morphologi G3, сканирующей электронной микроскопии (SEM), термогравиметрического анализа (TGA).

Микрочастицы, функционализированные с помощью N, N,N-триметилпропан-1-аммония

Хлорид триметоксисилилпропилтриметиламмония (3,61 мл, 6,51 ммоль; 50% раствор в метаноле) добавляли к взвеси 1,0 г мезопористых микрочастиц кремнезема в 150 мл этанола, чистого для анализа, и нагревали до 75 градусов Цельсия в течение 7 часов. После охлаждения до комнатной температуры взвесь фильтровали, и частицы промывали деионизированной водой и затем этанолом, а потом высушивали в печи при 100 градусах Цельсия в течение 20 часов с получением микрочастиц, функционализированных с помощью N, N,N-триметилпропан-1-аммония, называемых в данном документе "MSR с триметиламмонием".

Уменьшение размера MSR

Длина исходных вариантов MSR составляла примерно 100-200 мкм после синтеза. MSR гомогенизировали для уменьшения их размера и улучшения инъекционной способности. В частности, для улучшения инъекционной способности при прохождении через шприц для инсулина 28,5 калибра сухие MSR гомогенизировали в ударной мельнице с гранулами MP FastPrep-24 5G и системе для лизиса в течение 80 секунд **(фиг.**

30). Как показано на **фиг. 30A**, уменьшение размера наблюдалось в отношении длины MSR, что позволяет осуществлять инъекцию во внутридермальное пространство с помощью иглы с меньшим диаметром. Затем MSR автоклавировали и хранили при комнатной температуре до применения.

Загрузка лентивируса на MSR и определение характеристик комплекса MSR+вирусный вектор

Партии гомогенизированных MSR ресуспендировали при 10 мг/мл в ледяном буфере Tris-NaCl-EDTA с pH 7,5 (буфере NTE). Требуемый исходный раствор лентивируса (описанный ниже) разбавляли в ледяном буфере NTE до получения требуемого общего количества трансдуцирующих единиц (TU) для загрузки. Суспензию MSR и разбавленный вирус объединяли в соотношениях 1:1 об./об. и инкубировали на льду в течение 30 минут. По меньшей мере две стадии промывания в избытке DPBS осуществляли для удаления избытка вируса до проведения функциональных тестов in vitro или применения in vivo. Для исследований загрузки и удерживания (**фиг. 27-28**) суспензию 2,5 мг/мл MSR смешивали в соотношении 1:1 с раствором, содержащим указанное на фигурах количество вируса, и инкубировали в течение 30 минут на льду. Показатели количества вируса в загрузочных растворах, связанного с MSR и высвобождаемого из MSR, количественно определяли с помощью коммерчески доступного набора, например, набора для использования в qRT-PCR, например, набора Lenti-X для определения титра с помощью qRT-PCR. Для исследований высвобождения комплекс MSR-лентивирус инкубировали в средах при 37°C, и надосадочную жидкость собирали в указанные моменты времени для анализа методом qPCR.

Сначала измеряли емкость нагрузки MSR лентивирусом, кодирующим GFP. MSR с триметиламмонием совместно инкубировали с лентивирусом, экспрессирующим GFP, в различных количествах в соответствии с функциональными титрами, определенным посредством клеточных анализов трансдукции. Определяли характеристики количества вируса в трех фракциях, которые включают загрузочный раствор вируса (исходное вводимое количество, добавленное к MSR), вирус, связанный с MSR (количество, остающееся связанным с MSR после инкубирования и промывания), и несвязанный вирус (количество в растворе, остающееся после совместного инкубирования MSR и вируса). MSR и вирус совместно инкубировали в течение 30 минут на льду, надосадочную жидкость удаляли (несвязанный вирус), и MSR дважды промывали перед оценкой вируса, связанного с MSR. Неиспользованные загрузочные растворы вируса для каждого условия также анализировали. Как показано на **фиг. 27A**, большая часть вируса из вводимого загрузочного раствора вируса удерживалась во фракции вируса, связанного с MSR, после адсорбции и промывания по сравнению с несвязанным вирусом. Количество вируса, адсорбированного на MSR, также увеличивалось по мере увеличения количества вируса в загрузочном растворе вируса. Как показано на **фиг. 27B,** на которой графически представлена процентная доля в вирусном загрузочном растворе в зависимости от функционального титра вируса, расчетная фракция вируса, связанного с MSR, по

сравнению с загрузочным раствором вируса характеризовалась высокой эффективностью загрузки и удерживания на MSR после адсорбции и промывки.

Затем определяли характеристики удерживания вируса на MSR. В частности, лентивирус и MSR совместно инкубировали в течение 30 минут на льду, и MSR дважды промывали. Затем MSR культивировали в среде R10, содержащей 10% FCS, или бессывороточной среде OpTmizer, и вводимый исходный раствор вируса также инкубировали в среде. Надосадочную жидкость удаляли в указанные моменты времени после начала инкубирования и анализировали в отношении общего содержания вируса. Как продемонстрировано на **фиг. 28**, результаты указывают на то, что MSR высвобождают лишь определенную долю вводимого вируса в течение первых 18 часов (вирус на MSR в среде R10 и вирус на MSR в среде OpTmizer) по сравнению с контролями с несвязанным вирусом (вирусом в среде R10 и вирусом в среде OpTmizer).

Пример 4. Трансдукция Т-клеток с помощью MSR, и вирусного вектора, и необязательно STARTERS и функциональное тестирование

В данном примере описывается трансдукция Т-клеток in vitro с помощью вирусного вектора, кодирующего CAR. Без ограничения какой-либо теорией, вирусный вектор вводили совместно с MSR (для стимуляции контролируемого высвобождения вектора), а также необязательно STARTERS (для стимуляции активации Т-клеток).

Трансдукция Т-клеток in vitro с помощью MSR+вирусный вектор+необязательно STARTERS

Т-клетки человека выделяли из лейкоцитарных масс с помощью набора для выделения общей популяции Т-клеток человека Miltenyi и замораживали перед применением. Клетки размораживали и высевали в полную среду OpTmizer в присутствии конструкции 4 STARTERS (**таблица 20, фиг. 48A**). Вирус, кодирующий CAR для CD19 (также называемый CAR19), в виде свободного вируса либо комплексов MSR-вирус добавляли в культуру с последующим инкубированием в течение одного дня. Клетки промывали и высевали на три дополнительных дня перед применением для определения характеристик и функциональных тестов.

Определение характеристик и функциональное тестирование CAR-Т-*клеток*

CAR-Т-клетки анализировали в отношении экспрессии рецептора CAR посредством окрашивания с помощью антиидиотипического антитела к CAR для CD19, конъюгированного с PE, и анализа методом проточной цитометрии.

Для измерения экспрессии CAR для CD19 количественно определяли процентную долю CAR+ клеток в день 4 после трансдукции (**фиг. 29A**). Эффективность трансдукции Т-клеток in vitro была сопоставимой с таковой для Т-клеток, трансдуцированных с помощью CAR-MSR или CAR-свободного (несвязанного вируса) **(фиг. 29A**).

Для измерения функции CD19-CAR-Т-клеток, трансдуцированных с помощью вируса, связанного с MSR, или несвязанного вируса, применяли анализ специфичного уничтожения клеток Nalm6-Luc и анализ высвобождения интерферона-γ (IFN-γ). Nalm6 (RRID: CVCL_0092) представляет собой линию клеток острого лимфобластного лейкоза

(ALL) человека. Клетки выращивали в среде RMPI, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, и выращивали в суспензии. Клетки модифицировали таким образом, чтобы они экспрессировали люциферазу (Nalm6-Luc), так чтобы их присутствие в совместных культурах можно было оценить с помощью сигнала люциферазы. Клетки Nalm6-Luc совместно культивировали при различных соотношениях клеток (соотношениях эффекторов и мишеней (соотношение E:T)) с клетками CD19-CART, полученными с применением свободного вируса или комплексов MSR-вирус (**фиг. 29B-29C**). Сигнал люциферазы в конце 1-дневного совместного культивирования использовали для расчета процентной доли вводимых Nalm6, которые были уничтожены клетками CART. Уровни IFN-γ в надосадочной жидкости в конце совместного культивирования количественно определяли с помощью коммерчески доступного набора.

Результаты данных анализов указывают на то, что активность специфичного уничтожения (**фиг. 29B**) и высвобождение IFN-γ (**фиг. 29C**) в ходе совместного инкубирования в течение 24 часов являлись сопоставимыми для CAR-T-клеток, трансдуцированных с помощью вируса, связанного с MSR (CAR-MSR), и CAR-T-клеток, трансдуцированных с помощью свободного вируса (CAR-свободный), тем самым демонстрируя, что трансдукция с помощью состава с MSR обеспечивает получение в эквивалентной степени функциональных клеток CART in vitro по сравнению с традиционной трансдукцией с помощью свободного вируса.

Затем оценивали эффективность трансдукции для MSR после гомогенизации. MSR гомогенизировали, как описано выше, для обеспечения возможности инъекции с помощью иглы с меньшим диаметром (**фиг. 30A**). Как показано на **фиг. 30B**, на стандартные MSR с триметиламмонием или гомогенизированные MSR адсорбировали лентивирус, и серию разведений данного комплекса получали и применяли для трансдукции Т-клеток с помощью лентивируса, кодирующего GFP. Гомогенизация MSR по существу не изменяла показатели трансдукции in vitro.

Введение криогеля слапонитом с последующим введением MSR+вирусного вектора in vivo

Эксперимент разрабатывали для изучения локализации и распределения криогеля, инъецируемого мышам с последующей инъекцией комплексов MSR-вирус. Чистые альгинатные криогели инъецировали подкожно, и через 7 дней вирусные частицы (4e6 TU), свободные или связанные с MSR, инъецировали во внутридермальное пространство над гелем с помощью шприца для инсулина (для группы, получавшей вирус на MSR) или шприца Гамильтона (для группы, получавшей свободный вирус). Через 72 ч. после доставки вируса мышей умерщвляли, и ткани (кожу и дренирующий лимфатический узел) собирали для иммуногистохимического анализа. Ткани кожи с криогелем, прилегающую кожу и дренирующий лимфатический узел собирали при аутопсии, фиксировали путем погружения в 10% нейтральный забуференный формалин и обрабатывали с получением парафиновых блоков. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для проведения гистологической оценки. Предметные стекла оцифровывали с помощью

сканера для предметных стекол, и получали иллюстративные снимки. На **фиг. 31A-31B** изображен окрашенный гематоксилином и эозином (H&E) срез кожи, содержащий прилегающие друг к другу криогель и MSR.

На **фиг. 31A** изображены окрашенные с помощью H&E срезы, демонстрирующие локализацию подкожного криогеля над поверхностной мышцей в гиподерме. MSR наблюдались в виде слегка эозинофильного зернистого материала в смеси с мононуклеарными клетками, расположенными в дермо-гиподермальном соединении, прилегающем к имплантированному криогелю (см. изображение на **фиг. 31B** в увеличенном масштабе).

На фиг. 32A-32B показана гибридизация in situ для определения мРНК CAR в срезах выделенной кожи мыши. Гибридизацию in situ для выявления транскрипта CAR, а также генов Hs-PPIB (положительный контроль и контроль качества ткани) и DAPB (отрицательный контроль) проводили в срезах ткани, фиксированных формалином и заключенных в парафин. Наборы зондов для положительного контроля PPIB и отрицательного контроля DAPB включали для оптимизации предварительного кондиционирования и обеспечения качества и специфичности мРНК соответственно. Способ гибридизации осуществляли согласно известным протоколам с использованием хромогена 3,3'-диаминобензидина (DAB). Вкратце, срезы ткани толщиной 5 мкм помещали на предметные стекла, подвергали термической обработке в течение 60 минут и использовали для гибридизации. Протокол депарафинизации и регидратации выполняли с использованием устройства для окрашивания. Проводили автономную ручную предварительную обработку в 1X буфере для демаскировки. Оптимизацию осуществляли посредством первоначального оценивания сигнала гибридизации для PPIB и DAPB и последующего применения одинаковых условий для всех предметных стекол. После предварительной обработки предметные стекла переносили в устройство для автоматического окрашивания для завершения процедуры гибридизации, включающей предварительную обработку протеазой; гибридизацию с последующей амплификацией и выявление с помощью HRP и контрастного окрашивания гематоксилином. Предметные стекла оцифровывали с помощью сканера для предметных стекол, и получали иллюстративные снимки.

Как показано на **фиг. 32A,** гибридизация in situ для выявления мРНК-транскрипта CAR демонстрировала устойчивый сигнал в областях, соответствующих инъецированным MSR, у мышей, которым инъецировали вирус, связанный с MSR. Как показано на **фиг. 32B**, с помощью гибридизации in situ выявляли диффузный сигнал в клетках, инфильтрирующих криогель, а также в клетках, прилегающих к нему, в условии со свободным вирусом. Эти данные, по-видимому, подтверждают концепцию о том, что MSR могут поддерживать локализацию вируса в дерме, где Т-клетки инфильтрируют кожу.

На фиг. 33A-33B показано, что у мыши, которой инъецировали вирус на MSR, имелось меньшее количество клеток, положительных в отношении мРНК-транскрипта

CAR, в дренирующем лимфатическом узле по сравнению с группой, получавшей свободный вирус. Гибридизацию in situ для определения мРНК CAR осуществляли, как описано выше, в срезах дренирующего лимфатического узла (dLN). С помощью данной гибридизации in situ выявили только одну клетку, положительную в отношении мРНК-транскрипта CAR, в dLN мышей, которым инъецировали вирус, связанный с MSR (**фиг. 33A**), тогда как у мышей, которым инъецировали свободный вирус, наблюдалось незначительное количество клеток, положительных в отношении мРНК-транскрипта CAR, в субкапсулярном синусе, что соответствовало локальному оттоку вируса или клеток из участка имплантации криогеля (**фиг. 35B**). Данное исследование демонстрировало, что составы на основе вируса на MSP ограничивали отток вируса в дренирующий лимфатический узел, за счет чего уменьшалась потенциальная трансдукция за пределами заданного участка и улучшалась безопасность.

Загрузка вируса и STARTERS на MSR для применения in vivo

STARTERS (в частности, конструкцию 2 STARTERS, показанную в **таблице 20, фиг. 37A**) и MSR с триметиламмонием совместно инкубировали для обеспечения адсорбции средства для активации клеток на поверхности MSR. Белковую конструкцию 2 STARTERS добавляли к суспензии 8 мг/мл MSR с триметиламмонием и инкубировали в течение 1 часа при 4°C. Нагруженные MSR промывали три раза и ресуспендировали в DPBS до получения конечной концентрации 15 мг/мл MSR. Буферный раствор NTE, содержащий лентивирус, кодирующий CAR для CD19, смешивали с суспензией 10 мг/мл MSR с триметиламмонием и инкубировали в течение 30 минут при 4°C. MSR промывали два раза и ресуспендировали в DPBS до получения конечной концентрации 15 мг/мл MSR. Наконец, MSR энергично пипетировали движениями вверх и вниз, загружали обратно в шприцы для инсулина и немедленно инъецировали мышам внутридермально.

В совокупности эти данные указывают на то, что вирус, связанный с MSR, совместно с конструкцией STARTERS обладал способностью эффективно трансдуцировать Т-клетки с получением функциональных CAR-Т-клеток. Соответственно, в данном документе предусмотрена доставка VEGF-C в кожу мыши с получением вторичного участка примирования для Т-клеток, подлежащих обучению и трансдукции после инъекции вирусных частиц, связанных с мезопористыми стержнями из кремнезема (MSR), в комбинации со STARTERS, связанными с MSP (**фиг. 26A**), или свободного вируса в комбинации со STARTERS, связанными с MSR (**фиг. 26B**).

Пример 5. Изготовление CART in vivo

Проводили исследование для демонстрации вирусной трансдукции Т-клеток человека с помощью лентивируса, кодирующего CAR для CD19, в мышиной модели in vivo . В частности, криогель с VEGF-C (0,25 мг/мл лапонита) вводили мышам для стимуляции лимфангиогенеза и привлечения Т-клеток. Затем вводили комбинацию вирусного вектора, кодирующего CAR для CD19, MSR и STARTERS для активации и трансдукции Т-клеток в области, которая подвергалась лимфангиогенезу.

Способы

Исследование на мышах и анализ методом проточной цитометрии

Мышам NSG (N=45) инъецировали криогели с VEGF-C в день 0 и PBMC в день 10 путем инъекции в хвостовую вену. Через семь дней в день 17 мышам интрадермально инъецировали: 1) PBS (N=15 в общей сложности/5 для FACS-анализа конечных точек), либо 2) MSR с конструкцией 2 STARTERS (инъекция объемом 10 мкл 15 мг/мл эквивалента MSR, полученного, как описано выше) и затем свободного лентивируса, кодирующего CAR для CD19 (инъекция объемом 10 мкл, содержащая 4,26e6 TU вируса, через 1 час после инъекции STARTERS) (N=15 в общей сложности/6 для FACS-анализа конечных точек), либо 3) связанный с MSR лентивирус, кодирующий CAR для CD19, смешанный в соотношении 1:1 с MSR с конструкцией 2 STARTERS (однократная инъекция объемом 20 мкл 15 мг/мл MSR) (N=15 в общей сложности/5 для FACS-анализа конечных точек (**фиг. 34A**). STARTERS на MSR применяли для стимуляции активации Т-клеток и трансдукции Т-клеток. В день 14 3 или 4 мыши из каждой группы умерщвляли и анализировали в отношении лимфангиогенеза в области кожи с инъецированным криогелем. В день 35 мышей умерщвляли, и селезенку и кровь собирали для определения того, вызывает ли доставка вируса, кодирующего CAR для CD19, in vivo трансдукцию этих Т-клеток, привлекаемых посредством лимфангиогенеза, индуцированного с помощью VEGF-C, и поиска клеток, подвергнутых локальной и системной трансдукции (N=3/группа/момент времени). У мышей периодически собирали кровь для FACS-анализа циркулирующих CD19-CAR+ клеток в дни 25, 30, 35. Наконец, мышей умерщвляли в день 35 для FACS-анализа кожи с криогелем и селезенки с целью поиска размножения CART и истощения популяции В-клеток. Истощение популяции В-клеток и CAR-Т-клетки также количественно определяли в селезенке мышей во всех группах.

ISH-*окрашивание CAR*

Гибридизацию in situ с использованием зонда RNAscope 2.5 VS для 3-UTR CAR (№ по каталогу 438289) для выявления мРНК-транскриптов CAR, а также зонда 2.5 VS для Hs-PPIB (положительный контроль и контроль качества ткани (№ по каталогу 313909)) и зонда 2.5 VS для DAPB (отрицательный контроль (№ по каталогу 3120390) выполняли на блоках с использованием реагентов и оборудования, поставляемых Advanced Cell Diagnostics (ACDBio) (Хейвард, Калифорния) и Ventana Medical Systems (Roche, Тусон, Аризона). Наборы зондов для положительного контроля PPIB и отрицательного контроля DAPB включали для обеспечения качества и специфичности мРНК соответственно. Способ гибридизации осуществляли согласно протоколам, установленным ACDBio и Ventana systems, с использованием хромогена 3,3'-диаминобензидина и оптимизировали для исследуемых тканей. Вкратце, срезы толщиной 5 мкм подвергали термической обработке при 60 градусах в течение 60 минут и использовали для гибридизации. Протокол депарафинизации и регидратации выполняли с использованием устройства для окрашивания Sakura Tissue-Tek DR5 со следующими стадиями: 3-кратная обработка ксилолом в каждом случае в течение 3 минут; 2-кратная обработка 100% спиртом в течение 3 минут; высушивание на воздухе в течение 5 минут. Проводили автономную

ручную предварительную обработку в 1X буфере для демаскировки при 98-104 градусах Цельсия в течение 15 минут. Оптимизацию осуществляли посредством первоначального оценивания сигнала гибридизации для PPIB и DAPB и последующего применения одинаковых условий для всех предметных стекол. После предварительной обработки предметные стекла переносили в устройство для автоматического окрашивания Ventana Ultra для завершения процедуры ISH, включающей предварительную обработку протеазой; гибридизацию при 43 градусах Цельсия в течение 2 часов с последующей амплификацией и выявление с помощью HRP и контрастного окрашивания гематоксилином.

IHC-*окрашивание на Т-клетки*

Иммуногистохимическое окрашивание на CD3, включающее стадии депарафинизации и демаскировки антигена, выполняли с помощью устройства для автоматического окрашивания Ventana Discovery XT с помощью стандартных реагентов Ventana Discovery XT (Ventana, Индианаполис, Индиана) с использованием клона моноклонального антитела кролика 2GV6 (Ventana, № по каталогу 790-431). Предметные стекла депарафинизировали, а затем подвергали термоиндуцированной демаскировке антигена посредством покрытия их раствором 1 для кондиционирования клеток (CC1/pH8) согласно стандартному протоколу демаскировки Ventana. Предметные стекла инкубировали с первичным антителом или неиммунным изотипически сходным отрицательным контролем. Визуализацию осуществляли посредством инкубирования с реагентом HRP Ventana Discovery OmniMap и последующей обработки 3,3'-диаминобензидином (DAB) Ventana Discovery ChromoMap. Контрастное окрашивание выполняли с помощью гематоксилина Ventana и реагента Bluing Ventana в течение 4 минут в каждом случае. Предметные стекла подвергали дегидратации, очищали и накрывали покровными стеклами с использованием синтетической среды для заключения препаратов.

Протокол IF-окрашивания - ткань мыши для мультиплексирования CART in vivo

В день 1 предметные стекла промывали и затем блокировали в течение ночи при 4°C. В день 2 предметные стекла инкубировали с Fab-фрагментом антитела козы к IgG мыши (H+L) AffiniPure и затем с меченным Alexa Fluor® 647 антителом к CD19 в течение ночи при 4°C. В день 3 предметные стекла промывали и затем инкубировали с меченным Alexa Fluor® 488 антителом к CD3-дзета в течение ночи при 4°C. В день 4 предметные стекла промывали, подвергали контрастному окрашиванию с помощью DAPI и затем снова промывали. Предметные стекла заключали под покровные стекла, помещали в холодильник на по меньшей мере 24 часа перед визуализацией.

Результаты

Как показано на **фиг. 38**, Т-клетки эффективно привлекались вокруг участка имплантации в коже мыши и в области, окружающей гель. Результаты исследования CAR с помощью ISH показали, что некоторые мононуклеарные клетки (как следует из фенотипа, по всей вероятности, Т-клетки) в данном участке были трансдуцированы с

помощью лентивирусного вектора, который кодирует CAR (**фиг. 39**). Экспрессию РНК CAR также наблюдали в некоторых эндотелиальных клетках (по всей вероятности, лимфатических сосудов) (**фиг. 39**). Однако экспрессия белка CAR для CD19 на клеточной поверхности, анализируемая с помощью проточной цитометрии, подтверждалась почти исключительно на Т-клетках, за исключением незначительного количества клеток-моноцитов человека, что указывало на то, что имела место минимальная трансдукция клеток, отличных от Т-клеток, с помощью свободного вируса и вируса на MSR (**фиг. 35**).

Полученные локально CAR-Т-клетки мигрировали в селезенку (**фиг. 40**). Как показано на **фиг. 34B**, CAR-Т-клетки, а также значительное снижение количества В-клеток выявлялись у тех мышей, которые получали (a) свободный вирус и MSR, связанные с конструкцией 2 STARTERS, или (b) связанный с MSR лентивирус, кодирующий CAR для CD19, смешанный в соотношении 1:1 с MSR с конструкцией 2 STARTERS. Число В-клеток в селезенке обратно коррелировало с числом CAR-Т-клеток (которые были в основном CD8+) в селезенке (**фиг. 34C и 36A**), а также в крови (**фиг. 36B**), что подтверждало то, что истощение популяции В-клеток было обусловлено CD19-специфичными CAR-Т-клетками, полученными in vivo. Как показано на **фиг. 41A-41B**, В-клетки в непосредственной близости от Т-клеток имели сморщенную и патологическую форму, что указывало на гибель клетки, тогда как В-клетки, которые еще не вступили в контакт с CD19-специфичными Т-клетками, демонстрировали нормальный фенотип (округлые и более крупные клетки с окрашиванием CD19 только на клеточной поверхности). Т-клетки, окрашенные с помощью антитела к CD3 (точечное окрашивание), по всей вероятности, представляли собой CAR-Т-клетки, даже при том, что совместное окрашивание с помощью зонда для CAR не проводилось.

Данное исследование демонстрирует, что функциональные CAR-Т-клетки можно получать in vivo после локального введения криогеля, содержащего фактор роста/привлечения клеток, например, VEGF-C, для индуцирования лимфангиогенеза и привлечения Т-клеток, которые затем впоследствии подвергаются трансдукции с помощью вируса, связанного с MSR, или свободного вируса и STARTERS, связанной с MSR.

Пример 6. Дополнительное исследование, в ходе которого тестируют изготовление CART in vivo

В данном примере дополнительное исследование, изложенное на **фиг. 42A**, проводили для тестирования изготовления CART in vivo. Способы аналогичны описанным в примере 5. Вкратце, мышам NSG подкожно инъецировали криогель с VEGF-C (0,25 мг/мл лапонита) в день -24 и PBMC человека в день -14. В день 0 мышам внутридермально инъецировали: 1) свободный вирус и MSP с конструкцией 2 STARTERS (называемые группой, получавшей свободный вирус), 2) MSP с вирусом и MSP с конструкцией 2 STARTERS (называемые группой, получавшей вирус на MSP) или 3) PBS и MSP с конструкцией 2 STARTERS (называемые группой, получавшей PBS). Четвертая группа мышей получала чистый криогель в день -24 и свободный вирус, а также чистые

MSP в день 0 (называемые контрольной группой, получавшей свободный вирус). Первые две группы (группа, получавшая свободный вирус, и группа, получавшая вирус на MSP) называются группами полной комбинации или группами, получавшими полную комбинацию для обработки. Дозу вируса увеличивали от 4e6 TU (пример 5, фиг. 34A) до 1,1e7 TU (пример 6, фиг. 42A).

Как показано на **фиг. 42B**, число циркулирующих CD45 клеток человека увеличивалось с течением времени. Виды полной комбинации для обработки (прямоугольник со сплошной линией, белые и черные кружки) дополнительно стимулировали размножение Т-клеток, в частности CD8+ Т-клеток, по сравнению с контрольными мышами (прямоугольник с пунктирной линией, серые треугольники, белый ромб). В отличие от исследования, описанного в примере 5 (инъекция вируса через 17 дней после инъекции VEGF-C и через 7 дней после инъекции PBMC), в этом новом исследовании инъекция вируса была отложена до прошествия 24 дней после инъекции VEGF-C и 14 дней после инъекции PBMC. Данная модификация приводила к повышению единообразия получения CAR-Т-клеток, вероятно вследствие более высокой плотности Т-клеток вокруг имплантата криогеля с VEGF-C в данный более поздний момент времени (день 24).

Как показано на **фиг. 43A**, у мышей, обработанных полной комбинацией для обработки (прямоугольник со сплошной линией, белые и черные кружки), с течением времени увеличивалось число полученных in vivo CD3+ CAR+ Т-клеток человека, в частности CAR-Т-клеток с фенотипом CD8, по сравнению с контрольными мышами (прямоугольник с пунктирной линией, серые треугольники, белый ромб). В соответствии с увеличением числа CAR-Т-клеток наблюдалось уменьшение числа В-клеток в кровотоке с течением времени по сравнению с контролем с PBS (**фиг. 43B**, верхняя панель). Группы, получавшие вирус на MSP и свободный вирус, демонстрировали сходные результаты, тогда как контрольная группа, получавшая свободный вирус (**фиг. 43B**, нижняя панель) также демонстрировала частичное истощение популяции В-клеток, хотя и не в такой же степени, как группы, получавшие полную комбинацию. Действительно, число циркулирующих CAR-Т-клеток у мышей из контрольной группы, получавшей свободный вирус, было не таким высоким, как число в группах, получавших полную комбинацию.

Сообразно результатам, описанным в примере 5, это новое исследование также продемонстрировало сильную корреляцию между размножением CAR-Т-клеток и истощением популяции В-клеток в крови (**фиг. 44A**) и в селезенке (**фиг. 44B**). Тогда как контрольная группа, получавшая свободный вирус, демонстрировала промежуточный уровень истощения популяции В-клеток в циркулирующей крови (**фиг. 44A**), данная контрольная обработка не приводила к эффективному истощению популяции В-клеток в селезенке (**фиг. 44B**). Присутствие CAR-Т-клеток, особенно фенотипа CD8, соответствовало истощению популяции В-клеток в селезенке (**фиг. 45A-45B**) и в коже (**фиг. 46A-46C**) обработанных мышей. В коже размножение CAR-Т-клеток также коррелировало с лимфангиогенезом согласно измерению по числу лимфатических

эндотелиальных клеток (LEC) (**фиг. 46D**).

Таким образом, данное исследование демонстрирует, что способы изготовления CART in vivo, описанные в данном документе, можно применять для получения функциональных CART, размножение которых коррелирует с истощением популяции B-клеток.

Пример 7. Совместная доставка вируса и STARTERS с помощью MSP

В данном примере изучается совместная доставка вируса и STARTERS с помощью одного и того же MSP. Вкратце, MSP одновременно совместно инкубировали с лентивирусным вектором, который кодирует GFP, и конструкцией 1 STARTERS (**таблица 20**, **фиг. 48A**). После совместного инкубирования и промывания нагруженные вирусом и STARTERS MSP подвергали серийному разведению перед инкубированием с Т-клетками в 96-луночном плоскодонном планшете. Как показано на **фиг. 47**, совместная доставка вируса и STARTERS с помощью MSP приводила к успешной экспрессии трансгена в общей популяции первичных Т-клеток.

Пример 8. Получение молекул STARTERS

В данном примере описывается получение полиспецифических молекул, которые содержат домен, связывающий CD3, и домен, связывающий костимулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления домен, связывающий костимулирующую молекулу, связывается с CD28, CD2, CD25, CD27, IL6Ra, IL6Rb, ICOS или 4-1BB. Такие молекулы называются молекулами STARTERS.

Был получен ряд конфигураций биспецифических антител к CD3/CD28 или CD3/CD2 и их мультимерных конъюгатов. Схема таких молекул представлена на **фиг. 48A-48B** (конструкции 1-17, также называемые F1 - F17; молекулы STARTERS первого поколения). Последовательности конструкций 1-17 и их связывающие домены раскрыты в **таблице 19** и **таблице 20**.

Кроме того, получали молекулы STARTERS второго поколения для тестирования связывающих средств, нацеливающихся на различные костимулирующие молекулы (например, CD25, IL6Rb, CD27, 4-1BB, ICOS или CD2). Также сравнивали различные CD3-связывающие средства (связывающие средства на основе антитела к CD3 (1) или антитела к CD3 (2)). Все молекулы STARTERS второго поколения (**фиг. 49A**) имеют конфигурацию, показанную на **фиг. 49B**. Последовательности различных связывающих средств для молекул STARTERS второго поколения можно найти в **таблице 19**.

Без ограничения какой-либо теорией, снижение связывания молекул STARTERS с FcR может приводить к уменьшению или предотвращению нежелательного уничтожения клеток, экспрессирующих FcR, Т-клетками. Молекулы STARTERS третьего поколения получали посредством введения замен D265A/N297A/P329A (нумерация EU в соответствии с Kabat) ("DANAPA") в Fc-область IgG1. Кроме того, также сравнивали различные CD3-связывающие средства (связывающие средства на основе антитела к CD3 (1), антитела к CD3 (2) или антитела к CD3 (3)) и различные CD28-связывающие средства (связывающие средства на основе антитела к CD28 (1) или антитела к CD28 (2)) (**фиг.**

50A). Все молекулы STARTERS третьего поколения имеют конфигурацию, показанную на **фиг. 50B**. Последовательности молекул STARTERS третьего поколения и их связывающие домены можно найти в **таблице 19** и **таблице 20**.

Было показано, что молекулы STARTERS опосредуют трансдукцию Т-клеток с помощью лентивирусного вектора, который кодирует CAR.

Иллюстративные способы анализа активности STARTERS раскрыты, например, в примерах 16-19 и 22-23 в PCT/US2021/019889, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Пример J. Применение молекулы STARTERS в изготовлении CART in vivo

В данном примере описывается определение характеристик молекулы STARTERS для применения в изготовлении CART in vivo. Данная молекула STARTERS представляет собой биспецифическую молекулу антитела к CD3/CD28, содержащую антитело к CD28, слитое с scFv для CD3 (фиг. 51A). Данная молекула STARTERS содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 726, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 728. Fc-область данной молекулы STARTERS содержит мутации L234A/L235A/S267K/P329A, пронумерованные в соответствии с системой нумерации Eu.

В ходе первого исследования in vitro молекулу STARTERS тестировали в отношении ее способности опосредовать активацию и трансдукцию Т-клеток при ее доставке с помощью MSP. Вкратце, выделенные Т-клетки размораживали и ресуспендировали при 1e6 клеток/мл в бессывороточной среде для Т-клеток со 100 единицами/мл IL2 перед добавлением в 96-луночный планшет. 20 мг каждой партии MSP ресуспендировали при 30 мг/мл в PBS в модификации Дульбекко (Thermo: № 14190144), и 1,5 мг MSP (или равный объем DPBS) добавляли в пробирки Eppendorf. В те же пробирки Eppendorf добавляли 2,1 мкг STARTERS. Лентивирус размораживали на льду и разбавляли до 1,4e8 TU/мл с помощью DPBS перед добавлением 7e7 TU вируса в каждую из вышеупомянутых пробирок. После инкубирования смесей при 4°C в течение одного часа их подвергали серийному разведению с помощью среды для Т-клеток перед введением в высеянные Т-клетки. Компоненты совместно культивировали с Т-клетками в течение трех дней перед оцениванием активации и трансдукции Т-клеток с помощью проточной цитометрии.

Две независимо полученные партии MSP нагружали лентивирусом и молекулой STARTERS перед совместным культивированием с Т-клетками in vitro. Доставка молекулы STARTERS, связанной с MSP, усиливала активацию и трансдукцию по сравнению с доставкой растворимой молекулы, в частности в более разбавленных условиях (фиг. 51B и 51C). Комплексы MSP-вирус-STARTERS совместно культивировали с Т-клетками в течение трех дней перед проведением анализа методом проточной цитометрии для изучения экспрессии CD25 в качестве показателя активации (фиг. 51B) и экспрессии GFP для измерения трансдукции (фиг. 51C). Данные показывают, что комплексы, образуемые с любой из партий MSP, обладали способностью активировать Т-

клетки и опосредовать трансдукцию Т-клеток. Следует отметить, что активация и трансдукция с помощью MSP демонстрирует колоколообразный ответ. Без ограничения какой-либо теорией, высокие концентрации MSP в культурах Т-клеток могут оказывать отрицательное влияние на жизнеспособность Т-клеток и впоследствии могут препятствовать эффективности активации и трансдукции.

В ходе второго исследования in vitro тестировали, оказывает ли уменьшение размера MSP посредством обработки ультразвуком либо гомогенизации с помощью гранул влияние на функциональные характеристики MSP. Выделенные Т-клетки размораживали и ресуспендировали при 1e6 клеток/мл в бессывороточной среде для Т-клеток со 100 единицами/мл IL-2 перед добавлением в 96-луночный планшет. 60 мг MSP ресуспендировали при 30 мг/мл в DPBS. Часть раствора MSP подвергали уменьшению размера посредством гомогенизации с помощью гранул. Кроме того, 30 мг MSP ресуспендировали при 5 мг/мл в стерильной воде и затем обрабатывали ультразвуком с использованием зонда для обработки ультразвуком из системы Q125 (qSonica) при амплитуде 40% в течение двух минут (обработку ультразвуком выполняли интервалами по 15 с с перерывами в 30 с). После обработки ультразвуком MSP центрифугировали для аспирации воды и ресуспендировали при 30 мг/мл в DPBS. 1,5 мг полноразмерных или уменьшенных в размере MSP добавляли в свежие пробирки Eppendorf, и добавляли равный объем DPBS в отдельную пробирку Eppendorf в качестве контроля с растворимым вирусом. Затем 1,6 мкг молекулы STARTERS добавляли к MSP или DPBS перед добавлением 8e7 TU размороженного вируса. Смеси инкубировали при 4°C в течение одного часа перед их серийным разведением с помощью среды для Т-клеток и добавлением к высеянным Т-клеткам. Компоненты совместно культивировали с Т-клетками в течение трех дней перед оцениванием активации и трансдукции Т-клеток с помощью проточной цитометрии.

Лентивирус, кодирующий GFP, и молекулу STARTERS загружали в полноразмерные или уменьшенные в размере MSP, где уменьшение размера достигалось путем гомогенизации MSP с помощью гранул или их обработки ультразвуком. Комплексы MSP-вирус-STARTERS совместно культивировали с Т-клетками в течение трех дней перед проведением анализа методом проточной цитометрии в отношении экспрессии CD25 (активация) и экспрессии GFP (трансдукция). Уменьшение размера MSP не оказывало отрицательного влияния на активность in vitro с точки зрения активации (фиг. 52A) и трансдукции (фиг. 52B) Т-клеток, и обработанные ультразвуком MSP демонстрировали наиболее высокую пиковую эффективность трансдукции для тестируемых условий MSP.

Затем проводили исследование in vivo (фиг. 53A) для изучения применения молекулы STARTERS в изготовлении CART in vivo. Вкратце, нагруженные VEGF-C криогели ("инъекционное средство 1" на фиг. 53A) инъецировали в день -16 с последующей инъекцией 20e6 PBMC человека в день -14. Через 14 дней различные комбинации вируса, кодирующего CAR для CD19, и молекул STARTERS, совместно

загруженных на MSP ("инъекционное средство 2" на фиг. 53B), инъецировали внутридермально над местом локализации криогеля. Анализ методом проточной цитометрии проводили с использованием крови, полученной при еженедельном сборе крови, и оценивали размножение популяций лимфоцитов. В день 18 мышей со значительным размножением CAR-T умерщвляли, и циркулирующие лимфоциты собирали посредством пункции сердца, анализировали в отношении % CAR и количества клеток, объединяли в пределах групп и подвергали адоптивному переносу мышам, которые были подвергнуты стимуляции с помощью 1e6 клеток NALM6 за 4 дня до этого. Еженедельный сбор крови и люминесцентную визуализацию опухолей один раз в две недели осуществляли до конца исследования. Цели данного исследования заключались в 1) выяснении необходимости отдельных компонентов в каждом инъекционном средстве и 2) демонстрации способности изготовленных in vivo CAR-T контролировать опухолевую нагрузку.

Как показано на фиг. 53C, изготовленные in vivo CAR-T при адоптивном переносе мышам, несущим опухоль из NALM6, обладали способностью распознавать их рецептор-мишень CD19 и осуществлять истощение популяции B-клеток у данных мышей. Как показано на фиг. 53D, опухоли, обработанные перенесенными PBMC от мышей-доноров без CART ("контроль с PBMC" на фиг. 53D), демонстрировали сопоставимую кинетику роста по сравнению с необработанными опухолями из NALM6 ("NALM6" на фиг. 53D). Мыши, обработанные дозой 3e5 клеток CAR-T, изготовленных с применением свободного вируса ("свободный вирус" на фиг. 53D) или вируса, доставляемого с помощью MSP ("вирус на MSP" на фиг. 53D), демонстрировали сниженную опухолевую нагрузку. Эти данные показывают, что полученные in vivo CART демонстрировали сильную противоопухолевую активность in vivo.

Кроме того, изучали размножение полученных in vivo CART в кровотоке. Через 13 дней после внутридермальной инъекции инъекционного средства 2 в участок с криогелем мыши, обработанные комбинацией криогеля с VEGF-C, вируса (доставляемого с помощью MSP или свободного) и STARTERS на MSP, демонстрировали сопоставимый уровень CART, выраженный в сходных показателях процентной доли CAR в общей популяции циркулирующих T-клеток (фиг. 53E) и количества/мкл CAR-T-клеток в крови (фиг. 53F). Мыши, обработанные без полной комбинации для обработки, демонстрировали более низкие уровни числа CAR-T и % CAR+ (фиг. 53E и 53F).

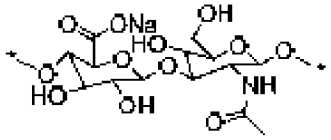
Через 18 дней после внутридермальной инъекции инъекционного средства 2, несмотря на сходное количество циркулирующих T-клеток (фиг. 53H), у мышей, обработанных вирусом и STARTERS, совместно загруженными на MSP, имелось более высокое число CAR-T (фиг. 53I) и % CAR+ (фиг. 53J) по сравнению с мышами, обработанными STARTERS, доставляемыми с помощью MSP, в комбинации со свободным вирусом. Данные для дня 18 применялись для определения числа CAR+ клеток после объединения лимфоцитов крови с целью определения числа клеток, введенных дозами мышам, несущим опухоли из Nalm6.

На фиг. 53K и 53L показаны результаты комбинированного анализа методом проточной цитометрии крови от мышей, используемых для адоптивного переноса, и остальных мышей, включенных в исследование. Значимого различия в числе циркулирующих Т-клеток между группами не наблюдалось (фиг. 53K). Полная комбинация инъекционного средства 1 и инъекционного средства 2 индуцировала наиболее высокие абсолютные показатели количества CART в кровотоке (фиг. 53L).

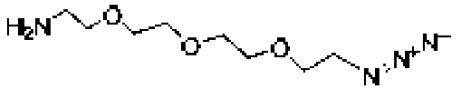
Пример K. Применение гидрогеля HA для замедленного высвобождения VEGF-C

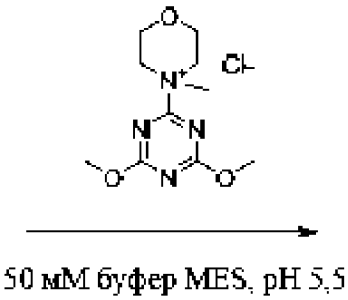
В данном примере описывается применение гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты (HA) для замедленного высвобождения белка VEGF-C для достижения лимфангиогенеза и локализации Т-клеток в участке инъекции.

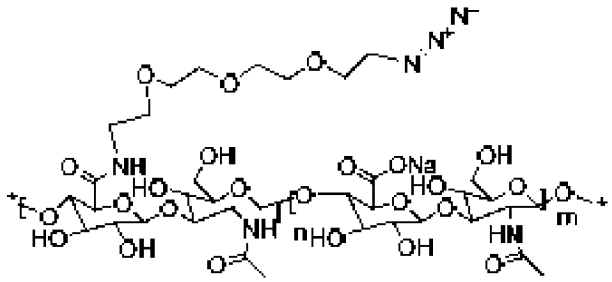
Пример 1. Функционализация гиалуроновой кислоты



Гиалуроновая кислота (HA)
200 кДа или 700 кДа







В данном примере описан синтез гиалуроновой кислоты, функционализированной с помощью азида, которая подвергается реакции со сшивающим компонентом с образованием гидрогеля.

Синтез промежуточного соединения гиалуроновой кислоты [HA-N_3]

Натриевая соль гиалуроновой кислоты представляет собой линейный полимер, состоящий из повторяющихся димерных звеньев глюкуроновой кислоты и N-ацетилгалактозамина, при этом молекулярная масса повторяющегося звена составляет 401,3 Да. В данном примере представленные моли гиалуроновой кислоты относятся к молям повторяющегося звена, а эквиваленты реагентов, используемых в реакции с гиалуроновой кислотой, представлены относительно молей повторяющегося звена гиалуроновой кислоты. Средняя молекулярная масса полимера определяет среднее количество повторяющихся звеньев на нить полимера. Натриевую соль гиалуроновой кислоты получали от поставщика Lifecore Biomedical с маркировкой HA700K-5 как имеющую номинальную среднюю молекулярную массу 700 кДа, которая может

варьироваться в разных партиях.

Синтез 700 кДа [HA-N_3]-16%

Раствор натриевой соли гиалуроновой кислоты (номинальная средняя молекулярная масса 700 кДа; 258,9 мг, 0,62 ммоль; Lifecore Biomedical, LLC; номер продукта HA700K-5) полностью растворяли в 37,5 мл буфера MES (50 мМ, pH 5,5). К данному раствору добавляли хлорид 4-(4',6'-диметокси-1',3',5'-триазин-2'-ил)-4-метилморфолин-4-ия (DMTMM, 298,1 мг, 1,077 ммоль, 1,736 экв.) с последующим добавлением через 5 мин 11-азидо-3,6,9-триоксаундекан-1-амина (201 мг, 0,921 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Диализную мембрану (MWCO 50 кДа) заполняли неочищенной реакционной смесью, которую подвергали диализу в течение 1-3 дней против 0,25 М NaCl с несколькими сменами раствора для диализа, а затем подвергали диализу в течение 1-3 дней против деионизированной воды, причем также с несколькими сменами раствора для диализа. После завершения образец удаляли из диализной трубки, подвергали быстрому замораживанию и лиофилизировали с получением **700 кДа [HA-N_3]-16%**.

^{1}H ЯМР (400 МГц, D_2O) δ 4,45 (bs, 1,71H), 4,0-3,1 (m, 16H), 1,95 (s, 3H).

DOSY-ЯМР. Спектры одномерной диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР (DOSY) снимали с использованием индуцированного эха с одной последовательностью очищенных градиентных импульсов (stegp1s1d) на приборе Bruker AVANCE III, работающем при 400 МГц (для ^{1}H-ЯМР) с криозондом DCH диаметром 5 мм. Время диффузии и время градиента диффузии устанавливали на 50 мс и 4 мс соответственно. Два спектра снимали при силе градиента (gpz6), установленной на 2% и 95%. При сравнении двух спектров не были продемонстрированы различия, за исключением пика растворителя, что указывает на то, что в полимере отсутствуют низкомолекулярные примеси.

Элементный анализ очищенного образца показал следующее содержание элементов - C: 38,9%; H: 5,42%; N: 4,85%.

Степень замещения **[HA-N_3]** определяется как % повторяющихся звеньев, в которых

карбоксилатный фрагмент был подвергнут реакции с получением изображенного амида. Элементный анализ

применяли для определения степени замещения. Соотношение [%C/%N], определенное с помощью элементного

анализа очищенного образца, вводили в следующую формулу для определения степени

замещения. Если y=[(%C)/(%N)]), тогда:

степень замещения =

$$100 \times \frac{\frac{14 \times 12.01}{14.01 \times y} - 1}{4 - \frac{8 \times 12.01}{14.01 \times y}}$$

В данном примере степень замещения (DS) **[HA-N_3]** составляла 16%.

Данная гиалуроновая кислота с массой 700 кДа, функционализированная на 16% азидным линкером, обозначена как **700 кДа [HA-N_3]-16%**.

Синтез 200 кДа [HA-N_3]-24%

В другом аспекте натриевую соль гиалуроновой кислоты (номинальная средняя молекулярная масса 200 кДа) подвергали реакции, как описано выше в примере 1.

^{1}H ЯМР (400 МГц, D_2O) δ 4,45 (bs, 2H), 4,0-3,1 (m, 18H), 1,95 (s, 3H).

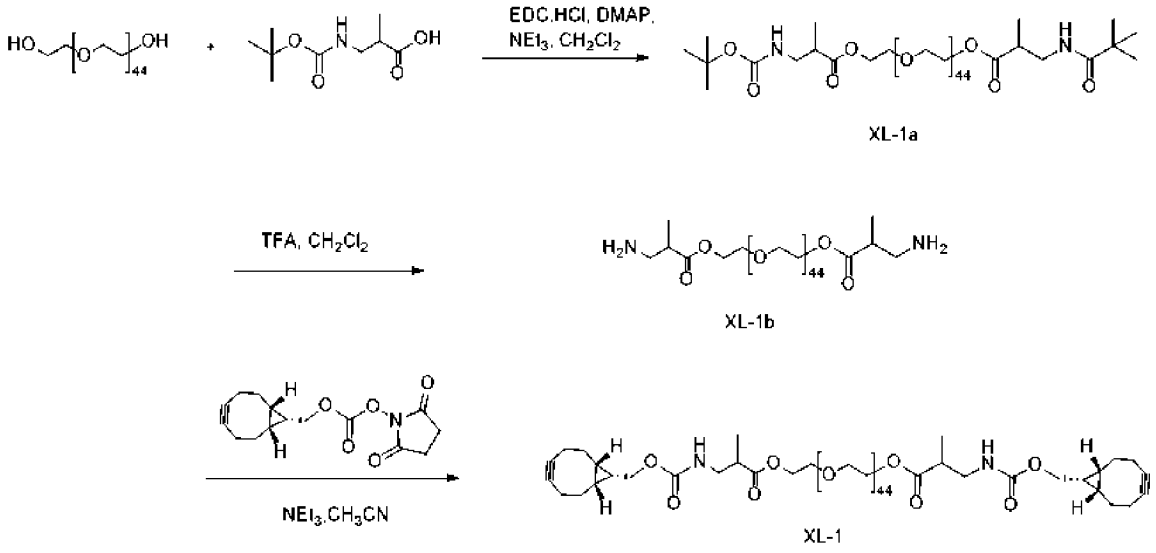
Элементный анализ: C: 39,94%; H: 5,53%; N: 5,73%.

В остальных примерах гиалуроновая кислота с массой 700 кДа и 200 кДа, функционализированная на X% азидным линкером, обозначена как **700 кДа [HA-N_3]-X%** и **200 кДа [HA-N_3]-X%** соответственно.

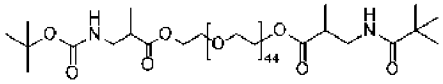
Промежуточные соединения **[HA-N_3]** можно также очищать посредством тангенциальной поточной фильтрации. Реакционную смесь разбавляли с помощью 25 мл 0,25 М раствора NaCl и очищали с помощью тангенциальной поточной фильтрации. Тангенциальную поточную фильтрацию проводили с использованием картриджа Vivaflow-50R с мембраной Hydrosart с MWCO 30 кДа (Sartorius), элюируя с помощью 400 мл 0,25 М раствора NaCl, а затем 400 мл воды. Продукт подвергали быстрому замораживанию и лиофилизировали с получением конечного продукта.

Пример 2. Синтез сшивающих средств (XL)

Синтез XL-1

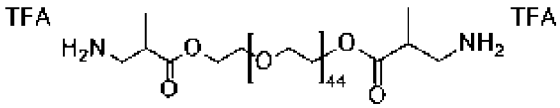


XL-1a. PEG(2000)-бис-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпропаноат



3-((Трет-бутоксикарбонил)амино)пропановую кислоту (0,152 г, 0,75 ммоль) и PEG с Mn ~ 2 кДа (0,5 г, 0,250 ммоль) растворяли в 15 мл дихлорметана. Добавляли диметиламинопиридин (0,015 г, 0,125 ммоль) и EDC·HCl (0,192 г, 1,003 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на диоксиде кремния с градиентом 0-15% дихлорметана в метаноле. Фракции, содержащие продукт, объединяли и приводили в сухое состояние с получением **XL-1a**. ^{1}H ЯМР (400 МГц, метанол-d4) δ 4,23 (m, 4H), 3,63 (m, 170H), 3,22 (m, 4H) 2,66 (m, 2H), 1,43 (s, 18H), 1,13 (m, 6H).

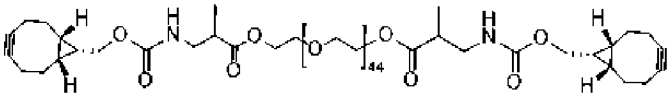
XL-1b. PEG(2000)-бис-[метил-3-амино-2-метилпропаноат] в форме соли бис-трифторуксусной кислоты



XL-1a (260 мг, 0,108 ммоль) растворяли в дихлорметане (3 мл). Добавляли трифторуксусную

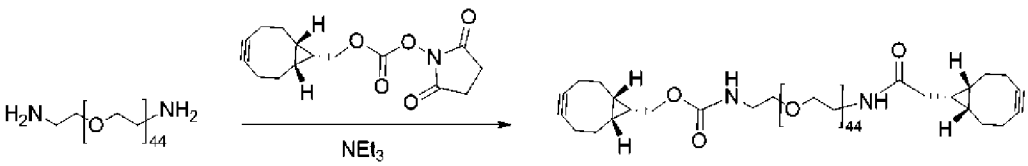
кислоту (0,415 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт растирали в порошок с использованием Et_2O дважды, затем высушивали под вакуумом с получением **XL-1b**. ^{1}H ЯМР (400 МГц, Метанол-d4) δ 4,45 (m, 2H), 4,22 (m, 2H), 3,59 (m, 177H), 3,12 (m, 4H), 2,87 (m, 2H), 1,22 (m, 6H).

XL-1. PEG(2000)-бис-3-(((((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метокси)карбонил)амино)-2-метилпропаноат



XL-1b (200 мг, 0,086 ммоль) растворяли в ацетонитриле (3 мл). Добавляли триэтиламин (0,599 мл, 4,30 ммоль), затем добавляли ((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метил(2,5-диоксопирролидин-1-ил)карбонат (200 мг, 0,688 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой HPLC со сбором фракций, запускаемым ELSD (способ, описанный ниже). Фракции, содержащие продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением **XL-1**. Для целей хранения **XL-1** сохраняли в виде раствора в ацетонитриле, DMSO или метаноле в морозильной камере. Аналитическая HPLC-CAD (способ, описанный ниже): время удерживания=2,75 мин. 1H ЯМР (400 МГц, метанол-d4) δ 4,23 (m, 4H), 4,14 (m, 4H), 3,63 (m, 188H), 2,68 (m, 2H), 2,22 (m, 12H), 1,60 (m, 4H), 1,37 (m, 2H), 1,14 (m, 6H), 0,94 (m, 4H).

Синтез XL-2



Гидрохлорид PEG-диамина с Mn ~ 2 кДа (JenKem Technology, 300 мг, 0,148 ммоль) растворяли в ацетонитриле (3 мл). Добавляли триэтиламин (0,413 мл, 2,96 ммоль), затем добавляли ((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метил(2,5-диоксопирролидин-1-ил)карбонат (345 мг, 1,184 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой HPLC со сбором фракций, запускаемым ELSD (способ, описанный ниже). Фракции, содержащие продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением **XL-2**. Для целей хранения **XL-2** сохраняли в виде раствора в ацетонитриле, DMSO или метаноле в морозильной камере. Аналитическая HPLC-CAD (способ, описанный ниже): время удерживания=2,61 мин. 1H ЯМР (400 МГц, метанол-d4) δ 4,14 (m, 4H), 3,63 (br s, 186H), 3,54 (m, 4H), 2,22 15 (m, 12H), 1,61 (m, 4H), 1,38 (m, 2H), 0,94 (m, 4H).

Условия препаративной HPLC: Waters XBridge C18; размер частиц: 5 мкм; размер колонки: 19 × 250 мм; элюент/градиент: 5% CH_3CN/H_2O/0,5 мин, 5-95% CH3CN/H2O/12,5 мин, 95% CH_3CN/H_2O/3 мин; скорость потока: 30 мл/мин; температура колонки: комнатная температура.

Условия аналитической HPLC-CAD: Waters ACQUITY UPLC BEH C18; размер частиц: 1,7 мкм; размер колонки: 2,1 × 50 мм; элюент/градиент: 2% CH_3CN/H_2O/0,5 мин, 2-98% CH_3CN/H_2O/5 мин (CH_3CN, содержащий 0,1% муравьиную кислоту, и H_2O, содержащая 0,1% муравьиную кислоту); скорость потока: 1 мл/мин; температура колонки: 50°C.

Пример 3. Получение составов на основе гидрогеля HA для исследований in vitro и in vivo

Раствор сшивающего средства (50 мг/мл), полученный в примере 2, высушивали при пониженном давлении с удалением ACN (ацетонитрила). Такое же количество 1X PBS добавляли к сухому остатку с получением концентрации 50 мг/мл сшивающего средства в 1X буфере PBS. Данный свежеприготовленный раствор применяли для получения составов для исследований in vitro и in vivo.

H1a. Синтез образующегосяin situ гидрогеля HA

200 кДа [HA-N3]-24% (122,4 мг, степень замещения=24%) растворяли в 7,26

мл 1× буфера PBS с pH 7,4 (16,9 мг/мл в качестве концентрации по весу) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи в защищенном от света месте. Молекулярная масса незамещенного повторяющегося димерного звена в форме карбоксилатной соли натрия составляет 401,3 Да. MW азидилированного повторяющегося димерного звена составляет 579,6 Да. Средняя MW димерного звена **200 кДа [HA-N_3]-24%** в форме соли натрия составляет 444,1 Да=((401,3 × 0,76) + (579,6 × 0,24)). При

использовании средней MW димерного звена в форме соли натрия общее число молей повторяющегося димерного звена составляет 276 мкмоль, и число молей азидилированного повторяющегося димерного звена составляет 66,2 мкмоль. Аликвоту 200 мкл 200 кДа HA-N_3 -24% (3,38 мг, 7,61 мкмоль) отбирали из исходного раствора, и гелеобразование выполняли посредством добавления 10,4 мкл сшивающего средства **XL-2** (0,52 мг, 0,221 мкмоль реагента, 0,442 мкмоль реакционноспособной функциональной группы, 50 мг/мл в 1X PBS). Это приводило к получению раствора с предсказанной степенью сшивания повторяющихся звеньев **200 кДа [HA-N_3]-24%** с помощью **XL-2**, составляющей 6,7% ((0,442 мкмоль [XL-2-реактивная функциональная группа]/66,2 мкмоль [звенья HA)× 100=6,7%). Смесь перемешивали вихревым способом, и аликвоту 50 мкл смешанного раствора быстро добавляли в пробирку Eppendorf и хранили при комнатной температуре в течение ночи. На следующий день визуальный осмотр демонстрировал образование геля **H1a**.

Синтез гидрогеля H2a

Белок VEGF-C смешивали с раствором **200 кДа [HA-N_3]-24%**, и реакцию гелеобразования осуществляли со сшивающим средством **XL-2**, как описано выше, с получением геля **H2a**.

Синтез гидрогеля H3a

Белок VEGF-C смешивали с раствором **200 кДа [HA-N_3]-24%**, и реакцию гелеобразования осуществляли с 2X количеством сшивающего средства **XL-1**, как описано выше, с получением геля **H3a**.

Синтез гидрогеля H4a

Белок VEGF-C смешивали с раствором **700 кДа [HA-N_3]-16%**, и реакцию гелеобразования осуществляли с 2X количеством сшивающего средства **XL-2**, как описано выше, с получением геля **H4a**.

Синтез гидрогеля H5a

Получали комплекс белка VEGF-C с лапонитом XLG (BYK Additives) перед добавлением к раствору **700 кДа [HA-N_3]-16%** с лапонитом в концентрации 0,25 мг/мл в конечном геле. Реакцию гелеобразования осуществляли с 2X количеством сшивающего средства **XL-2**, как описано выше, с получением геля **H5a**.

Синтез гидрогеля H6a

Получали комплекс белка VEGF-C с лапонитом XLG (BYK Additives) перед добавлением к раствору **700 кДа [HA-N_3]-16%** с лапонитом в концентрации 1 мг/мл в конечном геле. Реакцию гелеобразования осуществляли с 2X количеством сшивающего средства **XL-2**, как описано выше, с получением геля **H6a**.

H3b. Синтез частиц гидрогеля HA

200 мкл геля **H3a**, полученного, как описано выше, проталкивали через дисковое сито из нержавеющей стали на 100 меш в шприц объемом 1 мл с получением крупных частиц геля. 100 мкл 1× PBS добавляли в данный шприц с последующим перемешиванием вихревым способом с целью смешивания. Шприц выдерживали при комнатной

температуре в течение 6 ч. для обеспечения возможности набухания гидрогеля. Набухшие крупные частицы геля **H3a** проталкивали 20 раз через дисковое сито из нержавеющей стали на 200 меш с получением мелких частиц геля для получения продукта **H3b**.

Синтез гидрогеля H5b

Гель **H5a** экструдировали до мелких частиц геля с получением конечного продукта **H5b**.

Синтез гидрогеля H6b

Гель **H6a** экструдировали до мелких частиц геля с получением конечного продукта **H6b**.

Модель исследования высвобождения in vitro

950 мкл буфера PBS с 2% BSA добавляли к аликвоте 50 мкл гидрогеля и инкубировали при 37°C со встряхиванием при 300 об./мин. Аликвоты 800 мкл отбирали в различные моменты времени, и гель не удаляли в данные моменты времени. Исследуемые образцы восполняли с помощью такого же количества 1X буфера PBS с 2% BSA для сохранения одинакового объема исследуемого образца. Образцы для исследования высвобождения затем анализировали с помощью ELISA в отношении содержания VEGF-C.

Модель исследования in vivo

После смешивания всех компонентов для получения геля **H3a** содержимое пробирки перемешивали вихревым способом, и им быстро заполняли заднюю часть шприца для инсулина. Образец проталкивали в шприц с помощью поршня, и удаляли любые образовавшиеся пузырьки воздуха. 30 мкл инъецировали мышам внутридермально в течение 2-3 минут после перемешивания.

Результаты

Замедленное высвобождение VEGF-C достигалось in vitro при использовании различных композиций на основе гидрогелей HA (фиг. 54A-54D). Не наблюдалось различия между кривыми высвобождения для гидрогелей HA, полученных с использованием **700 кДа [HA-N_3]-16%** и **200 кДа [HA-N_3]-24% (фиг. 54A).** Высвобождение VEGF-C из составов на основе гидрогеля HA можно регулировать посредством добавления лапонита. Составы на основе гидрогеля HA, содержащие лапонит, обеспечивали зависимое от концентрации более медленное высвобождение белка VEGF-C по сравнению с составами, не содержащими лапонит (фиг. 54B). Образующиеся in situ частицы гидрогеля и гидрогеля HA, содержащие лапонит, обеспечивали сходный профиль высвобождения для белка VEGF-C (фиг. 54C и 54D).

Исследование in vivo проводили с использованием внутридермальной инъекции образующихся in situ гидрогелей H1a и H3a у мышей. Состав, содержащий VEGF-C (H3a), демонстрировал увеличение количества лимфатических эндотелиальных клеток (LEC) и T4-клеток после анализа в день 7 по сравнению с контрольным (H1a) составом (фиг. 55A и 55B).

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Раскрытия всех без исключения патентов, заявок на патент и публикаций, цитируемых в данном документе, настоящим включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Несмотря на то, что настоящее изобретение было раскрыто со ссылкой на определенные варианты осуществления, очевидно, что дополнительные варианты осуществления и видоизменения настоящего изобретения могут быть разработаны другими специалистами в данной области без отступления от фактической сущности и объема настоящего изобретения. Предполагается, что прилагаемую формулу изобретения следует истолковывать как включающую все такие варианты осуществления и эквивалентные видоизменения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Множество композиций, содержащее:

первую композицию, содержащую

биологический материал и фактор привлечения клеток; и

вторую композицию, содержащую

вирусный вектор.

2. Первая композиция, содержащая

биологический материал и фактор привлечения клеток,

где биологический материал содержит гидрогель, например, криогель (например, альгинатный криогель) или гидрогель на основе гиалуроновой кислоты (гидрогель HA), и

где фактор привлечения клеток содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 741 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, при условии, что аминокислота в положении 26 в SEQ ID NO: 741 не представляет собой цистеин (C), где необязательно аминокислота в положении 26 в SEQ ID NO: 741 представляет собой аланин (A).

3. Способ трансдукции клеток субъекта in vivo или лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, при этом способ включает:

введение биологического материала и фактора привлечения клеток в участок (например, верхнее подкожное пространство или подкожное пространство, прилегающее к дерме) у субъекта и

введение субъекту вирусного вектора или нуклеиновой кислоты, содержащих трансген;

за счет чего осуществляется трансдукция клеток субъекта с помощью трансгена.

4. Способ по п. 3, где биологический материал и фактор привлечения клеток содержатся в первой композиции, а вирусный вектор или нуклеиновая кислота содержатся во второй композиции.

5. Множество композиций по п. 1 или способ по любому из пп. 3-4, где биологический материал:

(i) содержит гидрогель;

(ii) содержит криогель, например, альгинатный криогель;

(iii) содержит гидрогель на основе гиалуроновой кислоты (гидрогель HA);

(iv) содержит желатин, гиалуроновую кислоту, коллаген, альгинат, ламинин, хитозан, фиброин шелка, агарозу, поли(этиленгликоль), поливиниловый спирт и/или гидроксиэтилметилакрилат;

(v) содержит альгинатный гидрогель, где необязательно альгинатный гидрогель дополнительно содержит норборнен и/или тетразин, где необязательно норборнен и/или тетразин ковалентно связаны, например, химически связаны, или нековалентно связаны с альгинатом, например, адсорбированы на нем; и/или

(vi) содержит поры диаметром от приблизительно 10 мкм до приблизительно 300

мкм, например, от приблизительно 50 мкм до приблизительно 300 мкм, или не содержит пор; и/или

(vii) является химически сшитым.

6. Множество композиций, первая композиция или способ по любому из предыдущих пунктов, где первая композиция, содержащая биологический материал, дополнительно содержит лапонит; или где биологический материал содержится в первой композиции, которая дополнительно содержит лапонит; где необязательно лапонит присутствует в концентрации, составляющей от приблизительно 0,15 мг/мл до приблизительно 0,35 мг/мл, например, приблизительно 0,25 мг/мл.

7. Множество композиций, первая композиция или способ по любому из предыдущих пунктов, где фактор привлечения клеток:

(i) нековалентно связан с биологическим материалом, например, адсорбирован на нем; или

(ii) ковалентно связан с биологическим материалом, например, конъюгирован с ним.

8. Множество композиций, первая композиция или способ по любому из предыдущих пунктов, где фактор привлечения клеток:

(i) индуцирует лимфангиогенез;

(ii) индуцирует рост лимфатических эндотелиальных клеток и/или

(ii) осуществляет привлечение иммунных клеток, где необязательно иммунные клетки включают в себя Т-клетки и/или NK-клетки.

9. Множество композиций, первая композиция или способ по п. 8, где индуцирование лимфангиогенеза:

(i) включает повышение уровня лимфатических эндотелиальных клеток (LEC) (например, CD45- CD31+ PDPN+ клеток), где необязательно уровень LEC повышается на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или 200% по сравнению с эталонным уровнем (например, уровнем LEC в участке у субъекта до инъекции множества композиций или первой композиции), при измерении с помощью анализа, например, анализа методом проточной цитометрии, например, как описано в примере H или I; и/или

(ii) приводит к получению по меньшей мере 50 LEC (например, по меньшей мере 75, 100, 125, 150, 200, 225 или 250 LEC) на миллиграмм ткани при измерении с помощью анализа, например, анализа методом проточной цитометрии, например, как описано в примере H или I.

10. Множество композиций, первая композиция или способ по любому из предыдущих пунктов, где фактор привлечения клеток осуществляет привлечение Т-клеток, где необязательно Т-клетки включают в себя необученные Т-клетки (например, CD45RA+ CD62L+ Т-клетки или CD45RA+ CD62L+ CCR7+ CD27+ CD95+ Т-клетки).

11. Множество композиций, первая композиция или способ по п. 10, где привлечение Т-клеток включает повышение уровня Т-клеток, где необязательно уровень

Т-клеток повышается на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200% или 300% по сравнению с эталонным уровнем (например, уровнем Т-клеток в участке у субъекта до инъекции множества композиций или первой композиции), при измерении с помощью анализа, например, анализа методом проточной цитометрии, например, как описано в примере H или I.

12. Множество композиций по любому из п. 1 или пп. 5-11 или способ по любому из пп. 3-11, где фактор привлечения клеток выбран из VEGF-C, IL-2, IL-7, IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)), GM-CSF, CXCL12, CXC3L1, CCL19, CCL21, CXCL10 или CXCL11.

13. Множество композиций по любому из п. 1 или пп. 5-12 или способ по любому из пп. 3-12, где фактор привлечения клеток включает в себя VEGF-C, где необязательно VEGF-C:

(i) включает в себя зрелый пептид VEGF-C, необязательно его минорную или основную зрелую форму или мутантный вариант;

(ii) представляет собой мономер или димер и/или

(iii) присутствует в эффективном количестве, необязательно в количестве, которое меньше 1 мг или составляет приблизительно это значение, меньше 10 мг или составляет приблизительно это значение, больше 10 мкг или составляет приблизительно это значение, больше 1 мкг или составляет приблизительно это значение, от приблизительно 1 мкг до 1 мг, от приблизительно 10 мкг до 1 мг, от приблизительно 1 мкг до 10 мг или от приблизительно 10 мкг до 10 мг.

14. Множество композиций или способ по п. 13, где VEGF-C содержит:

(i) аминокислотную последовательность согласно любой из последовательностей, представленных в таблице 18, или последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, где необязательно последовательность содержит или не содержит линкер (например, глицин-сериновый линкер) и/или His-метку; и/или

(ii) аминокислотную замену C137A, пронумерованную согласно SEQ ID NO: 725.

15. Множество композиций по любому из п. 1 или пп. 5-14 или способ по любому из пп. 3-14, где фактор привлечения клеток содержит:

(i) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 741 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней, при условии, что аминокислота в положении 26 в SEQ ID NO: 741 не представляет собой цистеин (C), где необязательно аминокислота в положении 26 в SEQ ID NO: 741 представляет собой аланин (A);

(ii) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 743 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней;

(iii) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 740 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99%

идентичностью последовательности с ней;

(iv) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 736 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней;

(v) линкер, например, где линкер имеет последовательность Gly-Ser, где необязательно линкер расположен с С-концевой стороны от SEQ ID NO: 743 или последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней;

(vi) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 735 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней;

(vii) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 734 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней и/или

(viii) аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 733 или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичностью последовательности с ней.

16. Множество композиций по любому из п. 1 или пп. 5-15 или способ по любому из пп. 3-15, где фактор привлечения клеток включает в себя VEGF-C или его функциональный вариант; IL-15 (например, hetIL-15 (IL15/sIL-15Ra)) или его функциональный вариант; IL-7 или его функциональный вариант или их комбинацию.

17. Множество композиций по любому из п. 1 или пп. 5-16 или способ по любому из пп. 4-16, где вторая композиция дополнительно содержит частицу.

18. Множество композиций или способ по п. 17, где частица представляет собой мезопористую частицу, частицу кремнезема и/или мезопористую частицу кремнезема, где необязательно мезопористая частица кремнезема представляет собой мезопористый стержень из кремнезема.

19. Вторая композиция, содержащая:

мезопористую частицу кремнезема;

вирусный вектор и

средство для активации клеток.

20. Множество композиций или способ по п. 18 или вторая композиция по п. 19, где мезопористая частица кремнезема:

(i) содержит модификацию поверхности, где необязательно модификация поверхности включает в себя:

(a) -OH (гидроксил), амин, карбоновую кислоту, фосфонат, галогенид, азид, алкин, эпоксид, сульфгидрил, полиэтиленимин, гидрофобный фрагмент или их соли, необязательно с использованием C_1-C_{20}алкильного линкера или линкера $(-O(CH2-CH_2-)_{1-25}$;

(b) первичный, вторичный, третичный или четвертичный амин и/или

(c) полиэтиленимин со средней молекулярной массой от приблизительно 1000 до 20000 Да, от приблизительно 1200 до 15000 Да, от приблизительно 1500 до 12000 Да, приблизительно 2000 Да, приблизительно 3000 Да, приблизительно 4000 Да, приблизительно 5000 Да, приблизительно 6000 Да, приблизительно 7000 Да, приблизительно 8000 Да, приблизительно 9000 Да или приблизительно 10000 Да согласно измерению посредством гель-проникающей хроматографии (GPC);

(ii) представляет собой мезопористую частицу кремнезема, функционализированную с помощью триметиламмония, например, мезопористую частицу кремнезема, функционализированную с помощью N, N,N-триметилпропан-1-аммония;

(iii) содержит множество пор, где необязательно диаметр пор составляет 2-50 нм; и/или

(iv) предусматривает площадь поверхности, составляющую по меньшей мере приблизительно 100 $м^2$/г.

21. Множество композиций по любому из пп. 1, 5-18 или п. 20, вторая композиция по п. 19 или п. 20 или способ по любому из пп. 3-18 или п. 20, где:

(i) вирусный вектор нековалентно, например, электростатически, или ковалентно связан с мезопористой частицей кремнезема; и/или

(ii) средство для активации клеток нековалентно или ковалентно связано с мезопористой частицей кремнезема.

22. Способ трансдукции клеток субъекта in vivo или лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, при этом способ включает:

введение вирусного вектора или нуклеиновой кислоты, содержащих трансген, в участок у субъекта,

где субъекту ранее вводили биологический материал и фактор привлечения клеток в количестве, достаточном для индуцирования лимфангиогенеза и/или привлечения Т-клеток в участок у субъекта;

за счет чего осуществляется трансдукция клеток.

23. Способ по п. 22, где вирусный вектор нековалентно, например, электростатически, или ковалентно связан с частицей, например, мезопористой частицей кремнезема.

24. Множество композиций по любому из пп. 1, 5-18 или пп. 20-21, вторая композиция по любому из пп. 19-21 или способ по любому из пп. 3-18 или пп. 20-23, где вирусный вектор включает в себя:

(i) лентивирус, ретровирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус или вирус герпеса; и/или

(ii) вектор экспрессии, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательность для контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии.

25. Множество композиций, вторая композиция или способ по п. 24, где нуклеотидная последовательность кодирует химерный антигенный рецептор (CAR),

сконструированный TCR, цитокин, хемокин, shRNA или полипептид, сконструированный для нацеливания на опухолевый антиген.

26. Множество композиций, вторая композиция или способ по п. 25, где опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Ag Tn, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, антигена Y системы Льюис, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, рецептора фолиевой кислоты альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, рецептора фолиевой кислоты бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, E6, E7 HPV, MAGE-A1, ETV6-AML, белка 17 сперматозоидов, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутантного p53, простеина, сурвивина и теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутантного Ras, hTERT, антигенов саркомы с точечными разрывами при транслокации, ML-IAP, ERG (продукта слитого гена TMPRSS2 и ETS), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, мутантного hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1 и любой их комбинации.

27. Множество композиций по любому из пп. 1, 5-18, 20-21 или пп. 24-26, вторая композиция по любому из пп. 19-21 или пп. 24-26 или способ по любому из пп. 3-18 или пп. 20-26, где вирусный вектор кодирует CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен, где:

(i) антигенсвязывающий домен связывает антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, CD123, CD22, CD20, EGFRvIII, BCMA, мезотелина, CD33, CLL-1 и любой их комбинации;

(ii) трансмембранный домен содержит шарнирную область CD8;

(iii) костимулирующая сигнальная область выбрана из костимулирующего сигнального домена 4-1BB или CD28; и/или

(iv) сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета.

28. Множество композиций по любому из пп. 1, 5-18, 20-21 или пп. 24-27 или способ по любому из пп. 4-18 или пп. 20-27, где вторая композиция дополнительно содержит средство для активации клеток.

29. Множество композиций или способ по п. 28, вторая композиция по любому из пп. 19-21 или пп. 24-27, где средство для активации клеток:

(a) включает в себя средство, которое стимулирует комплекс CD3/TCR, и/или

средство, которое стимулирует костимулирующую молекулу и/или рецептор фактора роста;

(b) представляет собой полиспецифическую связывающую молекулу, содержащую (i) домен, связывающий CD3, и (ii) домен, связывающий костимулирующую молекулу (например, домен, связывающий CD2, или домен, связывающий CD28);

(c) содержит аминокислотную последовательность любой тяжелой цепи, представленной в таблице 20, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; и/или аминокислотную последовательность любой легкой цепи, представленной в таблице 20, или аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; и/или

(d) конъюгировано с частицей, например, мезопористой частицей кремнезема, или адсорбировано на ней.

30. Множество композиций, способ или вторая композиция по п. 29, где:

(i) домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, расположен с N-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу, например, Fab для CD2 или Fab для CD28; или

(ii) домен, связывающий CD3, например, scFv для CD3, расположен с C-концевой стороны от домена, связывающего костимулирующую молекулу, например, Fab для CD2 или Fab для CD28, где необязательно:

между доменом, связывающим CD3, и доменом, связывающим костимулирующую молекулу, расположена Fc-область; или

полиспецифическая связывающая молекула содержит CH2, и домен, связывающий CD3, расположен с N-концевой стороны от CH2.

31. Множество композиций, способ или вторая композиция по п. 29 или п. 30, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH домена, связывающего CD3, VL домена, связывающего CD3, VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, CH2 и CH3; и

(ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL.

32. Множество композиций, способ или вторая композиция по п. 29 или п. 30, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, CH2, CH3, VH домена, связывающего CD3, и VL домена, связывающего CD3; и

(ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL.

33. Множество композиций, способ или вторая композиция по п. 29 или п. 30, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) первый полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VH домена, связывающего костимулирующую молекулу, CH1, VH домена, связывающего CD3, VL домена, связывающего CD3, CH2 и CH3; и

(ii) второй полипептид, содержащий от N-конца к C-концу VL домена, связывающего костимулирующую молекулу, и CL.

34. Множество композиций, способ или вторая композиция по п. 29 или п. 30, где полиспецифическая связывающая молекула содержит Fc-область, содержащую:

(i) мутацию L234A, L235A, S267K и P329A (LALASKPA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu;

(ii) мутацию L234A, L235A и P329G (LALAPG), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu;

(iii) мутацию G237A, D265A, P329A и S267K (GADAPASK), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu;

(iv) мутацию L234A, L235A и G237A (LALAGA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu;

(v) мутацию D265A, P329A и S267K (DAPASK), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu;

(vi) мутацию G237A, D265A и P329A (GADAPA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu;

(vii) мутацию L234A, L235A и P329A (LALAPA), пронумерованную в соответствии с системой нумерации Eu; или

(viii) аминокислотную последовательность любой из Fc-областей в таблице 20 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с ней.

35. Множество композиций, способ или вторая композиция по пп. 29, 30 или п. 34, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 726, 893 или 895 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; и/или

(ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 728, 730, 892 или 894 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней.

36. Множество композиций, способ или вторая композиция по любому из пп. 29, 30 или пп. 34-35, где полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 726 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 728 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью

последовательности с ней;

(ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 726 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 730 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней;

(iii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1416 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 728 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней;

(iv) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1416 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 730 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней;

(v) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 893 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 892 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней;

(vi) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1417 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 892 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней; или

(vii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 895 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 894 или аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с ней.

37. Множество композиций по любому из пп. 1, 5-18, 20-21 или пп. 24-36 или способ по любому из пп. 4-18 или пп. 20-36, где вторая композиция дополнительно содержит первую популяцию частиц и вторую популяцию частиц, например, первую

популяцию мезопористых частиц кремнезема и вторую популяцию мезопористых частиц кремнезема, где первая популяция содержит вирусный вектор, и вторая популяция содержит средство для активации клеток, например, где вирусный вектор нековалентно связан с частицей из первой популяции, и средство для активации клеток нековалентно связано с частицей из второй популяции.

38. Множество композиций по любому из пп. 1, 5-18, 20-21 или пп. 24-37, первая композиция по любому из п. 2 или пп. 6-11 или вторая композиция по любому из пп. 19-21, 24-27 или пп. 29-36, где первая или вторая композиция является подходящей для инъекционного применения.

39. Множество композиций по любому из пп. 1, 5-18, 20-21 или пп. 24-38, первая композиция по любому из пп. 2, 6-11 или п. 38 или вторая композиция по любому из пп. 19-21, 24-27, 29-36 или п. 38, которая дополнительно содержит:

(i) ингибитор Tet2, где необязательно ингибитор Tet2 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на один или несколько сайтов в пределах гена, кодирующего Tet2, или ее соответствующие регуляторные элементы; (2) нуклеиновую кислоту (например, siRNA или shRNA), которая ингибирует экспрессию Tet2; (3) белок Tet2 (например, с доминантно-негативным эффектом, например, каталитически неактивный) или партнера Tet2 по связыванию (например, партнера Tet2 по связыванию с доминантно-негативным эффектом); (4) малую молекулу, которая ингибирует экспрессию и/или функцию Tet2; (5) нуклеиновую кислоту, кодирующую любое из (1)-(3); или (6) любую комбинацию (1)-(5); и/или

(ii) ингибитор ZBTB32, где необязательно ингибитор ZBTB32 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на ген ZBTB32, или один или несколько ее компонентов; (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов системы редактирования генов, или (3) комбинацию (1) и (2). В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на ген ZBTB32, или один или несколько ее компонентов. В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов системы редактирования генов. В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя комбинацию (1) и (2).

40. Способ по любому из пп. 3-18 или пп. 20-37, который дополнительно включает введение субъекту:

(i) ингибитора Tet2, где необязательно ингибитор Tet2 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на один или несколько сайтов в пределах гена, кодирующего Tet2, или ее соответствующие регуляторные элементы; (2) нуклеиновую кислоту (например, siRNA или shRNA), которая ингибирует экспрессию Tet2; (3) белок Tet2 (например, с доминантно-негативным эффектом, например, каталитически неактивный) или партнера Tet2 по связыванию (например, партнера Tet2 по связыванию с доминантно-негативным эффектом); (4) малую молекулу, которая ингибирует экспрессию и/или функцию Tet2; (5) нуклеиновую кислоту, кодирующую любое из (1)-(3); или (6)

любую комбинацию (1)-(5); и/или

(ii) ингибитора ZBTB32, где необязательно ингибитор ZBTB32 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на ген ZBTB32, или один или несколько ее компонентов; (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов системы редактирования генов, или (3) комбинацию (1) и (2). В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя (1) систему редактирования генов, нацеливающуюся на ген ZBTB32, или один или несколько ее компонентов. В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя (2) нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов системы редактирования генов. В одном варианте осуществления ингибитор ZBTB32 включает в себя комбинацию (1) и (2).

41. Способ трансдукции клеток субъекта in vivo или лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, включающий введение первой композиции и второй композиции из множества композиций по любому из пп. 1, 5-18, 20-21 или пп. 24-39.

42. Способ трансдукции клеток субъекта in vivo или лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, включающий введение первой композиции по любому из пп. 2, 6-11, 38 или п. 39 и второй композиции по любому из пп. 19-21, 24-27, 29-36 или п. 38.

43. Способ по любому из пп. 3-18, 20-21, 24-37 или пп. 40-42, где первую композицию и вторую композицию вводят последовательно.

44. Способ по любому из пп. 3-18, 20-21, 24-37 или пп. 40-43, где первую композицию вводят до введения второй композиции, где необязательно:

(i) первую композицию вводят за приблизительно 1-4 недели, например, за приблизительно 2 недели, до введения второй композиции; или

(ii) первую композицию вводят за по меньшей мере две недели до введения второй композиции.

45. Способ по любому из пп. 3-18, 20-21, 24-37 или пп. 40-44, дополнительно включающий оценивание, например, измерение, лимфангиогенеза в образце, полученном от субъекта (например, в образце, полученном из участка введения или вблизи него), где лимфангиогенез измеряют после введения первой композиции и/или до введения второй композиции,

где необязательно измерение лимфангиогенеза включает определение значения уровня и/или активности лимфатических эндотелиальных клеток (LEC) (например, CD45-CD31+ PDPN+ клеток) в образце.

46. Способ по любому из пп. 3-18, 20-21, 24-37 или пп. 40-45, дополнительно включающий оценивание, например, измерение, привлечения Т-клеток в образце, полученном от субъекта (например, в образце, полученном из участка введения или вблизи него), где привлечение Т-клеток измеряют после введения первой композиции и/или до введения второй композиции,

где необязательно измерение привлечения Т-клеток включает определение значения уровня и/или активности Т-клеток (например, необученных Т-клеток, например,

CD45RA+ CD62L+ Т-клеток и/или CD45RA+ CD62L+ CCR7+ CD27+ CD95+ Т-клеток) в образце.

47. Множество композиций по любому из пп. 1, 5-18, 20-21 или пп. 24-39 для применения в способе трансдукции клеток субъекта in vivo или лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

48. Первая композиция по любому из пп. 2, 6-11, 38 или п. 39 в комбинации со второй композицией по любому из пп. 19-21, 24-27, 29-36 или п. 38 для применения в способе трансдукции клеток субъекта in vivo или лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

49. Вторая композиция по любому из пп. 19-21, 24-27, 29-36 или п. 38 в комбинации с первой композицией по любому из пп. 2, 6-11, 38 или п. 39 для применения в способе трансдукции клеток субъекта in vivo или лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

50. Способ по любому из пп. 3-18, 20-37 или пп. 40-46, где:

(i) у субъекта имеется заболевание, нарушение или состояние или было диагностировано его наличие; и/или

(ii) субъект является человеком.

51. Способ по любому из пп. 3-18, 20-37, 40-46 или п. 50, где заболевание, нарушение или состояние включает:

(i) рак;

(ii) гематологический рак, где необязательно гематологический рак включает лейкоз или лимфому;

(iii) гематологический рак, выбранный из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), множественной миеломы, острого лимфоидного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфоидного лейкоза (BALL), Т-клеточного острого лимфоидного лейкоза (TALL), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (SLL), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), DLBCL, ассоциированной с хроническим воспалением, хронического миелоидного лейкоза, миелопролиферативных новообразований, фолликулярной лимфомы, педиатрической фолликулярной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной или крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, MALT-лимфомы (экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны из лимфоидной ткани слизистых оболочек), лимфомы из клеток маргинальной зоны, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, новообразования из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки, лимфомы/лейкоза селезенки, диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки, варианта волосатоклеточного лейкоза, лимфоплазмоцитарной лимфомы, болезни тяжелых

цепей, плазмоклеточной миеломы, солитарной плазмоцитомы кости, внекостной плазмоцитомы, нодулярной лимфомы из клеток маргинальной зоны, педиатрической нодулярной лимфомы из клеток маргинальной зоны, первичной кожной лимфомы из клеток центра фолликула, лимфоматоидного гранулематоза, первичной медиастинальной (тимической) крупноклеточной В-клеточной лимфомы, внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфомы, ALK+ крупноклеточной В-клеточной лимфомы, крупноклеточной В-клеточной лимфомы, возникающей при HHV8-ассоциированной многоочаговой болезни Кастлемана, первичной выпотной лимфомы, В-клеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза (AML) или неклассифицируемой лимфомы;

(iv) солидный рак или

(v) солидный рак, выбранный из одного или нескольких из мезотелиомы, злокачественной мезотелиомы плевры, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака легкого, крупноклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, аденокарциномы пищевода, рака молочной железы, глиобластомы, рака яичника, колоректального рака, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака кожи, меланомы, рака почки, рака печени, рака головного мозга, тимомы, саркомы, карциномы, рака матки, рака почки, рака желудочно-кишечного тракта, уротелиального рака, рака глотки, рака головы и шеи, рака прямой кишки, рака пищевода или рака мочевого пузыря или их метастазов;

(vi) аутоиммунное заболевание, где необязательно вирусный вектор или нуклеиновая кислота кодируют CAR, который связывается с В-клеточным антигеном, например, CD19, CD20, CD22, CD123, FcRn5, FcRn2, BCMA, CS-1 и CD138.

52. Набор, содержащий первую композицию и вторую композицию из множества композиций по любому из пп. 1, 5-18, 20-21 или пп. 24-39.

53. Множество композиций по любому из пп. 1, 5-18, 20-21 или пп. 24-39, способ по любому из пп. 3-18, 20-37, 40-46 или пп. 50-51 или вторая композиция по любому из пп. 19-21, 24-27, 29-36 или п. 38, где вирусный вектор или нуклеиновая кислота кодируют:

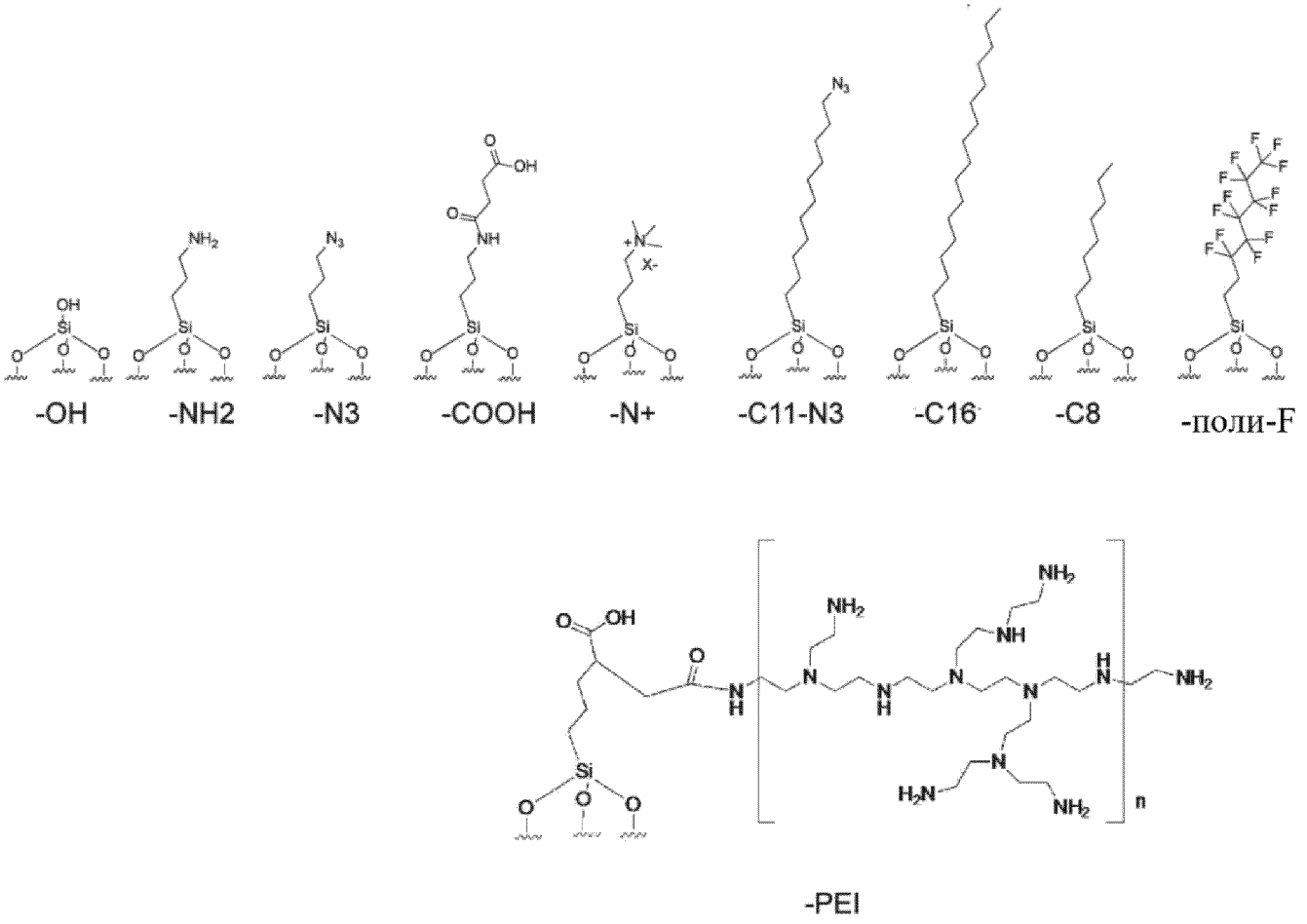
(i) первый CAR, который связывается с В-клеточным антигеном, и второй CAR, который связывается с (a) антигеном солидной опухоли, (b) антигеном миелоидной опухоли или (c) антигеном гематологической опухоли, не относящейся к В-клеточной линии дифференцировки; или

(2) CAR, который содержит первый связывающий домен, который связывается с В-клеточным антигеном, и второй связывающий домен, который связывается с (a) антигеном солидной опухоли, (b) антигеном миелоидной опухоли или (c) антигеном гематологической опухоли, не относящейся к В-клеточной линии дифференцировки.

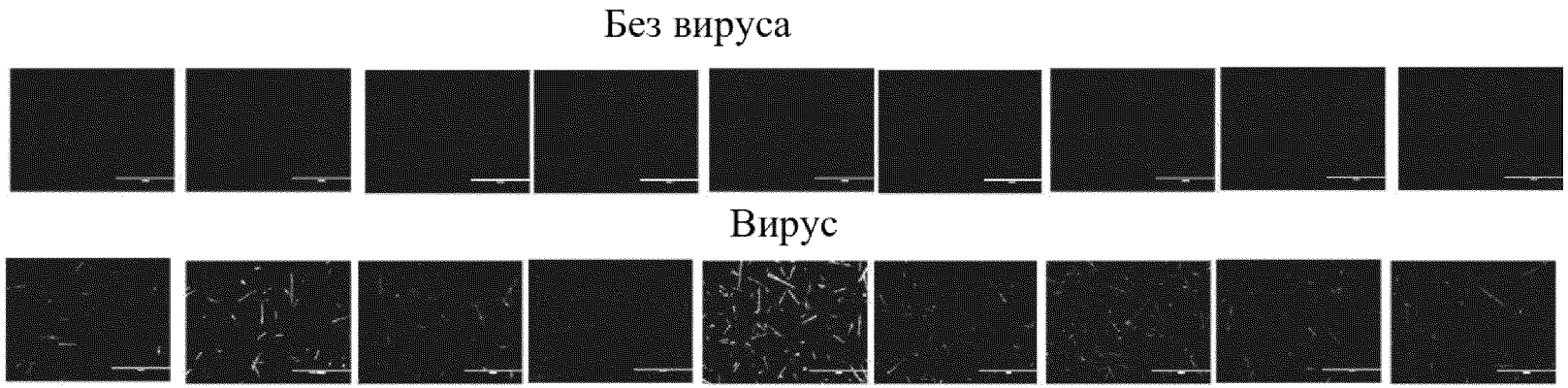
54. Способ по п. 53, где заболевание, нарушение или состояние представляет собой солидную опухоль.

По доверенности

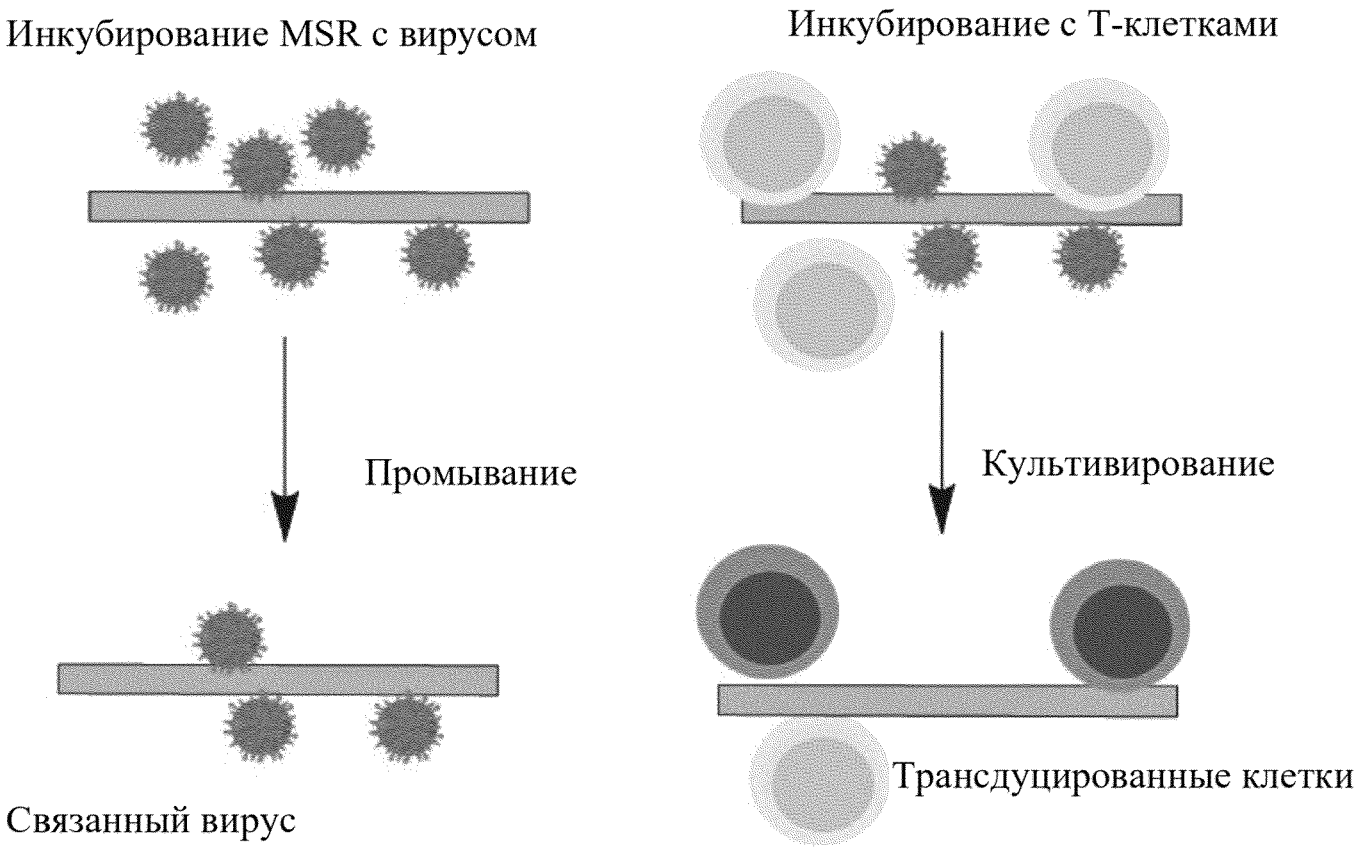
ФИГ. 1



ФИГ. 2



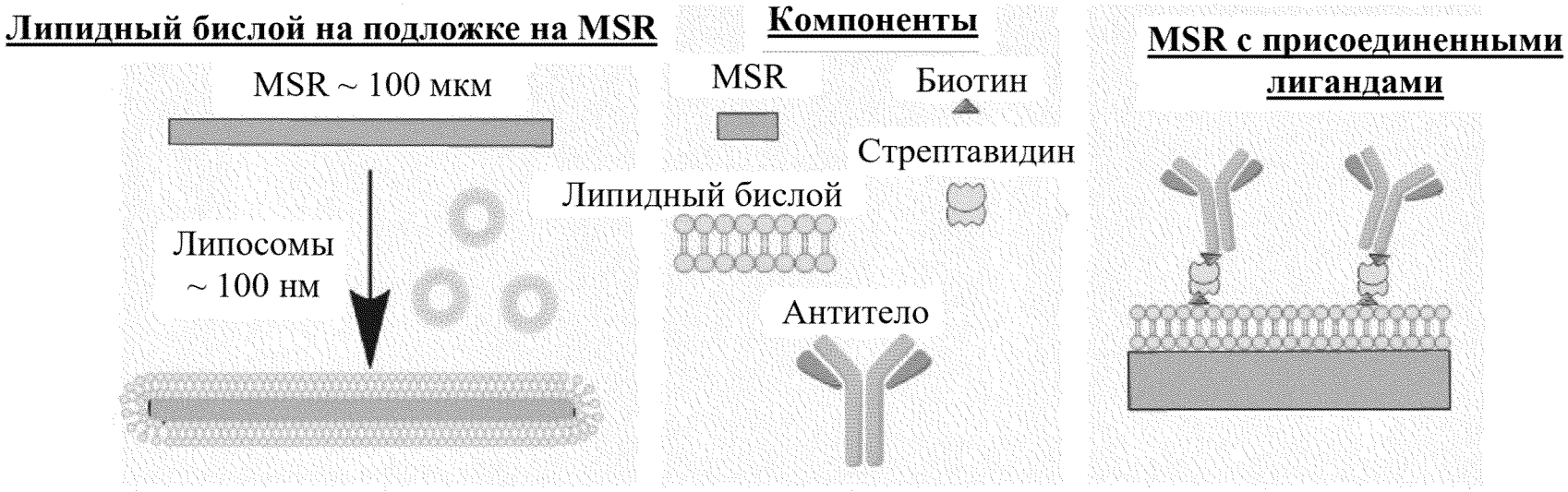
ФИГ. 3


Инкубирование MSR с вирусом
Промывание
Связанный вирус
Инкубирование с Т-клетками
Культивирование
Трансдуцированные клетки

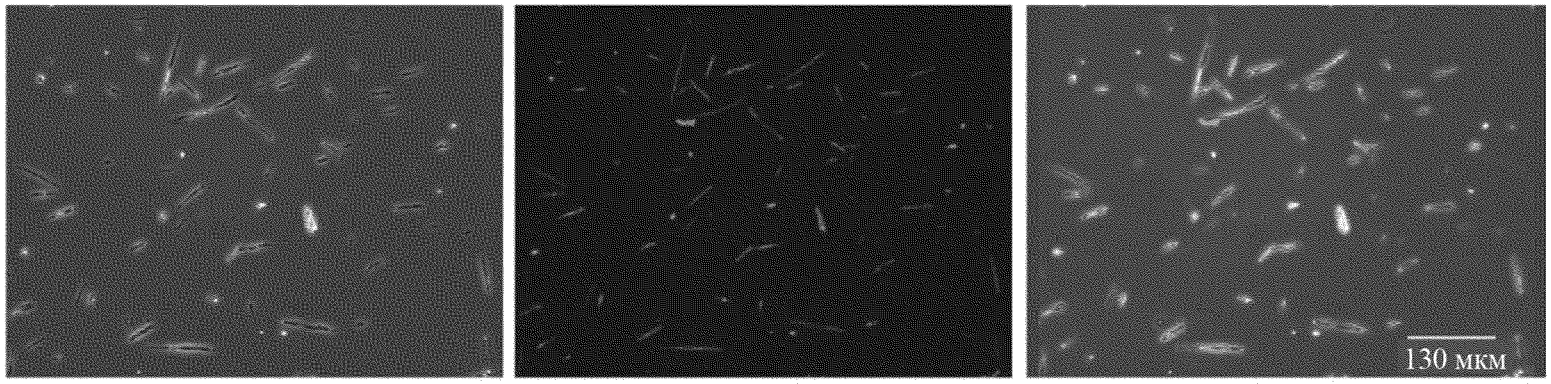
ФИГ. 4


% GFP+ среди живых лимфоцитов
% GFP+ среди живых лимфоцитов
20
15
10
5
0
Без вируса
2х лент.
1х лент.
-OH
-NH2
-N3
-COOH
-N+
-C11-N3
-C16
-C8
-поли-F
Свободный вирус
MSR + вирус
Разбавление от начальной концентрации
1
2
4
8
16
32

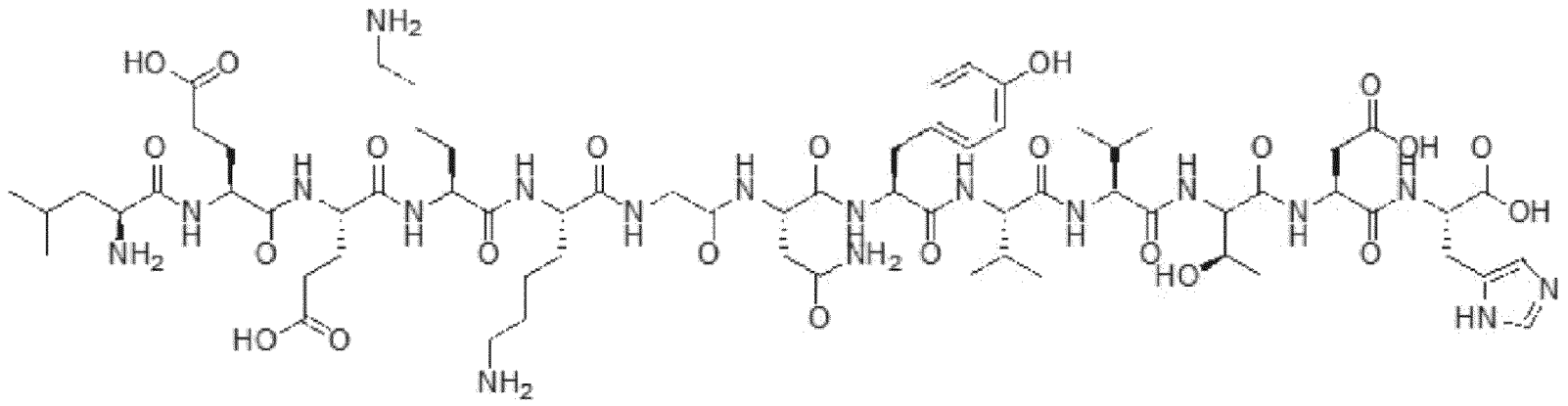
ФИГ. 5

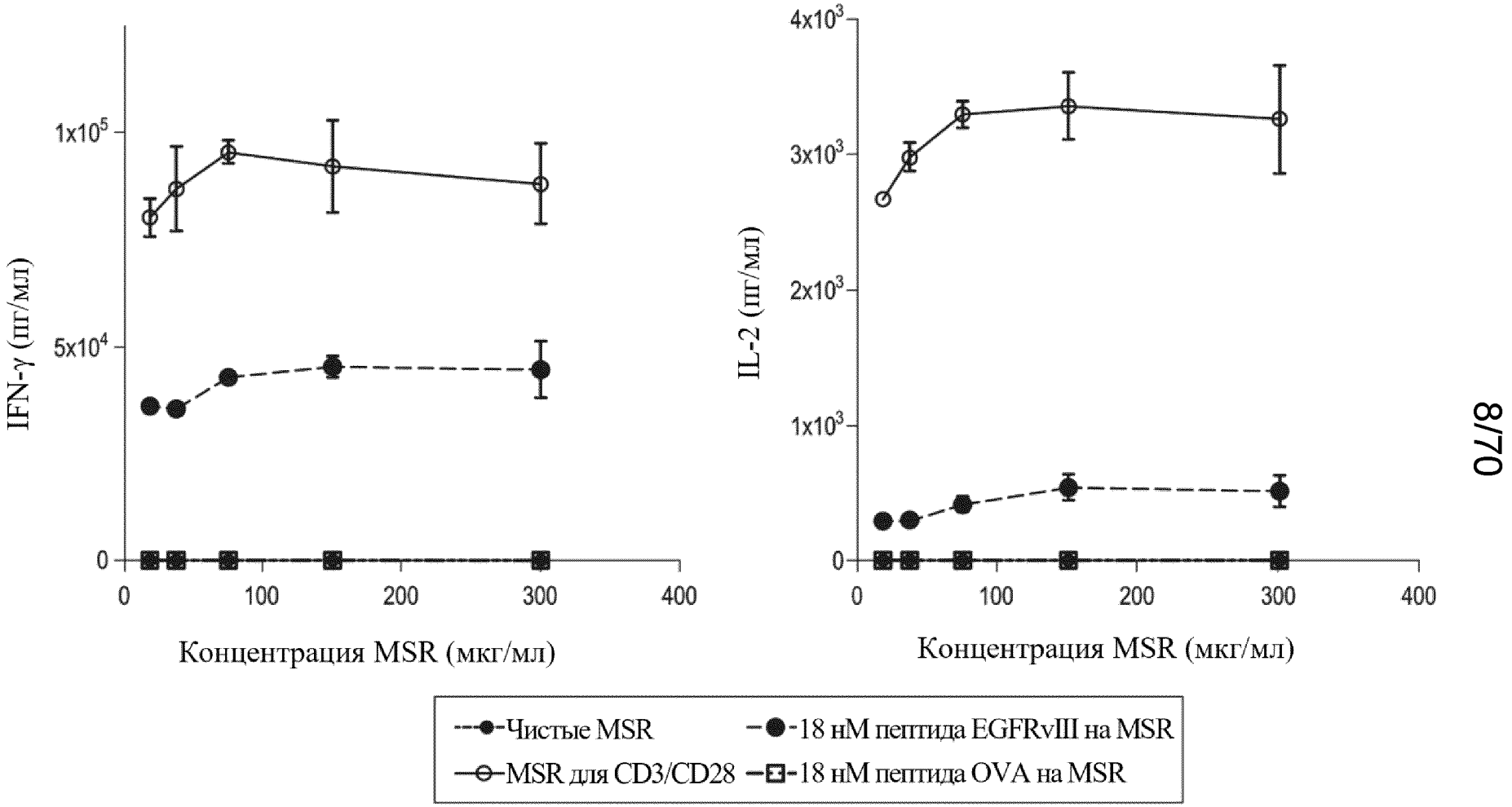

Липидный бислой на подложке на MSR
MSR ~ 100 мкм
Липосомы
~ 100 нм
Компоненты
MSR
Биотин
Стрептавидин
Липидный бислой
Антитело
MSR с присоединенными лигандами

ФИГ. 6



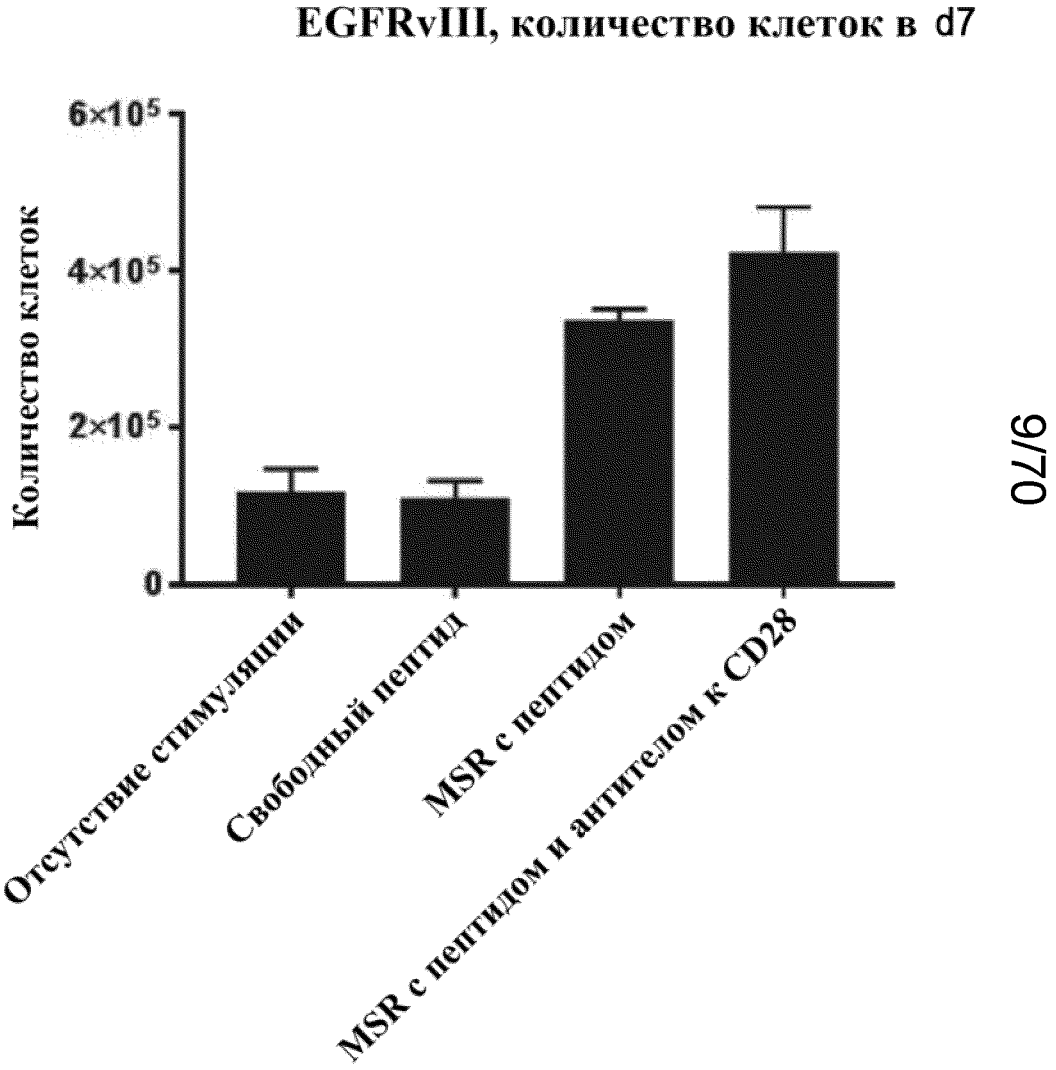
ФИГ. 7




IFN-γ (пг/мл)
1x10^5
5x10^4
0
0
100
200
300
400
Концентрация MSR (мкг/мл)
IL-2 (пг/мл)
4x10^3
3x10^3
2x10^3
1x10^3
0
0
100
200
300
400
Концентрация MSR (мкг/мл)
Чистые MSR
18 нМ пептида EGFRvIII на MSR
MSR для CD3/CD28
18 нМ пептида OVA на MSR

ФИГ. 8

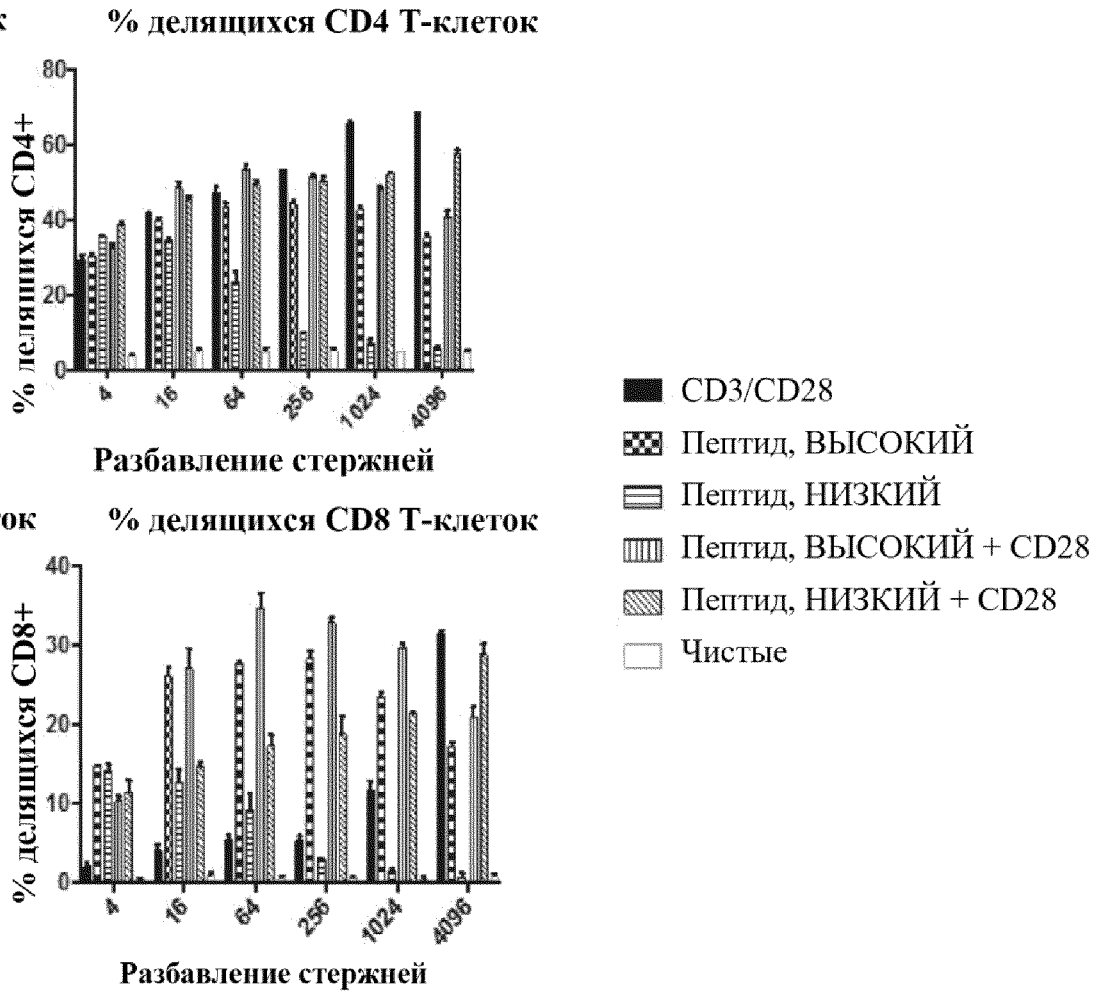
ФИГ. 9


EGFRvIII, количество клеток в d7
Количество клеток
6×10^5
4×10^5
2×10^5
0
Отсутствие стимуляции
Свободный пептид
MSR с пептидом
MSR с пептидом и антителом к CD28

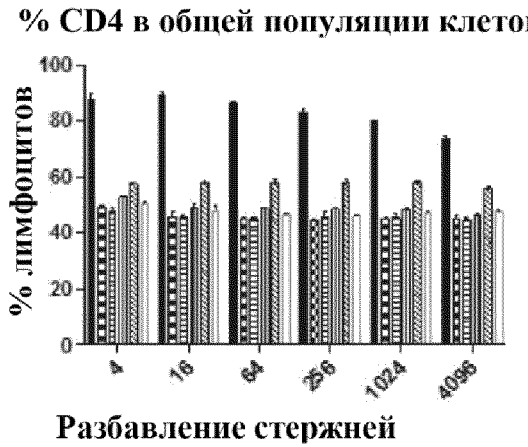
ФИГ. 10А

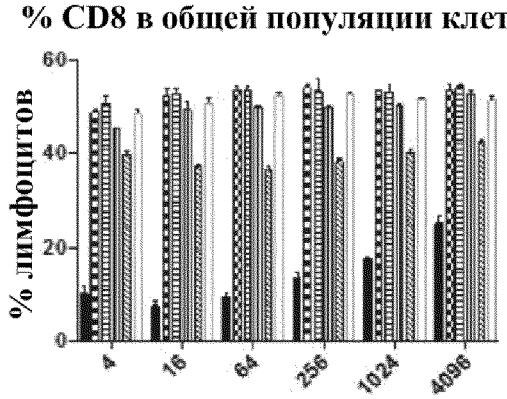


ФИГ. 10В

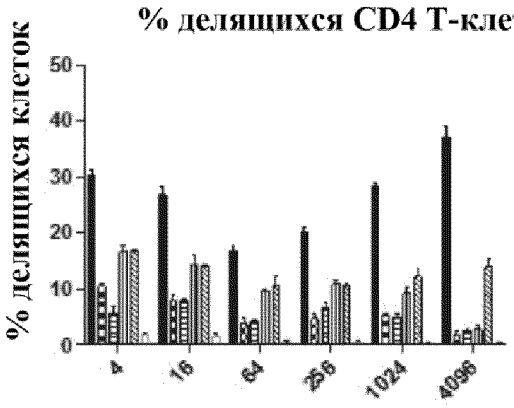


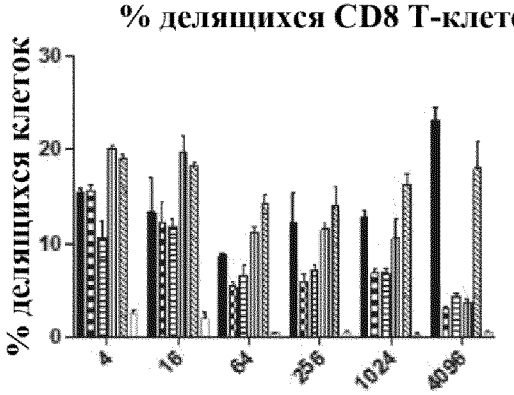
ФИГ. 11A

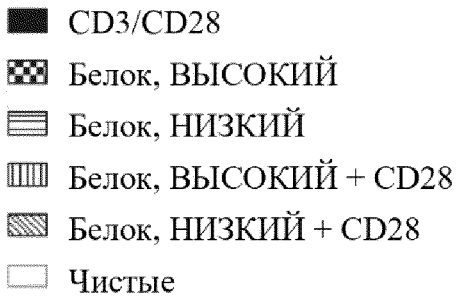




ФИГ. 11B



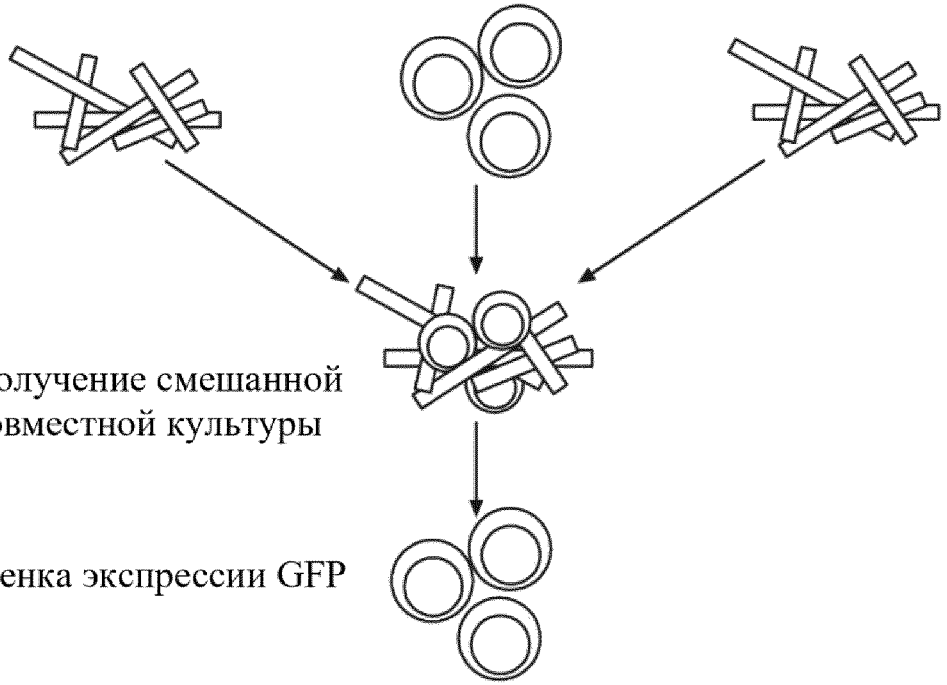




Активирующие MSR

- Гидроксил-функционализированные MSR с липидным покрытием, презентирующие агонистические антитела к CD3/CD28

Нестимулированные Т-клетки человека

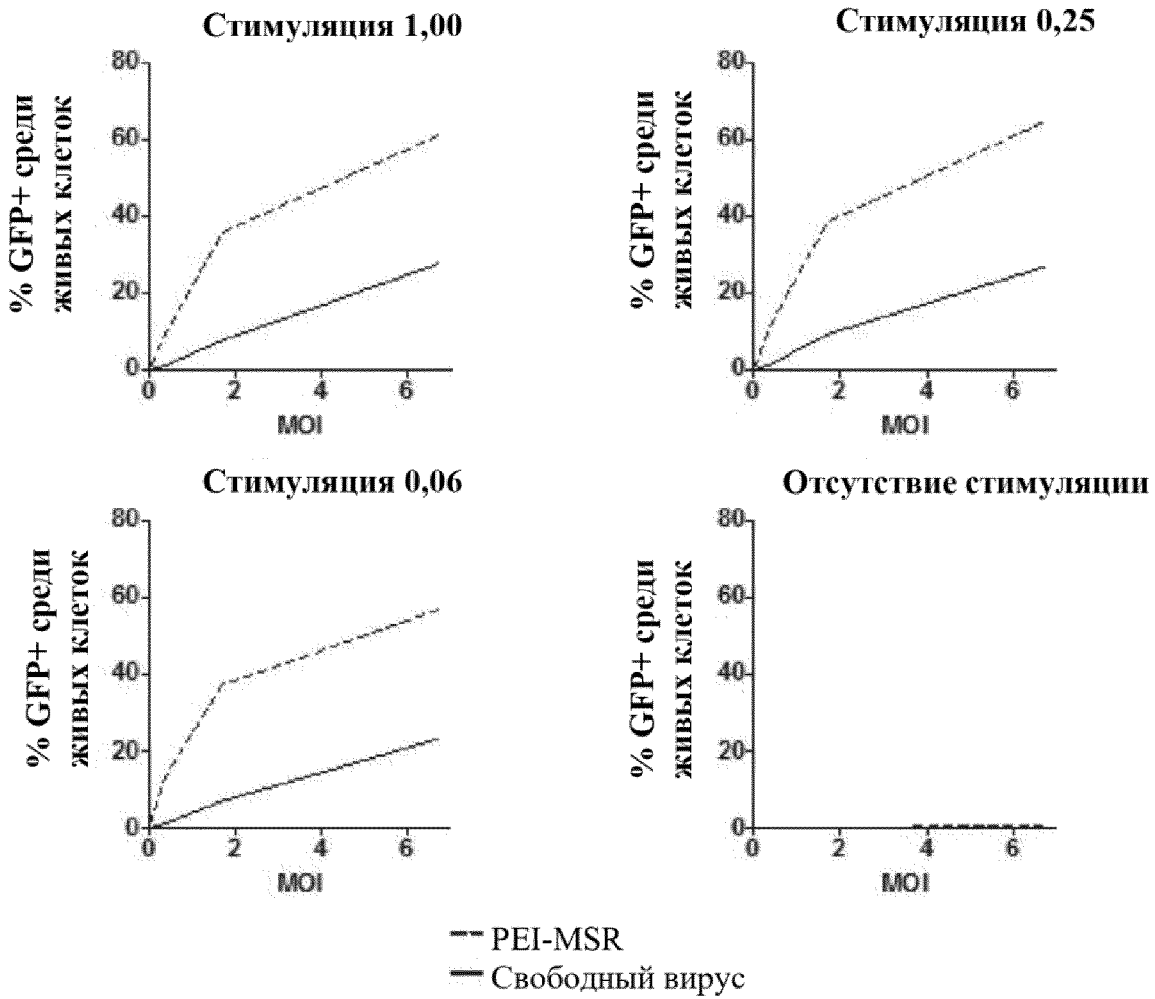


MSR, нагруженные вирусом

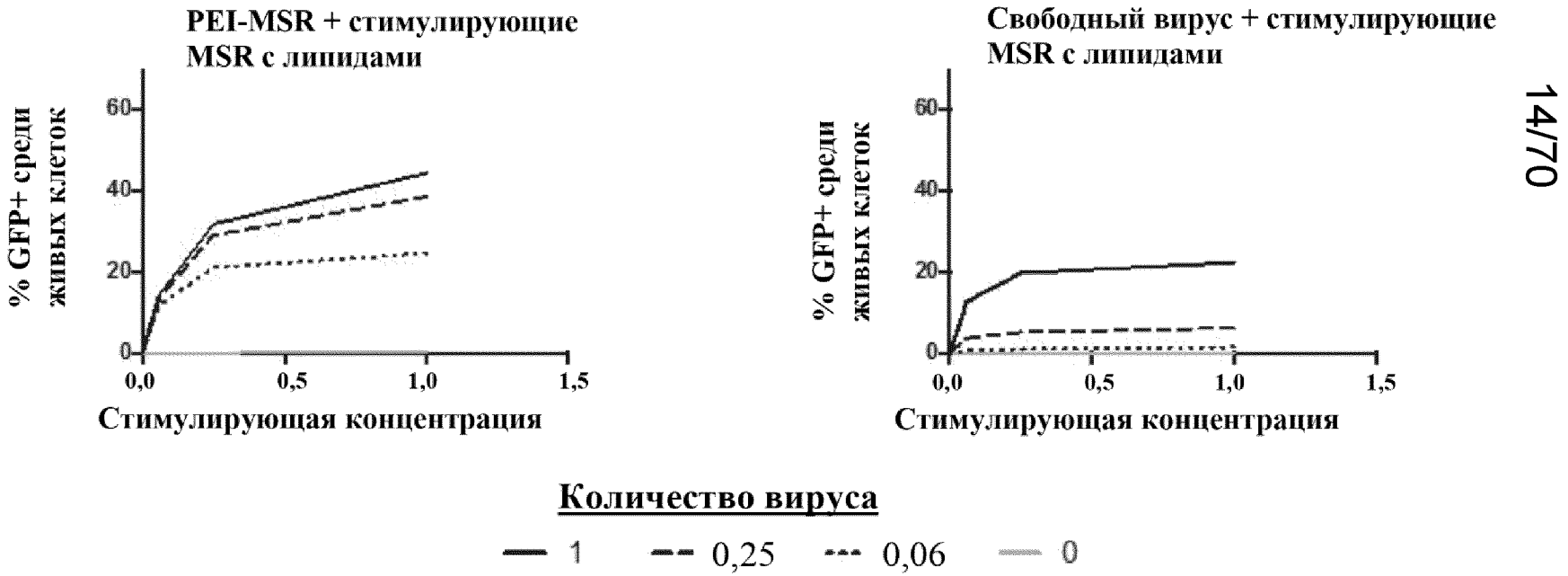
- MSR, содержащие привитый разветвленный PEI и инкубируемые с лентивирусом с GFP перед добавлением в культуру

ФИГ. 12

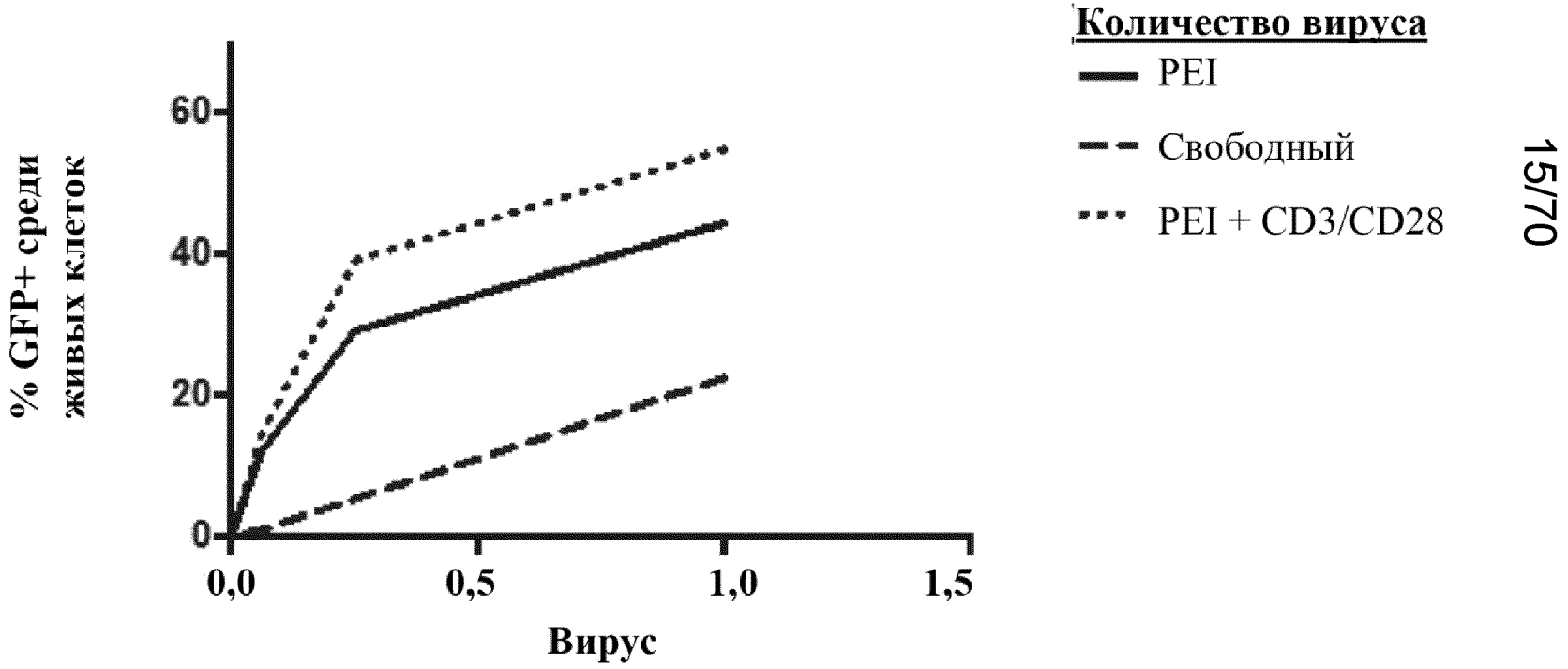
ФИГ. 13

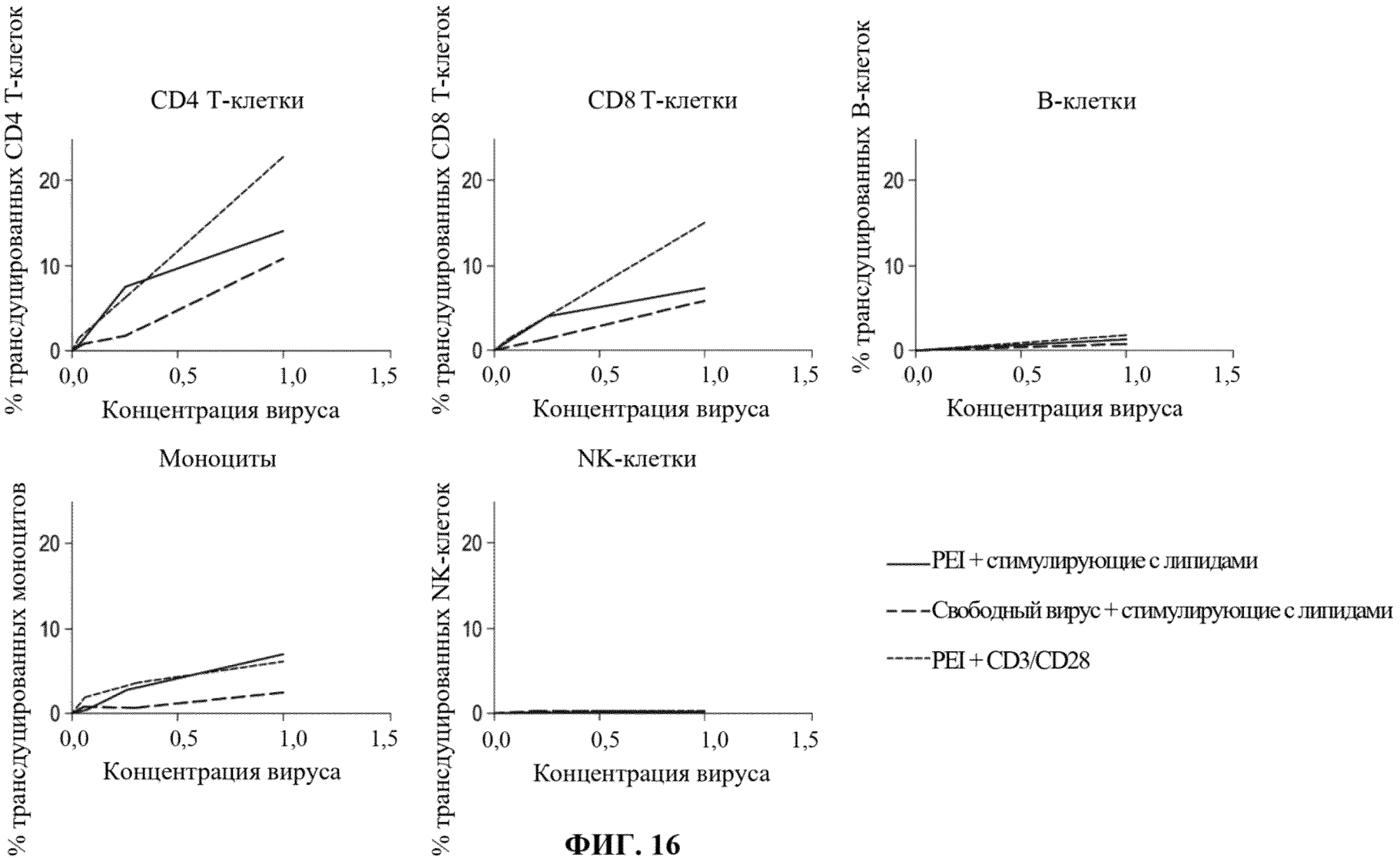

Стимуляция 1,00
Стимуляция 0,25
Стимуляция 0,06
Отсутствие стимуляции
% GFP+ среди живых клеток
MOI
0
20
40
60
80
0
2
4
6
PEI-MSR
Свободный вирус

ФИГ. 14


PEI-MSR + стимулирующие MSR с липидами
% GFP+ среди живых клеток
60
40
20
0
0,0
0,5
1,0
1,5
Стимулирующая концентрация
Свободный вирус + стимулирующие MSR с липидами
% GFP+ среди живых клеток
60
40
20
0
0,0
0,5
1,0
1,5
Стимулирующая концентрация
Количество вируса
1
0,25
0,06
0

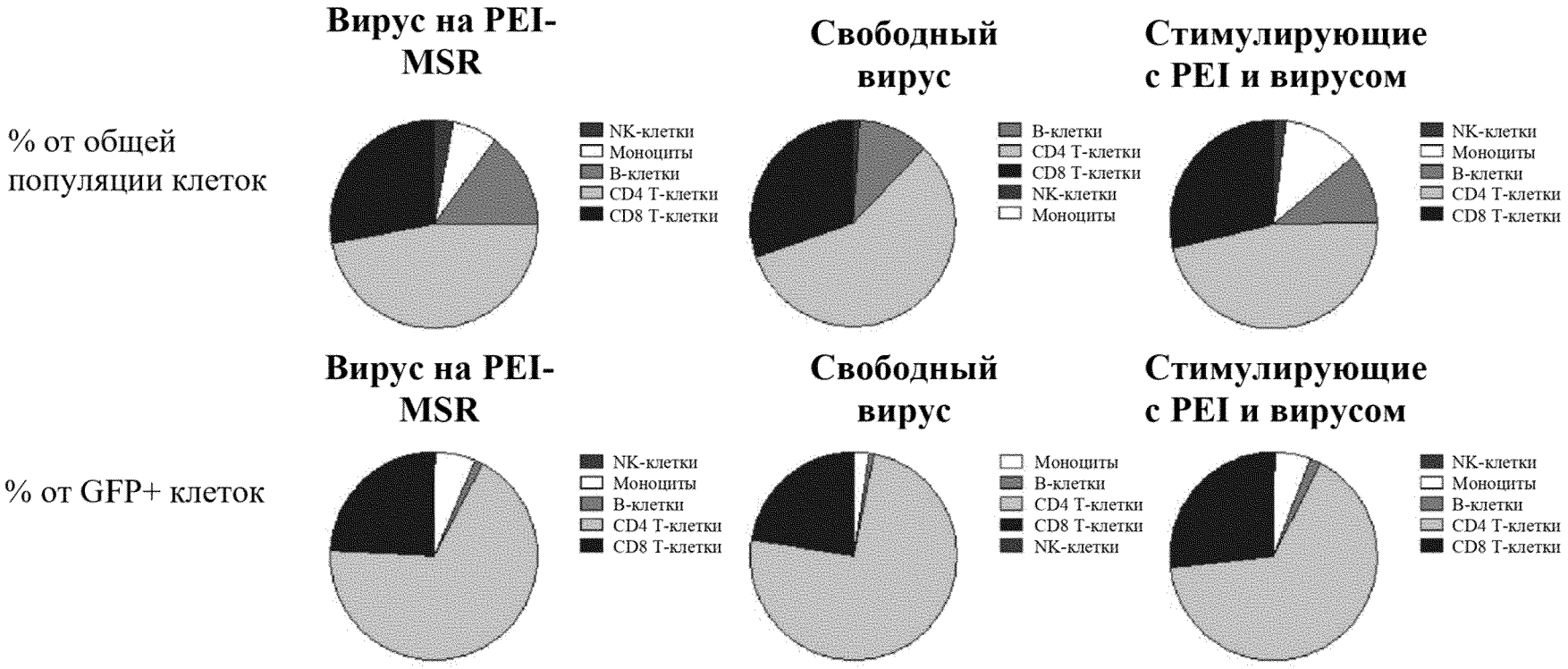
ФИГ. 15


% GFP+ среди живых клеток
60
40
20
0
0,0
0,5
1,0
1,5
Вирус
Количество вируса
PEI
Свободный
PEI + CD3/CD28

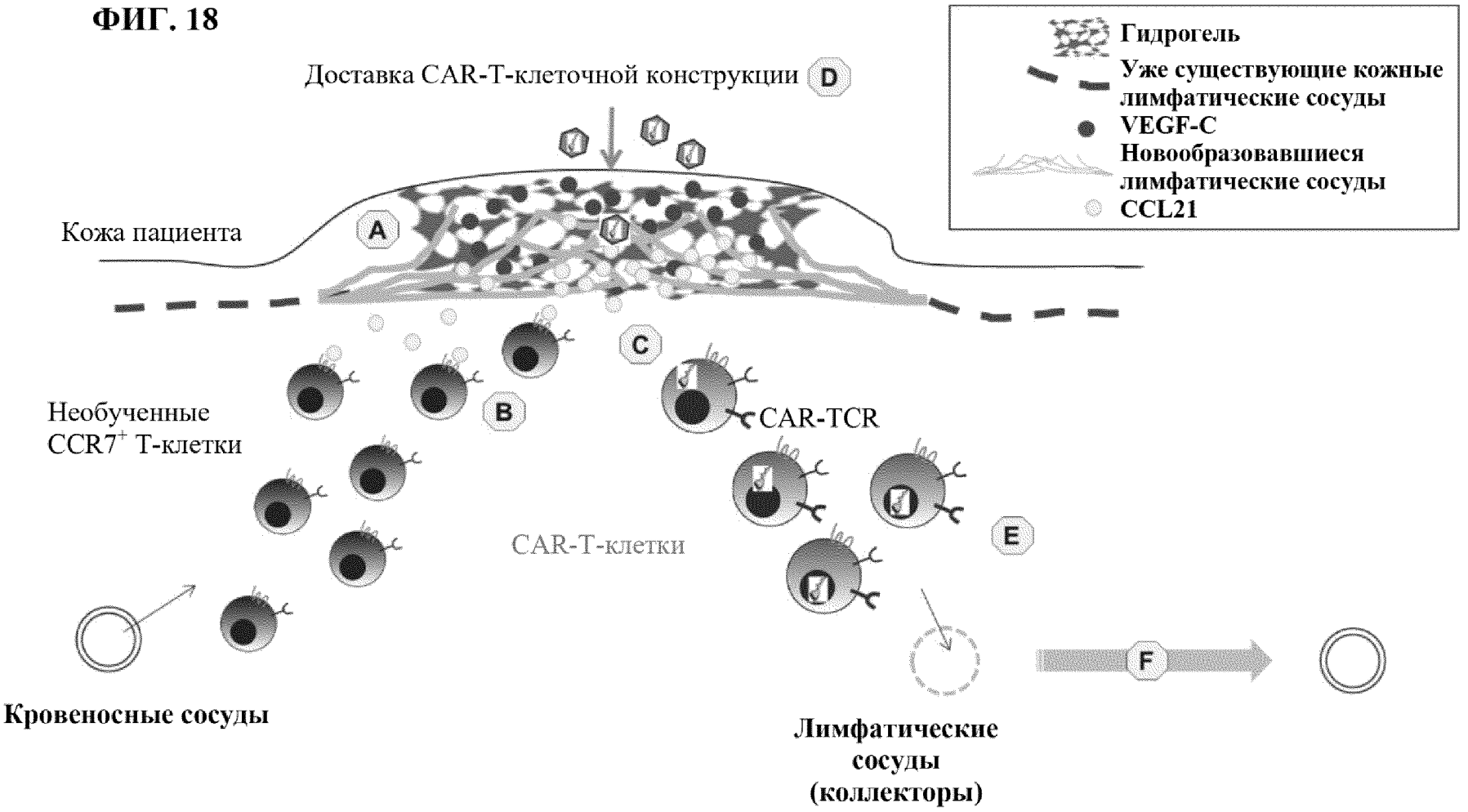

CD4 Т-клетки
% трансдуцированных CD4 Т-клеток
CD8 Т-клетки
% трансдуцированных CD8 Т-клеток
B-клетки
% трансдуцированных B-клеток
Моноциты
% трансдуцированных моноцитов
NK-клетки
% трансдуцированных NK-клеток
0
10
20
0,0
0,5
1,0
1,5
Концентрация вируса
PEI + стимулирующие с липидами
Свободный вирус + стимулирующие с липидами
PEI + CD3/CD28

ФИГ. 16

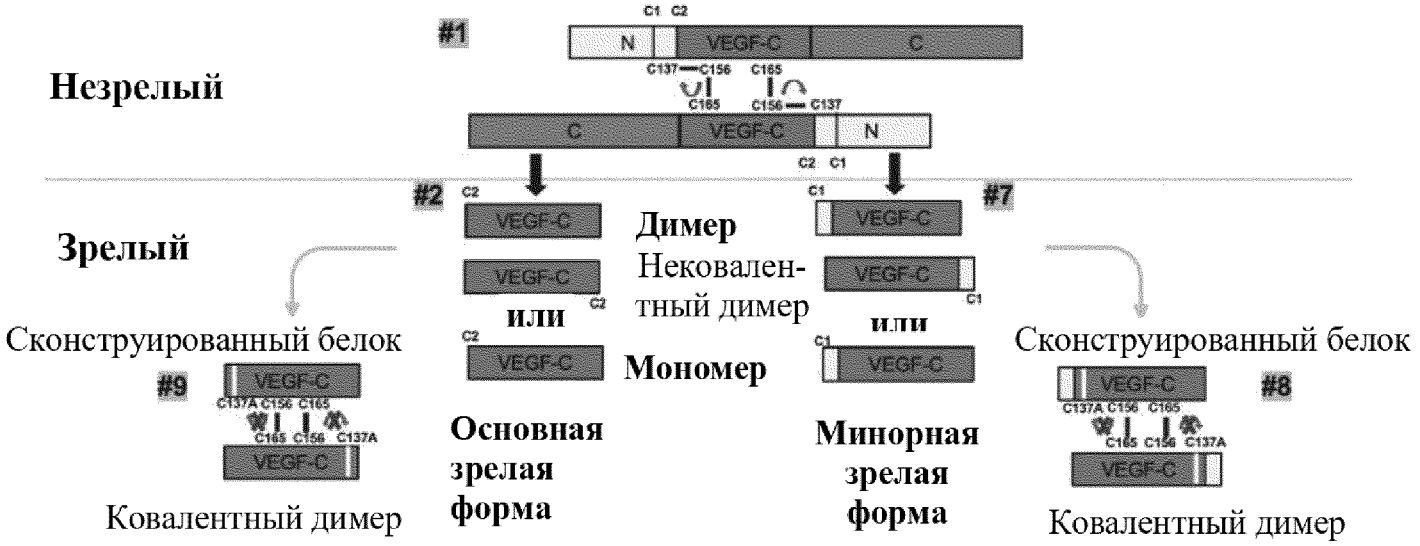
ФИГ. 17


Вирус на PEI-MSR
Свободный вирус
Стимулирующие с PEI и вирусом
% от общей популяции клеток
NK-клетки
Моноциты
B-клетки
CD4 T-клетки
CD8 T-клетки
Вирус на PEI-MSR
Свободный вирус
Стимулирующие с PEI и вирусом
% от GFP+ клеток
NK-клетки
Моноциты
B-клетки
CD4 T-клетки
CD8 T-клетки

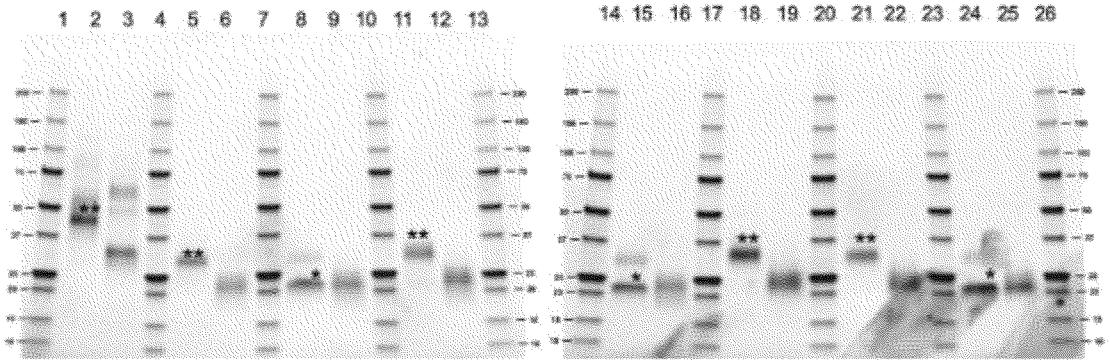
ФИГ. 18


Гидрогель
Уже существующие кожные лимфатические сосуды
VEGF-C
Новообразовавшиеся лимфатические сосуды
CCL21
Доставка CAR-T-клеточной конструкции
D
Кожа пациента
A
B
C
CAR-TCR
Необученные CCR7+ Т-клетки
CAR-T-клетки
E
F
Кровеносные сосуды
Лимфатические сосуды (коллекторы)

ФИГ. 19А


Незрелый
#1
N
VEGF-C
C
C1 C2
C137 C156 C165
C165 C156 C137
C
VEGF-C
N
C2 C1
Зрелый
#2
C2
VEGF-C
VEGF-C
C2
или
C2
VEGF-C
Димер
Нековален-
тный димер
Мономер
C1
VEGF-C
#7
VEGF-C
C1
или
C1
VEGF-C
Сконструированный белок
#9
VEGF-C
C137A C156 C165
C165 C156 C137A
VEGF-C
Ковалентный димер
Основная
зрелая
форма
Минорная
зрелая
форма
Сконструированный белок
VEGF-C
C137A C156 C165
C165 C156 C137A
VEGF-C
#8
Ковалентный димер

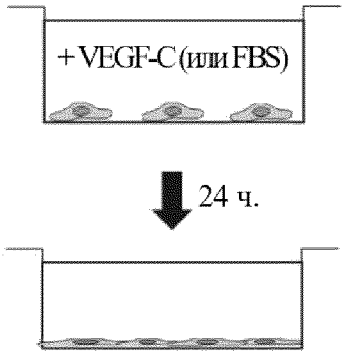
ФИГ. 19B



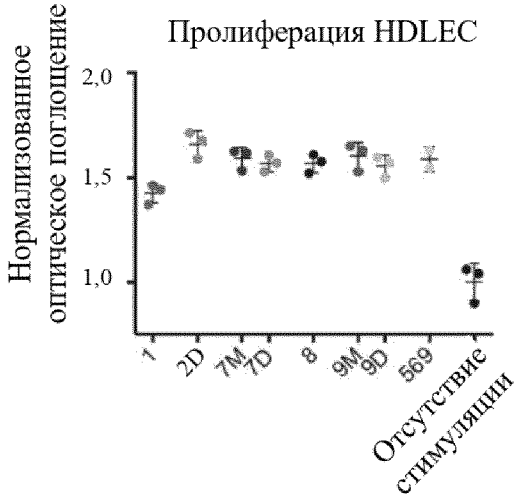
ФИГ. 19C

Дорожка	Продукт	Дорожка	Продукт
1	Маркер молекулярной массы	14	Маркер молекулярной массы
2	VEGF-C 1 NR**	15	VEGF-C 7 NR**
3	VEGF-C 1 R**	16	VEGF-C 7 R**
4	Маркер молекулярной массы	17	Маркер молекулярной массы
5	VEGF-C 2 NR**	18	VEGF-C 8 NR**
6	VEGF-C 2 R**	19	VEGF-C 8 R**
7	Маркер молекулярной массы	20	Маркер молекулярной массы
8	VEGF-C 2 NR**	21	VEGF-C 9 NR**
9	VEGF-C 2 R*	22	VEGF-C 9 R**
10	Маркер молекулярной массы	23	Маркер молекулярной массы
11	VEGF-C 7 NR**	24	VEGF-C 9 NR*
12	VEGF-C 7 R**	25	VEGF-C 9 R*
13	Маркер молекулярной массы	26	Маркер молекулярной массы

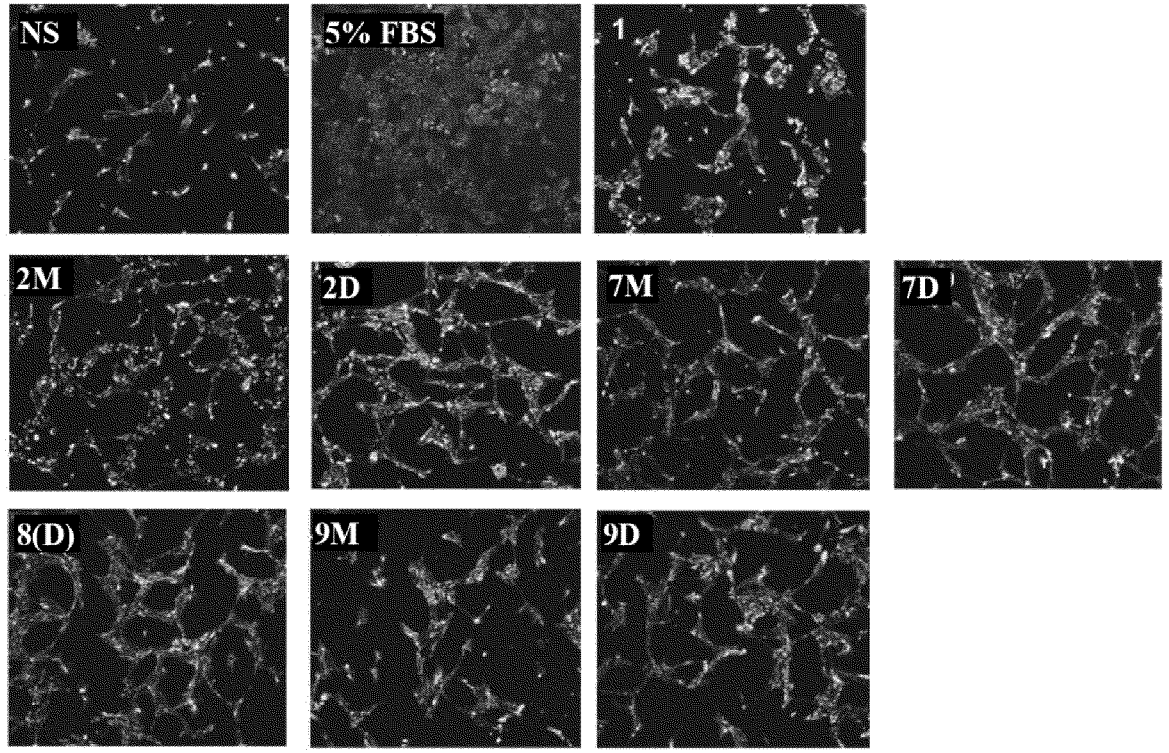
ФИГ. 20A



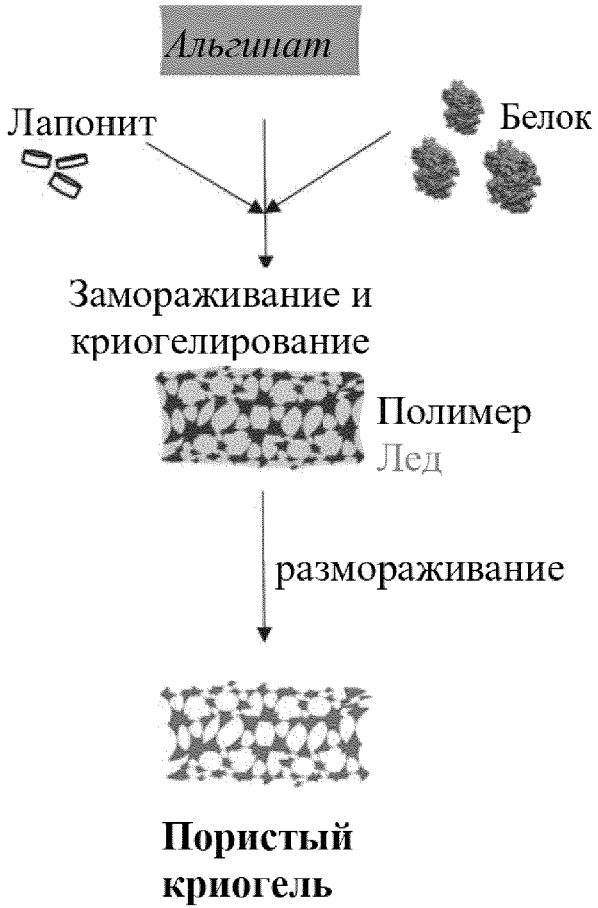
ФИГ. 20B



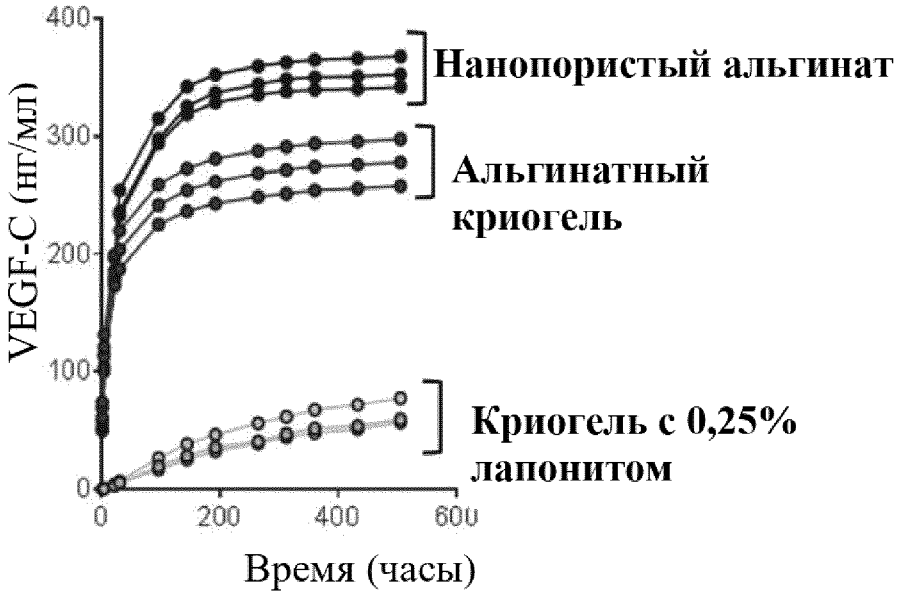
ФИГ. 20C



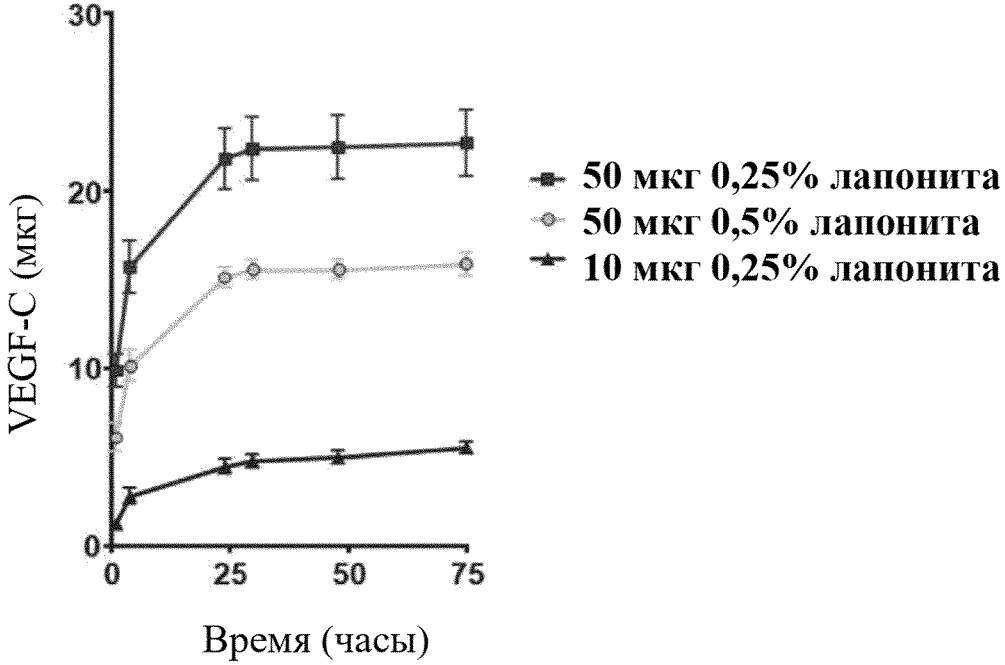
ФИГ. 21A



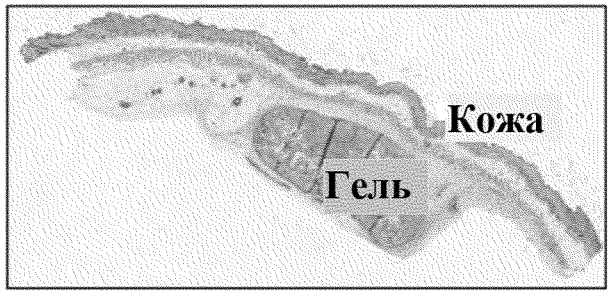
ФИГ. 21B



ФИГ. 21C



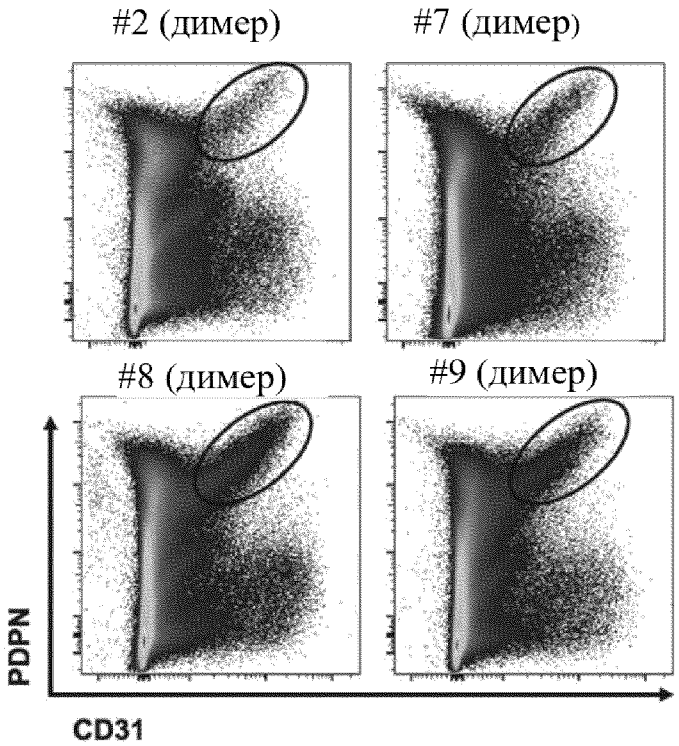
ФИГ. 21D



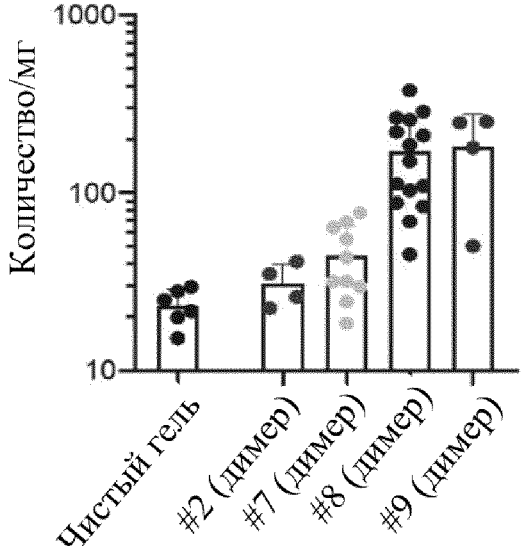
ФИГ. 22A



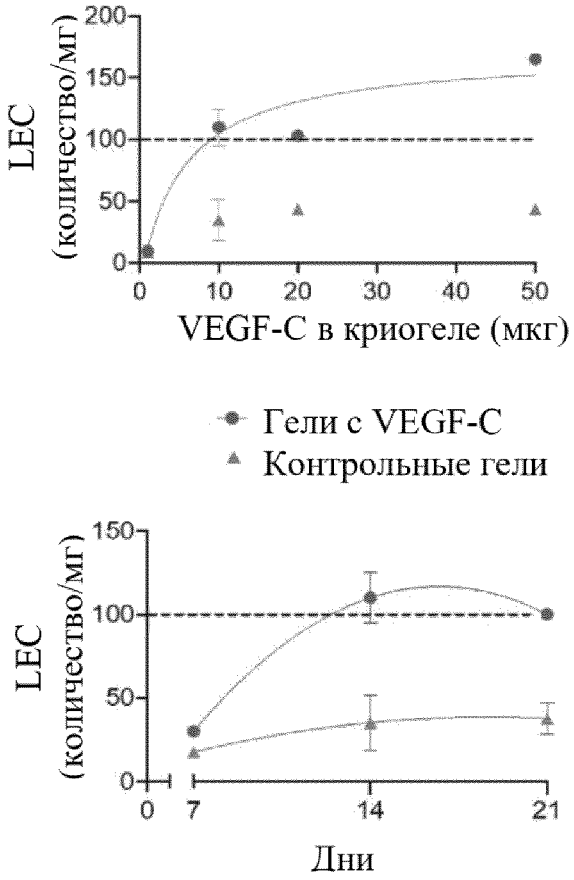
ФИГ. 22B



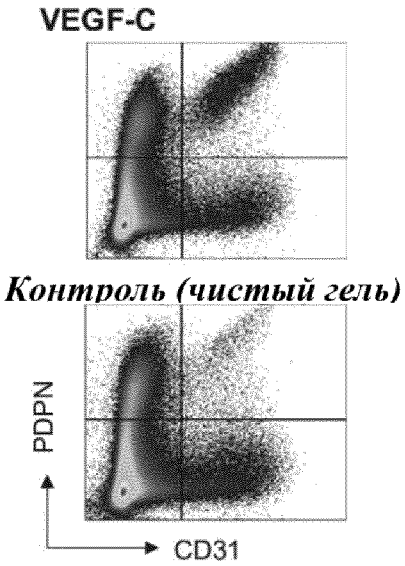
ФИГ. 22C



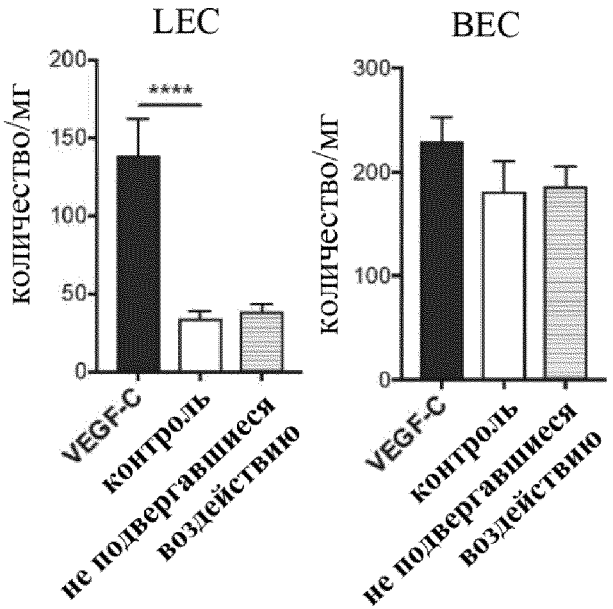
ФИГ. 23A



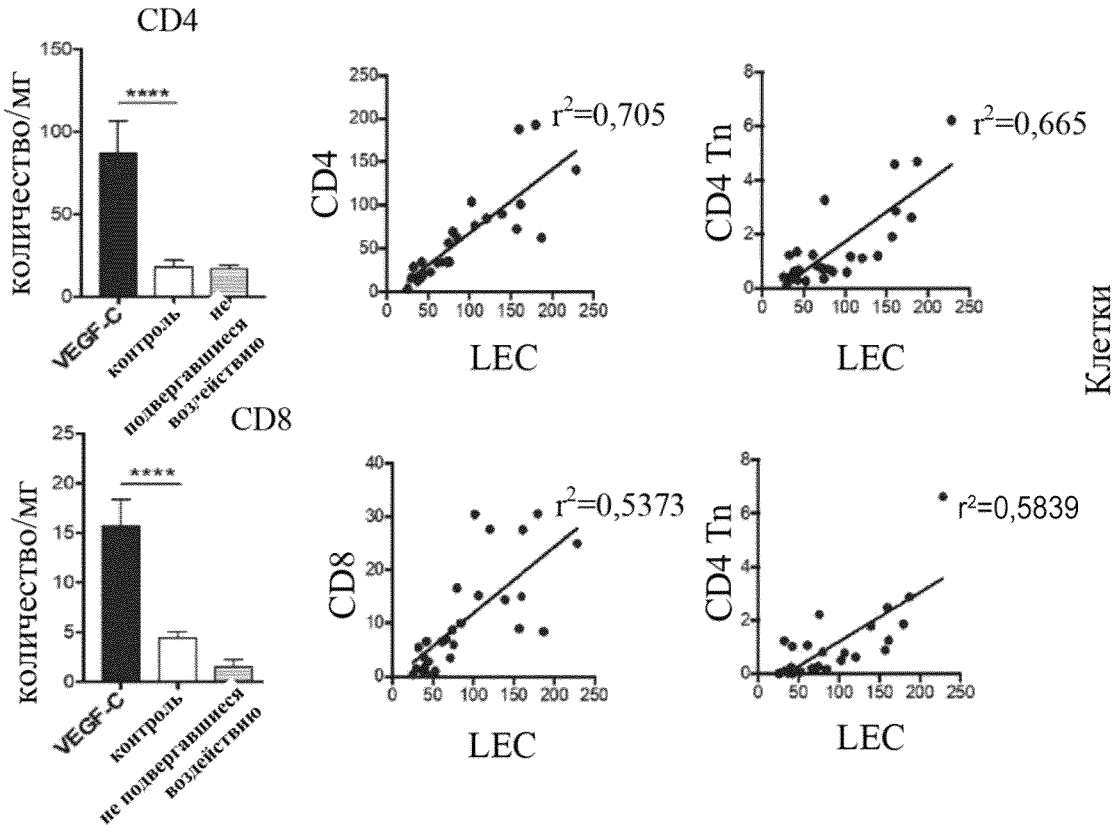
ФИГ. 23B



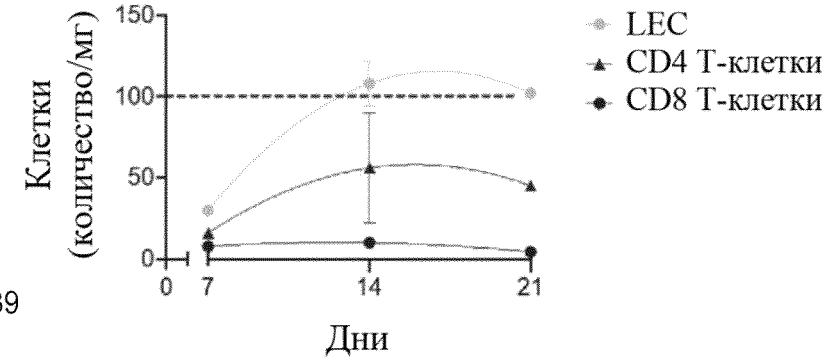
ФИГ. 23C



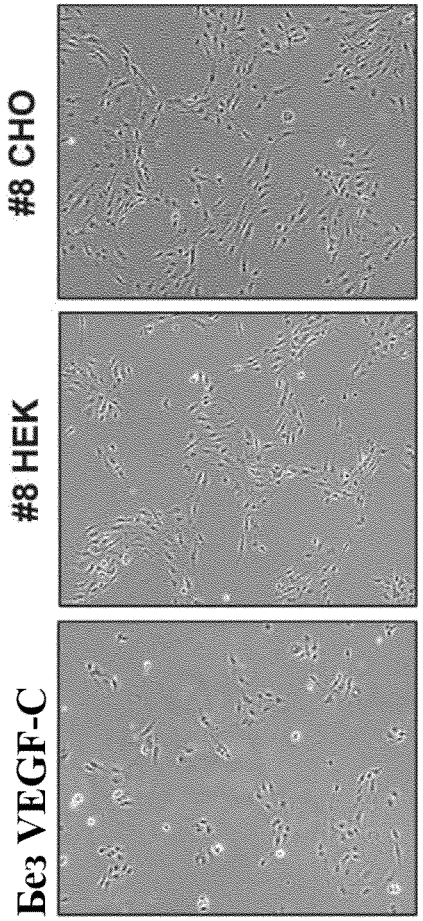
ФИГ. 23D



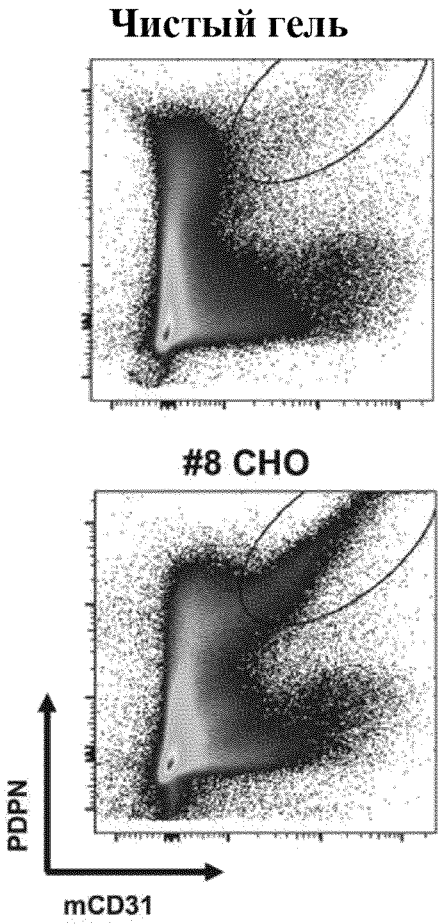
ФИГ. 23E



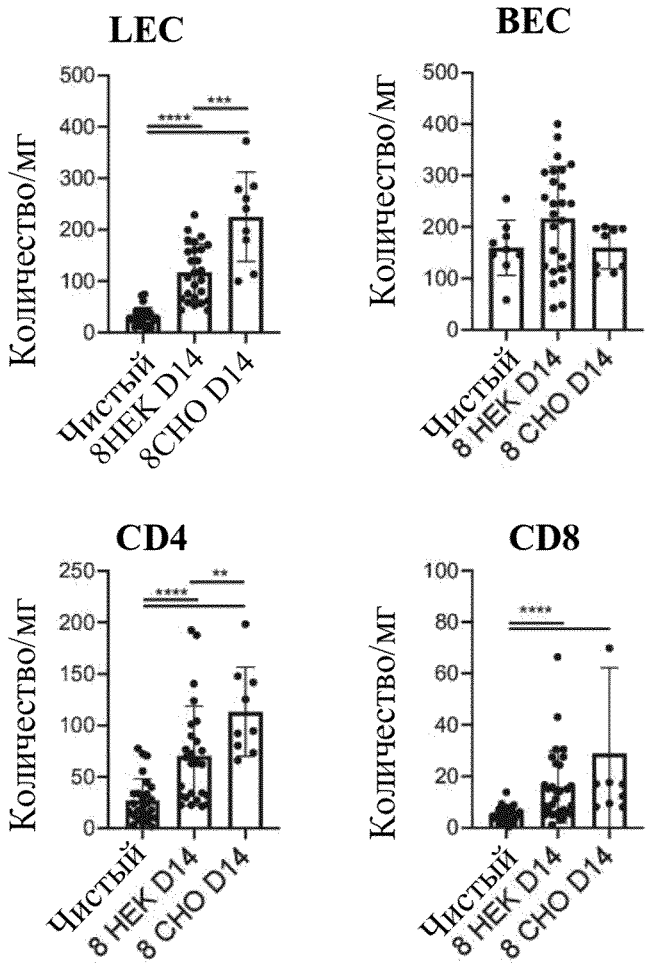
ФИГ. 24A



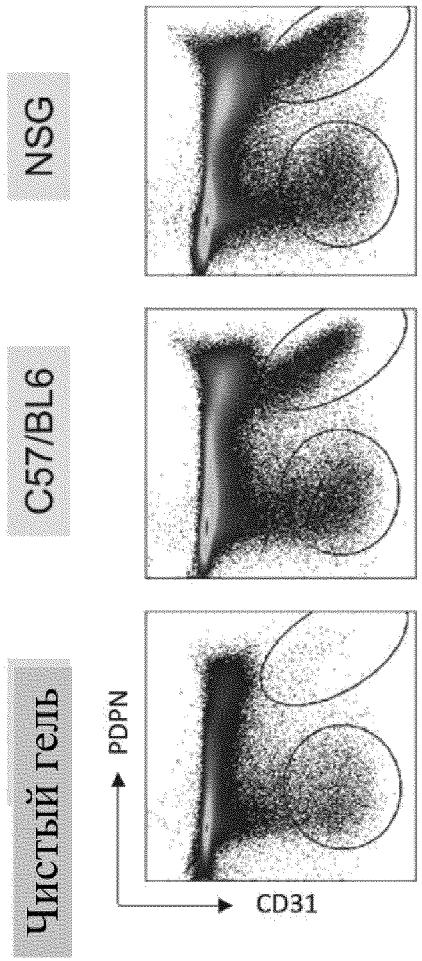
ФИГ. 24B



ФИГ. 24C



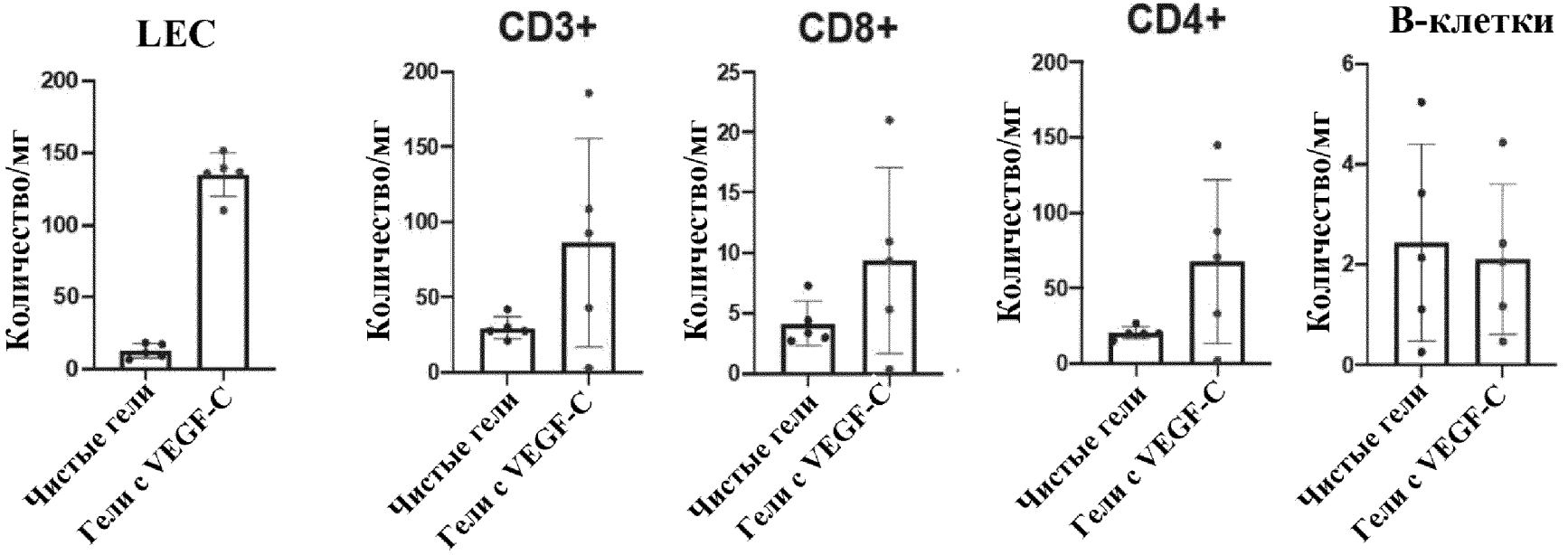
ФИГ. 25A



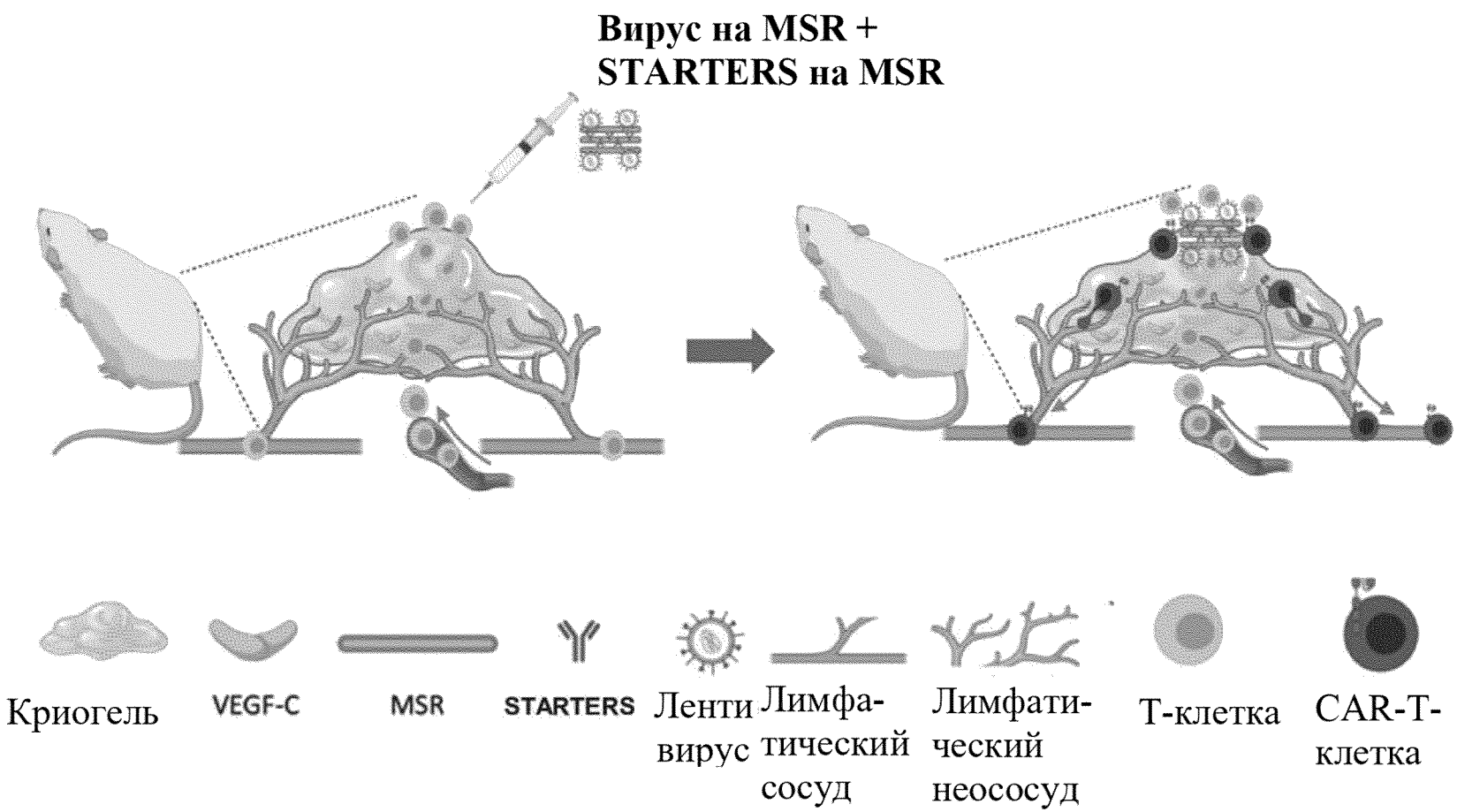
ФИГ. 25B



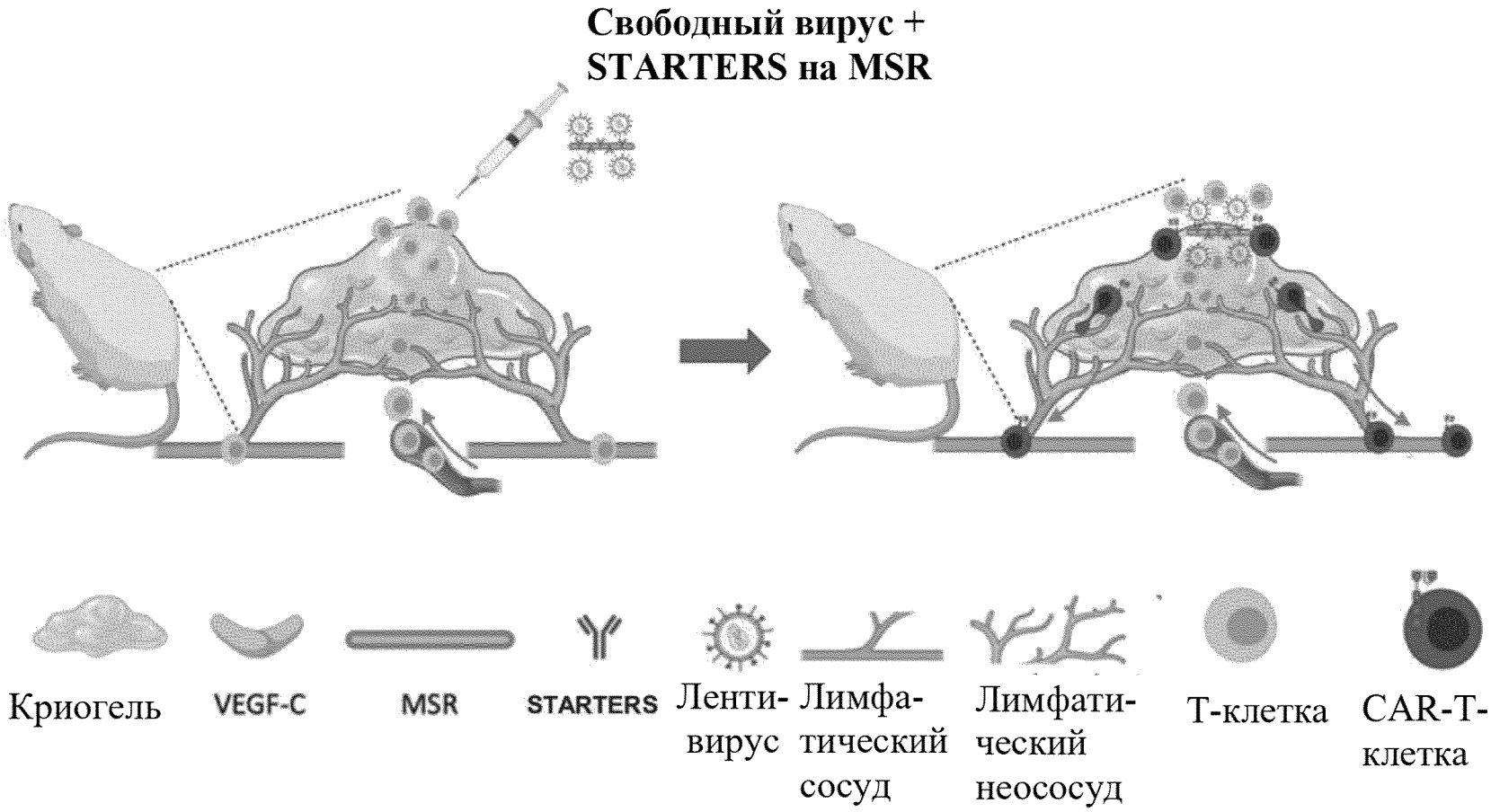
ФИГ. 25C


LEC
CD3+
CD8+
CD4+
B-клетки
Количество/мг
Чистые гели
Гели с VEGF-C

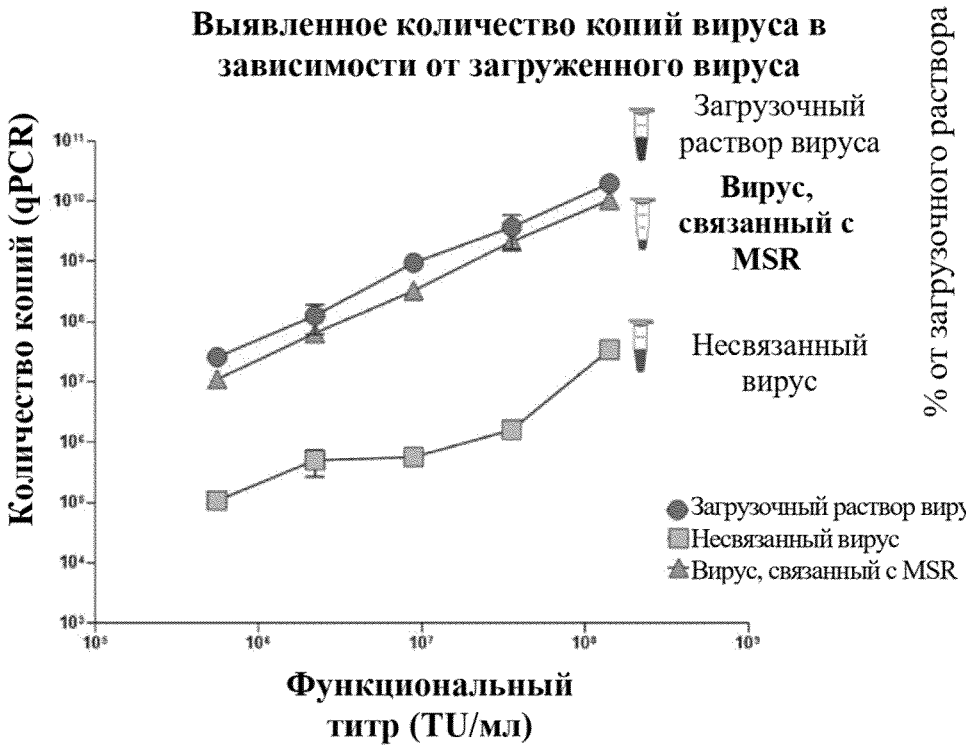
ФИГ. 26А


Вирус на MSR +
STARTERS на MSR
Криогель
VEGF-C
MSR
STARTERS
Ленти вирус
Лимфа-тический сосуд
Лимфати-ческий неососуд
Т-клетка
CAR-T-клетка

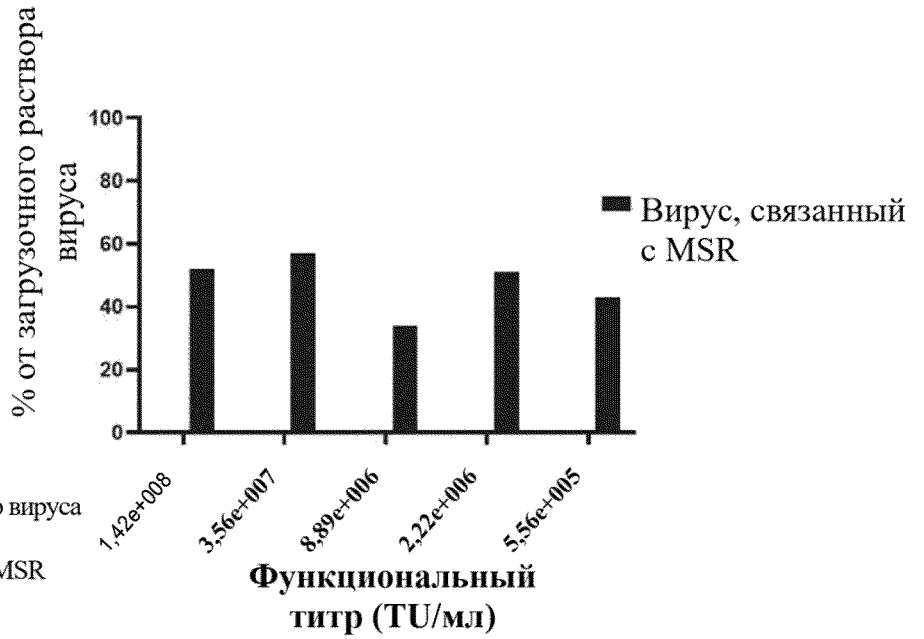
ФИГ. 26B


Свободный вирус +
STARTERS на MSR
Криогель
VEGF-C
MSR
STARTERS
Ленти-вирус
Лимфатический сосуд
Лимфатический неососуд
Т-клетка
CAR-T-клетка

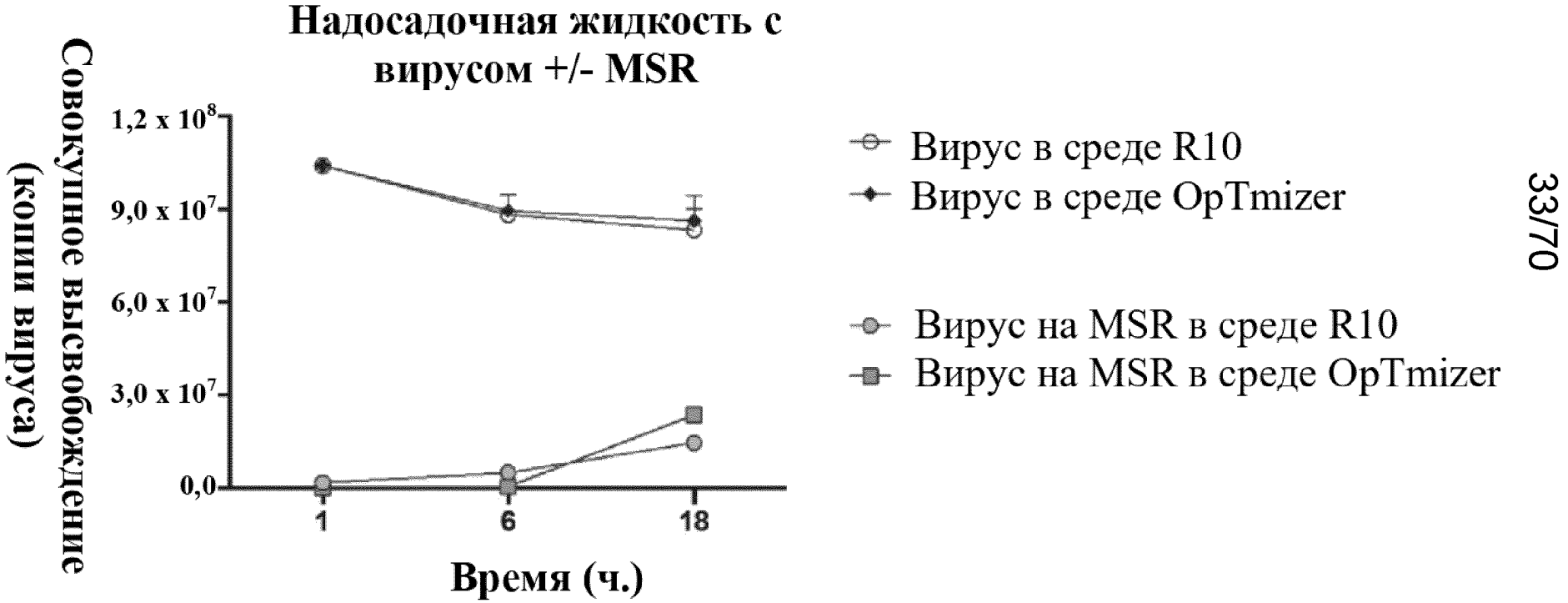
ФИГ. 27A



ФИГ. 27B

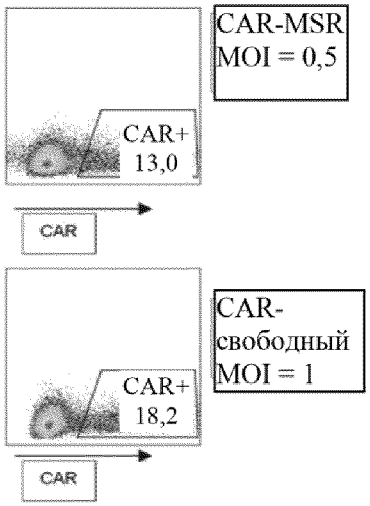


ФИГ. 28


Надосадочная жидкость с вирусом +/- MSR
Совокупное высвобождение (копии вируса)
1,2 x 10^8
9,0 x 10^7
6,0 x 10^7
3,0 x 10^7
0,0
1
6
18
Время (ч.)
Вирус в среде R10
Вирус в среде OpTmizer
Вирус на MSR в среде R10
Вирус на MSR в среде OpTmizer

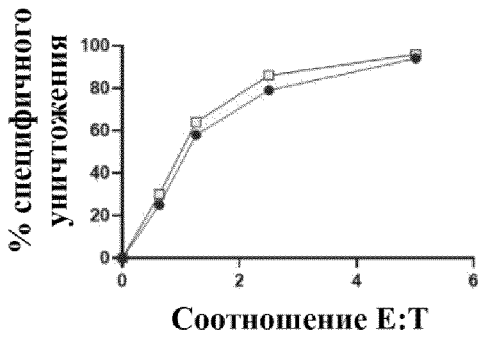
ФИГ. 29A

Эффективность трансдукции в день 4



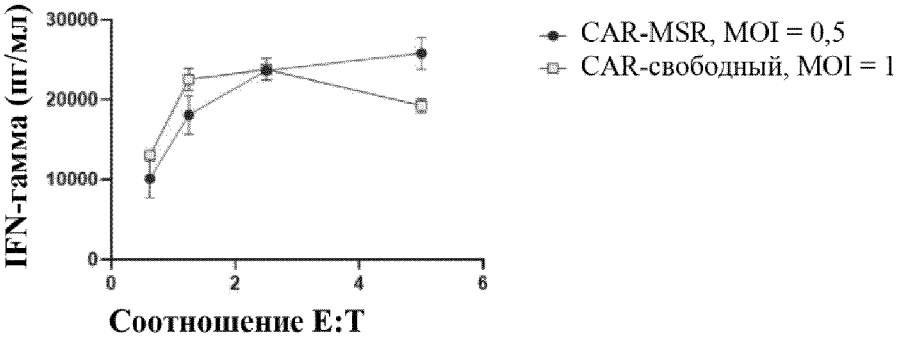
ФИГ. 29B

Совместное культивирование с Nalm6_Luc – специфичное уничтожение

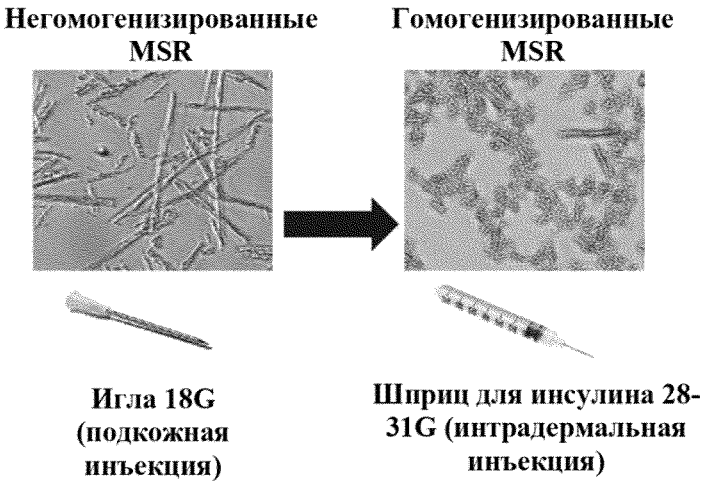


ФИГ. 29C

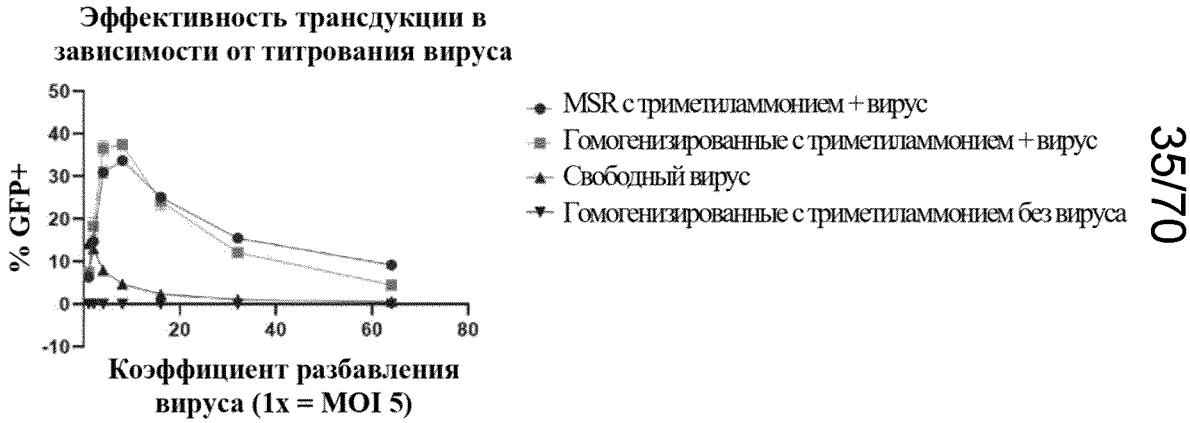
Совместное культивирование с Nalm6_Luc – высвобождение IFNγ



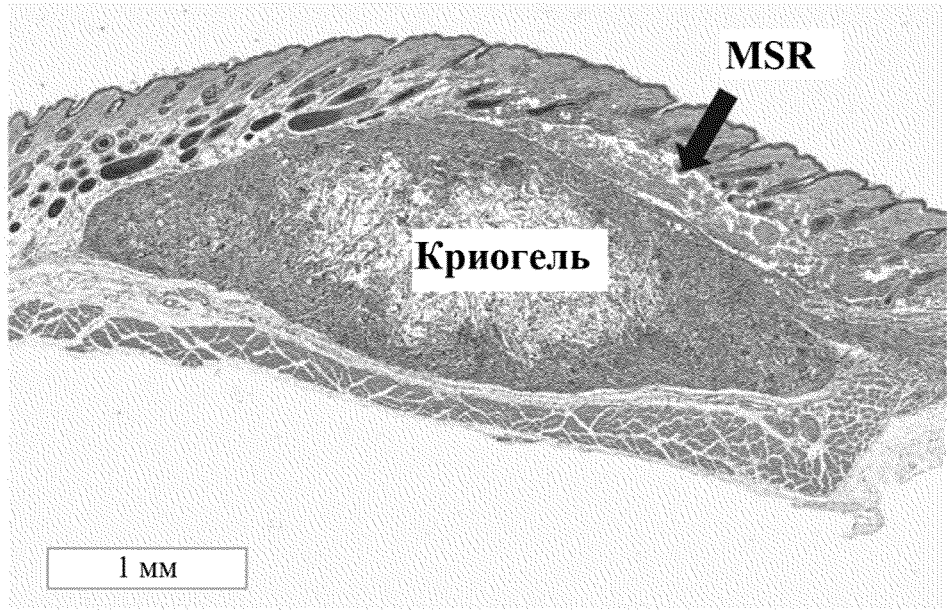
ФИГ. 30A



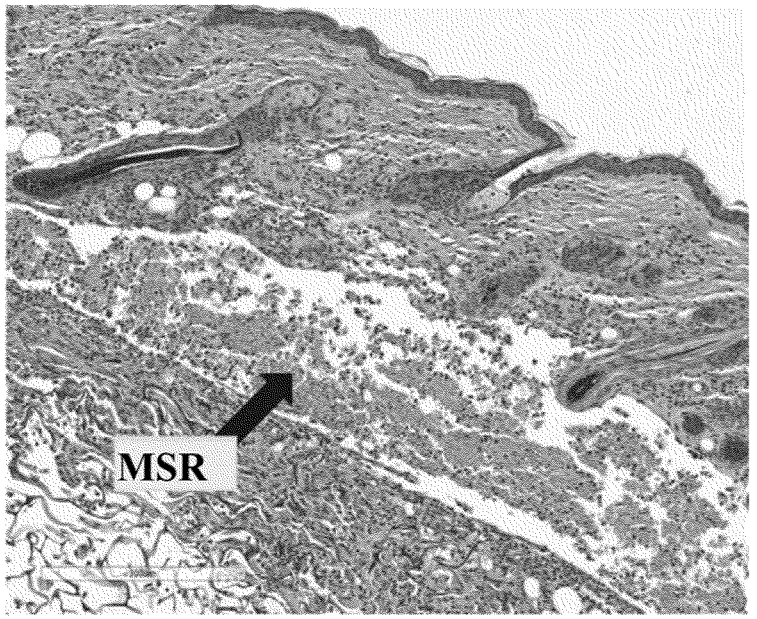
ФИГ. 30B



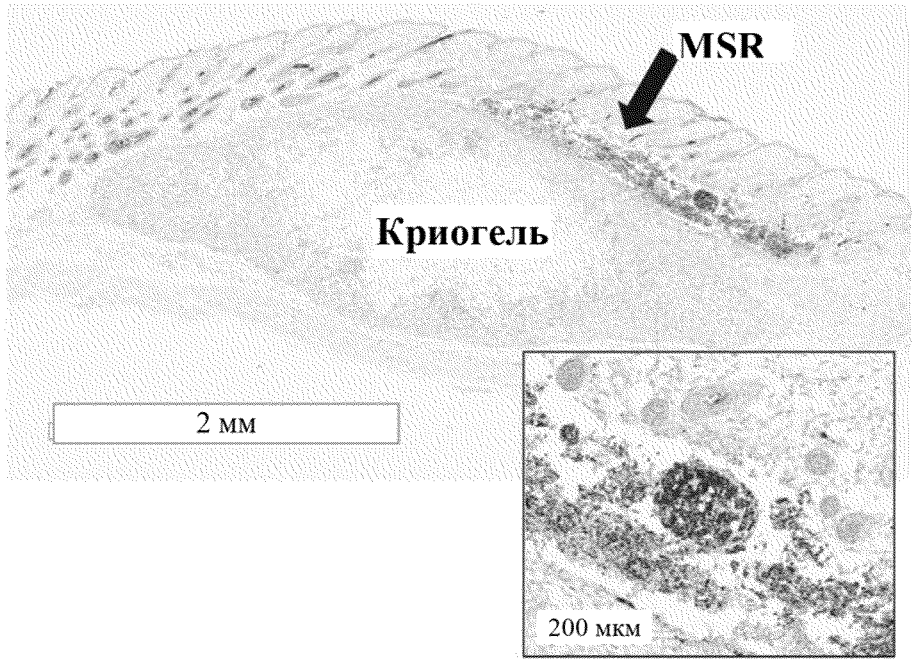
ФИГ. 31A



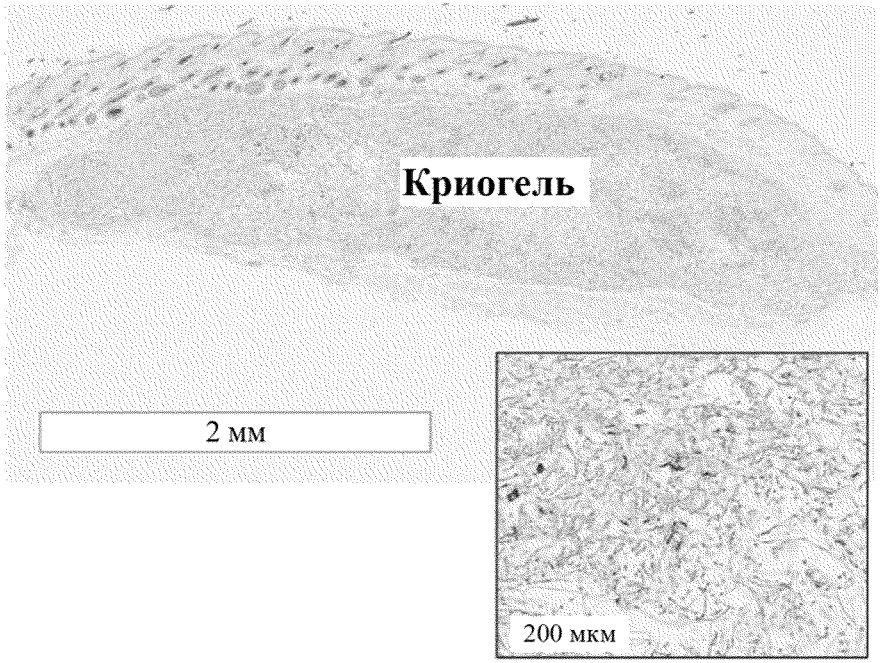
ФИГ. 31B



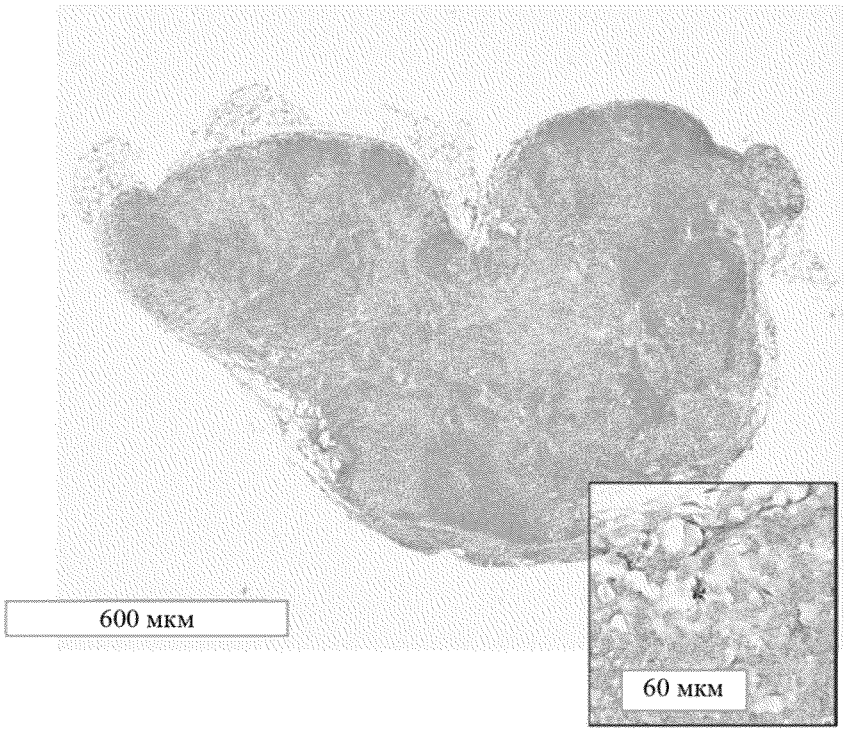
ФИГ. 32A



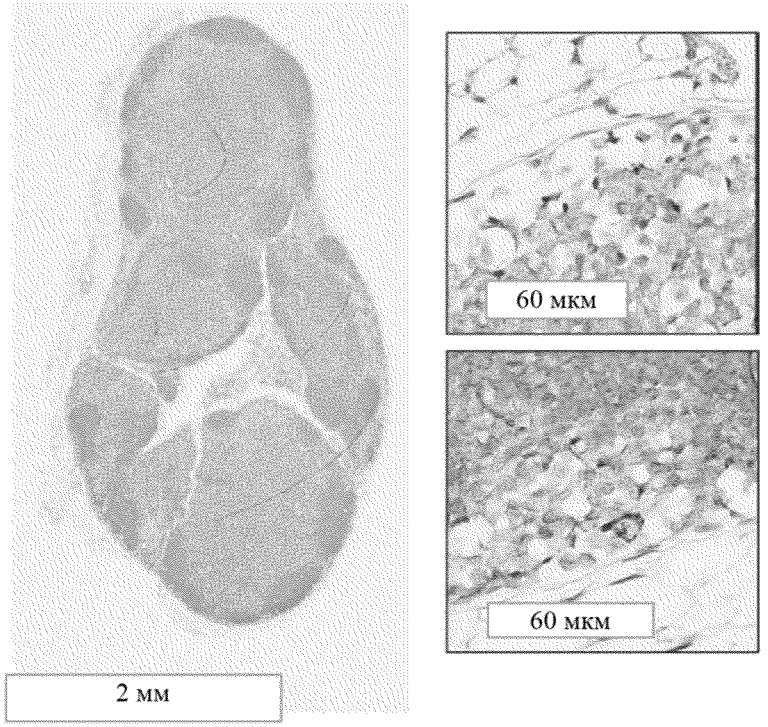
ФИГ. 32B



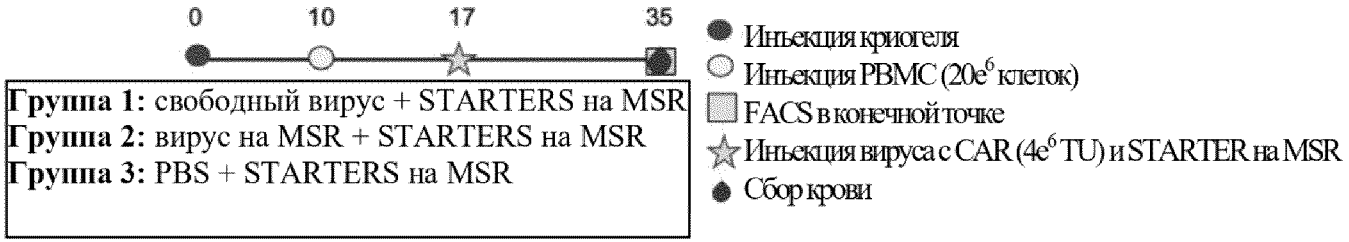
ФИГ. 33А



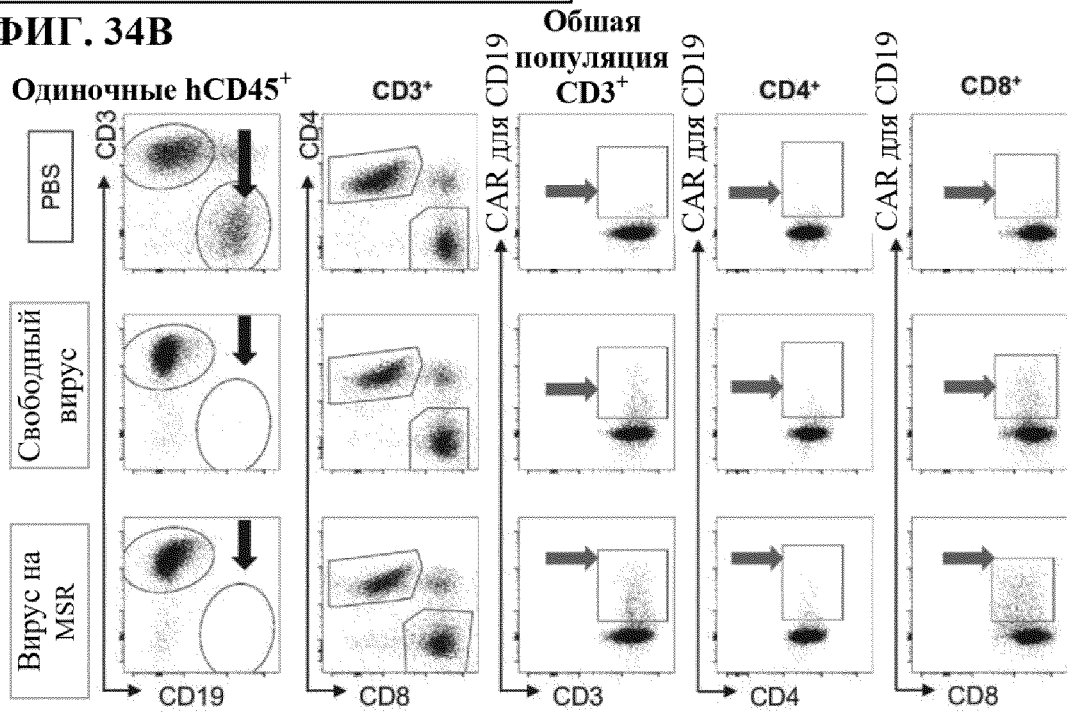
ФИГ. 33В



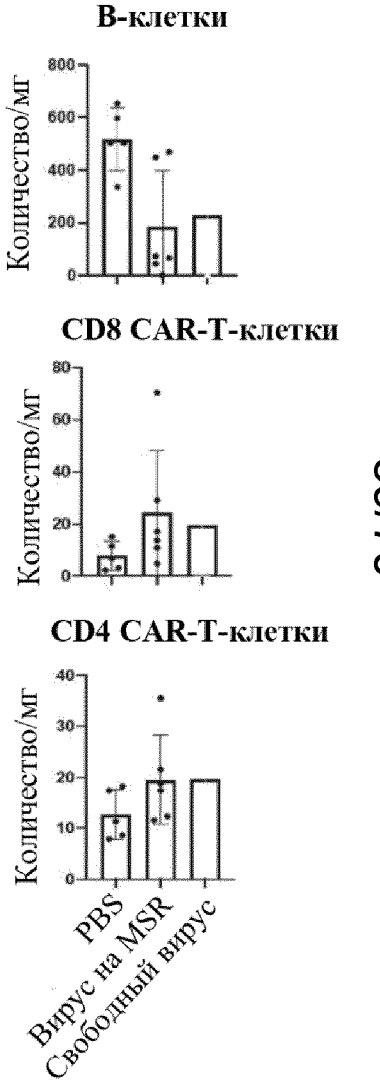
ФИГ. 34A



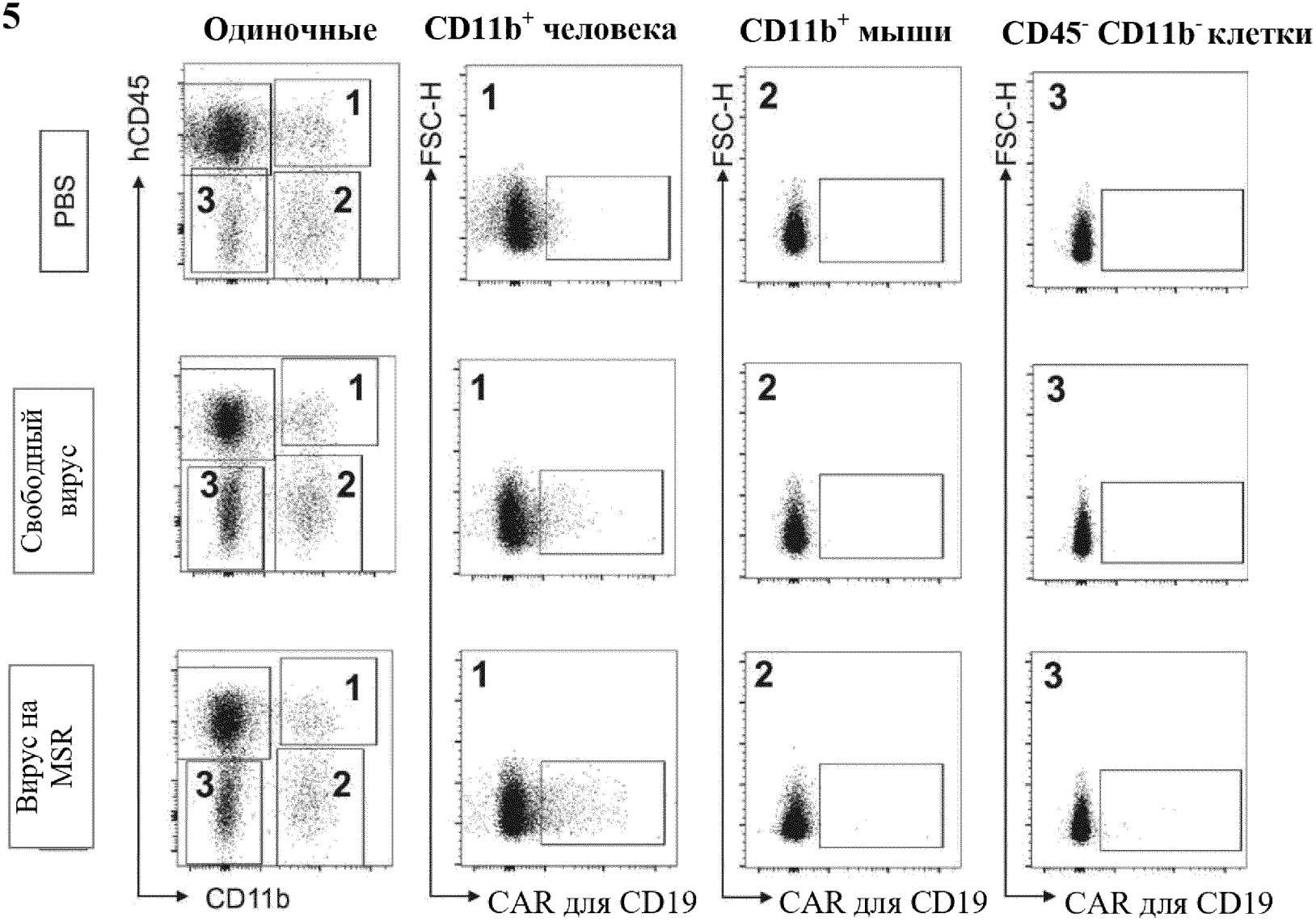
ФИГ. 34B



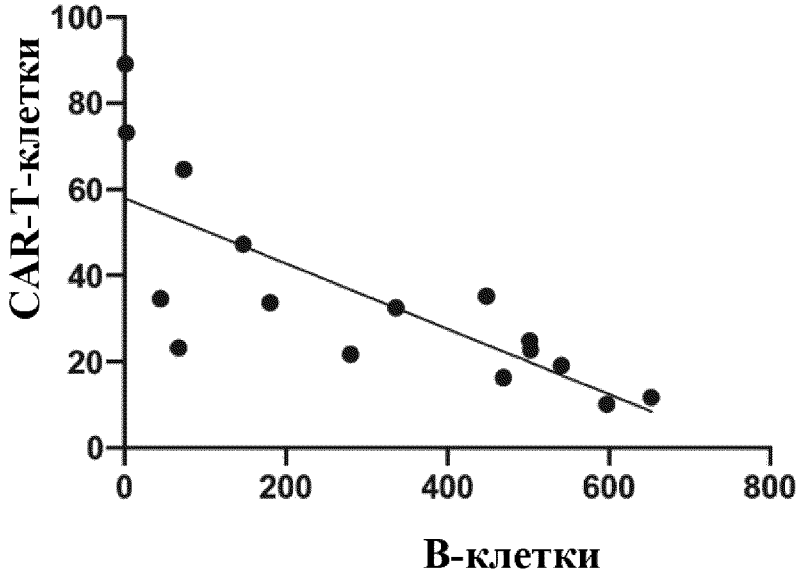
ФИГ. 34C



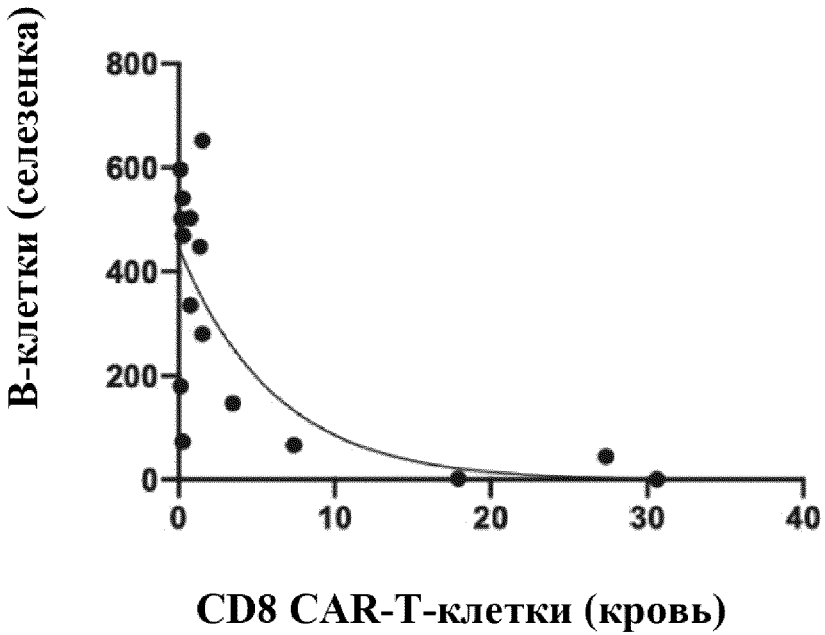
ФИГ. 35


Одиночные
CD11b+ человека
CD11b+ мыши
CD45- CD11b- клетки
PBS
Свободный вирус
Вирус на MSR
hCD45
CD11b
FSC-H
CAR для CD19
1
2
3

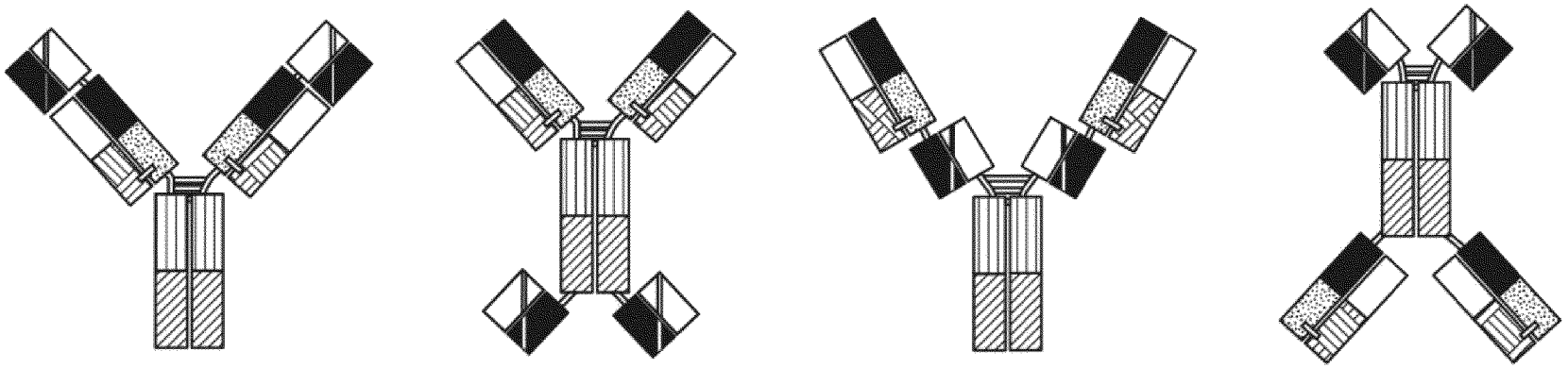
ФИГ. 36A



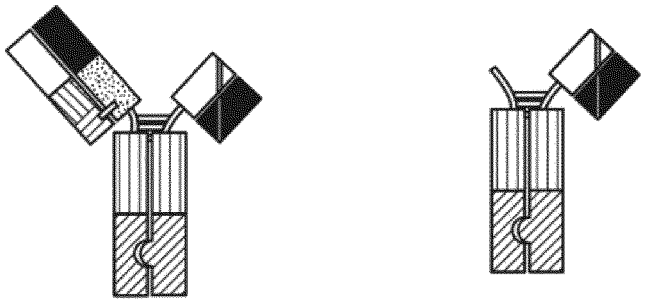
ФИГ. 36B

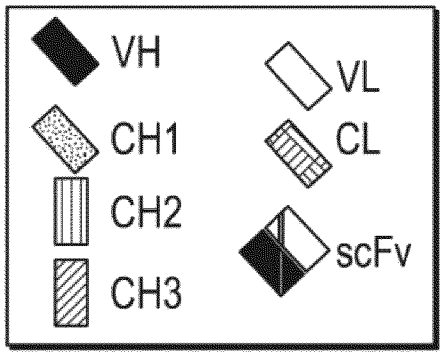


2+2:



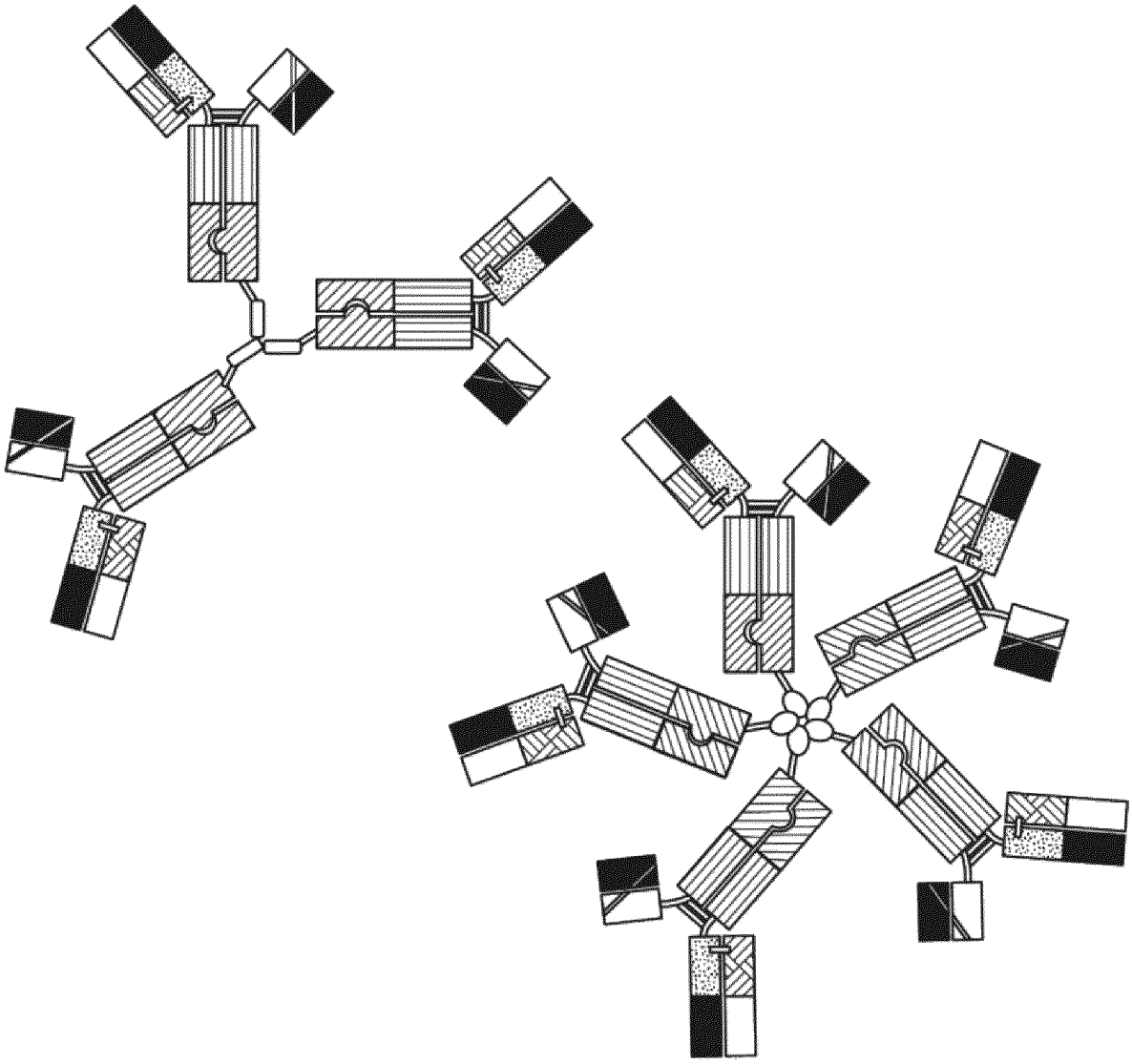
"Выступ во впадину" (KiH):



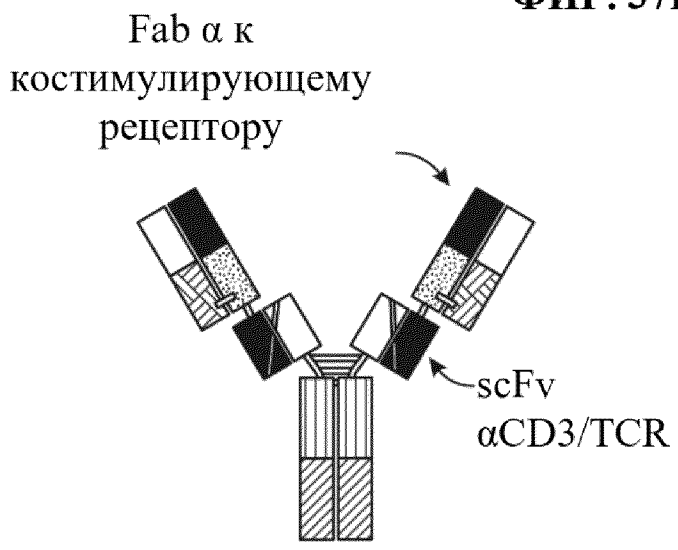


ФИГ. 37A

Мультимер:

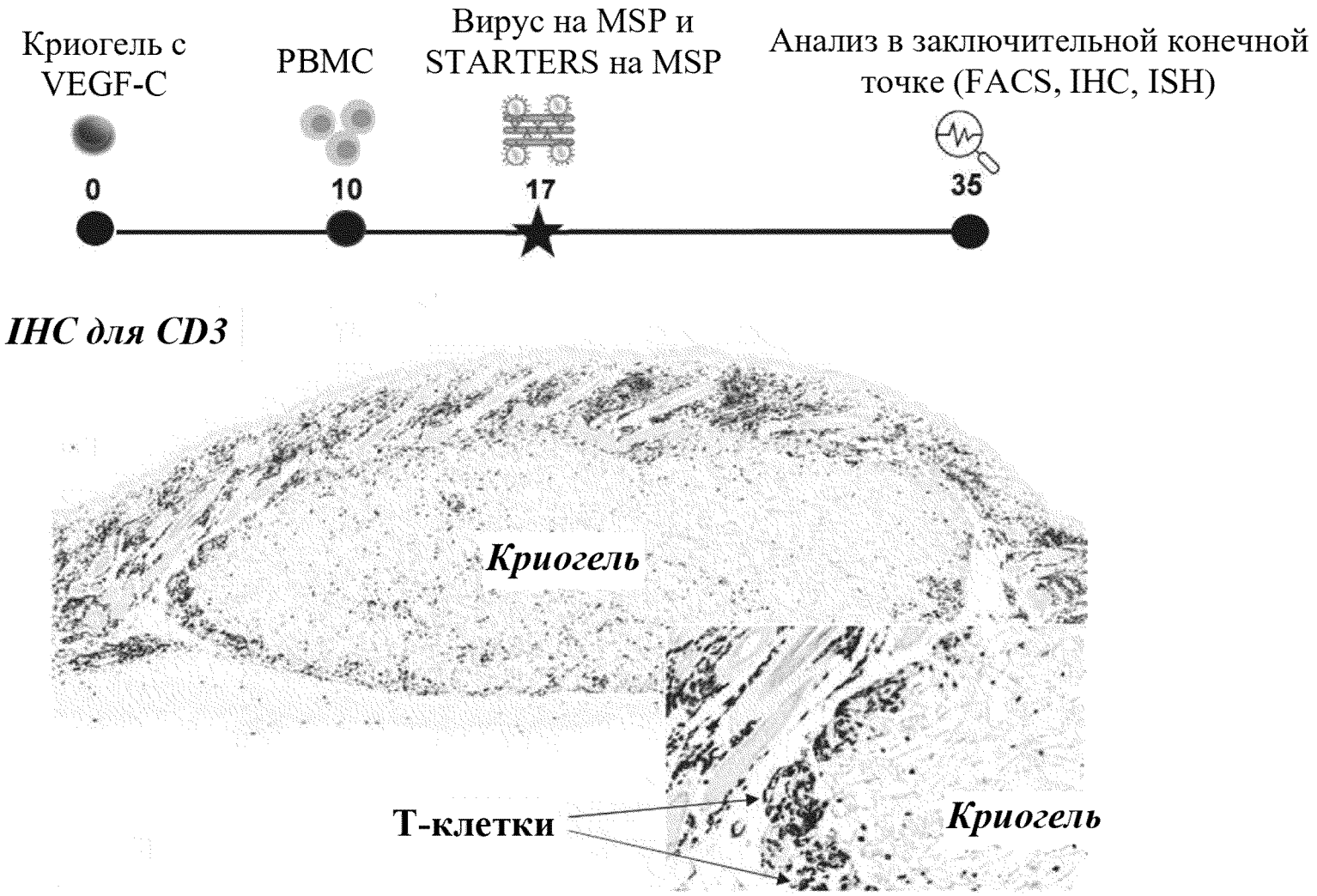


ФИГ. 37B

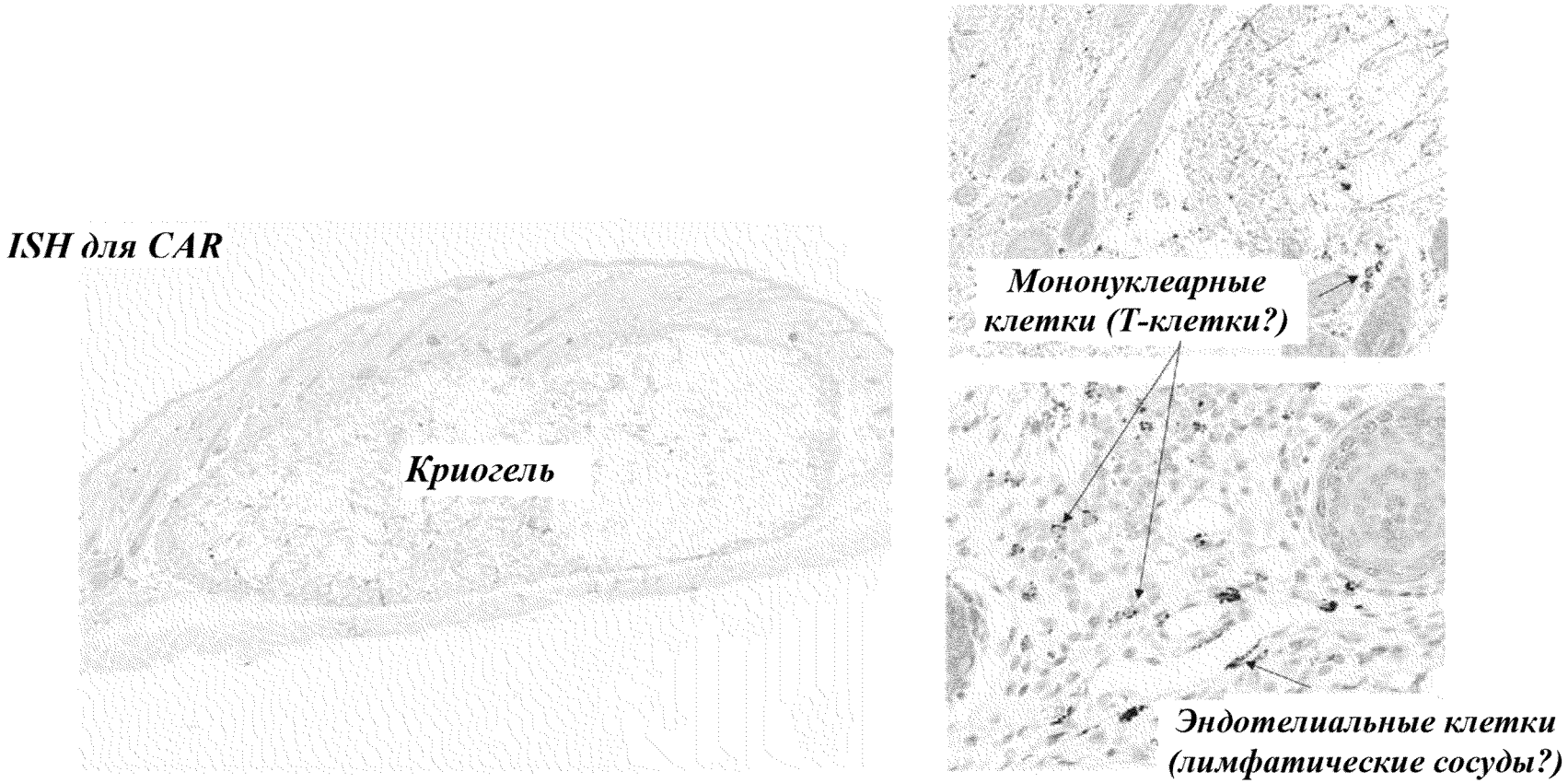


ФИГ. 37C

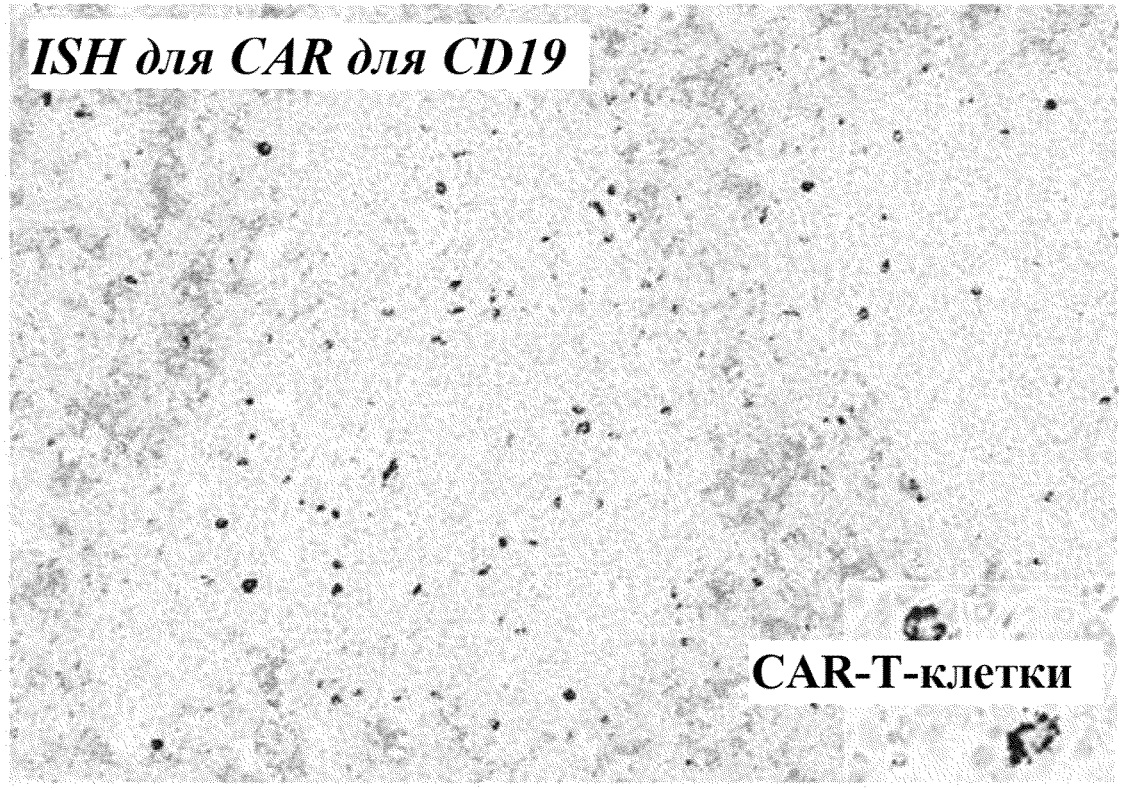
ФИГ. 38


Криогель с VEGF-C
PBMC
Вирус на MSP и STARTERS на MSP
Анализ в заключительной конечной точке (FACS, IHC, ISH)
0
10
17
35
IHC для CD3
Криогель
Т-клетки
Криогель

ФИГ. 39

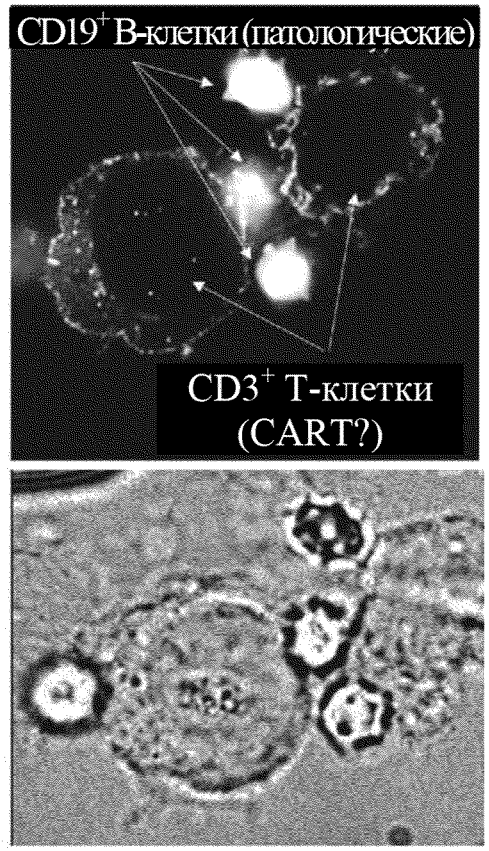

ISH для CAR
Криогель
Мононуклеарные клетки (Т-клетки?)
Эндотелиальные клетки (лимфатические сосуды?)

ФИГ. 40



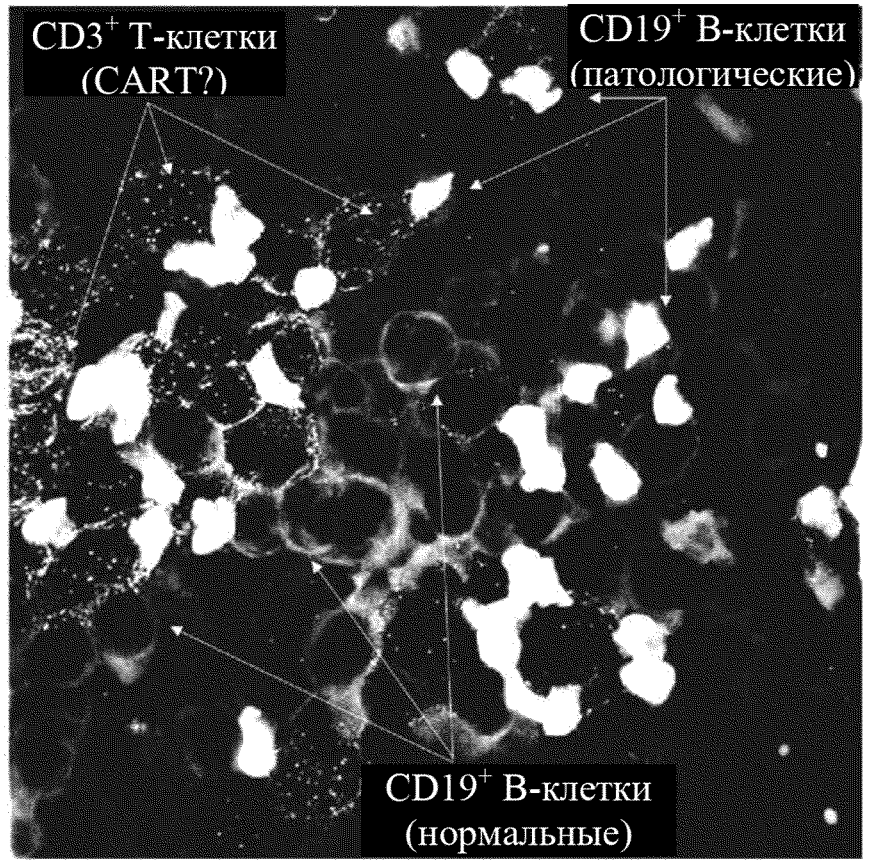
ФИГ. 41А

КОЖА, в участке имплантации

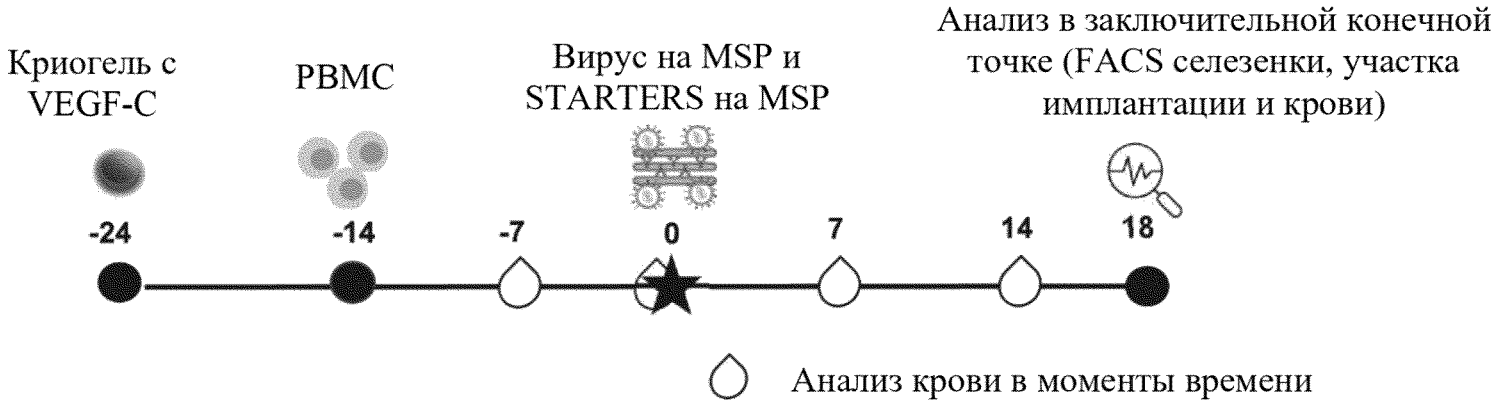


ФИГ. 41В

СЕЛЕЗЕНКА

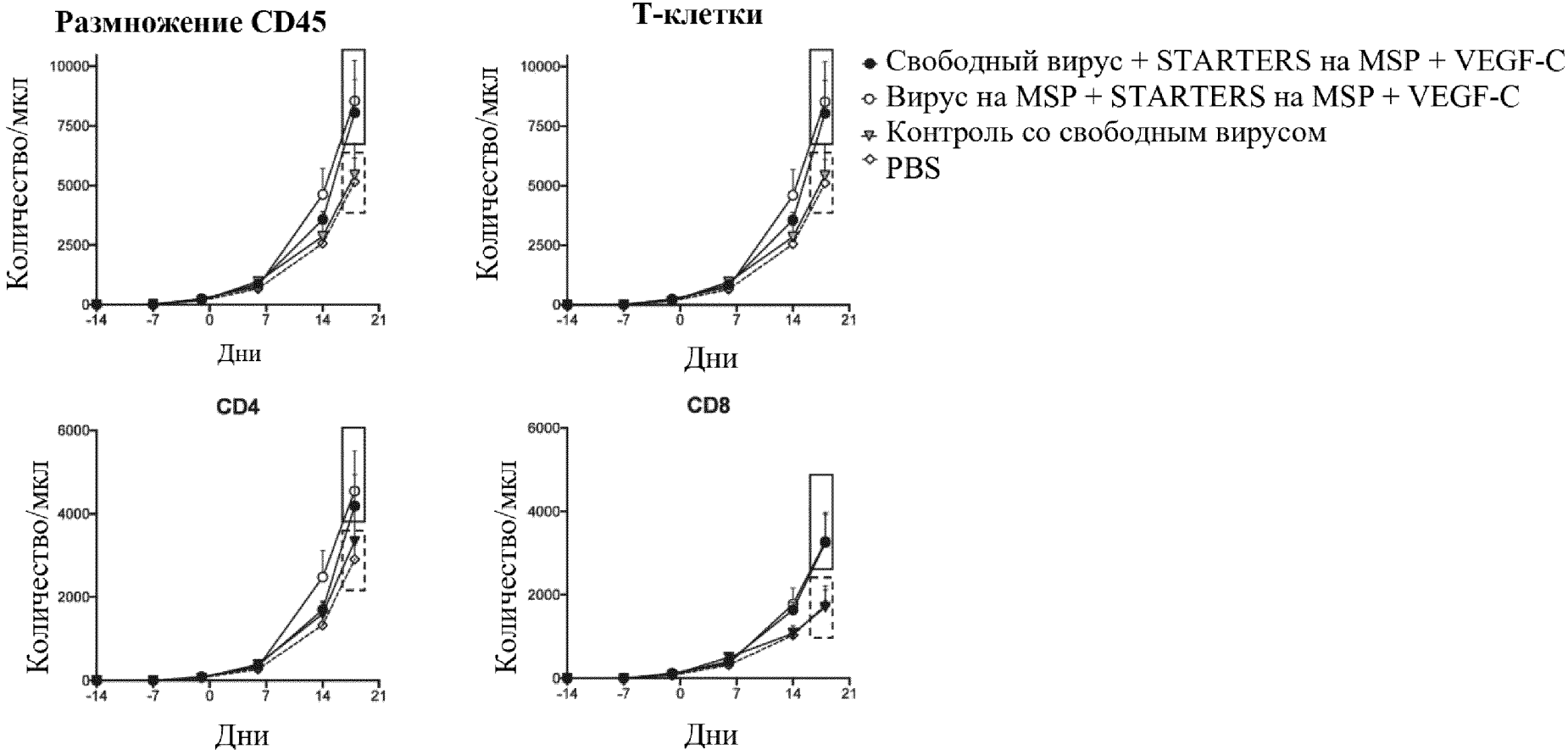


ФИГ. 42А

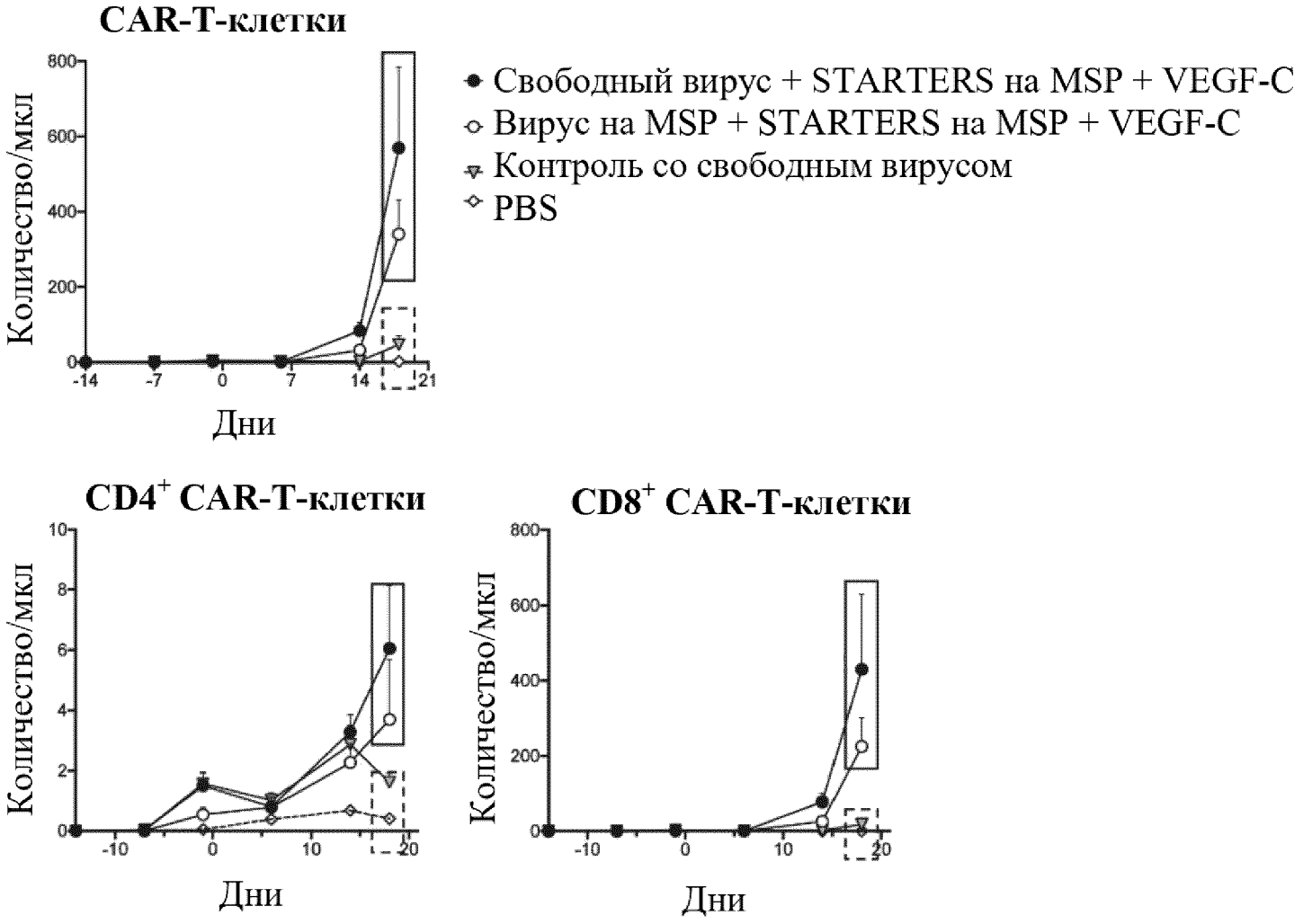


Группа	**Вирус**	**Объем инъекции MSP (мкл)**	**Доза MSP (мг)**	**STARTERS**	**PBMC**
Криогель с VEGF-C + свободный вирус + STARTERS на MSP	1,1e^7	10	0,15	89,6	20e^6
Криогель с VEGF-C + вирус на MSP + STARTERS на MSP	1,1e^7	20	0,3	89,6	20e^6
Криогель с VEGF-C + PBS + STARTERS на MSP ("PBS")	1,1e^7	10	0,15	89,6	20e^6
Чистый криогель + свободный вирус + чистые MSP ("контроль со свободным вирусом")	1,1e^7	10	0,15	0	20e^6
Концентрация MSP: 15 мг/мл					

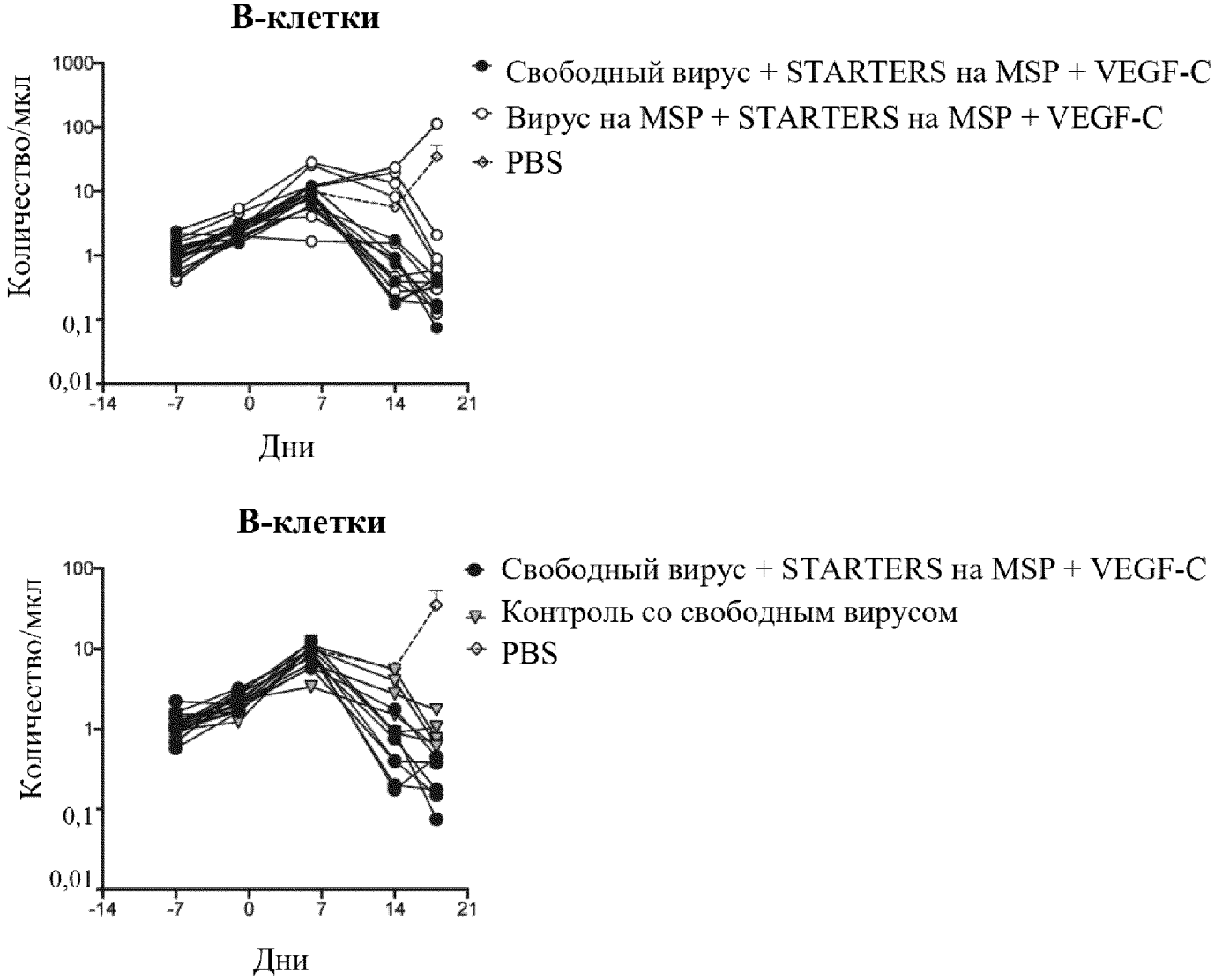
ФИГ. 42B


Размножение CD45
Количество/мкл
10000
7500
5000
2500
0
-14
-7
0
7
14
21
Дни
Т-клетки
Количество/мкл
10000
7500
5000
2500
0
-14
-7
0
7
14
21
Дни
Свободный вирус + STARTERS на MSP + VEGF-C
Вирус на MSP + STARTERS на MSP + VEGF-C
Контроль со свободным вирусом
PBS
CD4
Количество/мкл
6000
4000
2000
0
-14
-7
0
7
14
21
Дни
CD8
Количество/мкл
6000
4000
2000
0
-14
-7
0
7
14
21
Дни

ФИГ. 43А

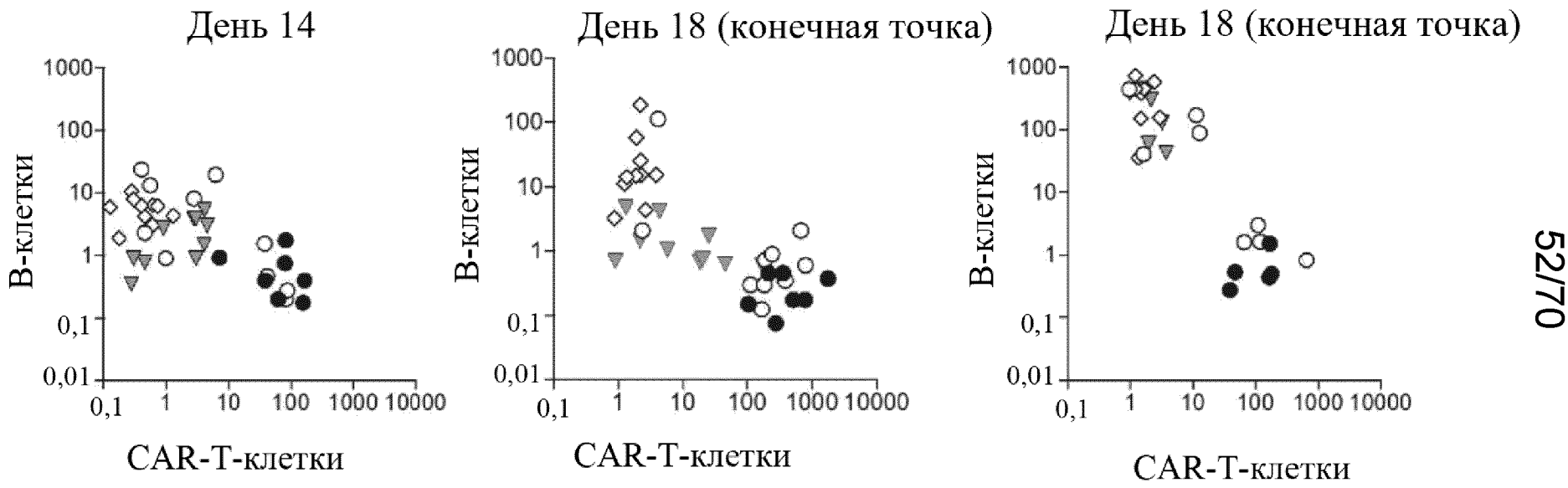

CAR-T-клетки
Количество/мкл
800
600
400
200
0
-14
-7
0
7
14
21
Дни
Свободный вирус + STARTERS на MSP + VEGF-C
Вирус на MSP + STARTERS на MSP + VEGF-C
Контроль со свободным вирусом
PBS
CD4+ CAR-T-клетки
Количество/мкл
10
8
6
4
2
0
-10
0
10
20
Дни
CD8+ CAR-T-клетки
Количество/мкл
800
600
400
200
0
-10
0
10
20
Дни

ФИГ. 43В


В-клетки
Количество/мкл
1000
100
10
1
0,1
0,01
-14
-7
0
7
14
21
Дни
Свободный вирус + STARTERS на MSP + VEGF-C
Вирус на MSP + STARTERS на MSP + VEGF-C
PBS
В-клетки
Количество/мкл
100
10
1
0,1
0,01
-14
-7
0
7
14
21
Дни
Свободный вирус + STARTERS на MSP + VEGF-C
Контроль со свободным вирусом
PBS

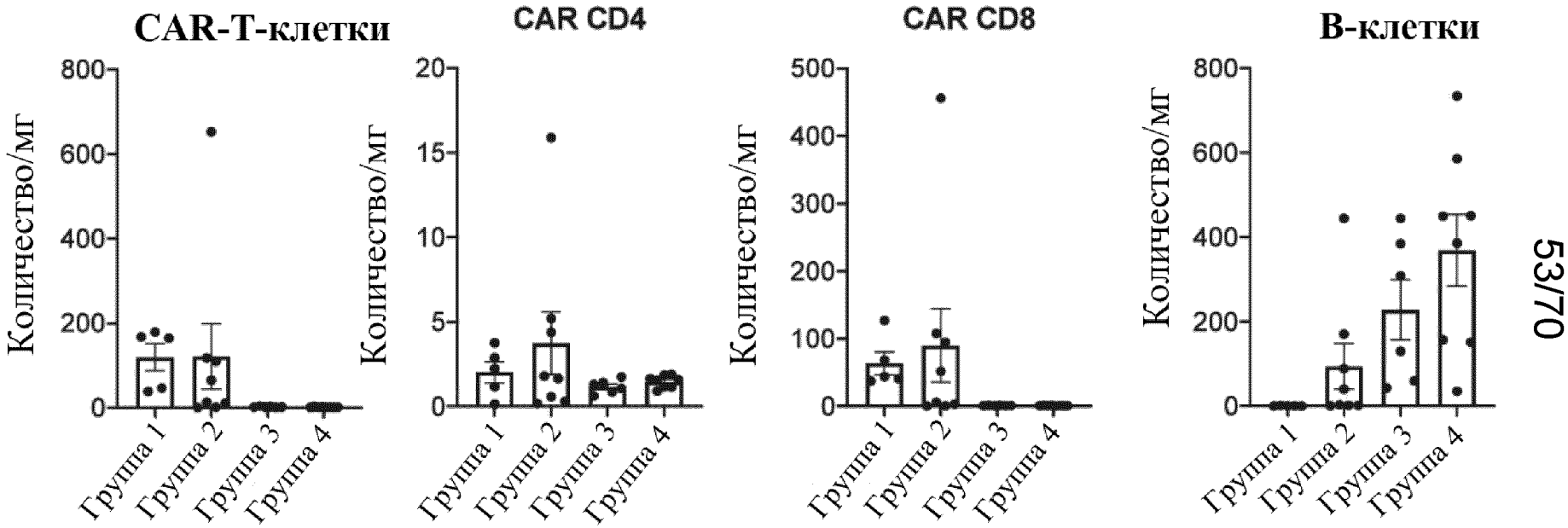
ФИГ. 44А

ФИГ. 44В



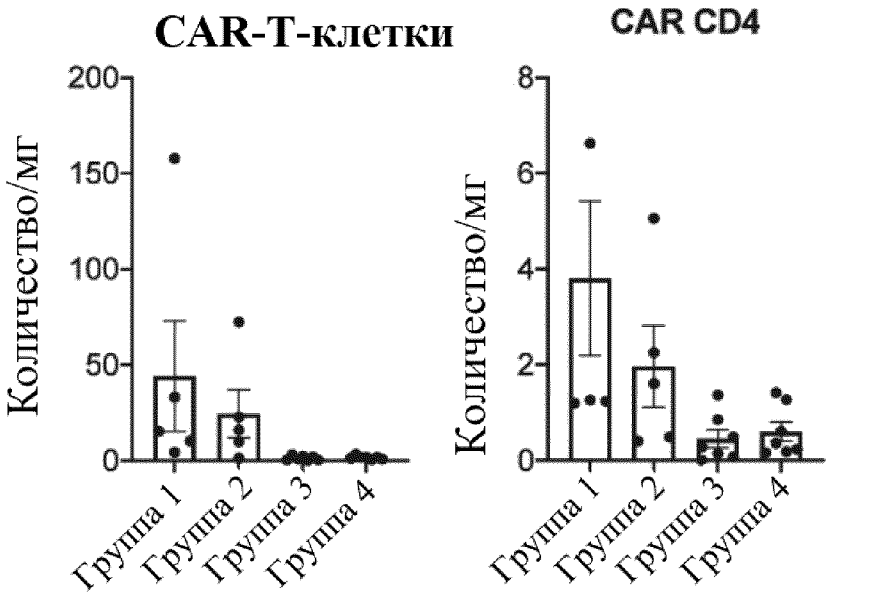
ФИГ. 45А

ФИГ. 45В

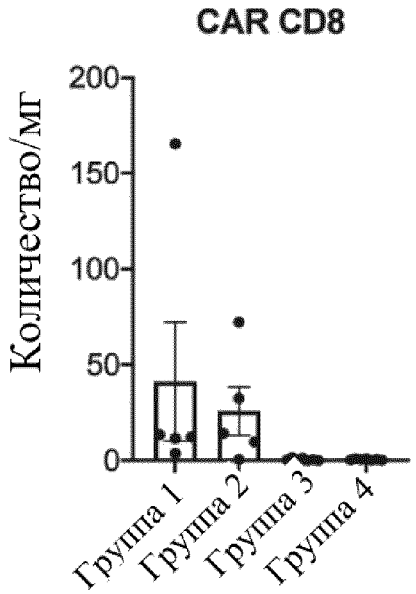


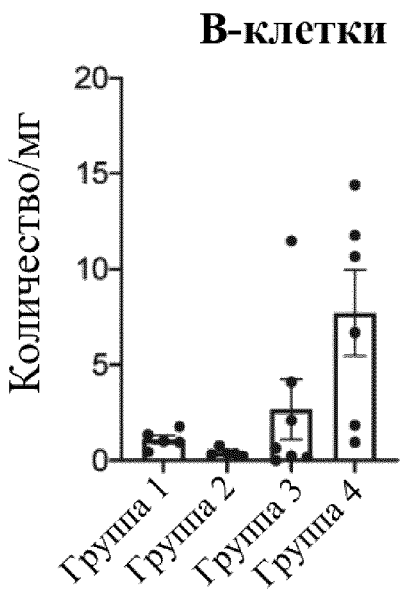
Группа 1: Свободный вирус + STARTERS на MSP + VEGF-C
Группа 2: Вирус на MSP + STARTERS на MSP + VEGF-C
Группа 3: Контроль со свободным вирусом
Группа 4: PBS

ФИГ. 46A



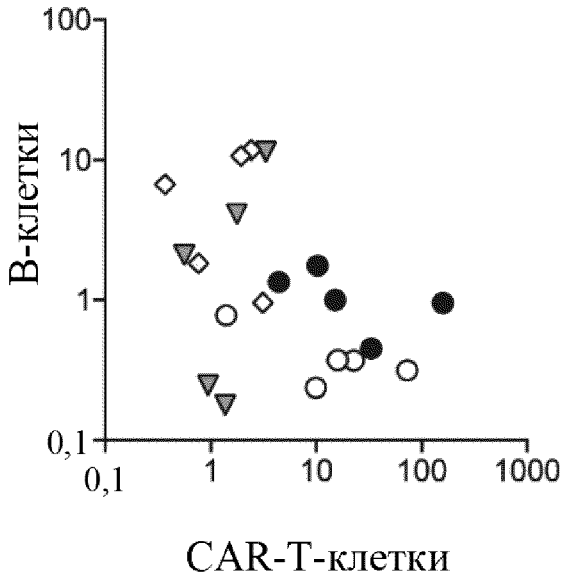
ФИГ. 46B



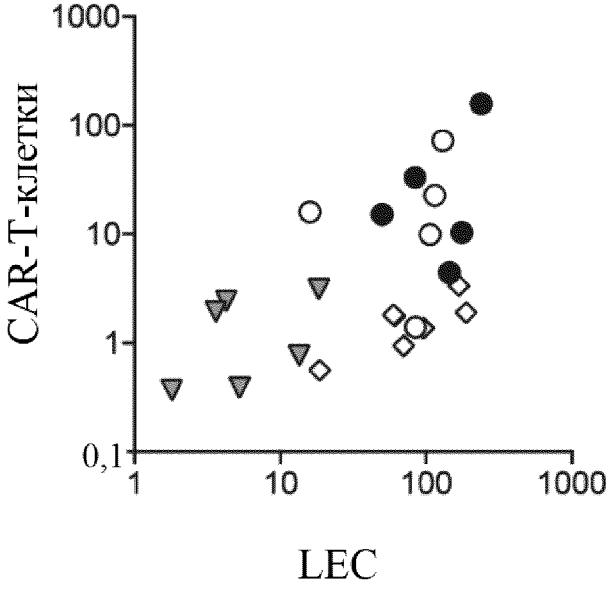


Группа 1: Свободный вирус + STARTERS на MSP + VEGF-C
Группа 2: Вирус на MSP + STARTERS на MSP + VEGF-C
Группа 3: Контроль со свободным вирусом
Группа 4: PBS

ФИГ. 46C



ФИГ. 46D



- Свободный вирус + STARTERS на MSP + VEGF-C
- Вирус на MSP + STARTERS на MSP + VEGF-C
- Контроль со свободным вирусом
- PBS

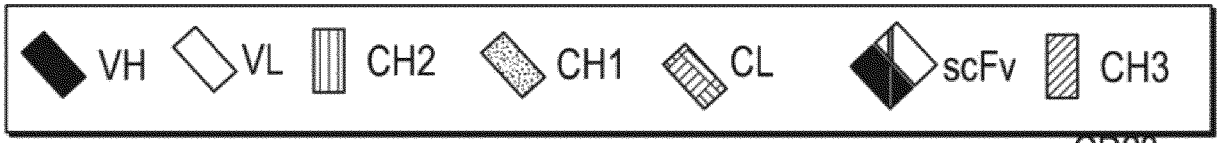
ФИГ. 47

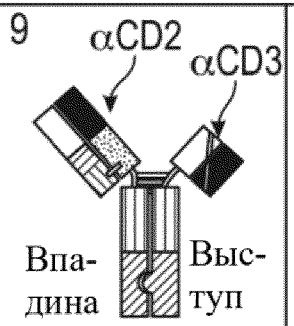
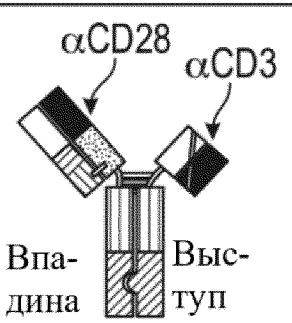
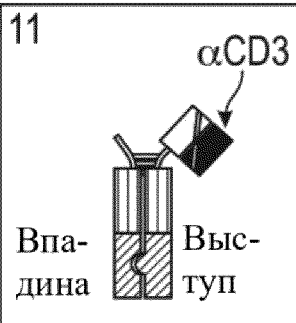
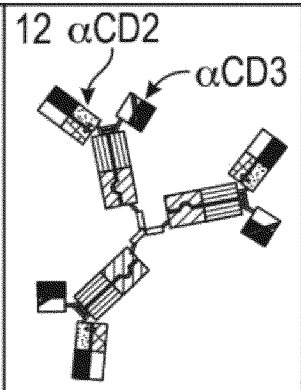
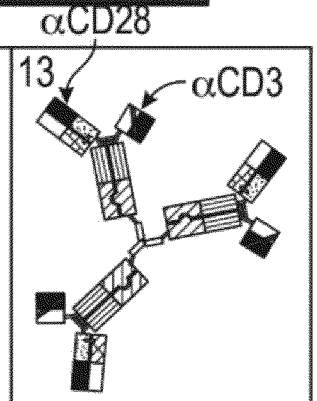

Экспрессия трансгена в зависимости от дозы вируса на MSP
% GFP+
50
40
30
20
10
0
1,00
2,00
4,00
8,00
16,00
Коэффициент разбавления
Конструкция 1 STARTER

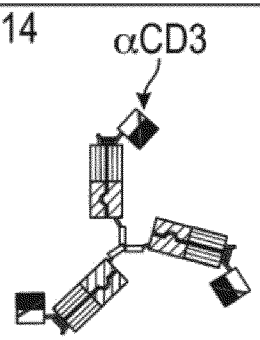
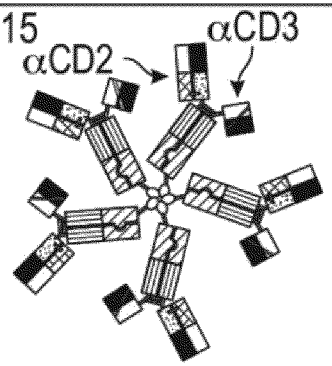
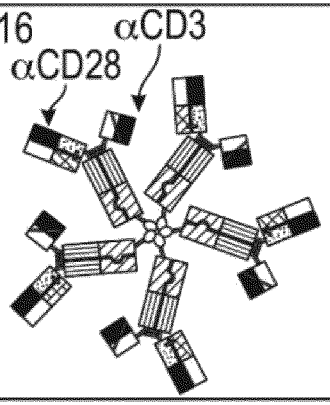
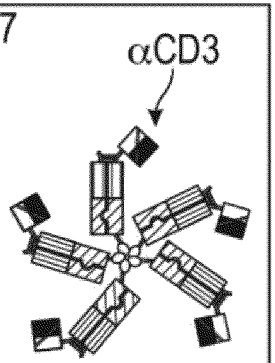


Конст-рукция	1 αCD3 αCD2	2 αCD3 αCD28	3 αCD2 αCD3	4 αCD28 αCD3
Костим.	CD2	CD28	CD2	CD28
Конст-рукция	5 αCD2 αCD3	6 αCD28 αCD3	7 αCD3 αCD2	8 αCD3 αCD28
Костим.	CD2	CD28	CD2	CD28

ФИГ. 48А



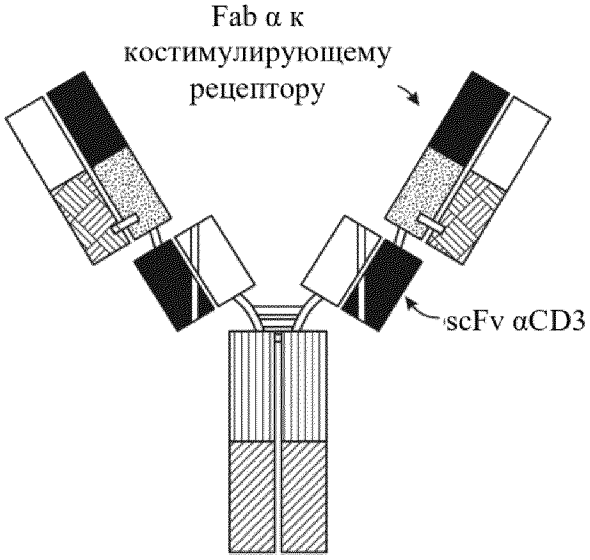
Конструкция	9 	10 	11 	12 	13 
Костим.	CD2	CD28	Отсутствует	CD2	CD28

Конструкция	14 	15 	16 	17 
Костим.	Отсутствует	CD2	CD28	Отсутствует

ФИГ. 48B

Костимулирующие связываемые молекулы	**CD3-связывающее средство**	**Название**	
CD25	Антитело к CD3 (1)	F5 CD25	Альтернативные костимулирующие молекулы
IL6Rb	Антитело к CD3 (1)	F5 IL6Rb	
CD27	Антитело к CD3 (1)	F5 CD27	
41BB	Антитело к CD3 (1)	F5 41BB	
ICOS	Антитело к CD3 (1)	ICOS для F5	
CD2	Антитело к CD3 (2)	F5 на основе антитела к CD3 (2)	Альтернативное CD3-связывающее средство

ФИГ. 49A

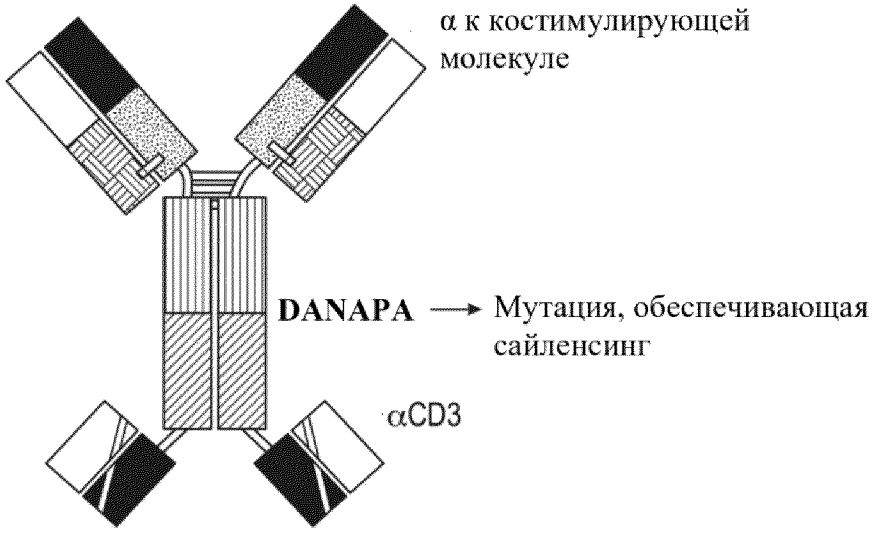


ФИГ. 49B

Варианты	Плечо антитела к CD3	Плечо антитела к костимулирующей молекуле
NEG2042	Антитело к CD3 (1)	CD2
NEG2043	Антитело к CD3 (1)	Антитело к CD28 (1)
NEG2044	Антитело к CD3 (1)	Антитело к CD28 (2)
NEG2050	Антитело к CD3 (2)	CD2
NEG2051	Антитело к CD3 (3)	CD2
NEG2052	Антитело к CD3 (2)	Антитело к CD28 (1)
NEG2053	Антитело к CD3 (3)	Антитело к CD28 (1)
F5 без сайленсинга Fc	Антитело к CD3 (1)	CD2
TransAct		CD28

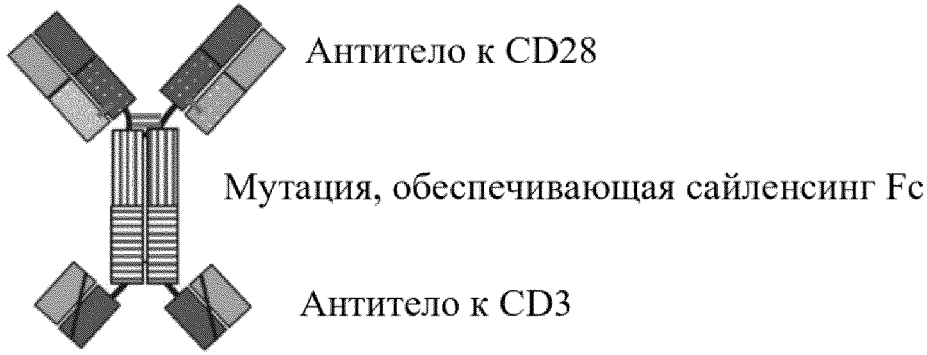
Альтернативные CD3-связывающие средства

ФИГ. 50A



ФИГ. 50B

ФИГ. 51A



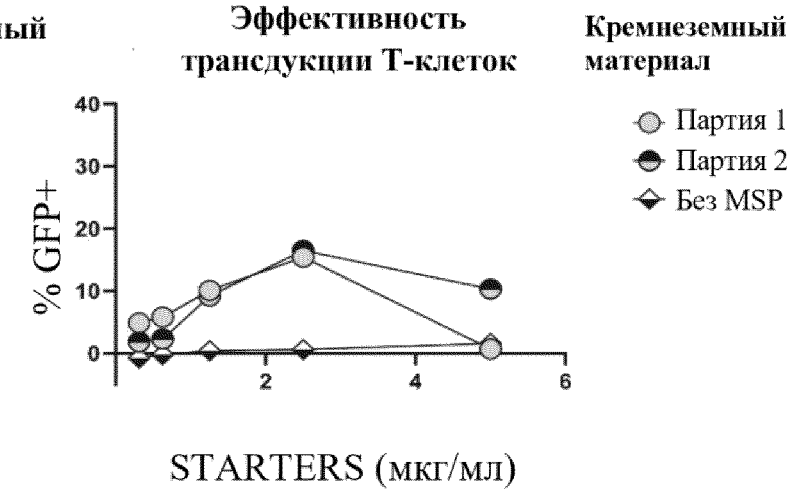
ФИГ. 51B

День 1: MFI для CD25

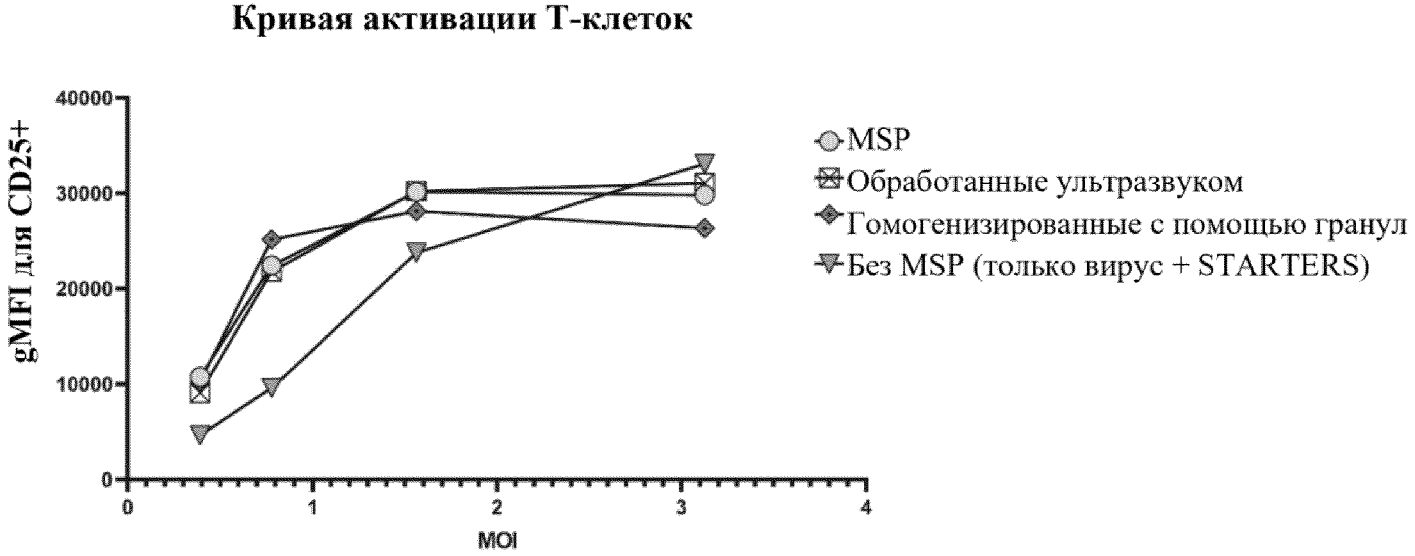


ФИГ. 51C

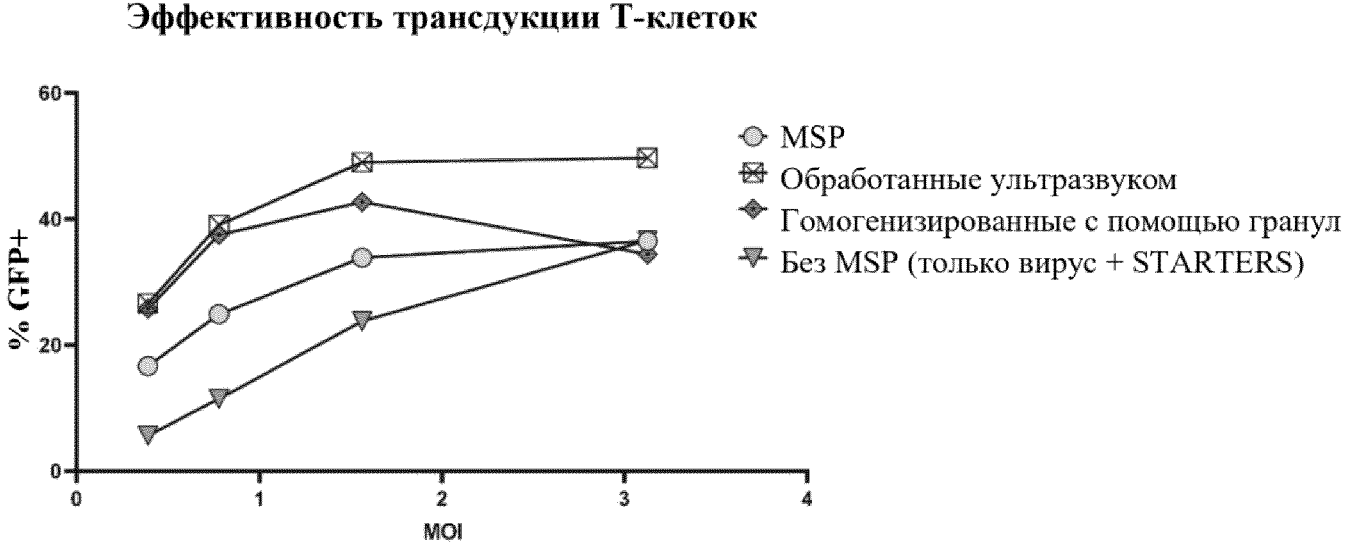
День 4: % CAR+



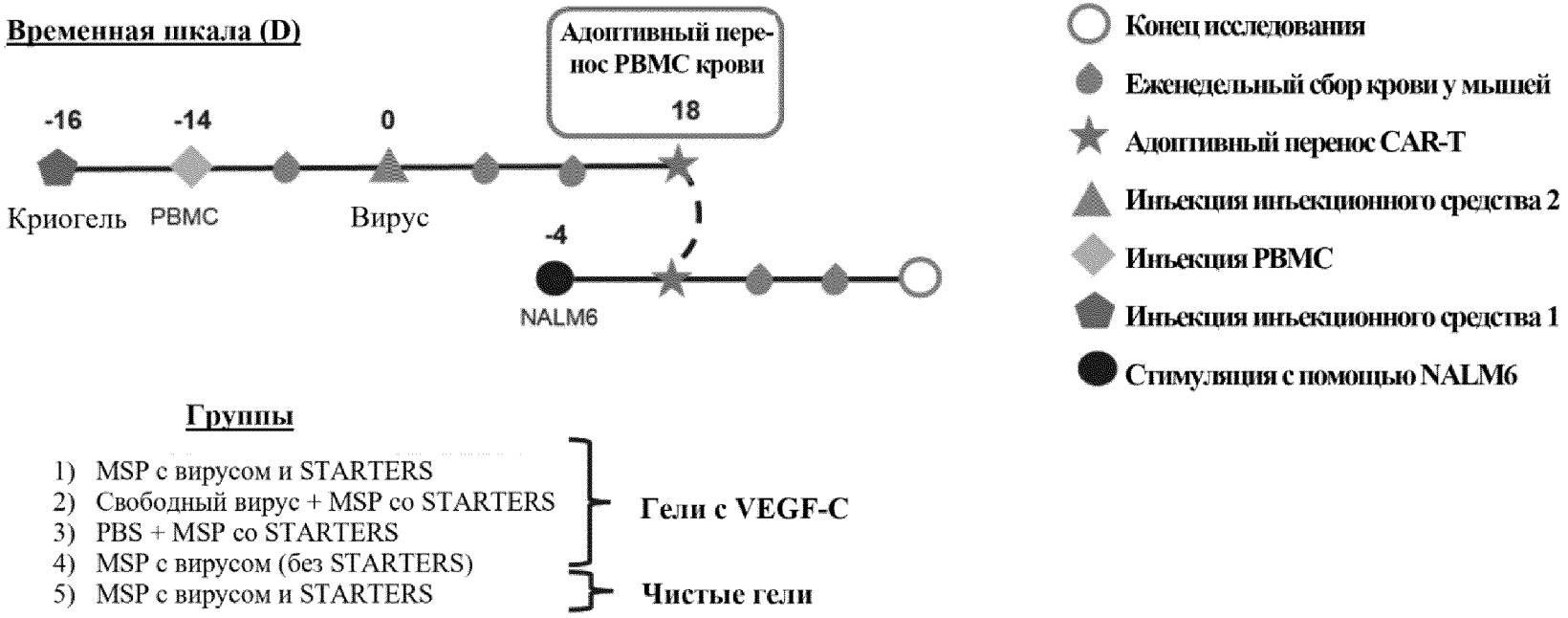
ФИГ. 52A



ФИГ. 52B



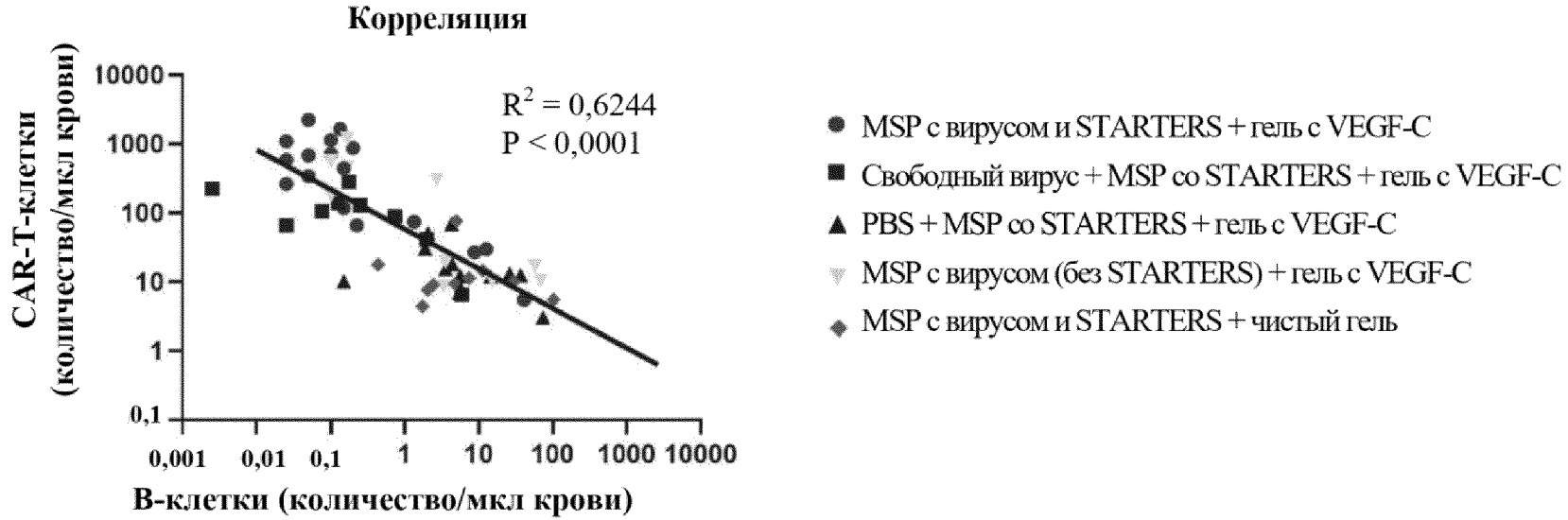
ФИГ. 53A



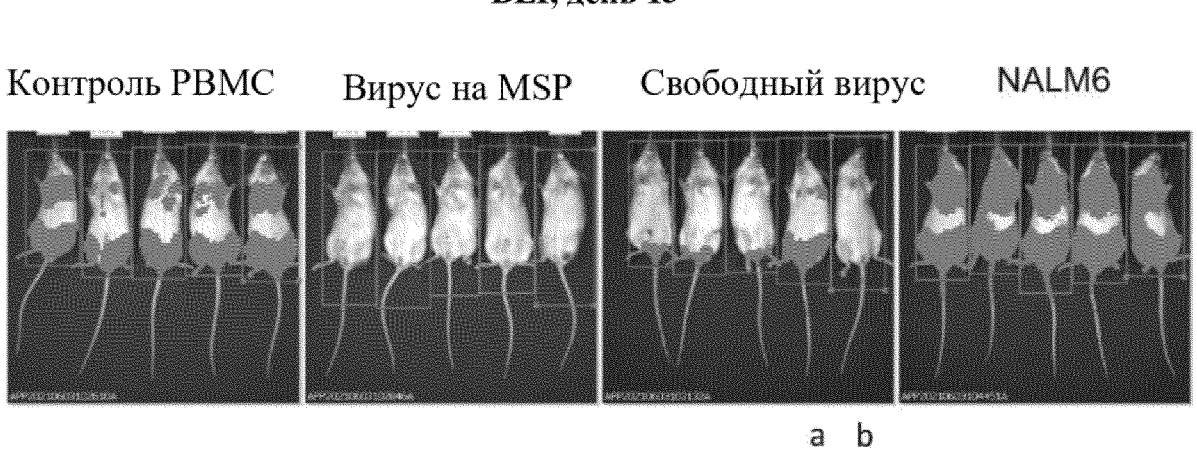
ФИГ. 53B

	Альгинатный криогель	Лапонит	Белок VEGF-C	MSP в TMA	STARTERS	Вирус с CAR для CD19
Инъекционное средство 1	+	+	+	-	-	-
Инъекционное средство 2	-	-	-	+	+	+

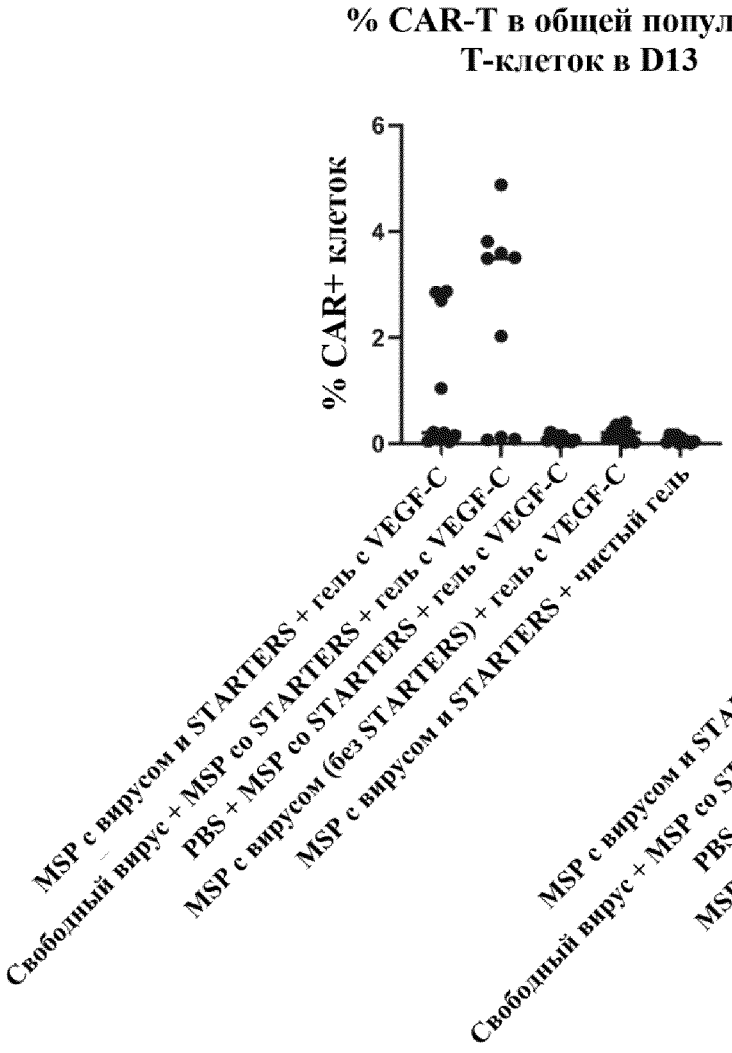
ФИГ. 53C



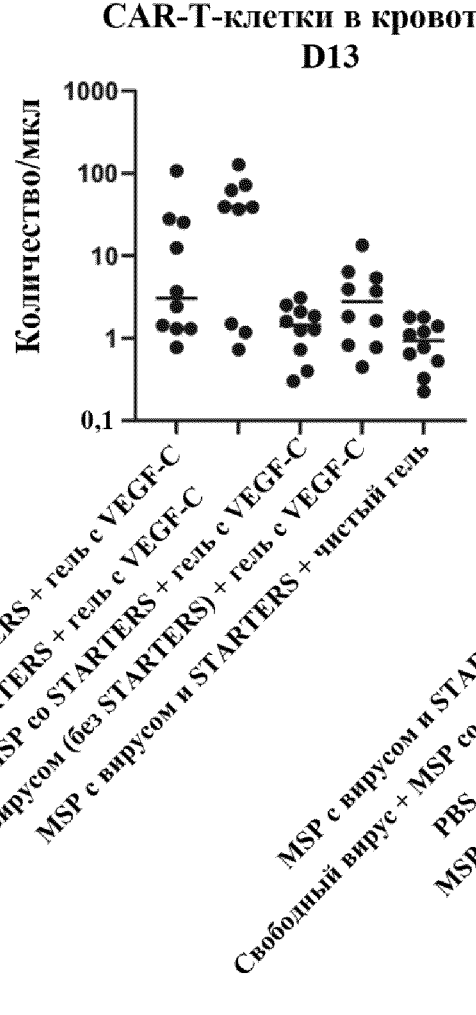
ФИГ. 53D



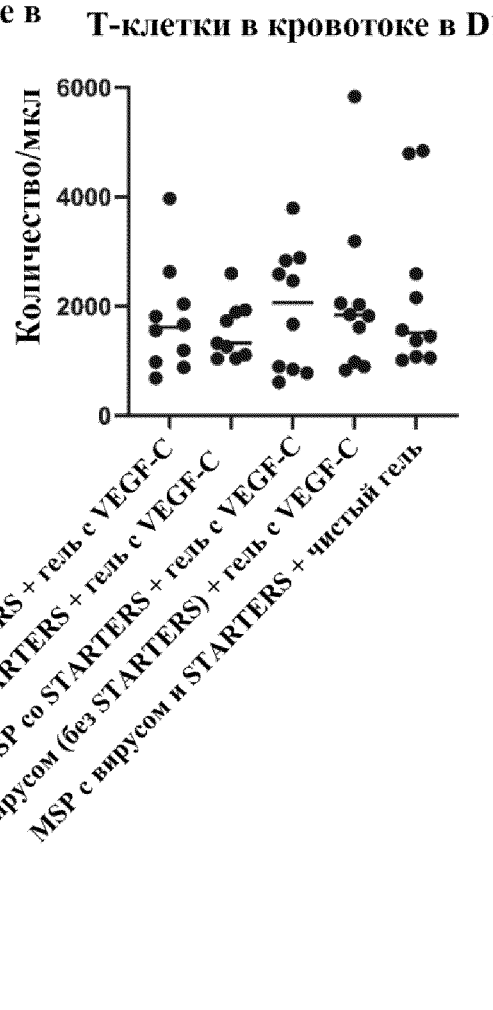
ФИГ. 53E



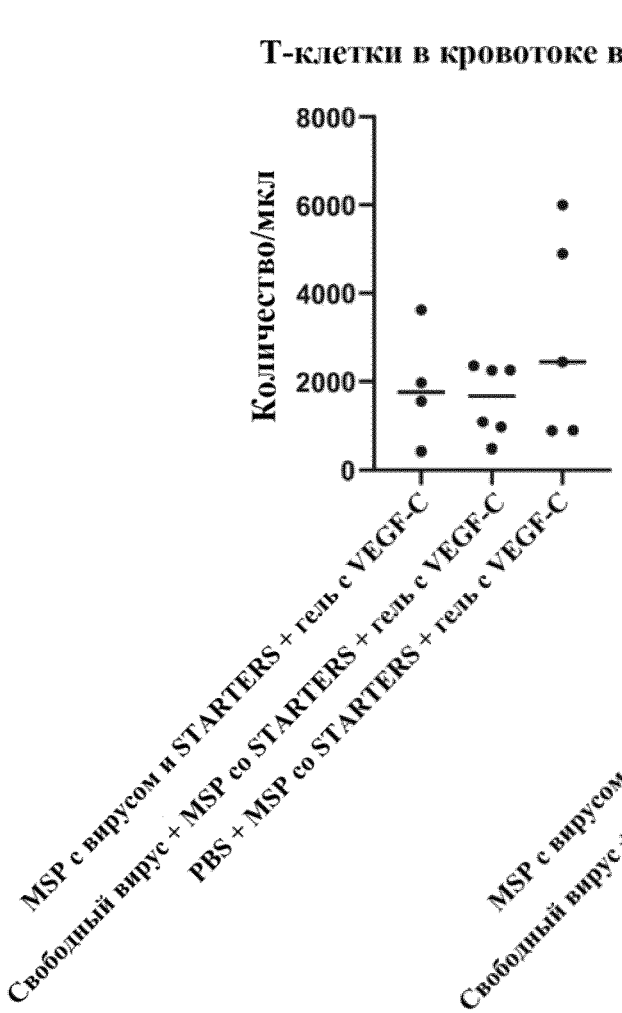
ФИГ. 53F



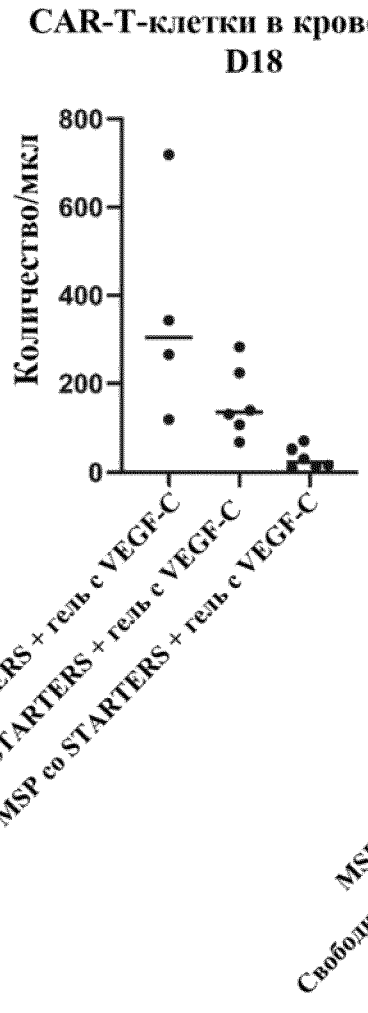
ФИГ. 53G



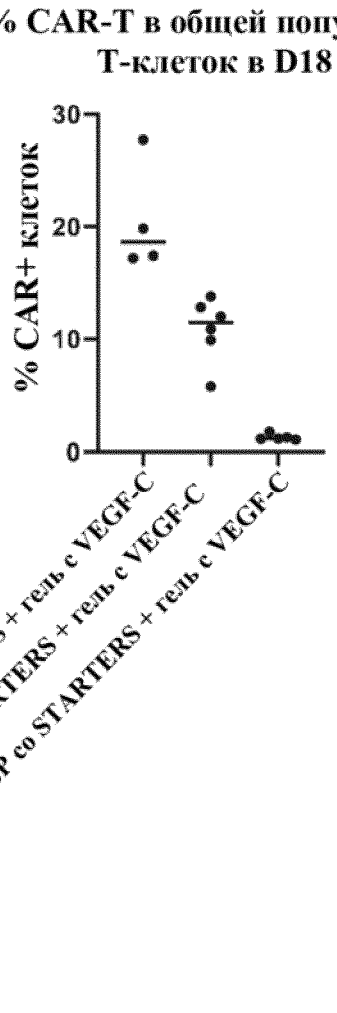
ФИГ. 53H



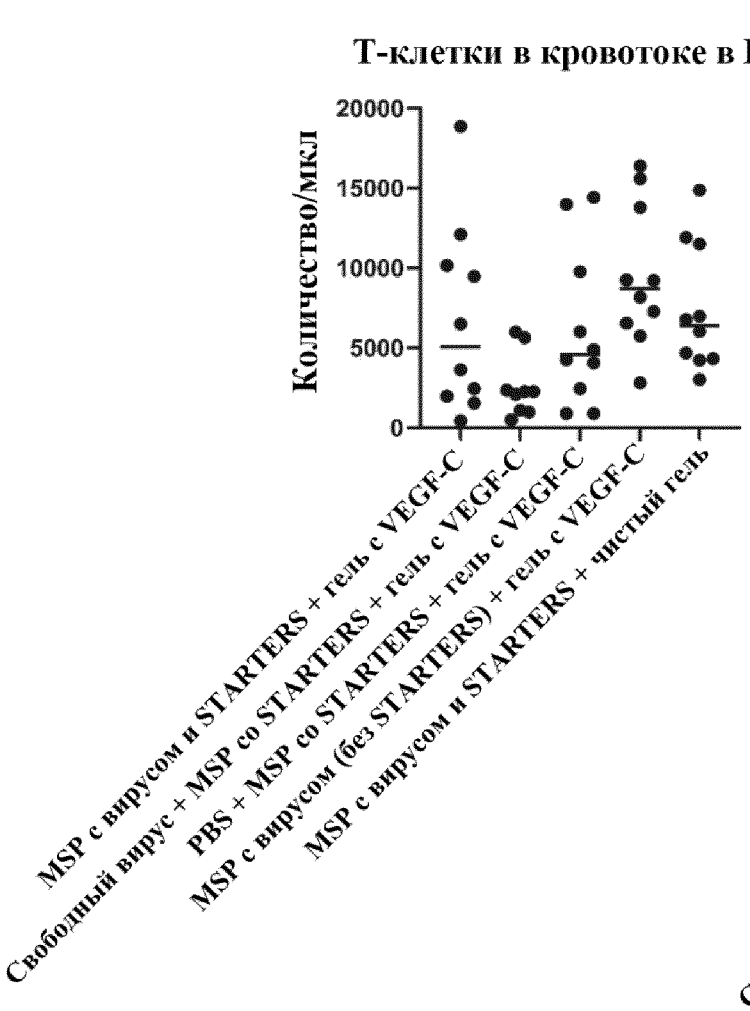
ФИГ. 53I



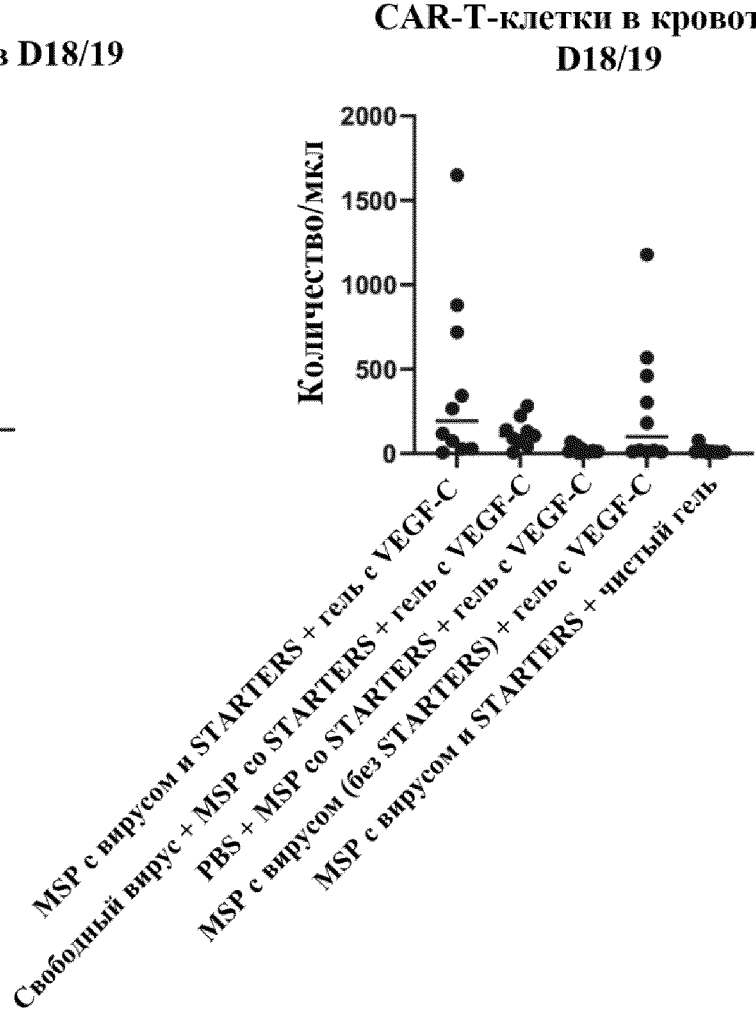
ФИГ. 53J



ФИГ. 53K

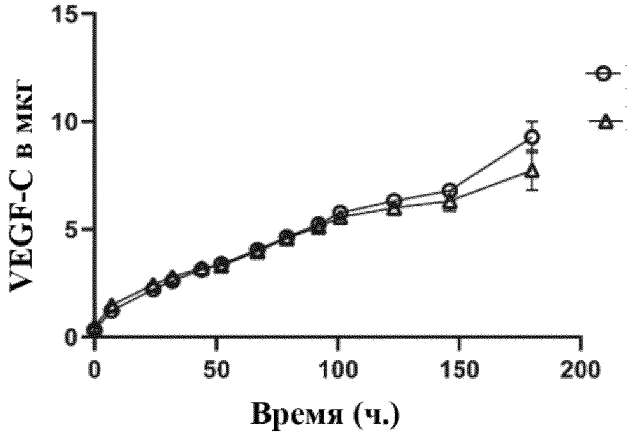


ФИГ. 53L



ФИГ. 54A

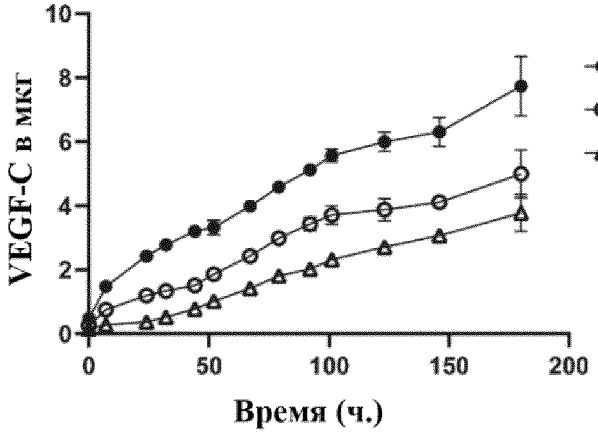
Сравнение молекулярной массы и % сшивания



Гидрогель H2a (200 кДа [HA-N3]-24%; степень сшивания 9%)
Гидрогель H4a (700 кДа [HA-N3]-16%; степень сшивания 18%)

ФИГ. 54B

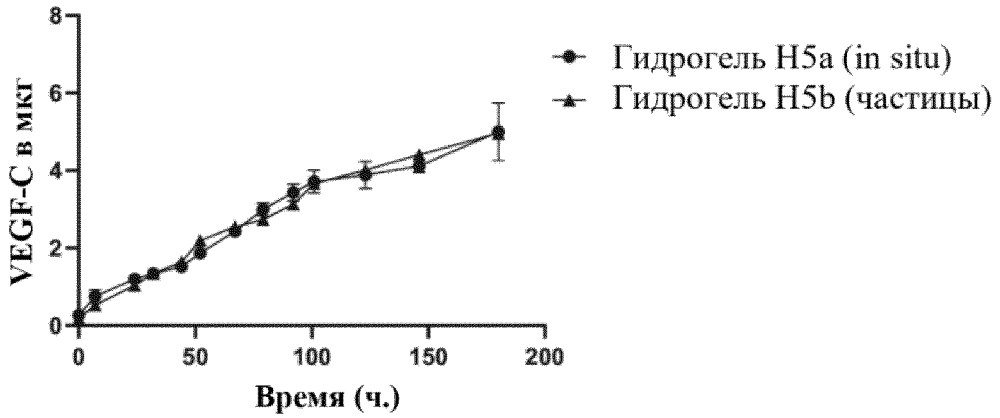
Гель 700 кДа HA, степень сшивания 18%



Гидрогель H4a (без лапонита)
Гидрогель H5a (0,25 мг/мл лапонита)
Гидрогель H6a (1 мг/мл лапонита)

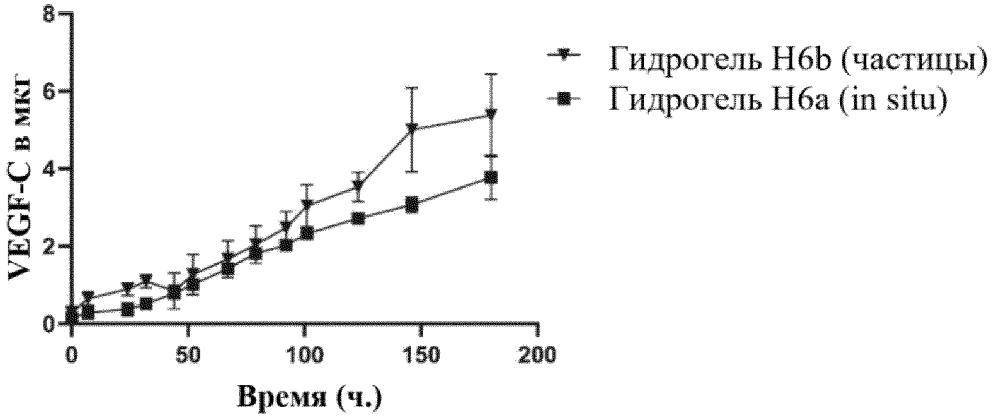
ФИГ. 54C

Гель HA с 0,25 мг/мл лапонита – in situ в сравнении с частицами

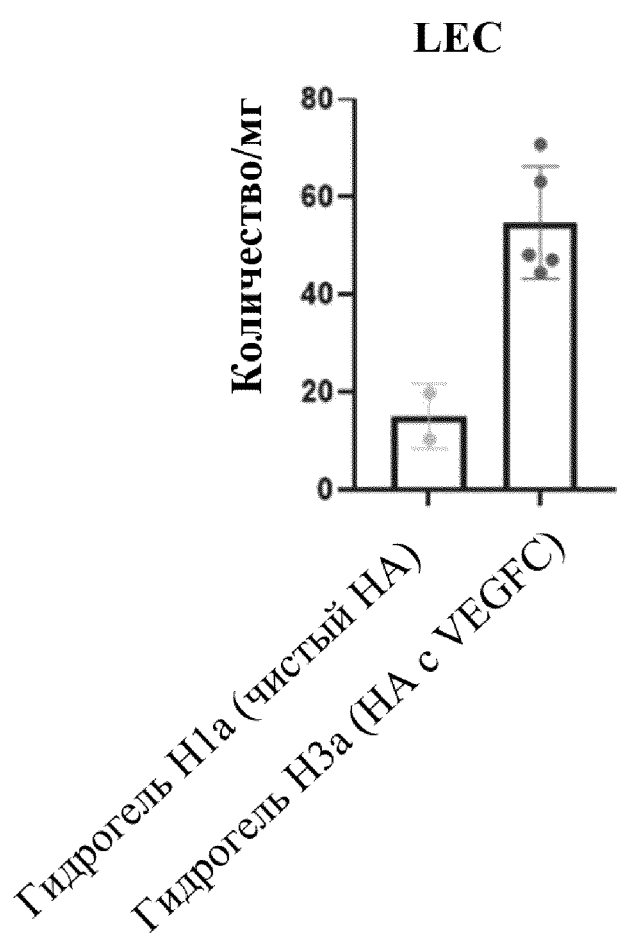


ФИГ. 54D

Гель HA с 1 мг/мл лапонита – in situ в сравнении с частицами



ФИГ. 55A



ФИГ. 55B

