

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202390744 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.05.31

(22) Дата подачи заявки  
2021.09.02

(51) Int. Cl. A61K 35/12 (2015.01)  
A61K 35/17 (2015.01)  
A61K 39/00 (2006.01)  
C12N 5/0781 (2010.01)  
C12N 5/10 (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ В-КЛЕТКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/073,799

(32) 2020.09.02

(33) US

(86) PCT/US2021/048944

(87) WO 2022/051556 2022.03.10

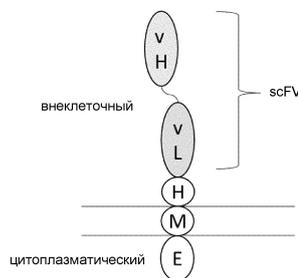
(71) Заявитель:  
УОКИНГ ФИШ ТЕРАПЬЮТИКС,  
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Бойл Кэтлин, Парк Хэнджил,  
Котхакота Сринивас, Селби Марк,  
Бреннан Томас, Уилльямс Льюис Т.  
(US)

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

(57) Изобретение относится к генетически модифицированным В-клеткам и их применениям, например для лечения различных заболеваний и расстройств, включая рак, болезни сердца, воспалительные заболевания, заболевания, связанные с истощением мышечной ткани, неврологические заболевания и т.п. В отдельных вариантах осуществления изобретение относится к выделенной модифицированной В-клетке ("CAR-В-клетке"), способной экспрессировать химерный рецептор ("CAR-В-рецептор"), где указанный химерный рецептор содержит: (а) внеклеточный домен; (b) трансмембранный домен; и (с) цитоплазматический домен, который содержит по меньшей мере один сигнальный домен. В различных вариантах осуществления изобретение включает выделенную модифицированную В-клетку, где указанная В-клетка способна экспрессировать и секретировать полезную нагрузку, где полезная нагрузка естественным образом не экспрессируется в В-клетке или экспрессируется на более высоких уровнях по сравнению с естественной экспрессией в В-клетке. В различных вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой антитело или его фрагмент.

Пример sBCR на клеточной мембране



vH: переменная область тяжелой цепи  
vL: переменная область легкой цепи  
H: шарнирная область  
M: трансмембранный домен  
E: цитоплазматический сигнальный домен

A1

202390744

202390744

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577648EA/071

### МОДИФИЦИРОВАННЫЕ В-КЛЕТКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Большинство методов клеточной иммунотерапии, известных на сегодняшний день, основаны на Т-клетках. Например, методы иммунотерапии рака в первую очередь направлены на модификацию и введение Т-клеток - усиление ответа Т-киллеров на опухоль. Однако модификация В-клеток для лечения различных заболеваний является методом, который широко не изучался, несмотря на ключевую роль В-клеток в иммунных ответах.

[0002] В-клетки, также известные как В-лимфоциты, представляют собой тип белых кровяных телец, ответственных, среди прочего, за помощь организму в противостоянии инфекциям и заболеваниям. Они являются частью нашей адаптивной иммунной системы и способны к различным иммунным ответам, например, к секреции антител в ответ на распознанный антиген. Кроме того, В-клетки способны презентировать антигены, а также могут секретировать цитокины.

[0003] Многие В-клетки созревают в плазматические клетки, которые вырабатывают антитела (белки), способные бороться с инфекциями. Другие В-клетки созревают в В-клетки памяти. Все плазматические клетки, происходящие от одной В-клетки, продуцируют одно и то же антитело, направленное против антигена, стимулировавшего его созревание. Тот же принцип справедлив и для В-клеток памяти. Таким образом, все плазматические клетки и клетки памяти «помнят» стимул, приведший к их образованию. В-клетка, или В-лимфоцит, не зависит от тимуса, имеет короткую продолжительность жизни и отвечает за выработку иммуноглобулинов. См., например, <https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=2413>. Таким образом, В-клетка является иммунологически важной клеткой.

[0004] В-клетки, по-видимому, связаны с результатами лечения рака у пациентов. Например, наличие третичных лимфоидных структур (TLS) связано с лучшими результатами лечения пациентов. См., например, Helmink, В.А., *et al.*, *Nature*, 2020, 577(7791), 549-555; Petitprez F *et al.*, *Nature*, 2020, 577(7791), 556-560. TLS представляют собой агрегаты иммунных клеток (в основном Т- и В-клеток), которые возникают в ответ на иммунологические стимулы. Хотя TLS, которые окружают опухолевые клетки, включают В-клетки, роль В-клеток в противоопухолевых ответах остается неясной. В-клетки, обнаруженные в опухолях, могут продуцировать ингибирующие факторы, препятствующие функционированию иммунных клеток. См., например, Kessel, А., *et al.*, *Autoimmun Rev.*, 2012, 11(9), 670-677; Khan, А.Р., *et al.*, *Nature Commun.*, 2015, 6, 5997. Кроме того, текущие данные указывают на то, что В-клетки препятствуют противоопухолевым ответам в большинстве моделей рака у мышей. Affara, N.I., *et al.* *Cancer Cell*, 2014, 25(6), 809-821; Shalapour, S., *et al.*, *Nature*, 2017, 551, 340-345; Ammirante, M. *et al.*, *Nature*, 2010, 464, 302-305. Тем не менее, присутствие В-клеток в структурах TLS

коррелирует с положительными клиническими результатами иммунотерапии рака. Petitprez 2020. Было показано, что внутритуморальная инъекция активированных LPS клеток селезенки, которые включают В-клетки, в сочетании с ингибиторами контрольных точек вызывает противоопухолевые ответы. Soldevilla *et al.*, *Oncoimmunology*, 2018, 7:8, e1450711.

[0005] Учитывая естественную способность В-клеток презентировать антигены и секретировать белки, существует большой потенциал их применения в качестве клеточной терапии для нацеливания на определенные типы больных клеток и секреции терапевтических полезных нагрузок. Таким образом, существует потребность в альтернативных методах лечения помимо видов Т-клеточной терапии, таких как сконструированные В-клетки, для лечения различных заболеваний и расстройств, включая рак, болезни сердца, воспалительные заболевания, заболевания, связанные с истощением мышечной ткани, неврологические заболевания и т. п.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Было обнаружено, что сконструированные В-клетки могут быть эффективными для лечения различных заболеваний и расстройств, перечисленных в настоящем документе. Таким образом, изобретение относится к модифицированным В-клеткам.

[0007] В отдельных вариантах осуществления изобретение относится к выделенной модифицированной В-клетке («CAR-В-клетке»), способной экспрессировать химерный рецептор («CAR-В-рецептор»), где указанный химерный рецептор содержит (a) внеклеточный домен; (b) трансмембранный домен; и (c) цитоплазматический домен, который содержит по меньшей мере один сигнальный домен. В различных вариантах осуществления внеклеточный домен содержит внеклеточный связывающий домен и шарнирный домен. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен(ы) распознает по меньшей мере один антиген или белок, экспрессируемый на поверхности клетки-мишени. В различных вариантах осуществления клетка-мишень выбрана из группы, состоящей из опухолевой клетки, клетки сердечной мышцы, клетки скелетной мышцы, клетки кости, клетки крови, нервной клетки, жировой клетки, клетки кожи и эндотелиальной клетки. В различных вариантах осуществления В-клетка экспрессирует более одной конструкции CAR-В-рецептора. В различных вариантах осуществления CAR-В-рецептор содержит более одного внеклеточного связывающего домена. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), или полноразмерное антитело, или внеклеточный домен рецептора или лиганда. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен способен связываться с антигеном или белком, выбранным из группы, состоящей из: PSMA, GPC3, ASGR1, ASGR2, саркогликана, корина и Her2. В различных вариантах осуществления шарнирный домен происходит из группы, состоящей из IgG, CD28 и CD8. В различных вариантах осуществления шарнирный домен состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 27, 29, 31. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит по меньшей мере один сигнальный домен, нативный для В-клеточных рецепторов. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит домен, выбранный из группы, состоящей из: CD79a (иммуноглобулин  $\alpha$ ), CD79b (иммуноглобулин  $\beta$ ), CD40, CD19, CD137, Fc $\gamma$ 2a, MyD88, CD21, Syk, FYN, LYN, PI3K, BTK, PLC $\gamma$ 2 и BLNK. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен дополнительно содержит костимулирующий домен.

[0008] В различных вариантах осуществления изобретение включает выделенную модифицированную В-клетку, где указанная В-клетка способна экспрессировать и секретировать полезную нагрузку, где полезная нагрузка естественным образом не экспрессируется в В-клетке или экспрессируется на более высоких уровнях по сравнению с естественной экспрессией в В-клетке. В различных вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой антитело или его фрагмент. В различных вариантах осуществления антитело представляет собой секреторируемое антитело и может включать блокирующие антитела (например, анти-PD-1) или антитела-агонисты (анти-CD137, GITR, OX40), сконструированные таким образом, чтобы они содержали нативные или сконструированные Fc-области. В различных вариантах осуществления антитело является мембраносвязанным. В различных вариантах полезная нагрузка выбрана из группы, состоящей из: IL-1, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL18, IL-21, интерферона  $\alpha$ , интерферона  $\beta$ , интерферона  $\gamma$ , TSLP, CCL21, FLT3L, XCL1, LIGHT(TNFSF14), OX40L, CD137L, CD40L, ICOSL, антитела к CD3, CD47, TIM4-FC, CXCL13, CCL21, CD80, CD40L, IFN $\alpha$  A2, LIGHT, 4-1BBL, MDGF (C19orf10), FGF10, PDGF, агрина, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, антитела к FAP, антитела к TGF- $\beta$ ; ловушки, приманки или другой молекулы, ингибирующей TGF- $\beta$ ; антитела к BMP; ловушки, приманки или другой молекулы, ингибирующей BMP. В различных вариантах осуществления В-клетка способна экспрессировать более одной полезной нагрузки. В различных вариантах осуществления В-клетка способна экспрессировать более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 полезных нагрузок.

[0009] В различных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения пациента, включающему введение модифицированной В-клетки согласно настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления модифицированную В-клетку вводят интратуморально, внутривенно, подкожно или внутрикожно. В различных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора контрольной точки. В различных вариантах осуществления ингибитор контрольной точки предназначен для молекулы контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM-3 и NKG2A. В различных вариантах осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой моноклональное антитело. В различных вариантах осуществления изобретение относится к выделенной модифицированной В-клетке, способной экспрессировать химерный рецептор, где указанный химерный рецептор содержит (а) внеклеточный домен, где внеклеточный домен содержит внеклеточный

связывающий домен и шарнирный домен; (b) трансмембранный домен; и (c) цитоплазматический домен, который содержит по меньшей мере один сигнальный домен, где указанная модифицированная В-клетка дополнительно способна экспрессировать полезную нагрузку, где полезная нагрузка естественным образом не экспрессируется на поверхности клетки. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен распознает антиген или белок, экспрессируемый на поверхности клетки-мишени. В различных вариантах осуществления клетка-мишень выбрана из группы, состоящей из опухолевой клетки, клетки сердечной мышцы, клетки скелетной мышцы, клетки кости, клетки крови, нервной клетки, жировой клетки, клетки кожи и эндотелиальной клетки. В различных вариантах осуществления В-клетка экспрессирует более одной конструкции CAR-В-рецептора. В различных вариантах осуществления CAR-В-рецептор содержит более одного внеклеточного связывающего домена. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), антитело или внеклеточный домен рецептора или лиганда. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен способен связываться с антигеном или белком, выбранным из группы, состоящей из PSMA, GP3, ASGR1, ASGR2, саркогликана, корина и Her2. В различных вариантах осуществления шарнирный домен происходит из группы, состоящей из IgG, CD28 и CD8. В различных вариантах осуществления шарнирный домен состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 29 и 31. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит по меньшей мере один сигнальный домен, нативный для В-клеток. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит домен, выбранный из группы, состоящей из: CD79a (иммуноглобулин  $\alpha$ ), CD79b (иммуноглобулин  $\beta$ ), CD40, CD19, CD137, Fc $\gamma$ 2a, MyD88, CD21, Syk, FYN, LYN, PI3K, BTK, PLC $\gamma$ 2 и BLNK. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен дополнительно содержит костимулирующий домен. В различных вариантах осуществления полезная нагрузка представляет собой секретируемое или мембраносвязанное антитело или его фрагмент. В различных вариантах полезная нагрузка выбрана из группы, состоящей из: IL-1, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-21, интерферона  $\alpha$ , интерферона  $\beta$ , интерферона  $\gamma$ , TSLP, CCL21, FLT3L, XCL1, LIGHT(TNFSF14), OX40L, CD137L, CD40L, ICOSL, антитела к CD3, CD47, TIM4-FC, CXCL13, CCL21, CD80, CD40L, IFN $\alpha$  A2, LIGHT, 4-1BBL, MDGF (C19orf10), FGF10, PDGF, агрина, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, антитела к FAP, антитела к TGF- $\beta$ ; ловушки, приманки или другой молекулы, ингибирующей TGF- $\beta$ ; антитела к BMP; ловушки, приманки или другой молекулы, ингибирующей BMP. В различных вариантах осуществления В-клетка способна экспрессировать более одной полезной нагрузки. В различных вариантах осуществления В-клетка способна экспрессировать более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 полезных нагрузок. В различных вариантах осуществления модифицированная В-клетка дополнительно кодирует по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из: цитоплазматических доменов CD79a, CD79b, CD40, CD19, CD137, Fc $\gamma$ 2a и MyD88. В

различных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения пациента, включающему введение модифицированной В-клетки. В различных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора контрольной точки. В различных вариантах осуществления ингибитор контрольной точки выбран из ингибиторов одной или более молекул контрольных точек из группы, состоящей из: PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, TIM-3 и NKG2A. В различных вариантах осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой моноклональное антитело. В различных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенной модифицированной В-клетке, способной экспрессировать химерный рецептор, где указанный химерный рецептор содержит внеклеточный домен, где указанный внеклеточный домен содержит шарнирный домен и внеклеточный связывающий домен, где указанный внеклеточный связывающий домен естественным образом не экспрессируется на В-клетке; и где указанный внеклеточный связывающий домен способен распознавать представляющую интерес мишень. В различных вариантах осуществления связывающий домен представляет собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), антитело, лиганд или рецептор. В различных вариантах осуществления связывающий домен представляет собой ScFv. В различных вариантах осуществления связывающий домен представляет собой рецептор, лиганд или их фрагмент. В различных вариантах осуществления В-клетка дополнительно способна экспрессировать полезную нагрузку. В различных вариантах осуществления изобретение включает способ лечения пациента, включающий введение пациенту модифицированной В-клетки.

[0010] В различных вариантах осуществления настоящее изобретение включает нуклеиновую кислоту, способную экспрессировать химерный В-клеточный рецептор, где указанный химерный рецептор содержит: (а) внеклеточный домен, где указанный внеклеточный домен содержит внеклеточный связывающий домен и шарнирный домен; (b) трансмембранный домен; и (с) цитоплазматический домен, который содержит по меньшей мере один сигнальный домен. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен распознает антиген или белок, экспрессируемый на поверхности клетки-мишени. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен представляет собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), антитело, рецептор или лиганд. В различных вариантах осуществления клетка-мишень выбрана из группы, состоящей из опухолевой клетки, клетки сердечной мышцы, клетки скелетной мышцы, клетки кости, клетки крови, нервной клетки, жировой клетки, клетки кожи и эндотелиальной клетки. В различных вариантах осуществления вектор экспрессирует более одного CAR-В-рецептора. В различных вариантах осуществления CAR-В-рецептор экспрессирует более одного внеклеточного связывающего домена. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен способен связываться с антигеном или белком, выбранным из группы, состоящей из: PSMA, GP3, ASGR1, ASGR2, саркогликана, корина, Her2, FAP1, MUC1, CEA153, JAM-1 и LFA-1. В различных вариантах осуществления шарнирный домен происходит из группы, состоящей из IgG, CD28 и CD8.

В различных вариантах осуществления шарнирный домен состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 29 и 31. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит по меньшей мере один сигнальный домен, нативный для В-клеточных рецепторов. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит домен, выбранный из группы, состоящей из: CD79a (иммуноглобулин  $\alpha$ ), CD79b (иммуноглобулин  $\beta$ ), CD40, CD19, CD137, Fc $\gamma$ 2a, MyD88, CD21, Syk, FYN, LYN, PI3K, BTK, PLC $\gamma$ 2 и BLNK. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен дополнительно содержит костимулирующий домен.

[0011] В различных вариантах осуществления изобретение относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, способную экспрессировать химерный В-клеточный рецептор, где указанный химерный рецептор содержит: (a) внеклеточный домен, где указанный внеклеточный домен содержит внеклеточный связывающий домен и шарнирный домен; (b) трансмембранный домен; и (c) цитоплазматический домен, который содержит по меньшей мере один сигнальный домен. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен распознает антиген или белок. В различных вариантах осуществления клетка-мишень выбрана из группы, состоящей из опухолевой клетки, клетки сердечной мышцы, клетки скелетной мышцы, клетки кости, клетки крови, нервной клетки, жировой клетки, клетки кожи и эндотелиальной клетки. В различных вариантах осуществления вектор экспрессирует более одного CAR-В-рецептора. В различных вариантах осуществления CAR-В экспрессирует более одного внеклеточного связывающего домена. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), антитело, рецептор или лиганд. В различных вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен способен связываться с антигеном или белком, выбранным из группы, состоящей из: PSMA, GPC3, ASGR1, AGSR2, саркогликана, корина, Her2, FAP1, MUC1, CEA153, JAM-1 и LFA-1. В различных вариантах осуществления шарнирный домен происходит из группы, состоящей из IgG, CD28 и CD8. В различных вариантах осуществления шарнирный домен состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 29 и 31. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит по меньшей мере один сигнальный домен, нативный для В-клеток. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из: CD79a (иммуноглобулин  $\alpha$ ), CD79b (иммуноглобулин  $\beta$ ), CD40, CD19, CD137, Fc $\gamma$ 2a, MyD88, CD21, Syk, FYN, LYN, PI3K, BTK, PLC $\gamma$ 2 и BLNK. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен дополнительно содержит костимулирующий домен.

[0012] В различных вариантах осуществления изобретение относится к выделенной модифицированной В-клетке, способной экспрессировать интегрин, хоминг-антитело, белок, рецептор или их комбинации, где указанный интегрин, хоминг-антитело, белок или рецептор естественным образом не экспрессируется в В-клетке или экспрессируется на

более высоких уровнях по сравнению с естественной экспрессией в В-клетке; и где указанный интегрин, хоминг-антитело, белок, рецептор или их комбинации привлечены к представляющему интерес сайту или мишени. В различных вариантах осуществления интегрин, хоминг-антитело, белок и рецептор выбраны из CLA (гликоформа PSGL-1), CLA (гликоформа PSGL-1), CCR10, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR9, CD43E, CD44, c-Met, CXCR3, CXCR4, LFA-1, LFA-1 ( $\alpha$ L $\beta$ 2), лигандов селектина, VLA-4, VLA-4 ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1) и  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 или их комбинаций. В различных вариантах осуществления представляющий интерес сайт представляет собой ткань для хоминга или ткань-мишень, очаг воспаления в определенном месте или ткани, или опухоль или микроокружение опухоли, куда желательна доставка полезных нагрузок. В различных вариантах осуществления ткань для хоминга или ткань-мишень выбрана из кожи, кишечника (кишечного тракта, толстой кишки, брыжеечных лимфатических узлов (БЛУ), пейеровой бляшки (ПБ), тонкой кишки), печени, легкого, костного мозга, сердца, периферического лимфатического узла (ЛУ), ЦНС (центральная нервная система), вилочковой железы и костного мозга. В различных вариантах осуществления представляющая интерес мишень выбрана из CXCL16, CCL17, CCL17(22), CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), CCL21, CCL25, CCL27, CCL28, CCL4, CCL5, CD62E, CD62P, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CXCL16, CXCL9/CXCL10, CXCR3, E/P-селектина, E-селектина, GPR15L, HGF, гиалуроната, ICAM-1, лигандов для CCR1, 2, 5, MAdCAM, MAdCAM-1, PNA<sub>d</sub>, VAP-1, VCAM и VCAM-1 или их комбинаций. В различных вариантах осуществления способ включает лечение пациента путем введения выделенной модифицированной В-клетки. В различных вариантах осуществления способ включает дополнительное введение соединения или его производного, где соединение или его производное способно повышать экспрессию интегрина, хоминг-антитела, белка и рецептора или их комбинаций. В различных вариантах осуществления соединение или его производное способно изменять перемещение В-клеток к представляющему интерес сайту или мишени у пациента. В различных вариантах осуществления соединение представляет собой полностью транс-ретиноевую кислоту (ПТРК) или ее производное.

[0013] В различных вариантах осуществления изобретение относится к выделенной модифицированной В-клетке, способной экспрессировать иммуноингибирующую молекулу, где указанная иммуноингибирующая молекула естественным образом не экспрессируется в В-клетке или экспрессируется на более высоких уровнях по сравнению с естественной экспрессией в В-клетке. В различных вариантах осуществления указанная иммуноингибирующая молекула выбрана из IL-10, TGF- $\beta$ , PD-L1, PD-L2, LAG-3 и TIM-3 или их комбинаций. В различных вариантах осуществления указанная иммуноингибирующая молекула способна снижать воспаление и аутоиммунную активность В-клеток в представляющем интерес сайте или мишени у пациента. В различных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения пациента, включающему введение указанной выделенной модифицированной В-клетки. В различных вариантах осуществления указанная иммуноингибирующая молекула выбрана из IL-10, TGF- $\beta$ , PD-L1, PD-L2, LAG-3 и TIM-3 или их комбинаций. В различных вариантах

осуществления указанная иммуноингибирующая молекула способна снижать воспаление и аутоиммунную активность В-клеток в представляющем интерес сайте или мишени у пациента. В различных вариантах осуществления изобретение относится к дополнительному введению соединения или его производного, способного повышать экспрессию интегрина, хоминг-антитела, белка, рецептора или их комбинаций в В-клетке. В различных вариантах осуществления указанное соединение или его производное способно изменять перемещение В-клеток к представляющему интерес сайту или мишени у пациента. В различных вариантах осуществления указанное соединение представляет собой полностью транс-ретиноевую кислоту (ПТРК) или ее производное. В различных вариантах осуществления изобретение относится к выделенной модифицированной В-клетке, где выделенная модифицированная В-клетка обработана соединением или его производным, где указанное соединение или его производное способно повышать экспрессию интегрина, хоминг-антитела, белка, рецептора или их комбинаций в В-клетках. В различных вариантах осуществления указанное соединение или его производное способно изменять перемещение В-клеток к представляющему интерес сайту или мишени у пациента. В различных вариантах осуществления указанное соединение представляет собой полностью транс-ретиноевую кислоту (ПТРК) или ее производное. В различных вариантах осуществления указанное соединение или его производное способно (i) повышать экспрессию интегрина, хоминг-антитела, белка, рецептора или их комбинаций в В-клетках и (ii) изменять перемещение В-клеток к представляющему интерес сайту или мишени у пациента. В различных вариантах осуществления указанное соединение представляет собой полностью транс-ретиноевую кислоту (ПТРК) или ее производное.

[0014] В различных вариантах осуществления изобретение относится к выделенной модифицированной В-клетке, способной экспрессировать по меньшей мере один или более конститутивно активных толл-подобных рецепторов (TLR), где указанный TLR естественным образом не экспрессируется в В-клетке или экспрессируется на более высоких уровнях по сравнению с естественной экспрессией в В-клетке. В различных вариантах осуществления указанный TLR выбран из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и TLR13 или их комбинаций. В различных вариантах осуществления указанный TLR способен повышать активность В-клеток для повышения иммунных ответов у пациента. В различных вариантах осуществления указанный TLR способен обеспечивать высокоактивные эффекторные В-клетки для повышения иммунных ответов у пациента. В различных вариантах осуществления указанная иммуноингибирующая молекула способна снижать воспаление и аутоиммунную активность В-клеток в представляющем интерес сайте или мишени у пациента. В различных вариантах осуществления указанный TLR выбран из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и TLR13 или их комбинаций. В различных вариантах осуществления указанный TLR способен (i) повышать активность В-клеток и (ii) обеспечивать высокоактивные эффекторные В-клетки для повышения иммунных ответов у пациента. В различных вариантах осуществления пациенту вводят по

меньшей мере один или более агонистов TLR. В различных вариантах осуществления выделенная модифицированная В-клетка обработана по меньшей мере одним или более агонистами TLR. В различных вариантах осуществления указанный агонист TLR способен (i) повышать активность В-клеток и (ii) обеспечивать высокоактивные эффекторные В-клетки для повышения иммунных ответов у пациента. В различных вариантах осуществления указанный агонист TLR связывается с одним или более TLR, выбранными из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и TLR13 или их комбинаций. В различных вариантах осуществления указанный агонист TLR выбран из CpG-богатых олигонуклеотидов, миметиков двухцепочечной РНК, полиинозиновой кислоты:полицитидиловой кислоты (поли-И:С). В различных вариантах осуществления указанный агонист TLR включает CpG-олигонуклеотиды. В различных вариантах осуществления указанный агонист TLR способен (i) повышать активность В-клеток и (ii) обеспечивать высокоактивные эффекторные В-клетки для повышения иммунных ответов у пациента. В различных вариантах осуществления указанный агонист TLR связывается с одним или более TLR, выбранными из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и TLR13 или их комбинаций. В различных вариантах осуществления указанный агонист TLR выбран из CpG-богатых олигонуклеотидов, миметиков двухцепочечной РНК, полиинозиновой кислоты:полицитидиловой кислоты (поли-И:С). В различных вариантах осуществления указанный агонист TLR включает CpG-олигонуклеотиды.

[0015] В различных вариантах осуществления изобретение относится к выделенной модифицированной В-клетке, где указанная В-клетка подвергнута электропорации мРНК, кодирующей по меньшей мере один или более антигенов, слитых с нацеливающим сигналом. В различных вариантах осуществления указанный антиген (i) естественным образом не презентуется В-клеткой, (ii) естественным образом не презентуется В-клеткой одновременно в молекулах HLA как класса I, так и класса II, или (iii) естественным образом не презентуется В-клеткой с высокой эффективностью в молекулах HLA как класса I, так и класса II. В различных вариантах осуществления указанный нацеливающий сигнал представляет собой нацеливающий сигнал лизосомального белка. В различных вариантах осуществления указанный нацеливающий сигнал представляет собой нацеливающий сигнал лизосома-ассоциированного мембранного белка-1 (LAMP1). В различных вариантах осуществления указанный антиген способен нацеливаться на лизосомы и одновременно и эффективно презентироваться в молекулах HLA как класса I, так и класса II. В различных вариантах осуществления указанные В-клетки способны повышать антигенспецифические иммунные ответы у пациента. В различных вариантах осуществления указанный антиген (i) естественным образом не презентуется В-клеткой, (ii) естественным образом не презентуется В-клеткой одновременно в молекулах HLA как класса I, так и класса II, или (iii) естественным образом не презентуется В-клеткой с высокой эффективностью в молекулах HLA как класса I, так и класса II. В различных вариантах осуществления указанный нацеливающий сигнал представляет собой

нацеливающий сигнал лизосомального белка. В различных вариантах осуществления указанный нацеливающий сигнал представляет собой нацеливающий сигнал лизосома-ассоциированного мембранного белка-1 (LAMP1). В различных вариантах осуществления указанный антиген способен нацеливаться на лизосомы и одновременно и эффективно презентироваться в молекулах HLA как класса I, так и класса II. В различных вариантах осуществления указанные В-клетки способны повышать антигенспецифические иммунные ответы у пациента.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0016] На ФИГ. 1 представлен пример химерного В-клеточного рецептора (сBCR или CAR-B) согласно настоящему изобретению. В отдельных вариантах осуществления конструкция CAR-B будет содержать внеклеточный домен, трансмембранный домен и цитоплазматический домен. Как показано на ФИГ. 1, в отдельных вариантах осуществления внеклеточный домен может содержать связывающий домен и шарнирную область. В отдельных вариантах осуществления связывающая область может представлять собой scFv. Конструкции CAR-B клонируют в вирусный вектор для экспрессии.

[0017] На ФИГ. 2А-2С показаны примеры сконструированных В-клеток с хоминг-доменами. В различных вариантах осуществления сконструированные В-клетки могут содержать (а) связывающий домен scFv и необязательную шарнирную область; (б) связывающий домен scFv, непосредственно связанный с клеткой, или (с) связывающий домен лиганда/рецептора, непосредственно связанный с клеткой.

[0018] На ФИГ. 3 показаны примеры некоторых конструкций CAR-B согласно настоящему изобретению. (А) CAR-B, которая связывает GPC3. (В) CAR-B, которая связывает PSMA.

[0019] На ФИГ. 4 показаны примеры рецепторов CAR-B согласно настоящему изобретению, способных связывать (А) GPC3 и (В) PSMA.

[0020] На ФИГ. 5 показана экспрессия анти-PSMA на поверхности клеток НЕК-293.

[0021] На ФИГ. 6А-6С представлен график FACS, иллюстрирующий связывание сBCR к PSMA и сBCR к саркогликану с PSMA. В-клетки, экспрессирующие рWF391 (сBCR к PSMA), связывали PSMA, тогда как В-клетки, экспрессирующие рWF394 (сBCR к саркогликану), не связывали PSMA.

[0022] На ФИГ. 7 проиллюстрирована способность аденовируса F35, кодирующего GFP, трансдуцировать В-клетки человека. В-клетки человека выделяли из периферической крови. В-клетки инфицировали аденовирусом, кодирующим GFP. 0, 1, 3, 10 представляют собой объем в микролитрах препарата аденовируса, использованного для инфицирования В-клеток человека.

[0023] На ФИГ. 8 описан эксперимент, в котором мышам BALB/c с обоих боков вводили опухоли СТ26 в нулевой день. На 12 и 16 день мышам с опухолями внутритуморально инъецировали клетки, экспрессирующие полезную нагрузку, в объеме  $10^6$  в 50 мкл.

[0024] На ФИГ. 9 проиллюстрирован эффект 12 различных комбинаций полезных

нагрузок, инъецированных внутритуморально, на объем опухоли за 30-35 дней по сравнению с физиологическим раствором и клетками 3Т3 (без полезной нагрузки).

[0025] На ФИГ. 10 проиллюстрирован эффект 12 различных комбинаций полезных нагрузок, инъецированных внутритуморально, на объем опухоли за 30-35 дней по сравнению с физиологическим раствором и клетками 3Т3 (без полезной нагрузки).

[0026] На ФИГ. 11А-11С проиллюстрирован эффект трех наилучших комбинаций полезных нагрузок, инъецированных внутритуморально, на объем опухоли за 30 дней по сравнению с физиологическим раствором и клетками 3Т3 (без полезной нагрузки).

[0027] На ФИГ. 12 проиллюстрирован абскопальный эффект внутритуморальных инъекций В-клеток. В-клетки инъецировали либо (i) свежими, либо (ii) предварительно стимулированными в течение 16-24 часов в ростовой среде (RPMI, 10% FBS, 1% пенициллин/стрептомицин, 5 нг/мл рекомбинантного мышинового IL-4, 100 мкМ бета-меркаптоэтанола) посредством 5 мкг/мл липополисахарида. Затем  $5 \times 10^6$  В-клеток внутритуморально инъецировали в мышиную модель СТ26 и измеряли противоопухолевые ответы в дистальной (абскопальной) опухоли. Опухоли имплантировали в 0 день, а на 6 день наблюдали пальпируемую опухолевую массу. Лечение начинали на 6 день внутритуморально.

[0028] На ФИГ. 13А-13С проиллюстрирована экспрессия CAR-В-рецепторов (также называемых sVCR-рецепторами) в различных типах клеток через 24 часа после трансфекции.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0029] Изобретение, раскрытое в настоящем документе, относится к нескольким вариантам осуществления сконструированных или модифицированных В-клеток:

1. В-клеткам, которые были модифицированы для хоминга в представляющий интерес сайт/мишень, с использованием, например, связывающего домена, такого как scFv, антитело, лиганд, рецептор или их фрагменты;

2. В-клеткам, которые были модифицированы хоминг-доменом, дополнительно содержащим активирующий и, необязательно, костимулирующий домен, так что В-клетки могут осуществлять хоминг и активироваться при взаимодействии с желаемой мишенью;

3. В-клеткам, сконструированным таким образом, чтобы они были способны получать желаемую белковую полезную нагрузку, такую как антитело, терапевтический белок, полипептид, последовательность нуклеиновой кислоты (такая как РНКи) и т. п.;

4. Сконструированным В-клеткам, содержащим хоминг-/связывающий домен, активирующий домен, необязательный костимулирующий домен и дополнительно сконструированным для экспрессии желаемой белковой полезной нагрузки, такой как антитело, терапевтический белок, полипептид, последовательность нуклеиновой кислоты (такая как РНКи) и т. п.;

5. В-клеткам, которые были модифицированы для экспрессии интегрина, хоминг-антитела, белка или рецептора, так что В-клетки привлекаются к определенным лигандам, хемокинам или аттрактантам в определенном представляющем интерес сайте/мишени

(например, ткани для хоминга) и, таким образом, могут осуществлять хоминг в представляющий интерес сайт/мишень, например, для доставки желаемой полезной нагрузки;

6. В-клеткам, которые были модифицированы для экспрессии иммуноингибирующей молекулы, так что воспаление и аутоиммунная активность В-клеток, локализованных в представляющем интерес сайте/мишени, снижены, что приводит к положительному терапевтическому ответу;

7. В-клеткам, которые были обработаны соединением или его производными, так что перемещение В-клеток изменено за счет экспрессии определенных интегринов В-клеток и/или хоминг-рецепторов;

8. В-клеткам, которые были (i) обработаны агонистом толл-подобного рецептора (TLR) и/или (ii) сконструированы для экспрессии конститутивно активного TLR, для повышения активности В-клеток и/или обеспечения высокоактивных эффекторных В-клеток для повышения иммунных ответов у субъекта;

9. В-клеткам, которые были подвергнуты электропорации мРНК, кодирующей определенные представляющие интерес антигены, слитые с нацеливающим сигналом лизосомального белка, так что В-клетки могут одновременно и эффективно презентировать определенные представляющие интерес антигены и/или эпитопы, происходящие от антигенов, в молекулах HLA как класса I, так и класса II.

10. В-клеткам, которые были подвергнуты электропорации самоамплифицирующейся РНК, кодирующей любые элементы, указанные ранее в пп. 1-9.

[0030] Подразумевается, что различные варианты осуществления сконструированных или модифицированных В-клеток согласно настоящей заявке не являются взаимоисключающими и могут быть комбинированы друг с другом любым образом и без каких-либо ограничений, если прямо не указано обратное, для достижения или облегчения любого из результатов и/или терапевтических ответов, рассматриваемых в настоящем документе.

[0031] **Опухолевый антиген.** В отдельных вариантах осуществления представляющий интерес сайт/мишень представляет собой опухолевый антиген. Выбор антигенсвязывающего домена (фрагмента) согласно изобретению будет зависеть от конкретного типа рака, подлежащего лечению. Некоторые опухолевые антигены могут быть мембраносвязанными, тогда как другие могут быть секретированы. Например, опухолевой антиген может секретироваться и накапливаться во внеклеточном матриксе, или опухолевый антиген может экспрессироваться как часть комплекса МНС. Опухолевые антигены хорошо известны в данной области техники и могут включать, например, CD19, KRAS, HGF, CLL, глиома-ассоциированный антиген, карциноэмбриональный антиген (CEA);  $\beta$ -субъединицу хорионического гонадотропина человека, альфафетопротеин (AFP), лектин-реактивную фракцию AFP, тироглобулин, RAGE-1, MN-CA IX, теломеразную обратную транскриптазу человека, RU1, RU2 (AS), карбоксилэстеразу кишечника, мутацию hsp70-2, M-CSF, простазу, простатспецифический антиген (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-

1a, p53, простеин, PSMA, Her2/neu, сурвивин и теломеразу, опухолевый антиген-1 карциномы простаты (PCTA-1), MAGE, ELF2M, эластазу нейтрофилов, эфрин B2, CD22, инсулиноподобный фактор роста (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I, мезотелин, EGFR, BCMA, KIT и IL-13.

[0032] **Антиген инфекционного заболевания.** В отдельных вариантах осуществления представляющий интерес сайт/мишень представляет собой антиген инфекционного заболевания, против которого может быть желателен иммунный ответ. Антигены инфекционных заболеваний хорошо известны в данной области техники и могут включать, не ограничиваясь перечисленным, вирусы, бактерии, простейших и паразитарные антигены, такие как паразиты, грибы, дрожжи, микоплазма, вирусные белки, бактериальные белки и углеводы, и белки и углеводы грибов. Кроме того, тип инфекционного заболевания антигена инфекционного заболевания не ограничен каким-либо определенным образом и может включать, не ограничиваясь перечисленным, фармакорезистентные заболевания, относящиеся к группе вирусных инфекционных заболеваний, такие как СПИД, гепатит В, инфекция, вызванная вирусом Эпштейна-Барр (EBV), инфекция ВПЧ (вирус папилломы человека), инфекция HCV и т. д. Паразитарные антигены могут включать, не ограничиваясь перечисленным, белок малярийного паразита на стадии спорозонта.

[0033] В отдельных вариантах осуществления модифицированные В-клетки экспрессируют сконструированный В-клеточный рецептор (CAR-B), содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. В отдельных вариантах осуществления внеклеточный домен содержит связывающий домен и шарнирный домен. В отдельных вариантах осуществления внеклеточный домен содержит связывающий домен, такой как scFv, лиганд, антигено, рецептор или их фрагмент, который позволяет модифицированной В-клетке нацеливаться на определенные клетки-мишени путем связывания с белками, экспрессируемыми на поверхности этих клеток. В отдельных вариантах осуществления модифицированные опухолевые клетки нацелены на белки/антигены, экспрессируемые на поверхности опухолевых клеток, и связываются с ними. В отдельных вариантах осуществления модифицированная В-клетка дополнительно экспрессирует полезную нагрузку. В отдельных вариантах осуществления полезная нагрузка способна увеличивать количество перекрестно презентующих дендритных клеток (ДК) в опухолях. В отдельных вариантах осуществления полезная нагрузка способна активировать Т-клетки и привлекать их в опухоли. В отдельных вариантах осуществления полезная нагрузка способна стимулировать образование третичных лимфоидных структур (TLS) в опухолях. В отдельных вариантах осуществления изобретения модифицированная В-клетка экспрессирует как CAR-B, так и полезную нагрузку. В отдельных вариантах осуществления CAR-B содержит стимулирующие домены, которые активируют экспрессию полезной нагрузки при связывании с антигеном или белком, экспрессируемым на поверхности опухолевой клетки.

## 1. Конструирование и ориентация доменов химерных антигенных рецепторов

### в В-клетках (CAR-B)

[0034] В различных вариантах осуществления изобретение относится к химерному В-клеточному рецептору (CAR-B). Следует принимать во внимание, что химерные В-клеточные рецепторы (CAR-B) представляют собой рецепторы, полученные с помощью генной инженерии. Эти сконструированные рецепторы могут быть легко вставлены и экспрессированы В-клетками в соответствии с методами, известными в данной области техники. С помощью CAR-B один рецептор может быть запрограммирован на распознавание определенного белка или антигена, экспрессируемого на опухолевой клетке, и при связывании с указанным белком или антигеном вызывать противоопухолевый ответ. В различных вариантах осуществления CAR-B частично служат механизмом хоминга для доставки В-клеток в ткань-мишень.

[0035] Следует принимать во внимание, что относительно клетки, несущей рецептор, химерный В-клеточный рецептор согласно изобретению будет содержать внеклеточный домен (который будет содержать антигенсвязывающий домен и может содержать внеклеточный сигнальный домен и/или шарнирный домен), трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Внутриклеточный домен содержит по меньшей мере активирующий домен, предпочтительно состоящий из CD79a (иммуноглобулин  $\alpha$ ), CD79b (иммуноглобулин  $\beta$ ), CD40, CD19, CD137, Fc $\gamma$ 2a и/или MyD88. Кроме того, следует принимать во внимание, что антигенсвязывающий домен сконструирован таким образом, что он расположен во внеклеточной части молекулы/конструкции, так что он способен распознавать свою мишень или мишени и связываться с ними.

[0036] Понятно, что структурно эти домены соответствуют положениям относительно иммунной клетки. Иллюстративные конструкции CAR-B согласно изобретению представлены в таблице 1:

**ТАБЛИЦА 1**

Название конструкции	Внеклеточный домен	Шарнир	ТМ	Сигнальный 1	Сигнальный 2
pWF-82	анти-PSMA	CD8	CD28	hCD19	
pWF-83	анти-PSMA	CD8	CD28	hCD40	
pWF-84	анти-PSMA	CD8	CD28	hCD40	CD79b
pWF-85	анти-PSMA	CD8	CD28	hCD40	CD137
pWF-86	анти-PSMA	CD8	CD28	hCD40	Fc $\gamma$ 2a
pWF-87	анти-PSMA	CD8	CD28	hMyd88	hCD40
pWF-88	анти-PSMA	CD8	CD28	CD79a	
pWF-89	анти-PSMA	CD8	CD28	CD79b	
pWF-391	анти-PSMA	3x strep II-метка	CD28	CD79b	
pWF-394	анти-	3x strep II-	CD28	CD79b	

	саркогликан	метка			
pWF-396	анти-GPC-3	CD8	CD28	CD79a	
pWF-397	анти-GPC-3	CD8	CD28	CD79b	
pWF-460	анти-GPC-3	Fc IgG1 человека	CD28	CD79a	
pWF428	анти-GPC-3	Константная область лямбда человека	Константная область лямбда человека		
pWF429	анти-GPC-3	Fc IgG1 человека	Fc IgG1 человека		
pWF-521	Анти-GPC3 vL- константная область лямбда человека- линкер-vH- hcH1-cH2-cH3	Fc IgG1 человека	IgG1 человека	Эндогенный комплекс BCR	
pWF-533	Анти-GPC3- vL-hcH1		IgG1 человека (комплекс с pWF534)	Эндогенный комплекс BCR	
pWF-534	Анти-GPC3- vH- константная область каппа человека- hcH2-cH3	Fc IgG1 человека	IgG1 человека	Эндогенный комплекс BCR	

[0037] В различных вариантах осуществления химерные В-клеточные рецепторы состоят из внеклеточного домена, трансмембранного домена и цитоплазматического домена. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит активирующий домен. В различных вариантах осуществления цитоплазматический домен может также содержать костимулирующий домен. В различных вариантах осуществления внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий домен. В различных вариантах

внеклеточный домен дополнительно содержит шарнирную область между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом. На ФИГ. 1 схематически изображен химерный В-клеточный рецептор согласно различным вариантам осуществления настоящего изобретения.

[0038] **Внеклеточный домен.** В настоящем изобретении может быть использован ряд внеклеточных доменов. В различных вариантах осуществления внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий домен. В различных вариантах внеклеточный домен может также содержать шарнирную область и/или сигнальный домен. В различных вариантах осуществления внеклеточные домены, содержащие константный домен IgG1, могут также содержать либо IgG1 (впадина), либо IgG1 (выступ) для облегчения направленного образования sBCR.

[0039] **Антигенсвязывающий домен и связывающий домен.** В контексте настоящего документа «антигенсвязывающий домен», «антиген-связывающий домен» или «связывающий домен» относится к части В-CAR, способной связывать антиген или белок, экспрессируемый на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с антигеном или белком на клетке, пораженной гиперпролиферативным заболеванием. В предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен связывается с антигеном или белком, экспрессируемым на поверхности опухолевой клетки. Антигенсвязывающие молекулы будут дополнительно пояснены с учетом приведенных ниже определений и описаний.

[0040] Говорят, что антигенсвязывающий домен «специфично связывает» свой антиген или белок-мишень, когда константа диссоциации ( $K_d$ ) составляет  $1 \times 10^{-7}$  М. Антигенсвязывающий домен специфично связывает антиген с «высокой аффинностью», когда  $K_d$  составляет  $1-5 \times 10^{-9}$  М, и с «очень высокой аффинностью», когда  $K_d$  составляет  $1-5 \times 10^{-10}$  М. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен имеет  $K_d$   $10^{-9}$  М. В одном варианте осуществления скорость диссоциации составляет  $< 1 \times 10^{-5}$ . В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен будет связываться с антигеном или белком с  $K_d$  приблизительно от  $10^{-7}$  М до  $10^{-13}$  М, а в еще одном варианте осуществления антигенсвязывающий домен будет связываться с  $K_d$   $1,0-5,0 \times 10^{-10}$ .

[0041] Говорят, что антигенсвязывающий домен является «селективным», когда он связывается с одной мишенью более прочно, чем со второй мишенью.

[0042] Термин «нейтрализующий» относится к антигенсвязывающему домену, который связывается с лигандом и предотвращает или снижает биологический эффект этого лиганда. Это может быть осуществлено, например, путем прямого блокирования сайта связывания на лиганде или путем связывания с лигандом и изменения способности лиганда к связыванию косвенными средствами (такими как структурные или энергетические изменения в лиганде). В некоторых вариантах осуществления данный термин может также обозначать антигенсвязывающий домен, который препятствует выполнению биологической функции белком, с которым он связан.

[0043] Термин «мишень» или «антиген» относится к молекуле или части молекулы,

способной быть связанной антигенсвязывающей молекулой. В отдельных вариантах осуществления мишень может иметь один или более эпитопов.

[0044] Термин «антитело» относится к так называемым иммуноглобулинам, Y-образным белкам, которые вырабатываются иммунной системой для распознавания определенного антигена. Термин «фрагмент антитела» относится к антигенсвязывающим фрагментам и Fc-фрагментам антител. Типы антигенсвязывающих фрагментов включают: молекулы F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fab' и Fv. Фрагменты Fc полностью образованы из константной области тяжелой цепи иммуноглобулина.

[0045] **Внеклеточные сигнальные домены.** Внеклеточный домен полезен для передачи сигналов и эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Внеклеточные домены, особенно подходящие для данного изобретения, могут происходить из (т. е. содержать) CD28, CD28T (см., например, заявку на патент США US2017/0283500A1), OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, программируемой смерти-1 (PD-1), индуцибельного костимулятора T-клеток (ICOS), ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, CD79a (иммуноглобулин α), CD79b (иммуноглобулин β), DAP-10, рецептора Fc-гамма, молекулы MHC класса 1, белков TNF-рецепторов, белка иммуноглобулина, рецептора цитокинов, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, толл-подобного рецептора, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, который специфично связывается с CD83, или любой их комбинации. Внеклеточный домен может происходить либо из природного, либо из синтетического источника.

[0046] **Шарнирные домены.** Как описано в настоящем документе, внеклеточные домены часто содержат шарнирную часть. Она представляет собой часть внеклеточного домена, проксимальную к клеточной мембране. Внеклеточный домен может дополнительно содержать спейсерную область. В соответствии с изобретением можно использовать различные шарниры, включая костимулирующие молекулы, как обсуждалось выше, а также последовательности иммуноглобулина (Ig), спейсер 3X Strep II или другие подходящие молекулы для достижения желаемого пространственного расстояния от клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления вся внеклеточная область включает шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит внеклеточный домен CD28 или CD8 или его часть, как описано в настоящем документе.

[0047] **Трансмембранные домены.** В-CAR может быть сконструирован таким образом, чтобы он содержал трансмембранный домен, слитый или иным образом связанный с внеклеточным доменом В-CAR. Аналогичным образом он может быть слит с внутриклеточным доменом В-CAR. В одном варианте осуществления используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в В-CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами того же или других поверхностных мембранных белков, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. Трансмембранный домен может происходить либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен может происходить из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области, особенно подходящие для данного изобретения, могут происходить из (т. е. содержать) CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, программируемой смерти-1 (PD-1), индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS), ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (В7-Н3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, CD79a (иммуноглобулин  $\alpha$ ), CD79b (иммуноглобулин  $\beta$ ), DAP-10, рецептора Fc-гамма, молекулы МНС класса 1, белков TNF-рецепторов, белка иммуноглобулина, рецептора цитокинов, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, толл-подобного рецептора, ICAM-1, B7-Н3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD1 1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда, который специфично связывается с CD83, или любой их комбинации.

[0048] Необязательно, короткие линкеры могут образовывать связи между любым или некоторыми из внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного доменов В-CAR.

[0049] В отдельных вариантах осуществления трансмембранный домен в В-CAR согласно изобретению представляет собой трансмембранный домен CD28. В одном варианте осуществления трансмембранный домен CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления трансмембранный домен CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления трансмембранный домен CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ

ID NO: 3. В еще одном варианте осуществления трансмембранный домен CD28 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

[0050] В одном варианте осуществления трансмембранный домен в В-CAR согласно изобретению представляет собой трансмембранный домен CD8.

[0051] **Внутриклеточные (цитоплазматические) домены.** Внутриклеточный (IC или цитоплазматический) домен рецепторов В-CAR согласно изобретению может обеспечивать активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки.

[0052] Следует принимать во внимание, что подходящие внутриклеточные молекулы включают, не ограничиваясь перечисленным, CD79a (иммуноглобулин  $\alpha$ ), CD79b (иммуноглобулин  $\beta$ ), CD40, CD19, CD137, Fc $\gamma$ 2a и MyD88. Внутриклеточные молекулы могут дополнительно включать CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, программируемую смерть-1 (PD-1), индуцибельный костимулятор Т-клеток (ICOS), ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP-10, рецептор Fc-гамма, молекулу MHC класса 1, белки TNF-рецепторов, белок иммуноглобулина, рецептор цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, толл-подобный рецептор, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганд, который специфично связывается с CD83, или любую их комбинацию. Цитоплазматические сигнальные последовательности внутри цитоплазматической сигнальной части CAR-В согласно изобретению могут быть связаны друг с другом в случайном или заданном порядке.

[0053] Термин «костимулирующий» домен или молекула в контексте настоящего документа относится к гетерогенной группе молекул клеточной поверхности, которые усиливают или противодействуют исходным активирующим сигналам клетки.

[0054] В одном предпочтительном варианте осуществления цитоплазматический домен сконструирован таким образом, чтобы он содержал сигнальный домен hCD19, где домен hCD19 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 5. В еще одном варианте осуществления цитоплазматический домен сконструирован таким образом, чтобы он содержал сигнальный домен hCD40, где домен hCD40 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO:

7. В еще одном варианте осуществления цитоплазматический домен сконструирован таким образом, чтобы он содержал сигнальный домен hCD40 и hCD79b, где домен hCD40 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 7, и домен hCD79b содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 25. В еще одном варианте осуществления цитоплазматический домен сконструирован таким образом, чтобы он содержал сигнальный домен hCD40 и hCD137, где домен hCD40 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 7, и домен hCD137 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 13. В еще одном варианте осуществления цитоплазматический домен сконструирован таким образом, чтобы он содержал сигнальный домен hCD40 и hFcγ2a, где домен hCD40 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 7, и домен hFcγ2a содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 17. В еще одном варианте осуществления цитоплазматический домен сконструирован таким образом, чтобы он содержал сигнальный домен hCD40 и hMyd88, где домен hCD40 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 7, и домен hMyd88 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 21. В еще одном варианте осуществления цитоплазматический домен сконструирован таким образом, чтобы он содержал сигнальный домен hCD79a, где домен hCD79a содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 23. В еще одном варианте осуществления цитоплазматический домен сконструирован таким образом, чтобы он содержал сигнальный домен hCD79b, где домен hCD79b содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 25. Эти варианты осуществления предпочтительно имеют человеческое происхождение, но могут происходить и от других видов.

## 2. Модифицированные В-клетки

[0055] **Модифицированные В-клетки, которые экспрессируют полезные нагрузки.** В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена модифицированная В-клетка, способная экспрессировать полезную нагрузку. В контексте настоящего документа термин «полезная нагрузка» относится к аминокислотной последовательности, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид или белок, или молекуле РНК для применения в качестве терапевтического агента. В отдельных вариантах осуществления полезная нагрузка предназначена для доставки в опухоль или микроокружение опухоли. В отдельных вариантах осуществления желательно, чтобы В-клетка доставляла в опухоль или микроокружение опухоли полезную нагрузку, способную, например, увеличивать количество перекрестно презентующих дендритных клеток (ДК) в опухолях. Перекрестно презентующие ДК позволят улучшить презентацию опухолевых антигенов. В различных вариантах осуществления полезная нагрузка может быть способна активировать Т-клетки и привлекать их в опухоли. Активация большего количества Т-клеток в опухолях дополнит перекрестно презентующие ДК, чтобы

изменить окружение опухоли, чтобы оно обладало более мощными противоопухолевыми иммунными способностями. Полезные нагрузки также способны способствовать образованию третичных лимфоидных структур (TLS) в опухолях. Клинические исследования показали, что существует взаимосвязь между В-клетками, TLS и ответами на блокаду иммунных контрольных точек.

[0056] Неисключительные примеры полезных нагрузок согласно настоящему изобретению включают: IL-1, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-21, интерферон  $\alpha$ , интерферон  $\beta$ , интерферон  $\gamma$ , TSLP, CCL21, FLT3L, XCL1, LIGHT(TNFSF14), OX40L, CD137L, CD40L, ICOSL, антитело к CD3, CD47, TIM4-FC, CXCL13, CCL21, CD80, CD40L, IFN $\alpha$  A2, LIGHT, 4-1BBL, MDGF (C19orf10), FGF10, PDGF, агрин, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, антитело к FAP, антитело к TGF- $\beta$ ; ловушку, приманку или другую молекулу, ингибирующую TGF- $\beta$ ; антитело к BMP; ловушку, приманку или другую молекулу, ингибирующую BMP.

[0057] **Передача сигналов для экспрессии полезной нагрузки.** В различных вариантах осуществления настоящего изобретения полезная нагрузка экспрессируется в модифицированной В-клетке в виде конструкции ДНК под контролем активированного пути транскрипции. В отдельных вариантах осуществления экспрессия полезной нагрузки контролируется путем ядерного фактора активированных Т-клеток («NFAT»). Путь NFAT представляет собой путь фактора транскрипции, активируемый во время иммунного ответа, и активируется NF $\kappa$ B. В различных вариантах осуществления модифицированная В-клетка экспрессирует как полезную нагрузку, так и CAR-V. В различных вариантах осуществления, где модифицированная В-клетка экспрессирует как полезную нагрузку, так и CAR-V, CAR-V может дополнительно кодировать сигнальные молекулы, которые индуцируют активацию пути NF $\kappa$ B. Такие молекулы включают, не ограничиваясь перечисленным: CD79a (иммуноглобулин  $\alpha$ ), CD79b (иммуноглобулин  $\beta$ ), CD40, CD19, CD137, Fc $\gamma$ 2a и MyD88.

[0058] В различных вариантах осуществления изобретение относится к выделенным В-клеткам, которые экспрессируют по меньшей мере одну полезную нагрузку. В различных вариантах осуществления изобретение относится к выделенным В-клеткам, которые экспрессируют более одной полезной нагрузки. В различных вариантах осуществления изобретение относится к выделенным В-клеткам, которые экспрессируют 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 различных полезных нагрузок.

[0059] **Модификация В-клеток для хоминга.** В различных вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные В-клетки могут быть модифицированы хоминг-доменами (например, как показано на ФИГ. 2), так что В-клетки могут осуществлять хоминг в представляющий интерес сайт/мишень и активироваться при взаимодействии с мишенью. Кроме того, В-клеточные хоминг-рецепторы, экспрессируемые на мембранах В-клеток, которые распознают адресины и лиганды на тканях-мишенях, соединения или их производные, которые изменяют перемещение В-клеток к определенному сайту, а также молекулы, ингибирующие воспаление и

аутоиммунную активность В-клеток, могут играть роль в хоминге В-клеток и развитии специализированных иммунных ответов.

[0060] **Модифицированные В-клетки, которые экспрессируют представляющий интерес интегрин.** Основными хоминг-рецепторами, экспрессируемыми лимфоцитами, являются интегрин, которые представляют собой большой класс молекул, характеризующихся гетеродимерной структурой  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей. В общем, спаривание специфических  $\alpha$ - и  $\beta$  цепей интегрин определяет тип хоминг-рецептора. Например, спаривание цепи  $\alpha 4$  с цепью  $\beta 7$  характеризует основную молекулу интегрин ( $\alpha 4 \beta 7$ ), ответственную за связывание лимфоцитов с молекулой адгезии-1 типа адресина слизистых оболочек (MAdCAM-1), экспрессируемой в наружных эндотелиальных венулах (HEV) в пейеровых бляшках (ПБ) и эндотелиальных венулах собственной пластинки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Аналогичным образом, спаривание цепи  $\alpha 4$  с цепью  $\beta 1$  характеризует хоминг-рецептор ( $\alpha 4 \beta 1$ ) для кожи.

[0061] **В различных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетка, подлежащая модификации, может быть выбрана заранее, с определенными признаками, которые опосредуют предпочтительные локализации.** Например, может быть осуществлено обогащение, а затем генетическая модификация В-клеток памяти, экспрессирующих CXCR3. Клетки CXCR3 могут быть привлечены к лигандам, экспрессируемым в очагах воспаления. Как таковые, модифицированные В-клетки могут предпочтительно локализоваться в таких сайтах.

[0062] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена модифицированная В-клетка, которая экспрессирует цепи  $\alpha 4$  и  $\beta 7$  интегрин. Желательно, чтобы экспрессия интегрин  $\alpha 4 \beta 7$  способствовала хомингу модифицированной В-клетки в толстую кишку. В различных вариантах осуществления предложена модифицированная В-клетка, которая экспрессирует цепи  $\alpha 4$  и  $\beta 1$  интегрин. Желательно, чтобы экспрессия интегрин  $\alpha 4 \beta 1$  способствовала хомингу модифицированной В-клетки в кожу. В различных вариантах осуществления предложена модифицированная В-клетка, которая экспрессирует  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи интегрин, спаренные желаемым образом, так что экспрессируемый интегрин способствует хомингу модифицированной В-клетки в желаемый представляющий интерес сайт/мишень. Соответственно, в различных вариантах осуществления для экспрессии в В-клетках предусмотрена любая желаемая комбинация  $\alpha$ - и  $\beta$  цепей интегрин, так что модифицированные В-клетки, экспрессирующие определенный интегрин, нацелены на желаемый представляющий интерес сайт/мишень.

[0063] **Модифицированные В-клетки, которые экспрессируют представляющие интерес хоминг-рецепторы.** В-клетки обладают способностью осуществлять хоминг в воспалительные ткани, и изменение экспрессии их хоминг-рецепторов может дополнять их нативные тенденции к хомингу. Локализация В-клеток также определяется экспрессией молекул-аттрактантов (например, мишеней, таких как лиганды и хемокины) в очагах воспаления в определенных местах или тканях. Такие молекулы также могут включать антитела, такие как антитело МЕСА79, которое нацеливает клетки на адресин

периферических узлов (PNAd). Bahmani et al., J Clin Invest. 2018;128(11):4770-4786; Azzi et al., Cell Rep. 2016;15(6):1202-13. Соответственно, В-клетки могут быть сконструированы для экспрессии определенных антител, белков и рецепторов, которые облегчают хоминг В-клеток в представляющий интерес сайт/мишень и взаимодействие таких В-клеток с желаемой мишенью. В некоторых случаях экспрессия таких рецепторов перенаправляет В-клетки в представляющую интерес ткань.

[0064] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена модифицированная В-клетка, способная экспрессировать хоминг-антитело, белок или рецептор, экспрессия которых способна направлять В-клетку в определенный представляющий интерес сайт/мишень. Примеры хоминга Т-клеток в определенные ткани для хоминга (ткани-мишени) с помощью определенных пар хоминг-рецептор/лиганд приведены в таблице 2. Те же самые определенные пары хоминг-рецептор/лиганд также способны облегчать хоминг В-клеток в определенную ткань для хоминга (ткань-мишень). Соответственно, в различных вариантах осуществления настоящего изобретения хоминг модифицированных В-клеток в иллюстративную ткань для хоминга (ткань-мишень) облегчается с помощью соответствующих пар хоминг-рецептор/лиганд, приведенных в таблице 2.

**ТАБЛИЦА 2**

<b>Хоминг-рецепторы T<sub>eff</sub>-клеток и их когнатные лиганды, опосредующие органотропное нацеливание</b>		
<b>Тип ткани для хоминга</b>	<b>Хоминг-рецептор T<sub>eff</sub>-клеток</b>	<b>Когнатный лиганд</b>
<b>Кожа</b>	CLA (гликоформа PSGL-1)	Е/Р-селектин
	CD43E	Е-селектин
	VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ )	VCAM-1
	LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ )	ICAM-1
	CCR4	CCL17
	CCR10	CCL27
	<b>Кишечник (кишечный тракт, толстая кишка, БЛУ, ПБ)</b>	$\alpha_4\beta_7$
CCR9 <sup>a</sup>		CCL25 <sup>a</sup>
CXCR4		CXCL12
Лиганды селектина <sup>b</sup>		Е/Р-селектин <sup>b</sup>
VLA-4 <sup>b</sup>		VCAM-1 <sup>b</sup>
LFA-1 <sup>b</sup>		ICAM-1 <sup>b</sup>
CCR6 <sup>b</sup>		CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ) <sup>b</sup>

<b>Печень</b>	CD44	Гиалуронат
	VLA-4	VCAM-1
	CCR5	CCL5
		VAP-1
	Лиганды селектина <sup>b</sup>	E/P-селектин
	$\alpha_4\beta_7^b$	MAdCAM-1 <sup>b</sup>
<b>Легкое</b>	LFA-1	ICAM-1
	CCR3	CCL28
	CCR4	CCL17
	CXCR4	CXCL12
	Лиганды селектина <sup>b</sup>	E/P-селектин <sup>b</sup>
	VLA-4 <sup>b</sup>	VCAM-1 <sup>b</sup>
	LFA-1 <sup>b</sup>	ICAM-1 <sup>b</sup>
<b>Костный мозг</b>	CLA (гликоформа PSGL-1)	E/P-селектин
	CD43E	E-селектин
	VLA-4	VCAM-1
	LFA-1	ICAM-1
	CXCR4	CXCL12
	$\alpha_4\beta_7^b$	MAdCAM-1 <sup>b</sup>
<b>Сердце</b>	CCR5	CCL4, CCL5
	CCR4	?
	CXCR3	CXCL10
	c-Met	HGF
<b>Головной мозг</b>	VLA-4 <sup>b</sup>	VCAM-1 <sup>b</sup>
	LFA-1 <sup>b</sup>	ICAM-1 <sup>b</sup>
	CXCR3 <sup>b</sup>	CXCL9/CXCL10 <sup>b</sup>
<b>Периферический ЛУ<sup>c</sup></b>	Лиганды селектина <sup>b</sup>	E/P-селектин <sup>b</sup>
	LFA-1 <sup>b</sup>	ICAM-1 <sup>b</sup>
	CXCR3 <sup>b</sup>	CXCL9/CXCL10 <sup>b</sup>
<p><sup>a</sup>Участвует в хоминге T<sub>eff</sub>-клеток в кишечный тракт, но не в толстую кишку.</p> <p><sup>b</sup>Воспалительные реакции, повреждение ткани.</p> <p><sup>c</sup>В невоспаленных, стационарных условиях T<sub>eff</sub>-клетки обычно утрачивают экспрессию L-селектина и CCR7 и в значительной степени ограничены в доступе к ЛУ, хотя могут проникать во время воспалительных реакций (b), как показано. Напротив, как наивные T-</p>		

клетки, так и T<sub>cm</sub>-клетки экспрессируют L-селектин, CCR7 и CXCR4 и вовлекают PNA<sub>d</sub>, CCL19/CCL21 и CXCL12, соответственно, в роллинг Т-клеток и LFA-1/ICAM-1/2-опосредованную адгезию и трансмиграцию в ЛУ.

[0065] Иллюстративные типы ткани для хоминга (ткани-мишени) и лиганда или хемокина, которые обеспечивают хоминг В-клеток, ограниченную тканью, согласно изобретению, приведены в таблице 3.

**ТАБЛИЦА 3**

Тип ткани для хоминга	Лиганд/Хемокины
ЦНС	VCAM-1, CD62P, лиганды для CCR1,2, 5, CXCR3
Печень	CD62P, VAP-1, CXCL16
Тонкая кишка	MAdCAM, CD62P, CCL25
Толстая кишка	MAdCAM, CD62P, CCL20, GPR15L
Кожа	CD62E, CD62P, CCL17(22), ICAM-1
Вилочковая железа	VCAM, CD62P, CCL25
Периферический лимфатический узел	PNA <sub>d</sub> , CCL21, ICAM-1
Пейерова бляшка	MAdCAM, CCL21, CXCL13
Костный мозг	VCAM, CD62P, CXCL12, ICAM-1

[0066] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена модифицированная В-клетка, которая экспрессирует одно или более антител, белков или рецепторов, которые облегчают хоминг модифицированной В-клетки в иллюстративные ткани-мишени/ткани для хоминга с помощью определенных пар хоминг-рецептор/лиганд, приведенных в таблице 2. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена модифицированная В-клетка, которая экспрессирует один или более хоминг-рецепторов, которые облегчают хоминг модифицированной В-клетки в иллюстративную ткань-мишень/ткань для хоминга с помощью лиганда или хемокинов, приведенных в таблицах 2 и/или 3. В контексте настоящего документа термин «хоминг В-клеток» относится к локализации, нацеливанию, доставке, перемещению или перенаправлению В-клетки согласно настоящему изобретению в представляющий интерес сайт/мишень, например, в ткань для хоминга или ткань-мишень, очаг воспаления в определенном месте или ткани, или опухоль или микроокружении опухоли, куда желательна доставка терапевтических полезных нагрузок. В контексте хоминга В-клеток термин «антитело», «белок» или «рецептор» относится к аминокислотной последовательности, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид или белок, или молекуле РНК для применения в качестве терапевтического средства, которое при экспрессии в модифицированной В-клетке согласно настоящему изобретению будет направлять В-клетку к представляющему интерес сайту/мишени.

[0067] В отдельных вариантах осуществления молекула хоминг-антитела, белка или

рецептора предназначена для хоминга/нацеливания модифицированной В-клетки, экспрессирующей такую молекулу, на представляющий интерес сайт/мишень. В отдельных вариантах осуществления молекула хоминг-антитела, белка или рецептора предназначена для хоминга/нацеливания модифицированной В-клетки, экспрессирующей такую молекулу, на очаги воспаления в определенных местах или тканях. В отдельных вариантах осуществления хоминг-антитело, белок или рецептор предназначены для нацеливания В-клетки на опухоль или микроокружение опухоли. В отдельных вариантах осуществления желательно нацеливание В-клеток на определенные места, чтобы сконструированные или модифицированные В-клетки согласно настоящему изобретению могли доставлять терапевтические полезные нагрузки в желаемые представляющие интерес места, например, в ткань для хоминга или ткань-мишень, очаг воспаления в определенном месте или ткани, или опухоль или микроокружение опухоли. Соответственно, в отдельных вариантах осуществления желательно, чтобы В-клетки осуществляли хоминг в представляющий интерес сайт/мишень, например, опухоль или микроокружение опухоли, и доставляли в указанный представляющий интерес сайт/мишень полезную нагрузку, способную, например, увеличивать количество перекрестно презентующих дендритных клеток (ДК) в представляющем интерес сайте/мишени (например, в опухолях).

[0068] В различных вариантах осуществления хоминг-антитело, белок или рецептор экспрессируется в модифицированной или сконструированной В-клетке в виде конструкции ДНК. В различных вариантах осуществления хоминг-антитело, белок или рецептор экспрессируется в модифицированной В-клетке в виде конструкции ДНК под контролем конститутивно активированного пути транскрипции. В различных вариантах осуществления хоминг-антитело, белок или рецептор, участвующие в хоминге/нацеливании В-клеток, либо естественным образом не экспрессируются в В-клетке, либо экспрессируются на более высоких уровнях по сравнению с естественной экспрессией в В-клетке. Иллюстративный хоминг модифицированных В-клеток в определенные ткани для хоминга/ткани-мишени с помощью определенных пар хоминг-рецептор/лиганд в соответствии с настоящим изобретением приведен в таблице 4. Следует понимать, что, несмотря на иллюстративные ткани для хоминга и пары хоминг-рецепторов и лигандов, приведенные в таблице 4, модифицированная В-клетка согласно настоящему изобретению может быть сконструирована для экспрессии любого хоминг-антитела, белка или рецептора (например, любого хоминг-рецептора, приведенного в таблице 2), так что модифицированная В-клетка может быть направлена на определенный представляющий интерес сайт/мишень.

**ТАБЛИЦА 4**

Тип ткани для хоминга	Хоминг-рецептор	Лиганд/Хемокин
Печень	CXCR6	CXCL16
Тонкая кишка	CCR9	CCL25
Толстая кишка (ободочная)	CCR6	CCL20

кишка)		
Лимфатический узел	CCR7	CCL21
Костный мозг	CXCR4	CXCL12
Пейерова бляшка	CCR7 и CXCR5	CCL21 и CXCL13, соответственно
Кожа	CCR4	CCL17(22)

[0069] Неисключительные примеры типов тканей для хоминга (тканей-мишеней) для определенных пар хоминг-рецептор/лиганд согласно настоящему изобретению включают: кожу, кишечник (кишечный тракт, толстую кишку, брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ), пейерову бляшку (ПБ), тонкую кишку), печень, легкое, костный мозг, сердце, периферический лимфатический узел (ЛЛУ), ЦНС (центральная нервная система), вилочковую железу и костный мозг.

[0070] Неисключительные примеры хоминг-рецепторов, которые могут образовать пару с определенными или соответствующими аттрактантами/лигандами/хемокинами согласно настоящему изобретению, включают: CLA (гликоформа PSGL-1), CLA (гликоформа PSGL-1), CCR10, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR9, CD43E, CD44, c-Met, CXCR3, CXCR4, LFA-1, LFA-1 ( $\alpha$ L $\beta$ 2), лиганды селектина, VLA-4, VLA-4 ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1) и  $\alpha$ 4 $\beta$ 7.

[0071] Неисключительные примеры лигандов/хемокинов, которые могут образовать пару с определенными или соответствующими хоминг-рецепторами согласно настоящему изобретению, включают: CXCL16, CCL17, CCL17(22), CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), CCL21, CCL25, CCL27, CCL28, CCL4, CCL5, CD62E, CD62P, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CXCL16, CXCL9/CXCL10, CXCR3, E/P-селектин, E-селектин, GPR15L, HGF, гиалуронат, ICAM-1, лиганды для CCR1, 2, 5, MAdCAM, MAdCAM-1, PNA $\beta$ , VAP-1, VCAM и VCAM-1.

[0072] В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена модифицированная В-клетка, которая экспрессирует или обладает повышенной экспрессией иллюстративных В-клеточных хоминг-рецепторов (например, приведенных в таблице 2), так что модифицированная В-клетка нацелена на соответствующую представляющую интерес ткань для хоминга, которая экспрессирует соответствующий лиганд/хемокины (например, приведенные в таблицах 2 и/или 3). В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена модифицированная В-клетка, коэкспрессирующая интегрин с определенной парой  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей и определенным В-клеточным хоминг-рецептором (например, приведенным в таблицах 2 и/или 3), где экспрессия указанного интегрина и/или хоминг-рецептора способствует или облегчает хоминг/нацеливание модифицированной В-клетки на представляющий интерес сайт/мишень. В некоторых вариантах осуществления предложена модифицированная В-клетка, коэкспрессирующая интегрин  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 и CCR9. Желательно, чтобы коэкспрессия  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 и CCR9 способствовала хомингу модифицированных В-клеток согласно настоящему изобретению в тонкую кишку. В некоторых вариантах осуществления предложена модифицированная В-клетка, коэкспрессирующая интегрин  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 и CCR4. Желательно,

чтобы коэкспрессия  $\alpha 4\beta 1$  и CCR4 способствовала хомингу модифицированных В-клеток согласно настоящему изобретению в тонкую кишку.

[0073] **Модифицированные В-клетки, которые экспрессируют иммуноингибирующие молекулы.** В-клетки играют ключевую роль во многих аутоиммунных заболеваниях. Однако В-клетки могут быть использованы в терапевтических целях для противодействия аутоиммунитету. В частности, В-клетки могут быть сконструированы для экспрессии по меньшей мере одной или более иммуноингибирующих молекул, что может снижать аутоиммунную активность В-клеток, приводя к уменьшению аутоиммунного заболевания. Иммуноингибирующие молекулы хорошо известны в данной области техники. Такие ингибирующие молекулы могут включать, не ограничиваясь перечисленным, IL-10, TGF- $\beta$ , PD-L1, PD-L2, LAG-3 и TIM-3. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена модифицированная В-клетка, сконструированная для экспрессии по меньшей мере одной или более ингибирующих молекул, выбранных из IL-10, TGF- $\beta$ , PD-L1, PD-L2, LAG-3 и TIM-3 или любых их комбинаций, так что воспаление в сайте и аутоиммунная активность В-клеток, локализованных в сайте, снижаются, что приводит к положительному терапевтическому ответу.

[0074] **Соединения, изменяющие перемещение В-клеток.** В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена модифицированная В-клетка, обработанная по меньшей мере одним или более соединениями или их производными, которые изменяют перемещение В-клеток путем индукции экспрессии определенного В-клеточного интегрина и/или хоминг-рецептора. Соединения или их производные, которые изменяют перемещение В-клеток, хорошо известны в данной области техники. В отдельных вариантах осуществления предложена модифицированная В-клетка, обработанная полностью транс-ретиноевой кислотой (ПТРК) или ее производными, которые способствуют хомингу В-клеток в кишечник (тонкий кишечник) благодаря повышенной экспрессии интегрина  $\alpha 4\beta 7$  и хоминг-рецептора CCR9. В контексте настоящего документа термин «соединение» относится к химическому веществу, лекарственному средству, терапевтическому средству или их производным, которые изменяют перемещение В-клеток желаемым образом.

[0075] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированную В-клетку, сконструированную для коэкспрессии определенного интегрин (например, с определенной парой  $\alpha$ - и  $\beta$  цепей) и определенного представляющего интерес В-клеточного хоминг-рецептора, обрабатывают по меньшей мере одним или более соединениями или их производными, которые изменяют перемещение В-клеток и способствуют хомингу клеток в определенный представляющий интерес сайт/мишень благодаря повышенной экспрессии указанного определенного интегрин и/или хоминг-рецептора. В различных вариантах осуществления В-клетка, модифицированная для коэкспрессии интегрин с определенными парами  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей и определенного В-клеточного хоминг-рецептора, дополнительно экспрессирует по меньшей

мере одну или более иммуноингибирующих молекул, так что аутоиммунная активность модифицированных В-клеток, нацеленная на определенный очаг воспаления, снижается, что приводит к уменьшению аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления модифицированную В-клетку, сконструированную для экспрессии одной или более иммуноингибирующих молекул, например, IL-10, TGF- $\beta$ , PD-L1, PD-L2, LAG-3 и TIM-3 или их комбинаций, обрабатывают ПТРК или ее производными в течение определенного периода времени, так что индуцируется экспрессия интегрина  $\alpha 4\beta 7$  и хоминг-рецептора CCR9 для способствования хомингу В-клеток в определенный представляющий интерес сайт/мишень (например, кишечник), но воспаление в указанном сайте и аутоиммунная активность В-клеток, локализованных в указанном сайте, снижаются, что приводит к положительному терапевтическому ответу. В одном варианте осуществления модифицированную В-клетку, сконструированную для экспрессии одной или более иммуноингибирующих молекул, например, IL-10, TGF- $\beta$  или их комбинаций, обрабатывают ПТРК или ее производными в течение определенного периода времени, так что индуцируется экспрессия интегрина  $\alpha 4\beta 7$  и хоминг-рецептора CCR9 для способствования хомингу В-клеток в определенный представляющий интерес сайт/мишень (например, кишечник), но воспаление в указанном сайте и аутоиммунная активность В-клеток, локализованных в указанном сайте, снижаются, что приводит к положительному терапевтическому ответу.

[0076] Подразумевается, что любая В-клетка согласно настоящему изобретению, модифицированная для коэкспрессии определенного В-клеточного интегрин и хоминг-рецептора, который нацеливает В-клетку на определенную представляющую интерес ткань для хоминга/ткань-мишень, может быть дополнительно сконструирована для экспрессии одной или более иммуноингибирующих молекул для уменьшения воспаления и аутоиммунной активности В-клеток, локализованных в указанном сайте, и/или обработана соединением, которое изменяет хоминг/нацеливание модифицированных В-клеток путем индукции экспрессии определенного В-клеточного интегрин и/или хоминг-рецептора.

[0077] **Активация В-клеток агонистами TLR и TLR.** В-клетки обладают естественной способностью поглощать и презентировать антигены, распознаваемые их специфическими В-клеточными рецепторами (BCR). В-клетки, активированные толл-подобными рецепторами (TLR), приводят к образованию высокоактивных эффекторных В-клеток, защищающих организм посредством иммунного ответа. Экспрессия или повышение экспрессии TLR в В-клетках может обеспечить механизм повышения активности В-клеток в части природных сигналов, регулирующих адаптивные иммунные ответы.

[0078] **Активация В-клеток агонистами TLR.** В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена В-клетка, где В-клетка обработана *in vitro* по меньшей мере одним агонистом TLR. В различных вариантах осуществления TLR может представлять собой TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и/или TLR13. В различных вариантах осуществления агонист TLR

избирательно связывается с одним или более TLR, выбранными из группы, состоящей из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и TLR13. Агонисты TLR хорошо известны в данной области техники и могут включать, не ограничиваясь перечисленным, CpG-богатые олигонуклеотиды и миметики двухцепочечной РНК, полиинозиновую кислоту:полицитидиловую кислоту (поли-I:C). В различных вариантах осуществления агонист TLR может представлять собой CpG-олигонуклеотиды.

[0079] В различных вариантах осуществления каждая В-клетка может быть обработана одним агонистом TLR. В различных вариантах осуществления каждая В-клетка может быть обработана более чем одним агонистом TLR. Например, каждая В-клетка может быть обработана 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 различными агонистами TLR. В качестве альтернативы пациенту может быть введена гетерогенная популяция В-клеток, где каждая В-клетка обработана уникальным агонистом TLR или комбинацией агонистов TLR. В некоторых вариантах осуществления В-клетки для применения в качестве терапевтического средства обрабатывают одним или более агонистами TLR одновременно или до введения В-клеток нуждающемуся в этом субъекту или пациенту. В отдельных вариантах осуществления обработка одним или более агонистами TLR способна обеспечить более высокоактивные эффекторные В-клетки для защиты организма посредством иммунного ответа. В отдельных вариантах осуществления обработка одним или более агонистами TLR способна повышать активность В-клеток в части иммунных ответов. В некоторых вариантах осуществления обработка В-клетки согласно настоящему изобретению с по меньшей мере одним или более агонистами TLR индуцирует экспрессию или активацию одного или более TLR.

[0080] **Активация В-клеток с помощью экспрессии TLR.** В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена модифицированная В-клетка, способная экспрессировать конститутивно активный TLR. В различных вариантах осуществления TLR экспрессируется в модифицированной или сконструированной В-клетке в виде конструкции ДНК под контролем конститутивно активированного пути транскрипции. В различных вариантах осуществления TLR либо естественным образом не экспрессируется в В-клетке, либо экспрессируется на более высоких уровнях по сравнению с естественной экспрессией в В-клетке. В различных вариантах осуществления TLR может представлять собой TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и/или TLR13.

[0081] В различных вариантах осуществления каждая В-клетка может экспрессировать более одного конститутивно активного TLR. Например, каждая В-клетка может экспрессировать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 различных конститутивно активных TLR. В качестве альтернативы пациенту может быть введена гетерогенная популяция В-клеток, где каждая В-клетка способна экспрессировать и/или секретировать уникальный TLR или комбинацию TLR, которые являются конститутивно активными. В различных вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 различных

конститутивно активных TLR могут быть введены субъекту или пациенту посредством гетерогенной популяции В-клеток.

[0082] В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетка представляет собой модифицированную В-клетку, которая экспрессирует по меньшей мере один конститутивно активный TLR. В отдельных вариантах осуществления модифицированную В-клетку, которая экспрессирует по меньшей мере один конститутивно активный TLR, обрабатывают одним или более агонистами TLR. В отдельных вариантах осуществления экспрессия конститутивно активного TLR способна обеспечить более высокоактивные эффекторные В-клетки для защиты организма посредством иммунного ответа. В отдельных вариантах осуществления экспрессия конститутивно активного TLR способна повышать активность В-клеток в части иммунных ответов. В отдельных вариантах осуществления модифицированная В-клетка экспрессирует как TLR, который является конститутивно активным, так и любой CAR-В согласно настоящей заявке. В различных вариантах осуществления модифицированную В-клетку, экспрессирующую TLR, который является конститутивно активным, и/или CAR-В, дополнительно обрабатывают одним или более агонистами TLR одновременно или до введения модифицированных В-клеток нуждающемуся в этом субъекту или пациенту. В отдельных вариантах осуществления В-клетки могут быть сконструированы для экспрессии полезных нагрузок и модуляторов, таких как TLR, в отсутствие CAR-В, для внутритуморального введения.

[0083] **Модифицированные В-клетки, которые презентируют антигены одновременно в молекулах HLA класса I и класса II.** В-клетки, помимо их функции по продукции антител, также на высоком уровне экспрессируют молекулы человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса II и могут презентировать антигены CD4<sup>+</sup> Т-клеткам. Hong et al., 2018, Immunity 49, 695-708. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена модифицированная В-клетка, способная презентировать определенные представляющие интерес антигены и/или антигенные эпитопы, такие как опухолевые антигены или антигены инфекционных заболеваний, одновременно в молекулах HLA как класса I, так и класса II. Опухолевые антигены и антигены инфекционных заболеваний хорошо известны в данной области техники и описаны в предшествующих разделах. В отдельных вариантах осуществления определенный представляющий интерес антиген, например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания, сливают с нацеливающим сигналом лизосомального белка, который нацеливает антиген на лизосомы и презентирует антиген одновременно и эффективно в молекулах HLA как класса I, так и класса II. В некоторых вариантах осуществления указанный нацеливающий сигнал представляет собой нацеливающий сигнал лизосома-ассоциированного мембранного белка-1 (LAMP1). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий сигнал способен проникать в рециркуляционные компартменты эндосом. С-концевая последовательность Сlec9A представляет собой такой нацеливающий фрагмент. В контексте настоящего документа определенный опухолевый

антиген или антиген инфекционного заболевания, слитый с нацеливающим сигналом, относится к аминокислотной последовательности, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид или белок, или молекуле РНК (например, молекуле мРНК) для применения в качестве терапевтического средства. В одном варианте осуществления определенный опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания, слитый с нацеливающим сигналом, относится к молекуле мРНК для применения в качестве терапевтического средства. В отдельных вариантах осуществления желательно, чтобы определенные опухолевые антигены и/или антигены инфекционных заболеваний, слитые с нацеливающим сигналом, таким как нацеливающий сигнал LAMP1 или Clec9A, были нацелены на лизосомы или эндосомы и одновременно и эффективно презентировались в молекулах HLA как класса I, так и класса II. В отдельных вариантах осуществления желательно, чтобы электропорация В-клеток (например, В-клеток человека), до или после созревания, посредством мРНК, кодирующей определенные представляющие интерес опухолевые антигены и/или антигены инфекционных заболеваний, слитые с нацеливающим сигналом, таким как нацеливающий сигнала LAMP1 или Clec9A, была способна одновременно и эффективно презентировать определенные антигены и/или антигенные эпитопы в молекулах HLA как класса I, так и класса II. В различных вариантах осуществления определенные представляющие интерес опухолевые антигены и/или антигены инфекционного заболевания естественным образом не презентуются В-клеткой, естественным образом не презентуются В-клеткой одновременно в молекулах HLA как класса I, так и класса II, или естественным образом не презентуются В-клеткой с высокой эффективностью в молекулах HLA как класса I, так и класса II. Предполагается, что введение таких электропорированных В-клеток субъекту, например, человеку-хозяину, будет способствовать развитию или усилению антиген-специфических иммунных ответов за счет одновременной и эффективной презентации определенных представляющих интерес антигенов и/или антигенных эпитопов в молекулах HLA как класса I, так и класса II.

[0084] В различных вариантах осуществления изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, например, последовательности мРНК, кодирующей по меньшей мере один определенный представляющий интерес антиген, например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания, слитой с нацеливающим сигналом, таким как нацеливающий сигнал LAMP1, для применения в качестве терапевтического средства при электропорации В-клеток для одновременной и эффективной презентации определенного антигена и/или антигенных эпитопов в молекулах HLA как класса I, так и класса II. В различных вариантах осуществления изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, например, последовательности мРНК, кодирующей более одного (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более) определенного представляющего интерес опухолевого антигена и/или антигена инфекционного заболевания, слитого с нацеливающим сигналом. В различных вариантах осуществления изобретение относится к пулам различных последовательностей

нуклеиновых кислот, например, пулам различных последовательностей мРНК, для применения в качестве терапевтического средства при электропорации В-клеток, как описано выше, где каждый пул кодирует по меньшей мере один определенный представляющий интерес антиген, например, опухолевый антиген или антиген инфекционного заболевания, слитый с нацеливающим сигналом, который отличается от других пулов последовательностей мРНК. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления субъекту может быть введена однородная популяция В-клеток, где каждая В-клетка подвергнута электропорации мРНК, кодирующей по меньшей мере один определенный представляющий интерес антиген, слитый с нацеливающим сигналом. В некоторых вариантах осуществления субъекту может быть введена однородная популяция В-клеток, где каждая В-клетка подвергнута электропорации мРНК, кодирующей более одного определенного представляющего интерес антигена, слитого с нацеливающим сигналом. В некоторых вариантах осуществления субъекту может быть введена гетерогенная популяция В-клеток, где каждая В-клетка подвергнута электропорации комбинацией мРНК, каждая из которых кодирует по меньшей мере один определенный представляющий интерес антиген, слитый с отличающимся нацеливающим сигналом.

[0085] В некоторых вариантах осуществления В-клетки для применения в электропорации, как описано выше, могут представлять собой любые модифицированные В-клетки согласно настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления модифицированная В-клетка содержит химерный антигенный рецептор для В-клеток (CAR-V). В различных вариантах осуществления модифицированная В-клетка может экспрессировать CAR-V и одновременно и эффективно презентировать определенный представляющий интерес антиген и/или антигенные эпитопы в молекулах HLA как класса I, так и класса II.

[0086] В различных вариантах осуществления изобретение относится к способу введения выделенной В-клетки нуждающемуся в этом пациенту. В различных вариантах осуществления пациенту может быть введена популяция В-клеток. В различных вариантах осуществления каждая В-клетка может экспрессировать более одного пептида или белка полезной нагрузки. Например, каждая В-клетка может экспрессировать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 различных полезных нагрузок. В качестве альтернативы пациенту может быть введена гетерогенная популяция В-клеток, где каждая В-клетка способна экспрессировать и/или секретировать уникальную полезную нагрузку или комбинацию полезных нагрузок. В различных вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 различных полезных нагрузок могут быть введены пациенту посредством гетерогенной популяции В-клеток.

### **3. Способы лечения**

[0087] Таким образом, в некоторых аспектах изобретение включает способ лечения или предупреждения опухоли или раковой ткани, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества по меньшей мере одного В-CAR, раскрытого в настоящем документе.

[0088] Предложены способы лечения заболеваний или расстройств, включая рак. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к созданию опосредованного В-клетками иммунного ответа у субъекта, включающему введение указанному субъекту эффективного количества сконструированных иммунных клеток согласно настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ, опосредованный В-клетками, направлен против клетки-мишени или клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная клетка содержит химерный антигенный рецептор для В-клеток (В-CAR). В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой опухолевую клетку. В некоторых аспектах изобретение включает способ лечения или предупреждения злокачественного новообразования, где указанный способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества по меньшей мере одной выделенной антигенсвязывающей молекулы, описанной в настоящем документе. В некоторых аспектах изобретение включает способ лечения или предупреждения злокачественного новообразования, где указанный способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества по меньшей мере одной иммунной клетки, где указанная иммунная клетка содержит по меньшей мере один химерный антигенный рецептор.

[0089] В некоторых аспектах изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одну антигенсвязывающую молекулу, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительный активный агент.

[0090] В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностировано метастатическое заболевание, локализованное в печени. В других вариантах осуществления метастатическое заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления рак метастазирует из первичной опухоли в молочной железе, толстой кишке, прямой кишке, пищеводе, легком, поджелудочной железе и/или желудке. В других вариантах осуществления у субъекта диагностированы нерезектабельные метастатические опухоли печени. В других вариантах осуществления у субъекта диагностированы нерезектабельные метастатические опухоли печени из первичного колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирована гепатоклеточная карцинома.

[0091] Следует принимать во внимание, что целевые дозы для модифицированных В-клеток могут находиться в диапазоне  $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^{10}$  клеток/кг, предпочтительно  $2 \times 10^6$  клеток/кг, более предпочтительно. Следует принимать во внимание, что дозы выше и ниже этого диапазона могут быть подходящими для отдельных субъектов, и соответствующие уровни доз могут быть определены медицинским работником по мере необходимости. Кроме того, в соответствии с изобретением могут быть предоставлены многократные дозы клеток.

[0092] Также предложены способы уменьшения размера опухоли у субъекта, включающие введение указанному субъекту модифицированной В-клетки согласно

настоящему изобретению, где указанная клетка содержит CAR-B-рецептор, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном на опухоли, полезную нагрузку или и CAR-B, и полезную нагрузку. В некоторых вариантах осуществления субъекта имеет солидную опухоль или злокачественное новообразование крови, такое как лимфома или лейкоз. В некоторых вариантах осуществления модифицированную В-клетку доставляют в ложе опухоли. В некоторых вариантах осуществления рак присутствует в костном мозге субъекта.

[0093] Также предложены способы хоминга В-клеток в представляющий интерес сайт/мишень у субъекта, включающие введение указанному субъекту модифицированной В-клетки согласно настоящему изобретению, где указанная клетка содержит интегрин, хоминг-антитело, белок или рецептор, который привлекается к лиганду, хемокину или аттрактанту в представляющем интерес сайте/мишени. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес сайт/мишень представляет собой, например, ткань для хоминга или ткань-мишень, очаг воспаления в определенном месте или ткани, или опухоль или микроокружение опухоли, куда желательна доставка терапевтических полезных нагрузок.

[0094] Также предложены способы снижения воспаления и аутоиммунной активности В-клеток в представляющем интерес сайте/мишени у субъекта, включающие введение указанному субъекту модифицированной В-клетки согласно настоящему изобретению, где указанная клетка содержит иммуноингибирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес сайт/мишень представляет собой, например, ткань для хоминга или ткань-мишень, очаг воспаления в определенном месте или ткани, опухоль или микроокружение опухоли, куда желательна доставка терапевтических полезных нагрузок.

[0095] Также предложены способы изменения перемещения В-клеток в представляющий интерес сайт/мишень у субъекта, включающие обработку В-клетки согласно настоящему изобретению соединением или его производными, подходящими для изменения перемещения В-клеток, и введение обработанных В-клеток нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых случаях соединение или его производные изменяют перемещение В-клеток путем повышения экспрессии интегрина, хоминг-антитела, белка, рецептора или их комбинаций, экспрессируемых В-клетками.

[0096] Также предложены способы повышения активности В-клеток и/или получения высокоактивных эффекторных В-клеток для повышения иммунных ответов у субъекта, включающие обработку В-клетки согласно настоящему изобретению по меньшей мере одним или более агонистами TLR и введение обработанной В-клетки нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления обработка В-клетки согласно настоящему изобретению по меньшей мере одним или более агонистами TLR индуцирует экспрессию или активацию одного или более TLR. В некоторых вариантах осуществления способ повышения активности В-клеток и/или получения высокоактивных эффекторных В-клеток для повышения иммунных ответов у субъекта дополнительно включает введение

указанному субъекту модифицированной В-клетки согласно настоящему изобретению, которая экспрессирует по меньшей мере один или более конститутивно активных TLR. Также предложены способы повышения активности В-клеток и/или получения высокоактивных эффекторных В-клеток для повышения иммунных ответов у субъекта, включающие введение указанному субъекту модифицированной В-клетки согласно настоящему изобретению, где указанная клетка экспрессирует CAR-В-рецептор, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном на опухоли, конститутивно активный TLR или как CAR-В, так и конститутивно активный TLR, где указанную клетку обрабатывают по меньшей мере одним или более агонистами TLR одновременно или до введения клеток субъекту.

[0097] Также предложены способы повышения антигенспецифических иммунных ответов у субъекта, включающие введение указанному субъекту модифицированной В-клетки согласно настоящему изобретению, где клетка подвергнута электропорации последовательностью нуклеиновой кислоты, например, мРНК, кодирующей определенные опухолевые антигены, и/или антигены инфекционных заболеваний, слитые с нацеливающим сигналом, таким как нацеливающий сигнал LAMP1 или Clec9A, для одновременной и эффективной презентации определенных антигенов и/или антигенных эпитопов в молекулах HLA как класса I, так и класса II. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет солидную опухоль или злокачественное новообразование крови, такое как лимфома или лейкоз.

[0098] Подразумевается, что различные варианты осуществления способов лечения, в которых применяются сконструированные или модифицированные В-клетки согласно настоящей заявке, не являются взаимоисключающими и могут быть комбинированы друг с другом любым образом и без каких-либо ограничений, если прямо не указано обратное, для достижения или облегчения любого из результатов и/или терапевтических ответов, рассматриваемых в настоящем документе.

[0099] В некоторых вариантах осуществления модифицированные В-клетки представляют собой аутологичные В-клетки. В некоторых вариантах осуществления модифицированные В-клетки представляют собой аллогенные В-клетки. В некоторых вариантах осуществления модифицированные В-клетки представляют собой гетерологичные В-клетки. В некоторых вариантах осуществления модифицированные В-клетки согласно настоящей заявке трансфицируют или трансдуцируют *in vivo*. В других вариантах осуществления сконструированные клетки трансфицируют или трансдуцируют *ex vivo*.

[0100] В контексте настоящего документа термин «субъект» или «пациент» означает индивидуума. В некоторых аспектах субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек. В некоторых аспектах субъект может представлять собой примата, отличного от человека. Приматы, отличные от людей, включают, среди прочего, включают мартышек, обезьян, шимпанзе, горилл, орангутанов и гиббонов. Термин «субъект» также включает домашних животных, таких как кошки, собаки и т. д., домашний скот (например, лам,

лошадей, коров), диких животных (например, оленя, лося, американского лося и т. д.), лабораторных животных (например, мышшь, кролика, крысу, песчанку, морскую свинку и т. д.) и породы птиц (например, кур, индеек, уток и т. д.). Предпочтительно субъект представляет собой субъекта-человека. Более предпочтительно субъект представляет собой пациента-человека.

[0101] Способы могут дополнительно включать введение одного или более химиотерапевтических средств. В отдельных вариантах осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство с лимфодеплетирующим (прекондиционирующим) действием. Эффективные схемы preconditionирования наряду с соответствующими эффективными биомаркерами описаны в предварительных заявках на патент США 62/262,143 и 62/167,750, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. В них описаны, например, способы кондиционирования пациента, нуждающегося в Т-клеточной терапии, включающие введение указанному пациенту определенных эффективных доз циклофосфида (от 200 мг/м<sup>2</sup>/сут до 2000 мг/м<sup>2</sup>/сут) и определенных доз флударабина (от 20 мг/м<sup>2</sup>/сут до 900 мг/м<sup>2</sup>/сут). Предпочтительный режим дозирования включает лечение пациента, включающее ежедневное введение пациенту приблизительно 500 мг/м<sup>2</sup>/сут циклофосфида и приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup>/сут флударабина в течение трех дней перед введением терапевтически эффективного количества сконструированных В-клеток пациенту.

[0102] В других вариантах осуществления каждое из антигенсвязывающей молекулы, трансдуцированных (или иным образом сконструированных) клеток (таких как CAR) и химиотерапевтического средства вводят в количестве, эффективном для лечения заболевания или состояния у субъекта.

[0103] В отдельных вариантах осуществления композиции, содержащие CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, раскрытые в настоящем документе, могут быть введены в сочетании с любым количеством химиотерапевтических средств. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфида (CYTOXAN™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилмеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфида, эстрамустин, ифосфида, мехлорэтамин, мехлорэтамину оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфида, урацилмустин; нитрозомочевинны, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловую кислоту,

ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; средства, угнетающие функцию надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (Taxol®, Bristol-Myers Squibb) и доксетаксел (Taxotere®, Rhone-Poulenc Rorer); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоклутетин; кселоду; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS2000; дифформетиломитин (DMFO); производные ретиноевой кислоты, такие как Targretin™ (бексаротен), Panretin™ (алитретиноин); Ontak™ (денилейкин дифтитокс); эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. В это определение также включены антигормональные средства, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. При необходимости также вводят комбинации химиотерапевтических средств, включая, не ограничиваясь перечисленным, СНОР, т. е. циклофосфамид (Cytoxan®), доксорубицин (гидроксидоксорубицин), флударабин, винкристин (Oncovin®) и преднизон.

[0104] В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство вводят одновременно или в течение одной недели после введения сконструированной клетки или нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления химиотерапевтическое средство вводят через от 1 до 4 недель или от 1 недели до 1 месяца,

от 1 недели до 2 месяцев, от 1 недели до 3 месяцев, от 1 недели до 6 месяцев, от 1 недели до 9 месяцев или от 1 недели до 12 месяцев после введения сконструированной клетки или нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления химиотерапевтическое средство вводят по меньшей мере за 1 месяц до введения клетки или нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение двух или более химиотерапевтических средств.

[0105] Различные дополнительные терапевтические средства могут быть использованы в сочетании с композициями, описанными в настоящем документе. Например, потенциально подходящие дополнительные терапевтические средства включают ингибиторы PD-1 (или PD-L1), такие как ниволумаб (Opdivo®), пембролизумаб (Keytruda®), пембролизумаб, пидилизумаб и атезолизумаб (Tecentriq®).

[0106] Дополнительные терапевтические средства, подходящие для применения в комбинации с изобретением, включают, не ограничиваясь перечисленным, ибрутиниб (Imbruvica®), офатумумаб (Arzerra®), ритуксимаб (Rituxan®), бевацизумаб (Avastin®), трастузумаб (Herceptin®), трастузумаб эмтанзин (KADCYLA®), иматиниб (Gleevec®), цетуксимаб (Egbitux®), панитумумаб (Vectibix®), катумаксамаб, ибритумомаб, офатумумаб, тозитумомаб, брентуксимаб, алемтузумаб, гемтузумаб, эрлотиниб, гефитиниб, вандетаниб, афатиниб, лапатиниб, нератиниб, акситиниб, мазитиниб, пазопаниб, сунитиниб, сорафениб, тоцераниб, лестауртиниб, акситиниб, цедираниб, ленватиниб, нинтеданиб, пазопаниб, регорафениб, семаксаниб, сорафениб, сунитиниб, тивозаниб, тоцераниб, вандетаниб, энтректиниб, кабозантиниб, иматиниб, дазатиниб, нилотиниб, понатиниб, радотиниб, бозутиниб, лестауртиниб, руксолитиниб, пакритиниб, кобиметиниб, селуметиниб, траметиниб, биниметиниб, алектиниб, церитиниб, кризотиниб, афлиберцепт, адипотид, денилейкин дифтитокс, ингибиторы mTOR, такие как эверолимус и темсиролимус, ингибиторы hedgehog, такие как сонидегиб и висмодегиб, ингибиторы CDK, такие как ингибитор CDK (палбоциклиб).

[0107] В дополнительных вариантах осуществления композицию, содержащую CAR-содержащие иммунные клетки, можно вводить с противовоспалительным средством. Противовоспалительные средства или лекарственные средства включают, не ограничиваясь перечисленным, стероиды и глюкокортикоиды (включая бетаметазон, будесонид, дексаметазон, гидрокортизона ацетат, гидрокортизон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизолон, триамцинолон), нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), включая аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, препараты против TNF, циклофосфамид и микофенолат. Примеры НПВП включают ибупрофен, напроксен, напроксен натрия, ингибиторы ЦОГ-2 и сиалилаты. Примеры анальгетиков включают ацетаминофен, оксикодон, трамадол или пропороксифена гидрохлорид. Примеры глюкокортикоидов включают кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или преднизон. Примеры модификаторов биологического ответа включают молекулы, направленные против маркеров клеточной поверхности (например, CD4, CD5 и т. д.),

ингибиторы цитокинов, такие как антагонисты TNF (например, этанерцепт (ENBREL®), адалимумаб (HUMIRA®) и инфликсимаб (REMICADE®)), ингибиторы хемокинов и ингибиторы молекул адгезии. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а также рекомбинантные формы молекул. Примеры DMARD (антивоспалительные лекарственные средства, модифицирующие заболевание) включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (пероральное (ауранофин) и внутримышечное) и миноциклин.

[0108] В отдельных вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, вводят в сочетании с цитокином. Под «цитокином» в контексте настоящего документа подразумеваются белки, выделяемые одной клеточной популяцией, которые действуют на другую клетку как медиаторы межклеточных взаимодействий. Примерами цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. Цитокины включают гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионил-гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреотропный гормон (ТТГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ); фактор роста печени (HGF); фактор роста фибробластов (FGF); пролактин; плацентарный лактоген; антимюллеров гормон; мышечный гонадотропин-ассоциированный пептид; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбопоэтин (ТПО); факторы роста нервов (NGF), такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (ЭПО); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF); и гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, фактор некроза опухоли, такой как TNF-альфа или TNF-бета; и другие полипептидные факторы, включая LIF и лиганд kit (KL). В контексте настоящего документа термин «цитокин» включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток, а также биологически активные эквиваленты цитокинов с нативной последовательностью.

#### 4. Способы получения

[0109] Для получения полинуклеотидов, полипептидов, векторов, антигенсвязывающих молекул, иммунных клеток, композиций и т. п. согласно изобретению можно использовать множество известных способов.

[0110] Перед осуществлением манипуляций *in vitro* или генетической модификацией иммунных клеток, описанных в настоящем документе, клетки могут быть получены от субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки включают В-клетки. В-клетки могут быть получены из множества источников, включая мононуклеарные клетки

периферической крови (РВМС), костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из сайта инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В отдельных вариантах осуществления В-клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта, с использованием любого количества методов, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение FICOLL™. Клетки предпочтительно могут быть получены из циркулирующей крови индивидуума с помощью афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В отдельных вариантах осуществления клетки, собранные с помощью афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и помещены в подходящий буфер или среду для последующей обработки. Клетки могут быть промыты PBS. Следует принимать во внимание, что можно использовать стадию промывки, например, с использованием полуавтоматической проточной центрифуги, например, процессора клеток Cobe™ 2991, Baxter Cyto-Mate™ и т. п. После промывки клетки могут быть ресуспендированы в различных биосовместимых буферах или другом солевом растворе с буфером или без него. В отдельных вариантах осуществления нежелательные компоненты образца продукта афереза могут быть удалены.

[0111] Иммуные клетки, такие как В-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с использованием известных способов, или иммуные клетки могут быть активированы и размножены (или дифференцированы в случае клеток-предшественников) *in vitro* перед генетической модификацией. В еще одном варианте осуществления иммуные клетки, такие как В-клетки, генетически модифицируют химерными В-клеточными рецепторами, описанными в настоящем документе (например, трансдуцируют вирусным вектором, содержащим одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих CAR-B), а затем активируют и/или размножают *in vitro*. Способы активации и размножения В-клеток известны в данной области техники и описаны, например, в патентах США №№ 6905874; 6867041; 6797514; и PCT WO 2012/079000, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Как правило, такие способы включают приведение РВМС или выделенных В-клеток в контакт со стимулирующим агентом и костимулирующим агентом, обычно прикрепленным к грануле или другой поверхности, в культуральной среде с подходящими цитокинами, такими как IL-2.

[0112] В других вариантах осуществления В-клетки могут быть активированы и стимулированы для осуществления пролиферации фидерными клетками и подходящими антителами и цитокинами с использованием способов, таких как описанные в патентах США №№ 6040177; 5827642; и WO/2012129514, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0113] Некоторые способы получения конструкций и сконструированных иммуных клеток согласно изобретению описаны в заявке PCT PCT/US2015/14520, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Дополнительные способы получения конструкций и клеток можно найти в предварительной заявке на патент США № 62244036, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0114] Для клонирования полинуклеотидов вектор может быть введен в клетку-хозяина (выделенную клетку-хозяина), чтобы сделать возможным репликацию самого вектора и тем самым амплифицировать содержащиеся в нем копии полинуклеотида. Клонированные векторы могут содержать компоненты последовательности, обычно включающие, не ограничиваясь перечисленным, точку начала репликации, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности и селективируемые маркеры. Эти элементы могут быть выбраны соответствующим образом специалистом в данной области техники. Например, точку начала репликации можно выбрать для обеспечения автономной репликации вектора в клетке-хозяине.

[0115] В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным клеткам-хозяевам, содержащим вектор, предложенный в настоящем документе. Клетки-хозяева, содержащие вектор, могут быть использованы для экспрессии или клонирования полинуклеотида, содержащегося в векторе. Подходящие клетки-хозяева могут включать, не ограничиваясь перечисленным, прокариотические клетки, клетки грибов, дрожжевые клетки или клетки высших эукариот, такие как клетки млекопитающих. Подходящие прокариотические клетки для этой цели включают, не ограничиваясь перечисленным, эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *Enterobacteriaceae*, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marc-escans* и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*.

[0116] Вектор может быть введен в клетку-хозяина с использованием любых подходящих способов, известных в данной области техники, включая, не ограничиваясь перечисленным, доставку, опосредованную ДЭАЭ-декстраном, метод преципитации с фосфатом кальция, доставку, опосредованную катионными липидами, липосомную трансфекцию, электропорацию, бомбардировку микрочастицами, рецептор-опосредованную доставку генов, доставку, опосредованную полилизинном, гистонном, хитозаном и пептидами. Стандартные способы трансфекции и трансформации клеток для экспрессии представляющего интерес вектора хорошо известны в данной области техники. В другом варианте осуществления смесь различных векторов экспрессии может быть использована для генетической модификации донорной популяции иммунных эффекторных клеток, где каждый вектор кодирует разные В-CAR, как раскрыто в настоящем документе. Полученные трансдуцированные иммунные эффекторные клетки образуют смешанную популяцию сконструированных клеток, причем часть сконструированных клеток экспрессирует более одного В-CAR, которые являются разными.

[0117] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ хранения генетически сконструированных клеток, экспрессирующих В-CAR, которые нацелены на белок. Это включает криоконсервацию иммунных клеток таким образом, чтобы они оставались жизнеспособными при размораживании. Фракция иммунных клеток, экспрессирующих В-CAR, может быть криоконсервирована способами, известными в данной области техники, чтобы обеспечить постоянный источник таких клеток для будущего лечения пациентов, пораженных злокачественным новообразованием. При необходимости криоконсервированные трансформированные иммунные клетки можно разморозить, вырастить и увеличить для получения большего количества таких клеток.

[0118] В контексте настоящего документа «криоконсервация» относится к сохранению клеток путем охлаждения до отрицательных температур, таких как (обычно) 77 Кельвинов или 196 °С (точка кипения жидкого азота). Криопротекторы часто используют при отрицательных температурах, чтобы сохранить клетки от повреждений, вызванных замораживанием при низких температурах или нагреванием до комнатной температуры. Криоконсерванты и оптимальные скорости охлаждения могут защитить клетки от повреждения. Криопротекторы, которые можно использовать в соответствии с изобретением, включают, не ограничиваясь перечисленным: диметилсульфоксид (DMSO) (Lovelock & Bishop, Nature, 1959, 183, 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961, 190, 1204-1205), глицерин, поливинилпирролидон (Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960, 85, 576) и полиэтиленгликоль (Sloviter & Ravdin, Nature, 1962, 196, 48). Предпочтительная скорость охлаждения составляет 1°-3° С/минуту

[0119] Термин «по существу чистый» используется для обозначения того, что данный компонент присутствует на высоком уровне. Компонент желательно является преобладающим компонентом, присутствующим в композиции. Предпочтительно он присутствует на уровне более 30%, более 50%, более 75%, более 90% или даже более 95%, причем указанный уровень определяется в пересчете на сухую массу/сухую массу относительно общей массы рассматриваемой композиции. При очень высоких уровнях (например, при уровнях более 90%, более 95% или более 99%) компонент можно рассматривать как находящийся в «чистой форме». Биологически активные вещества согласно настоящему изобретению (включая полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот, антигенсвязывающие молекулы, фрагменты) могут быть представлены в форме, по существу свободной от одного или более загрязняющих веществ, с которыми вещество могло бы в противном случае быть связано. Когда композиция по существу не содержит данного загрязнителя, уровень загрязняющего вещества будет низким (например, на уровне менее 10%, менее 5% или менее 1% в пересчете на сухую массу/сухую массу, как указано выше).

[0120] В некоторых вариантах осуществления клетки готовят путем их первоначального сбора из их культуральной среды, а затем промывания и концентрирования клеток в среде и системе контейнеров, подходящей для введения («фармацевтически приемлемый» носитель) в эффективном для лечения количестве.

Подходящей инфузионной средой может быть любой состав изотонической среды, обычно физиологический раствор, Normosol™ R (Abbott) или Plasma-Lyte™ A (Baxter), но также можно использовать 5% раствор декстрозы в воде или Рингер-лактат. Инфузионная среда может быть дополнена сывороточным альбумином человека.

[0121] Желаемое лечебное количество клеток в композиции обычно составляет по меньшей мере 2 клетки или, как правило, более  $10^2$  клеток и до  $10^6$ , до  $10^8$  или  $10^9$  клеток включительно и может составлять более  $10^{10}$  клеток. Количество клеток будет зависеть от желаемого применения, для которого предназначена композиция, а также от типа включенных в нее клеток. Плотность желаемых клеток обычно составляет более  $10^6$  клеток/мл и обычно составляет более  $10^7$  клеток/мл, обычно  $10^8$  клеток/мл или более. Клинически значимое количество иммунных клеток может быть распределено на несколько инфузий, которые в совокупности равны или превышают  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  или  $10^{12}$  клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения, в частности, поскольку все введенные клетки будут перенаправлены на определенный антиген-мишень, можно вводить меньшее количество клеток, в диапазоне  $10^6$ /килограмм ( $10^6$ - $10^{11}$  на пациента). Обработки B-CAR могут быть осуществлены многократно в дозировках в пределах этих диапазонов. Клетки могут быть аутологичными, аллогенными или гетерологичными по отношению к пациенту, проходящему терапию.

[0122] B-клетки согласно настоящему изобретению могут быть введены либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или клеточные популяции. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать клеточную популяцию, экспрессирующую B-CAR, такую как B-клетки, как описано в настоящем документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, натрий-фосфатный буфер и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно составлены для внутривенного введения. Лечение может также включать один или несколько кортикостероидов, таких как дексаметазон и/или метилпреднизолон.

[0123] Композиции согласно настоящей заявке могут содержать, по существу состоять из или состоять из раскрытых компонентов.

[0124] Фармацевтические композиции согласно изобретению (растворы, суспензии и т. п.) могут включать одно или более из следующих веществ: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить растворителем или суспендирующей

средой, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфат натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика. Инъекционная композиция предпочтительно является стерильной.

[0125] Следует принимать во внимание, что нежелательные явления можно свести к минимуму путем трансдукции иммунных клеток (содержащих один или более B-CAR) суицидальным геном. Также может быть желательно включить в иммунные клетки индуцибельный «включающий» или «ускоряющий» переключатель. В этих методиках могут использоваться домены димеризации и необязательные активаторы таких доменов димеризации. Эти методы включают, например, методы, описанные в источнике Wu et al., *Science* 2014, 350(6258), в которых используются системы димеризации FKBP/Rapalog в определенных клетках, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Дополнительная технология для димеризации описана, например, в Fegan et al. *Chem. Rev.* 2010, 110, 3315-3336, а также в патентах США №№ 5830462; 5834266; 5869337; и 6165787, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Дополнительные пары димеризации могут включать циклоспорин-А/циклофилин, рецептор, эстроген/эстрогеновый рецептор (необязательно с использованием тамоксифена), глюкокортикоиды/глюкокортикоидный рецептор, тетрациклин/тетрациклиновый рецептор, витамин D/рецептор витамина D. Дополнительные примеры технологии для димеризации содержатся, например, в WO 2014/127261, WO 2015/090229, US 2014/0286987, US 2015/0266973, US 2016/0046700, патенте США № 8486693, US 2014/0171649 и US 2012/0130076, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[0126] Подходящие методики включают применение индуцибельной каспазы-9 (публикация заявки на патент США № 2011/0286980) или тимидинкиназы до, после или одновременно с трансдукцией клеток конструкцией B-CAR согласно настоящему изобретению. Дополнительные способы введения суицидных генов и/или «включающих» переключателей включают CRISPR, TALENS, MEGATALEN, цинковые пальцы, РНКи, киРНК, кшРНК, антисмысловую технологию и другие методы, известные в данной области техники.

[0127] Следует принимать во внимание, что приведенные в настоящем документе описания являются лишь иллюстративными и пояснительными и не ограничивают заявленное изобретение. В данной заявке использование единственного числа включает множественное число, если специально не указано иное.

[0128] Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие

описываемый предмет. Все документы или части документов, цитируемые в данной заявке, включая, не ограничиваясь перечисленным, патенты, патентные заявки, статьи, книги и научные труды, настоящим явным образом включены посредством ссылки в полном объеме для любых целей. При использовании в соответствии с настоящим изобретением следующие термины, если не указано иное, следует понимать как имеющие следующие значения:

[0129] В данной заявке использование «или» означает «и/или», если не указано иное. Кроме того, использование термина «включающий», а также других форм, таких как «включает» и «включено», не имеет ограничительного характера. Кроме того, такие термины, как «элемент» или «компонент», охватывают как элементы и компоненты, состоящие из одной единицы, так и элементы и компоненты, состоящие из более чем одной субъединицы, если специально не указано иное.

[0130] Термин «полинуклеотид», «нуклеотид» или «нуклеиновая кислота» включает как одноцепочечные, так и двухцепочечные нуклеотидные полимеры. Нуклеотиды, составляющие полинуклеотид, могут представлять собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды, или модифицированную форму любого из этих типов нуклеотидов. Указанные модификации включают модификации оснований, такие как производные бромуридино и инозином, модификации рибозы, такие как 2',3'-дидезоксирибоза, и модификации межнуклеотидных связей, такие как тиофосфат, дитиофосфат, фосфорселеноат, фосфордиселеноат, фосфоранилотиоат, фосфораниладат и амидофосфат.

[0131] Термин «олигонуклеотид» относится к полинуклеотиду, содержащему 200 или менее нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, например, для использования при конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды могут представлять собой смысловые или бессмысловые олигонуклеотиды. Олигонуклеотид может включать метку, включая радиоактивную метку, флуоресцентную метку, гаптен или антигенную метку, для анализов обнаружения. Олигонуклеотиды могут применяться, например, в качестве праймеров для ПЦР, праймеров для клонирования или зондов для гибридизации.

[0132] Термин «контрольная последовательность» относится к полинуклеотидной последовательности, которая может влиять на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми она лигирована. Природа таких контрольных последовательностей может зависеть от организма-хозяина. В частных вариантах осуществления контрольные последовательности для прокариот могут включать промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции. Например, контрольные последовательности для эукариот могут включать промоторы, содержащие один или несколько сайтов распознавания для факторов транскрипции, последовательности энхансеров транскрипции и последовательности терминации транскрипции. «Контрольные последовательности» могут включать лидерные последовательности (сигнальные пептиды) и/или последовательности партнера по слиянию.

[0133] В контексте настоящего документа «функционально связанный» означает, что компоненты, к которым применяется этот термин, находятся во взаимосвязи, которая позволяет им выполнять присущие им функции в подходящих условиях.

[0134] Термин «вектор» означает любую молекулу или объект (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), используемые для переноса информации, кодирующей белок, в клетку-хозяина. Термин «вектор экспрессии» или «конструкция экспрессии» относится к вектору, который подходит для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновых кислот, которые направляют и/или контролируют (в сочетании с клеткой-хозяином) экспрессию одной или более гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ними. Конструкция экспрессии может включать, но ограничиваясь перечисленным, последовательности, которые влияют на или контролируют транскрипцию, трансляцию и, если присутствуют интроны, влияют на сплайсинг РНК кодирующей области, функционально связанной с ними.

[0135] Термин «клетка-хозяин» относится к клетке, которая была трансформирована или способна быть трансформирована последовательностью нуклеиновой кислоты и тем самым экспрессирует представляющий интерес ген. Данный термин включает потомство родительской клетки, независимо от того, идентично ли потомство по морфологии или генетической характеристике исходной родительской клетке, при условии наличия представляющего интерес гена.

[0136] Термин «трансформация» относится к изменению генетических характеристик клетки, и клетка была трансформирована, когда она была модифицирована таким образом, чтобы она содержала новую ДНК или РНК. Например, клетка трансформирована, когда она генетически модифицирована из своего нативного состояния путем введения нового генетического материала посредством трансфекции, трансдукции или других методов. После трансфекции или трансдукции трансформирующая ДНК может рекомбинировать с ДНК клетки путем физической интеграции в хромосому клетки, или может временно сохраняться в виде эписомального элемента без репликации, или может независимо реплицироваться в виде плазмиды. Клетка считается «стабильно трансформированной», когда трансформирующая ДНК реплицируется при делении клетки.

[0137] Термин «трансфекция» относится к поглощению чужеродной или экзогенной ДНК клеткой. Ряд способов трансфекции хорошо известен в данной области техники и раскрыт в настоящем документе. См., Graham *et al.*, VIROLOGY, 1973, 52:456; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2001, см. выше; Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, 1986, Elsevier; Chu *et al.*, Gene, 1981, 13:197.

[0138] Термин «трансдукция» относится к процессу, при котором чужеродную ДНК вводят в клетку с помощью вирусного вектора. См., например, Jones *et al.*, Genetics: principles and analysis, 1998, Boston: Jones & Bartlett Publ.

[0139] Термины «полипептид» или «белок» относятся к макромолекуле, имеющей аминокислотную последовательность белка, включая делеции, добавления и/или замены

одной или более аминокислот нативной последовательности. Термины «полипептид» и «белок» специально охватывают антигенсвязывающие молекулы, антитела или последовательности, которые имеют делеции, добавления и/или замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего белка. Термин «фрагмент полипептида» относится к полипептиду, который имеет делецию на аминоконце, делецию на карбоксиконце и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным нативным белком. Такие фрагменты также могут содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с нативным белком. Полезные полипептидные фрагменты включают иммунологически функциональные фрагменты антигенсвязывающих молекул.

[0140] Термин «выделенный» означает (i) не содержащий по меньшей мере некоторых других белков, вместе с которыми он обычно присутствует, (ii) по существу не содержащий других белков из того же источника, например, от того же вида, (iii) отделенный от по меньшей мере приблизительно 50 процентов полинуклеотидов, липидов, углеводов или других веществ, с которыми он связан естественным образом, (iv) функционально связанный (путем ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан естественным образом, или (v) не встречающийся естественным образом.

[0141] «Вариант» полипептида (например, антигенсвязывающая молекула) содержит аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков вставлены, удалены и/или заменены в аминокислотной последовательности по сравнению с другой полипептидной последовательностью. Варианты включают слитые белки.

[0142] Термин «идентичность» относится к взаимосвязи между последовательностями двух или более молекул полипептида или двух или более молекул нуклеиновой кислоты, определяемой путем выравнивания и сравнения последовательностей. «Процент идентичности» означает процент идентичных остатков в сравниваемых молекулах аминокислот или нуклеотидов и рассчитывается на основе размера наименьшей из сравниваемых молекул. Для этих расчетов гэпы в выравнивании (если таковые имеются) предпочтительно учитываются с помощью определенной математической модели или компьютерной программы (т. е. «алгоритма»).

[0143] Чтобы вычислить процент идентичности, сравниваемые последовательности обычно выравнивают таким образом, чтобы получить наибольшее совпадение между последовательностями. Одним из примеров компьютерной программы, которая может быть использована для определения процента идентичности, является пакет программ GCG, включающий GAP (Devereux *et al.*, Nucl. Acid Res., 1984, 12, 387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Мадисон, Висконсин). Компьютерный алгоритм GAP используется для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых необходимо определить процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для оптимального соответствия их соответствующих аминокислот или нуклеотидов («охвата совпадения», как определено алгоритмом). В отдельных вариантах

осуществления в алгоритме также используется стандартная матрица сравнения (см., например, Dayhoff *et al.*, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 1978, 5:345-352, где описана матрица сравнения PAM 250; Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992, 89, 10915-10919, где описана матрица сравнения BLO-SUM 62).

[0144] В контексте настоящего документа двадцать базовых (например, встречающихся естественным образом) аминокислот и их сокращения соответствуют общепринятому использованию. См., например, источник Immunology A Synthesis (2nd Edition, Golub and Green, Eds., Sinauer Assoc., Sunderland, Mass. (1991)), включенный в настоящий документ посредством ссылки для любых целей. Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати базовых аминокислот, нестандартные аминокислоты, такие как альфа-, альфа-дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нетрадиционные аминокислоты, также могут быть подходящими компонентами для полипептидов согласно настоящему изобретению. Примеры нестандартных аминокислот включают: 4-гидроксипролин, гамма-карбоксихлутамат, эпсилон-N, N, N-триметиллизин, е-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, сигма- N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В обозначениях полипептидов, используемых в настоящем документе, левое направление представляет собой аминоконцевое направление, а правое направление представляет собой карбоксиконцевое направление в соответствии со стандартным общепринятым использованием.

[0145] Консервативные аминокислотные замены могут охватывать не встречающиеся естественным образом аминокислотные остатки, которые обычно встраиваются путем химического пептидного синтеза, а не путем синтеза в биологических системах. К ним относятся пептидомиметики и реверсированные обращенные или инвертированные формы фрагментов аминокислот. Встречающиеся естественным образом остатки можно разделить на классы на основании общих свойств боковой цепи:

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

[0146] Например, неконсервативные замены могут включать замену члена одного из этих классов на член другого класса.

[0147] При внесении изменений в антигенсвязывающую молекулу, костимулирующие или активирующие домены сконструированной T-клетки, в соответствии с отдельными вариантами осуществления, можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидропатичности на основе ее характеристик гидрофобности и заряда. Они представляют собой: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин

(+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспарат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинин (-4,5). См., например, Kyte *et al.*, J. Mol. Biol., 1982, 157, 105-131. Известно, что некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами, имеющими аналогичный индекс или показатель гидропатичности, и при этом сохраняется аналогичная биологическая активность. Также в данной области техники известно, что замена подобных аминокислот может быть эффективно осуществлена на основе гидрофильности, в частности, когда созданный таким образом биологически функциональный белок или пептид предназначен для применения в иммунологических вариантах осуществления, как в данном случае. Иллюстративные аминокислотные замены приведены в таблице 5.

ТАБЛИЦА 5

Исходные остатки	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gin, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu	Норлейцин, Ile, Va, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-диаминомасляная кислота Acid, Gin, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr

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

[0148] Термин «производное» относится к молекуле, которая включает химическую модификацию, отличную от вставки, делеции или замены аминокислот (или нуклеиновых кислот). В отдельных вариантах осуществления производные содержат ковалентные модификации, включая, не ограничиваясь перечисленным, химическую связь с полимерами, липидами или другими органическими или неорганическими остатками. В отдельных вариантах осуществления химически модифицированная антигенсвязывающая молекула может иметь более длительный период полувыведения из кровотока, чем антигенсвязывающая молекула, которая не является химически модифицированной. В некоторых вариантах осуществления производная антигенсвязывающая молекула ковалентно модифицирована путем включения одного или более присоединенных водорастворимых полимеров, включая, не ограничиваясь перечисленным, полиэтиленгликоль, полиоксиэтиленгликоль или полипропиленгликоль.

[0149] Аналоги пептидов обычно используются в фармацевтической промышленности в качестве непептидных лекарственных средств со свойствами, аналогичными свойствам исходного пептида. Эти типы непептидных соединений называются «миметиками пептидов» или «пептидомиметиками». Fauchere, J. L., *Adv. Drug Res.*, 1986, 15, 29; Veber, D. F. & Freidinger, R. M., *Trends in Neuroscience*, 1985, 8, 392-396; и Evans, B. E., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1987, 30, 1229-1239, которые включены в настоящий документ посредством ссылки для любых целей.

[0150] Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству клеток CAR-B, которые, как определено, вызывают терапевтический ответ у млекопитающего. Такие терапевтически эффективные количества легко определяются специалистом в данной области техники.

[0151] Термины «пациент» и «субъект» используются взаимозаменяемо и включают людей и животных, отличных от людей, а также лиц с официально диагностированными расстройствами, лиц без официально признанных расстройств, лиц, получающих медицинскую помощь, лиц с риском развития расстройств и т. д.

[0152] Термины «лечить» и «лечение» включают терапевтическое лечение, профилактическое лечение и применения, при которых снижается риск развития у субъекта расстройства или другого фактора риска. Лечение не требует полного излечения расстройства и включает варианты осуществления, в которых уменьшают симптомы или лежащие в основе факторы риска. Термин «предотвращать» не требует 100% исключения возможности события. Скорее, он означает, что вероятность возникновения события была снижена в присутствии соединения или способа.

[0153] Для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, культуры и трансформации тканей могут быть использованы стандартные методы (например,

электропорация, липофекция). Ферментативные реакции и способы очистки могут быть выполнены в соответствии с рекомендациями производителя или в соответствии с обычными способами, применяемыми в данной области техники, или описанными в настоящем документе. Вышеуказанные методы и процедуры могут быть, как правило, выполнены в соответствии с обычными методами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных источниках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. См., например, источник Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), который включен в настоящий документ посредством ссылки для любых целей.

### 5. Последовательности

[0154] Следующие последовательности дополнительно иллюстрируют изобретение:

Трансмембранный домен CD28 - мышинный

(SEQ ID NO: 1)

TTCTGGGCCCTTGTGGTGGTTGCCGGAGTGCTGTTTTGCTATGGGCTCCTGGT  
TACCGTTGCCCTTTGTGTGATTTGGACC

Трансмембранный домен CD28 - мышинный

(SEQ ID NO: 2)

FWALVVVAGVLFYGLLVTVALCVIWT

Трансмембранный домен CD28 - человеческий

(SEQ ID NO: 3)

TTTTGGGTATTGGTAGTGGTGGGCGGAGTTTTAGCCTGCTACAGCCTCCTGGT  
AACAGTGGCTTTTATCATCTTTTGGGTG

Трансмембранный домен CD28 - человеческий

(SEQ ID NO: 4)

FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFHFWV

Цитоплазматический домен CD19 - человеческий

(SEQ ID NO: 5)

CAGCGGGCTTTAGTCTTGCGGCGTAAACGTAAAAGAATGACAGATCCAACTC  
GCAGGTTCTTCAAAGTGACCCCCCACCTGGGTCCGGACCGCAGAACCAATATGGG  
AATGTCCTGTCTCTGCCTACGCCTACAAGTGGACTGGGTAGGGCTCAGAGGTGGGCT  
GCCGGTCTCGGCGGAACCTGCGCCATCTTACGGAAATCCCTCCTCCGACGTTCAAGCA  
GACGGGGCCCTGGGGTCTCGATCCCCGCCTGGTGTTGGACCAGAAGAGGAAGAGGG  
CGAGGGCTACGAAGAGCCCGACTCCGAAGAGGACAGTGAGTTTTACGAGAACGACA  
GCAACCTGGGGCAGGATCAGCTGTCACAGGATGGCTCAGGATATGAAAACCCTGAG  
GACGAGCCTTTGGGGCCTGAAGATGAGGACTCCTTTTCTAATGCAGAGTCATATGAG  
AATGAGGACGAAGAATTGACTCAACCCGTGGCAAGAACAATGGATTTCTCAGTCC  
ACACGGGAGTGCATGGGACCCCTCCAGAGAGGCTACTAGCCTCGGTTCTCAAAGCT  
ATGAGGACATGAGGGGTATTCTGTACGCAGCGCCTCAGTTGAGGTCCATCCGCGGC  
CAGCCAGGCCCAAACCATGAGGAAGATGCCGATTCTTACGAAAACATGGACAACCC

CGATGGTCCTGACCCCGCATGGGGGGGCGGCGGGAGGATGGGCACCTGGTCTACTC  
GC

Цитоплазматический домен CD19 - человеческий

(SEQ ID NO: 6)

QRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTTPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRW  
AAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPPEEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSN  
LGQDQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFLSPHGSA  
WDPSREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPVPNHEEDADSYENMDNPDGPDPA  
WGGGGRMGTWSTR

Цитоплазматический домен CD40 - человеческий

(SEQ ID NO: 7)

AAGAAGGTTGCAAAAAACCTACTAATAAGGCTCCCCATCCTAAGCAAGAGC  
CCCAAGAAATTAACCTTTCCCGATGATCTTCCGGGTCTAACACGGCAGCCCCGGTGC  
AGGAGACCCTGCATGGTTGTCAACCCGTCACCTCAGGAGGACGGGAAAGAGTCTCGT  
ATCTCCGTCCAGGAGAGACAG

Цитоплазматический домен CD40 - человеческий

(SEQ ID NO: 8)

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKES  
RISVQERQ

Цитоплазматический домен CD40+CD79b - человеческий

(SEQ ID NO: 9)

AAGAAGGTTGCAAAAAACCTACTAATAAGGCTCCCCATCCTAAGCAAGAGC  
CCCAAGAAATTAACCTTTCCCGATGATCTTCCGGGTCTAACACGGCAGCCCCGGTGC  
AGGAGACCCTGCATGGTTGTCAACCCGTCACCTCAGGAGGACGGGAAAGAGTCTCGT  
ATCTCCGTCCAGGAGAGACAGGACAAGGACGATAGTAAAGCAGGGATGGAGGAGG  
ACCATACATACGAGGGACTGGATATCGATCAGACAGCCACGTACGAAGACATTGTG  
ACACTGAGAACTGGCGAGGTGAAGTGGTCAGTGGGAGAACATCCGGGGCAGGAA

Цитоплазматический домен CD40+CD79b - человеческий

(SEQ ID NO: 10)

KKVAKKPTNK APHPKQEPQE INFPDDLPGS NTAAPVQETL HGCQPVTQED  
GKESRISVQE RQDKDDSKAG MEEDHTYEGL DIDQTATYED IVTLRTGEVK  
WSVGEHPGQE

Цитоплазматический домен CD40+CD137 - человеческий

(SEQ ID NO: 11)

AAGAAGGTTGCAAAAAACCTACTAATAAGGCTCCCCATCCTAAGCAAGAGC  
CCCAAGAAATTAACCTTTCCCGATGATCTTCCGGGTCTAACACGGCAGCCCCGGTGC  
AGGAGACCCTGCATGGTTGTCAACCCGTCACCTCAGGAGGACGGGAAAGAGTCTCGT  
ATCTCCGTCCAGGAGAGACAGAAAAGAGGCCGAAAAAAGCTGCTGTACATCTTCAA  
ACAACCCTTCATGCGACCTGTTTCAGACGACACAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGTA  
GGTTTCCCGAAGAAGAGGAGGGAGGATGCGAACTT

Цитоплазматический домен CD40+CD137 - человеческий

(SEQ ID NO: 12)

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKES  
RISVQERQKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

Цитоплазматический домен CD137 - человеческий

(SEQ ID NO: 13)

AAAAGAGGCCGAAAAAAGCTGCTGTACATCTTCAAACAACCCTTCATGCGAC  
CTGTTTCAGACGACACAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGTAGGTTTCCCGAAGAAGAG  
GAGGGAGGATGCGAACTT

Цитоплазматический домен CD137 - человеческий

(SEQ ID NO: 14)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

Цитоплазматический домен CD40 и рецептора Fc гамма 2a - человеческий

(SEQ ID NO: 15)

AAGAAGGTTGCAAAAAAACCTACTAATAAGGCTCCCCATCCTAAGCAAGAGC  
CCCAAGAAATTAACCTTCCCGATGATCTTCCGGGTCTAACACGGCAGCCCCGGTGC  
AGGAGACCCTGCATGGTTGTCAACCCGTCCTCAGGAGGACGGGAAAGAGTCTCGT  
ATCTCCGTCCAGGAGAGACAGCGCAAAAAACGTATAAGCGCAAACCTCTACAGATCC  
AGTAAAAGCCGCGCAATTTCGAGCCTCCCGGCCGCCAGATGATTGCAATACGGAAAC  
GTCAACTGGAGGAAACTAATAATGACTATGAGACGGCCGACGGTGGATACATGACC  
CTTAATCCCCGCGCGCCAACCGACGATGATAAGAACATATATCTGACGCTCCCCCT  
AACGATCACGTTAACAGTAATAAT

Цитоплазматический домен CD40 и рецептора Fc гамма 2a - человеческий

(SEQ ID NO: 16)

KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKES  
RISVQERQKRKRISANSTDPVKAQFEPGRQMIARKRQLEETNNDYETADGGYMTLN  
PRAPTDDDKNIYLTLPNDHVNSNN

Цитоплазматический домен рецептора Fc гамма 2a - человеческий

(SEQ ID NO: 17)

CGCAAAAAACGTATAAGCGCAAACCTCTACAGATCCAGTAAAAGCCGCGCAA  
TTCGAGCCTCCCGGCCGCCAGATGATTGCAATACGGAAACGTCAACTGGAGGAAAC  
TAATAATGACTATGAGACGGCCGACGGTGGATACATGACCCTTAATCCCCGCGCGC  
CAACCGACGATGATAAGAACATATATCTGACGCTCCCCCTAACGATCACGTTAACA  
GTAATAAT

Цитоплазматический домен рецептора Fc гамма 2a - человеческий

(SEQ ID NO: 18)

RKKRISANSTDPVKAQFEPGRQMIARKRQLEETNNDYETADGGYMTLN  
PRTDDDKNIYLTLPNDHVNSNN

Цитоплазматический домен Myd88+CD40 - человеческий

(SEQ ID NO: 19)

ATGGCGGCGGGCGGGCCCCGGCGCCGGAAGCGCCGCGCCAGTCTCATCTACGT  
 CCAGTCTGCCACTGGCTGCCCTGAACATGAGAGTGAGACGCCGTTTATCCCTCTTCC  
 TGAATGTGCGGACCCAGGTCGCCGCTGATTGGACCGCCCTGGCCGAAGAGATGGAC  
 TTTGAATACTTGAAATCAGACAGCTGGAAACACAGGCAGACCCAACCGGGAGACT  
 GCTTGACGCCTGGCAGGGACGCCAGGGGCAAGTGTGGTTCGGTTACTGGAGCTTTT  
 AACTAAGTTGGGCCGCGATGACGTGCTGTTGGAGTTAGGACCCAGTATCGAGGAGG  
 ATTGTCAGAAATACATCTTGAACAGCAGCAGGAGGAGGCGGAAAAGCCCCTGCAG  
 GTGGCGGCCGTTGACAGCAGTGTACCCAGAACAGCTGAGCTGGCCGGCATCACAAAC  
 CCTGGATGATCCCCTGGGCCACATGCCTGAGAGGTTTCGACGCTTTCATAAAGAAGGT  
 TGCAAAAAACCTACTAATAAGGCTCCCCATCCTAAGCAAGAGCCCCAAGAAATTA  
 ACTTTCCCGATGATCTTCCGGGTTCTAACACGGCAGCCCCGGTGCAGGAGACCCTGC  
 ATGGTTGTCAACCCGTCACCTCAGGAGGACGGGAAAGAGTCTCGTATCTCCGTCCAG  
 GAGAGACAG

Цитоплазматический домен Myd88+CD40 - человеческий

(SEQ ID NO: 20)

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAE  
 MDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLELGPSIEED  
 CQKYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFIKKVAKK  
 PTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

Цитоплазматический домен Myd88 - человеческий

(SEQ ID NO: 21)

ATGGCGGCGGGCGGGCCCCGGCGCCGGAAGCGCCGCGCCAGTCTCATCTACGT  
 CCAGTCTGCCACTGGCTGCCCTGAACATGAGAGTGAGACGCCGTTTATCCCTCTTCC  
 TGAATGTGCGGACCCAGGTCGCCGCTGATTGGACCGCCCTGGCCGAAGAGATGGAC  
 TTTGAATACTTGAAATCAGACAGCTGGAAACACAGGCAGACCCAACCGGGAGACT  
 GCTTGACGCCTGGCAGGGACGCCAGGGGCAAGTGTGGTTCGGTTACTGGAGCTTTT  
 AACTAAGTTGGGCCGCGATGACGTGCTGTTGGAGTTAGGACCCAGTATCGAGGAGG  
 ATTGTCAGAAATACATCTTGAACAGCAGCAGGAGGAGGCGGAAAAGCCCCTGCAG  
 GTGGCGGCCGTTGACAGCAGTGTACCCAGAACAGCTGAGCTGGCCGGCATCACAAAC  
 CCTGGATGATCCCCTGGGCCACATGCCTGAGAGGTTTCGACGCTTTCATA

Цитоплазматический домен Myd88 - человеческий

(SEQ ID NO: 22)

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAE  
 MDFEYLEIRQLETQADP TGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLELGPSIE  
 EDCQKYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFI

Цитоплазматический домен CD79a - человеческий

(SEQ ID NO: 23)

AGGAAACGATGGCAGAACGAGAAGCTCGGGTTGGATGCCGGGGATGAATAT  
 GAAGATGAAAACCTTTATGAAGGCCTGAACCTGGACGACTGCTCCATGTATGAGGA  
 CATCTCCCGGGGCCTCCAGGGCACCTACCAGGATGTGGGCAGCCTCAACATAGGAG

ATGTCCAGCTGGAGAAGCCG

Цитоплазматический домен CD79a - человеческий

(SEQ ID NO: 24)

RKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNI  
GDVQLEKP

Цитоплазматический домен CD79b - человеческий

(SEQ ID NO: 25)

CTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGGCATGGAGGAAGATCACACCTACGAG  
GGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGACATAGTGACGCTGCGGACAGG  
GGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGAG

Цитоплазматический домен CD79b - человеческий

(SEQ ID NO: 26)

LKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

Шарнирный домен CD8 - человеческий

(SEQ ID NO: 27)

TTCGTGCCTGTGTTCCCTCCCAGCTAAGCCCACTACCACCCCGCTCCAAGGCC  
GCCCACGCCCGCTCCTACTATTGCTAGTCAGCCTTTAAGTTTACGACCCGAAGCTTG  
CAGGCCCGCCGCCGGCGGCGCTGTGCACACCAGGGGGCTTGATTTTGCCTGCGAC

Шарнирный домен CD8 - человеческий

(SEQ ID NO: 28)

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

Спейсер с 3X strep II-меткой

(SEQ ID NO: 29)

GGCGCTGGTAGTGGCGGTAACCTGGAGCCACCCTCAATTTGAGAAGGGCGGGT  
CAGGCGGATCAGGTGGTAGTGGTGGGTCCAACCTGGAGCCATCCGCAATTTGAAAAG  
GGCGGAAGCGGCGGTTCCGGCGGTTCCAGGCGGTAGCAACTGGTCACATCCGCAATT  
TGAGAAAGGCGGGTCAGGCGGCGGG

Спейсер с 3X strep II-меткой

(SEQ ID NO: 30)

GAGSGGNWSHPQFEKGGSGGSGGSGGSNWSHPQFEKGGSGGSGGSGGSNWSHP  
QFEKGGSGGG

Fc IgG1 человека (трансмембранная форма)

(SEQ ID NO: 31)

CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGC  
TGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGA  
TCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCA  
GAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA  
GCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGC  
TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCC  
CTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCC

CCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC  
 TGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC  
 AACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCAGTGCTGGACAGCGACGG  
 CAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCA  
 ACGTGTTACAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG  
 AGCCTGAGCCTGTCCCCGAGCTGCAACTGGAGGAGAGCTGTGCGGAGGCGCAGGA  
 CGGGGAGCTGGACGGGCTGTGGACGACCATCACCATCTTCATCACACTCTTCTGT  
 AAGCGTGTGCTACAGTGCCACCGTCACCTTCTTCAAGGTGAAGTGGATCTTCTCCTC  
 GGTGGTGGACCTGAAGCAGACCATCATCCCCGACTACAGGAACATGATCGGACAGG  
 GGGCCTGA

Fc IgG1 человека (трансмембранная форма)

(SEQ ID NO: 32)

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
 NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLPEL  
 QLEESCAEAQDGELDGLWTTITIFITLFLSVCYSATVTFKVKWIFSSVVDLKQTIIPDYR  
 NMIGQGA

scFv анти-PSMA человека

(SEQ ID NO: 33)

GAGGTTCAACTTGTTCAATCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCCGGGGCATCTG  
 TGAAAGTATCATGCAAAACATCCGGCTATACGTTTACCGAATACACCATTCCTGGG  
 TCAGACAGGCTCCCGGTCAAAGCCTCGAATGGATGGGAAATATTAACCCTAACAAT  
 GGCGGAACCACATATAATCAGAAATTCCAAGGCCGAGTGACGATAACTGTCGATAA  
 GAGTACGTCCACAGCTTACATGGAACTCAGCTCTTTGAGATCCGAAGACACTGCAGT  
 TTATTATTGTGCAGCTGGATGGAACTTCGACTATTGGGGACAAGGGACTCTTGTTAC  
 GGTGTCCAGTGGCAAACCAGGTAGTGGTAAACCCGGAAGCGGCAAGCCCGGGAGC  
 GGTAACCTGGTAGCGACATCGTCATGACTCAAAGCCCTGACTCACTCGCCGTGAGC  
 CTGGGAGAGCGTGCAACGCTATCTTGTCGGGCCTCTCAGGATGTCGGAAGTGTGTA  
 GACTGGTATCAACAGAAACCTGACCAATCACCAAACTCCTGATTTATTGGGCCTCA  
 ACACGTCACACAGGAGTGCCAGATAGGTTACAGGTAGTGGCAGTGGAACTGATTT  
 TACTTTGACAATTAGCAGCCTGCAAGCCGAAGATGTAGCCGTTTACTTCTGTCAACA  
 ATATAACTCATACCCACTAACGTTCCGGTGCCGGGACGAAGGTAGAGATTA

scFv анти-PSMA человека

(SEQ ID NO: 34)

EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKTSGYTFT EYTIHWVRQA PGQSLEWMGN  
 INPNNGGTTY NQKFQGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAAGW  
 NFDYWGGTL VTVSSGKPGS GKPGSGKPGS GKPGSDIVMT QSPDSLAVSL  
 GERATLSCRA SQDVGTAVDW YQQKPDQSPK LLIYWASTRH TGVPDRFTGS  
 GSGTDFTLTI SSLQAEDVAV YFCQQYNSYP LTFGAGTKVE IK

scFv анти-саркогликан

(SEQ ID NO: 35)

GAAGTCCAATTGGTTGAAAGCGGTGGTGGACTCGTCAAACCTGGCGGTAGCC  
 TTAAACTTTCATGTGCCGCAAGCGGCTTCACGTTTAGTAACTATGCTATGAGTTGGG  
 TCCGCCAAAGTCCAGAAAAGCGCCTCGAATGGGTGGCGGAGATCTCTGGAGGAGGA  
 ACATATACATATTATCCAGACACCATGACCGGTAGGTTTACAATCTCAAGAGACAAC  
 GCTAAGAACACCCTGTACCTGGAAATGTCAAGCCTGAGATCAGAAGATACGGCCAT  
 GTATTATTGTACGCGCCTACTCGACTATTGGGGTCAAGGAACTTCCGTGACGGTGTC  
 AAGCGGAGGAGGTGGGAGCGGAGGAGGCGGAAGTGGCGGTGGTGGCTCTGGTGGC  
 GGTGGAAGTGATATAGTGATGACGCAAGCTGCCTTTTCAAACCCTGTACTTTGGGG  
 ACTAGCGCATCAATCTCCTGTAGGTCCAGCAAATCTTTGCTGCACAGTAATGGAATC  
 ACCTATCTTTTCTGGTATTTGCAAAAGCCTGGGCAGAGCCCGCAACTGCTGATCTAT  
 CAAATGTCAAATCTTGCTTCCGGAGTTCAGACCGCTTCTCAAGTTCGGGGTCCGGC  
 ACTGATTTTACCTTGAGAATTTCTAGGGTTCGAAGCTGAAGACGTCGGTGTCTATTAT  
 TGC GCGCAAACCTTGAGCTTCCATACACCTTCGGGGGGGGCACAAAACCTTGAGAT  
 CAAG

scFv анти-саркогликан

(SEQ ID NO: 36)

EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NYAMSWVRQS PEKRLEWVAE  
 ISGGGTYYTY PDMTGRFTI SRDNAKNTLY LEMSSLRSED TAMYYCTRL  
 DYWGQGTSVT VSSGGGSGG GSGGGGSGG GGSDIVMTQA AFSNPVTLGT  
 SASISCRSSK SLLHSNGITY LFWYLQKPGQ SPQLLIYQMS NLAGVPRDF SSSGSGTDF  
 LRISRVEAED VGVYYCAQNL ELPYTFGGGT KLEIK

scFv анти-GPC3 человека

(SEQ ID NO: 37)

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAGGG  
 TCACCATCTCCTGCTCTGGAACCAGGTCCAACATTGGGAGTGATTATGTTTCCTGGT  
 ACCAACACCTCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCGTTTATGGCGATAATCTGCGAC  
 CCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGG  
 GCATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTACTGCGGCACATGGGAT  
 TACACCCTGAATGGTGTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTTCT  
 AGAGGTGGTGGTGGTAGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCTCGAGAT  
 GGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGG  
 TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGT  
 AGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGATAA  
 TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG  
 TATATTACTGTGCGCGCACTTCTTACCTGAACCATGGTGTACTGGGGTCAAGGTA  
 CTCTGGTGACCGTGTCTAGCGCCGCTGCA

scFv анти-GPC3 человека

(SEQ ID NO: 38)

QSVLTQPPSV SAAPGQRVTI SCSGTRSNIG SDYVSWYQHL PGTAPKLLVY  
 GDNLRPSGIP DRFSASKSGT SATLGITGLQ TGDEADYYCG TWDYTLNGVV  
 FGGGTKLTVL GSRGGGSGG GSGGGGSLE MAQVQLVESG GGLVQPGGSL  
 RLSCAASGFT FSSYAMSWVR QAPGKLEWV SVIYSGGSST YYADSVKGRF  
 TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCAR TSYLNHGDIW GQGLTLTVSS AAA

pWF-82

(SEQ ID NO: 39)

GAGGTTCAACTTGTTCAATCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCCGGGGCATCTG  
 TGAAAGTATCATGCAAAACATCCGGCTATACGTTTACCGAATACACCATTCACTGGG  
 TCAGACAGGCTCCCGGTCAAAGCCTCGAATGGATGGGAAATATTAACCCTAACAAT  
 GGCGGAACCATATAATCAGAAATTCCAAGGCCGAGTGACGATAACTGTCGATAA  
 GAGTACGTCCACAGCTTACATGGAATCAGCTCTTTGAGATCCGAAGACACTGCAGT  
 TTATTATTGTGCAGCTGGATGGAATTCGACTATTGGGGACAAGGGACTCTTGTTAC  
 GGTGTCCAGTGGCAAACCAGGTAGTGGTAAACCCGGAAGCGGCAAGCCCGGGAGC  
 GGTAACCTGGTAGCGACATCGTCATGACTCAAAGCCCTGACTCACTCGCCGTGAGC  
 CTGGGAGAGCGTGCAACGCTATCTTGTCTGGGCCTCTCAGGATGTCGGAACCTGCTGTA  
 GACTGGTATCAACAGAAACCTGACCAATCACCAAACTCCTGATTTATTGGGCCTCA  
 ACACGTCACACAGGAGTGCCAGATAGGTTACAGGTAGTGGCAGTGGAACTGATTT  
 TACTTTGACAATTAGCAGCCTGCAAGCCGAAGATGTAGCCGTTTACTTCTGTCAACA  
 ATATAACTCATACCCACTAACGTTCCGGTGCCGGGACGAAGGTAGAGATTAATTCGT  
 GCCTGTGTTCTCCAGCTAAGCCACTACCACCCCGCTCCAAGGCCGCCACGCC  
 CGCTCCTACTATTGCTAGTCAGCCTTTAAGTTTACGACCCGAAGCTTGCAGGCCCGC  
 CGCCGGCGGCGCTGTGCACACCAGGGGGCTTGATTTTGCCTGCGACTTTTGGGTATT  
 GGTAGTGGTGGGCGGAGTTTTAGCCTGCTACAGCCTCCTGGTAACAGTGGCTTTTAT  
 CATCTTTTGGGTGCAGCGGGCTTTAGTCTTGCGGCGTAAACGTAAAAGAATGACAGA  
 TCCAACTCGCAGGTTCTTCAAAGTGACCCCCCACCTGGGTCCGGACCGCAGAACCA  
 ATATGGGAATGTCCTGTCTCTGCCTACGCTACAAGTGGACTGGGTAGGGCTCAGAG  
 GTGGGCTGCCGTCTCGGCGGAACTGCGCCATCTTACGGAAATCCCTCCTCCGACGT  
 TCAGGCAGACGGGGCCCTGGGGTCTCGATCCCCGCCTGGTGTGGACCAGAAGAGG  
 AAGAGGGCGAGGGCTACGAAGAGCCCAGCTCCGAAGAGGACAGTGAGTTTTACGA  
 GAACGACAGCAACCTGGGGCAGGATCAGCTGTACAGGATGGCTCAGGATATGAAA  
 ACCCTGAGGACGAGCCTTTGGGGCCTGAAGATGAGGACTCCTTTTCTAATGCAGAGT  
 CATATGAGAATGAGGACGAAGAATTGACTCAACCCGTGGCAAGAACAATGGATTTCT  
 CTCAGTCCACACGGGAGTGCATGGGACCCCTCCAGAGAGGCTACTAGCCTCGGTTCT  
 CAAAGCTATGAGGACATGAGGGGTATTCTGTACGCAGCGCCTCAGTTGAGGTCCAT  
 CCGCGGCCAGCCAGGCCCAAACCATGAGGAAGATGCCGATTCTTACGAAAACATGG  
 ACAACCCCGATGGTCCTGACCCCGCATGGGGGGGCGGCGGGAGGATGGGCACCTGG  
 TCTACTCGCTAG

pWF-82

(SEQ ID NO: 40)

EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKTSGYTFT EYTIHWVRQA PGQSLEWMGN  
 INPNNGGTTY NQKFQGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAAGW  
 NFDYWGQGTL VTVSSGKPGS GKPGSGKPGS GKPGSDIVMT QSPDSLAVSL  
 GERATLSCRA SQDVGTAVDW YQQKPDQSPK LLIYWASTRH TGVPDRFTGS  
 GSGTDFTLTI SSLQAEDVAV YFCQQYNSYP LTFGAGTKVE IKFVPVFLPA  
 KPTTTPAPRP PTPAPTIASQ PLSLRPEACR PAAGGAVHTR GLDFACDFWV  
 LVVVGGVLAC YSLLVTVAFI IFWVQRALVL RKRKRMTDP TRRFFKVTPP  
 PGSGPQNQYG NVLSLPTPTS GLGRAQRWAA GLGGTAPSYG NPSSDVQADG  
 ALGSRSPPGV GPEEEEGEGY EEPDSEEDSE FYENDSNLGQ DQLSQDGSY  
 ENPEDEPLGP EDEDSFSNAE SYENEDEELT QPVARTMDFL SPHGSAWDPS  
 REATSLGSQS YEDMRGILYA APQLRSIRGQ PGPNHEEDAD SYENMDNPDG  
 PDPAWGGGGR MGTWSTR-

pWF-83

(SEQ ID NO: 41)

GAGGTTCAACTTGTTCAATCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCCGGGGCATCTG  
 TGAAAGTATCATGCAAACATCCGGCTATACGTTTACCGAATACACCATTCACTGGG  
 TCAGACAGGCTCCCGGTCAAAGCCTCGAATGGATGGGAAATATTAACCCTAACAAT  
 GGCGGAACCACATATAATCAGAAATTCCAAGGCCGAGTGACGATAACTGTCGATAA  
 GAGTACGTCCACAGCTTACATGGAAGTCACTCTTTGAGATCCGAAGACACTGCAGT  
 TTATTATTGTGCAGCTGGATGGAAGTTCGACTATTGGGGACAAGGGACTCTTGTTAC  
 GGTGTCCAGTGGCAAACCAGGTAGTGGTAAACCCGGAAGCGGCAAGCCCGGGAGC  
 GGTAACCTGGTAGCGACATCGTCATGACTCAAAGCCCTGACTCACTCGCCGTGAGC  
 CTGGGAGAGCGTGCAACGCTATCTTGTCGGGCCTCTCAGGATGTCGGAAGTCTGTA  
 GACTGGTATCAACAGAAACCTGACCAATCACCAAAACTCCTGATTTATTGGGCCTCA  
 ACACGTCACACAGGAGTGCCAGATAGGTTACAGGTAGTGGCAGTGGAAGTCTGATTT  
 TACTTTGACAATTAGCAGCCTGCAAGCCGAAGATGTAGCCGTTTACTTCTGTCAACA  
 ATATAACTCATACCCACTAACGTTCCGGTGCCGGGACGAAGGTAGAGATTAATTCGT  
 GCCTGTGTTCTCCAGCTAAGCCACTACCACCCCGCTCCAAGGCCGCCACGCC  
 CGCTCCTACTATTGCTAGTCAGCCTTTAAGTTTACGACCCGAAGCTTGCAGGCCCGC  
 CGCCGGCGGCGCTGTGCACACCAGGGGGCTTGATTTTGCCTGCGACTTTTGGGTATT  
 GGTAGTGGTGGGCGGAGTTTTAGCCTGCTACAGCCTCCTGGTAACAGTGGCTTTTAT  
 CATCTTTTGGGTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGGCATGGAGGAAGATCACA  
 CCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGACATAGTGACGCTG  
 CGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGAGTGA

pWF-83

(SEQ ID NO: 42)

EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKTSGYTFT EYTIHWVRQA PGQSLEWMGN  
 INPNNGGTTY NQKFQGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAAGW  
 NFDYWGQGTL VTVSSGKPGS GKPGSGKPGS GKPGSDIVMT QSPDSLAVSL

GERATLSCRA SQDVGTAVDW YQQKPDQSPK LLIYWASTRH TGVPDRFTGS  
 GSGTDFTLTI SSLQAEDVAV YFCQQYNSYP LTFGAGTKVE IKFVPVFLPA  
 KPTTTPAPRP PTPAPTIASQ PLSLRPEACR PAAGGAVHTR GLDFACDFWV  
 LVVVGGVLAC YSLLVTVAFI IFWVLDKDDS KAGMEEDHTY EGLDIDQTAT  
 YEDIVTLRTG EVKWSVGEHP GQE-

pWF-84:

(SEQ ID NO: 43)

GAGGTTCAACTTGTTCAATCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCCGGGGCATCTG  
 TGAAAGTATCATGCAAAACATCCGGCTATACGTTTACCGAATACACCATTCACTGGG  
 TCAGACAGGCTCCCGGTCAAAGCCTCGAATGGATGGGAAATATTAACCCTAACAAT  
 GGCGGAACCACATATAATCAGAAATTCCAAGGCCGAGTGACGATAACTGTCGATAA  
 GAGTACGTCCACAGCTTACATGGAACTCAGCTCTTTGAGATCCGAAGACACTGCAGT  
 TTATTATTGTGCAGCTGGATGGAACTTCGACTATTGGGGACAAGGGACTCTTGTTAC  
 GGTGTCCAGTGGCAAACCAGGTAGTGGTAAACCCGGAAGCGGCAAGCCCGGGAGC  
 GGTAACCTGGTAGCGACATCGTCATGACTCAAAGCCCTGACTCACTCGCCGTGAGC  
 CTGGGAGAGCGTGCAACGCTATCTTGTCGGGCCTCTCAGGATGTCGGAAGTCTGTA  
 GACTGGTATCAACAGAAACCTGACCAATCACCAAAACTCCTGATTTATTGGGCCTCA  
 ACACGTCACACAGGAGTGCCAGATAGGTTACAGGTAGTGGCAGTGGAAGTCTGATTT  
 TACTTTGACAATTAGCAGCCTGCAAGCCGAAGATGTAGCCGTTTACTTCTGTCAACA  
 ATATAACTCATACCCACTAACGTTCCGGTGCCGGGACGAAGGTAGAGATTAATTCGT  
 GCCTGTGTTCTCCAGCTAAGCCACTACCACCCCGCTCCAAGGCCGCCACGCC  
 CGCTCCTACTATTGCTAGTCAGCCTTTAAGTTTACGACCCGAAGCTTGCAGGCCCGC  
 CGCCGGCGGCGCTGTGCACACCAGGGGGCTTGATTTTGCCTGCGACTTTTGGGTATT  
 GGTAGTGGTGGGCGGAGTTTTAGCCTGCTACAGCCTCCTGGTAACAGTGGCTTTTAT  
 CATCTTTTGGGTGAAGAAGGTTGCAAAAAACCTACTAATAAGGCTCCCCATCCTAA  
 GCAAGAGCCCCAAGAAATTAACCTTTCCCGATGATCTTCCGGGTTCTAACACGGCAGC  
 CCCGGTGCAGGAGACCCTGCATGGTTGTCAACCCGTCACTCAGGAGGACGGGAAAG  
 AGTCTCGTATCTCCGTCCAGGAGAGACAGGACAAGGACGATAGTAAAGCAGGGATG  
 GAGGAGGACCATAACATACGAGGGACTGGATATCGATCAGACAGCCACGTACGAAG  
 ACATTGTGACACTGAGAAGTGGCGAGGTGAAGTGGTCAGTGGGAGAACATCCGGGG  
 CAGGAATAA

pWF-84:

(SEQ ID NO: 44)

EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKTSGYTFT EYTIHWVRQA PGQSLEWMGN  
 INPNNGGTTY NQKFQGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAAGW  
 NFDYWQGTL VTVSSGKPGS GKPGSGKPGS GKPGSDIVMT QSPDSLAVSL  
 GERATLSCRA SQDVGTAVDW YQQKPDQSPK LLIYWASTRH TGVPDRFTGS  
 GSGTDFTLTI SSLQAEDVAV YFCQQYNSYP LTFGAGTKVE IKFVPVFLPA  
 KPTTTPAPRP PTPAPTIASQ PLSLRPEACR PAAGGAVHTR GLDFACDFWV  
 LVVVGGVLAC YSLLVTVAFI IFWVKKVAKK PTNKAPHPKQ EPQEINFPDD

LPGSNNTAAPV QETLHGCQPV TQEDGKESRI SVQERQDKDD SKAGMEEDHT  
 YEGLDIDQTA TYEDIVTLRT GEVKWSVGEH PGQE-

pWF-85:

(SEQ ID NO: 45)

GAGGTTCAACTTGTTCAATCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCCCGGGGCATCTG  
 TGAAAGTATCATGCAAAACATCCGGCTATACGTTTACCGAATACACCATTCACTGGG  
 TCAGACAGGCTCCCGGTCAAAGCCTCGAATGGATGGGAAATATTAACCCTAACAAT  
 GGCGGAACCATATAATCAGAAATTCCAAGGCCGAGTGACGATAACTGTGATAA  
 GAGTACGTCCACAGCTTACATGGAACTCAGCTCTTTGAGATCCGAAGACACTGCAGT  
 TTATTATTGTGCAGCTGGATGGAACTTCGACTATTGGGGACAAGGGACTCTTGTTAC  
 GGTGTCCAGTGGCAAACCAGGTAGTGGTAAACCCGGAAGCGGCAAGCCCCGGGAGC  
 GGTAACCTGGTAGCGACATCGTCATGACTCAAAGCCCTGACTCACTCGCCGTGAGC  
 CTGGGAGAGCGTGCAACGCTATCTTGTGGGCCTCTCAGGATGTCGGAAGTGTGTA  
 GACTGGTATCAACAGAAACCTGACCAATCACCAAAACTCCTGATTTATTGGGCCTCA  
 ACACGTCACACAGGAGTGCCAGATAGTTTCACAGGTAGTGGCAGTGGAACTGATTT  
 TACTTTGACAATTAGCAGCCTGCAAGCCGAAGATGTAGCCGTTTACTTCTGTCAACA  
 ATATAACTCATACCCACTAACGTTCCGGTGCCGGGACGAAGGTAGAGATTAATTCGT  
 GCCTGTGTTCTCCAGCTAAGCCACTACCACCCCGCTCCAAGGCCGCCACGCC  
 CGCTCCTACTATTGCTAGTCAGCCTTTAAGTTTACGACCCGAAGCTTGCAGGCCCGC  
 CGCCGGCGGCGCTGTGCACACCAGGGGGCTTGATTTTGCCTGCGACTTTTGGGTATT  
 GGTAGTGGTGGGCGGAGTTTTAGCCTGCTACAGCCTCCTGGTAACAGTGGCTTTTAT  
 CATCTTTTGGGTGAAGAAGGTTGCAAAAAACCTACTAATAAGGCTCCCCATCCTAA  
 GCAAGAGCCCCAAGAAATTAACTTTCCCGATGATCTTCCGGGTTCTAACACGGCAGC  
 CCCGGTGCAGGAGACCCTGCATGGTTGTCAACCCGTCCTCAGGAGGACGGGAAAG  
 AGTCTCGTATCTCCGTCCAGGAGAGACAGAAAAGAGGCCGAAAAAAGCTGCTGTAC  
 ATCTTCAAACAACCCTTCATGCGACCTGTTTCAGACGACACAGGAGGAGGACGGCTG  
 CAGCTGTAGTTTTCCCGAAGAAGAGGAGGGAGGATGCGAACTTTAA

pWF-85:

(SEQ ID NO: 46)

EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKTSGYTFT EYTIHWVRQA PGQSLEWMGN  
 INPNNGGTTY NQKFQGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAAGW  
 NFDYWQGTL VTVSSGKPGS GKPGSGKPGS GKPGSDIVMT QSPDSLAVSL  
 GERATLSCRA SQDVGTAVDW YQQKPDQSPK LLIYWASTRH TGVPDRFTGS  
 GSGTDFTLTI SSLQAEDVAV YFCQQYNSYP LTFGAGTKVE IKFVPVFLPA  
 KPTTTPAPRP PTPAPTASQ PLSLRPEACR PAAGGAVHTR GLDFACDFWV

LVVVGGVLAC YSLLVTVAFI IFWVKKVAKK PTNKAPHPKQ EPQEINFPDD  
 LPGSNNTAAPV QETLHGCQPV TQEDGKESRI SVQERQKRGR KKLLYIFKQP  
 FMRPVQTTQE EDGCSCRFPE EEEGGCEL-

pWF-86:

(SEQ ID NO: 47)

EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKTSGYTFT EYTIHWVRQA PGQSLEWMGN  
 INPNNGGTTY NQKFQGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAAGW  
 NFDYWGGTL VTVSSGKPGS GKPGSGKPGS GKPGSDIVMT QSPDSLAVSL  
 GERATLSCRA SQDVGTAVDW YQQKPDQSPK LLIYWASTRH TGVPDRFTGS  
 GSGTDFTLTI SSLQAEDVAV YFCQQYNSYP LTFGAGTKVE IKFVFPVFLPA  
 KPTTTPAPRP PTPAPTIASQ PLSLRPEACR PAAGGAVHTR GLDFACDFWV  
 LVVVGGLVAC YSLLVTVAFI IFWVKKVAKK PTNKAPHPKQ EPQEINFPDD  
 LPGSNTAAPV QETLHGCQPV TQEDGKESRI SVQERQRKKR ISANSTDPVK  
 AAQFEPGRQ MIAIRKRQLE ETNNDYETAD GGYMTLNRA PTDDDKNIYL  
 TLPPNDHVNS NN-

pWF-87:

(SEQ ID NO: 48)

GAGGTTCAACTTGTTCAATCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCCCGGGGCATCTG  
 TGAAAGTATCATGCAAAACATCCGGCTATACGTTTACCGAATACACCATTCACTGGG  
 TCAGACAGGCTCCCGGTCAAAGCCTCGAATGGATGGGAAATATTAACCCTAACAAT  
 GGCGGAACCATATAATCAGAAATTCCAAGGCCGAGTGACGATAACTGTCGATAA  
 GAGTACGTCCACAGCTTACATGGAACTCAGCTCTTTGAGATCCGAAGACACTGCAGT  
 TTATTATTGTGCAGCTGGATGGAACTTCGACTATTGGGGACAAGGGACTCTTGTTAC  
 GGTGTCCAGTGGCAAACCAGGTAGTGGTAAACCCGGAAGCGGCAAGCCCCGGGAGC  
 GGTAACCTGGTAGCGACATCGTCATGACTCAAAGCCCTGACTCACTCGCCGTGAGC  
 CTGGGAGAGCGTGCAACGCTATCTTGTTCGGGCCTCTCAGGATGTCGGAAGTGTGTA  
 GACTGGTATCAACAGAAACCTGACCAATCACAAAACCTCCTGATTTATTGGGCCTCA  
 ACACGTCACACAGGAGTGCCAGATAGGTTACAGGTAGTGGCAGTGGAACTGATTT  
 TACTTTGACAATTAGCAGCCTGCAAGCCGAAGATGTAGCCGTTTACTTCTGTCAACA  
 ATATAACTCATACCCACTAACGTTCCGGTGCCGGGACGAAGGTAGAGATTAATTCGT  
 GCCTGTGTTCTCCAGCTAAGCCACTACCACCCCGCTCCAAGGCCGCCACGCC  
 CGCTCCTACTATTGCTAGTCAGCCTTTAAGTTTACGACCCGAAGCTTGCAGGCCCGC  
 CGCCGGCGGCGCTGTGCACACCAGGGGGCTTGATTTTGCCTGCGACTTTTGGGTATT  
 GGTAGTGGTGGGCGGAGTTTTAGCCTGCTACAGCCTCCTGGTAACAGTGGCTTTTAT  
 CATCTTTTGGGTGATGGCGGCGGGCGGGCCCGGCCGGAAGCGCCGCGCCAGTCT  
 CATCTACGTCCAGTCTGCCACTGGCTGCCCTGAACATGAGAGTGAGACGCCGTTTAT  
 CCCTCTTCTGAATGTGCGGACCCAGGTCGCCGCTGATTGGACCGCCCTGGCCGAAG  
 AGATGGACTTTGAATACTTGGAAATCAGACAGCTGGAAACACAGGCAGACCCAACC  
 GGGAGACTGCTTGACGCCTGGCAGGGACGCCAGGGGCAAGTGTTGGTTCGGTTACT  
 GGAGCTTTTAACTAAGTTGGGCGCGATGACGTGCTGTTGGAGTTAGGACCCAGTAT  
 CGAGGAGGATTGTCAGAAATACATCTTGAAACAGCAGCAGGAGGAGGCGGAAAAG  
 CCCCTGCAGGTGGCGGCCGTTGACAGCAGTGTACCCAGAACAGCTGAGCTGGCCGG  
 CATCACAACCCTGGATGATCCCCTGGGCCACATGCCTGAGAGGTTTCGACGCTTTCAT  
 AAAGAAGGTTGCAAAAAACCTACTAATAAGGCTCCCATCCTAAGCAAGAGCCCC  
 AAGAAATTAACCTTCCCGATGATCTTCCGGGTTCTAACACGGCAGCCCCGGTGCAGG

AGACCCTGCATGGTTGTCAACCCGTCCTCAGGAGGACGGGAAAGAGTCTCGTATC  
TCCGTCCAGGAGAGACAGTGA

pWF-87:

(SEQ ID NO: 49)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTEYTIHWVRQAPGQSLEWMGNINP  
NNGGTTYNQKFQGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGTL  
VTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATLSCRASQDVGTAVD  
WYQQKPDQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQYNS  
YPLTFGAGTKVEIKFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT  
RGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVMAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLA  
ALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQG  
RPGASVGRLELLTKLGRDDVLELGPSIEEDCQKYILKQQQEEAEKPLQVAADVSSVPR  
TAELAGITLDDPLGHMPERFDAFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAP  
VQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ-

pWF-88:

(SEQ ID NO: 50)

GAGGTTCAACTTGTTCAATCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCCGGGGCATCTG  
TGAAAGTATCATGCAAAACATCCGGCTATACGTTTACCGAATACACCATTCACTGGG  
TCAGACAGGCTCCCGGTCAAAGCCTCGAATGGATGGGAAATATTAACCCTAACAAT  
GGCGGAACCATATAATCAGAAATTCCAAGGCCGAGTGACGATAACTGTCGATAA  
GAGTACGTCCACAGCTTACATGGAACTCAGCTCTTTGAGATCCGAAGACACTGCAGT  
TTATTATTGTGCAGCTGGATGGAACTTCGACTATTGGGGACAAGGGACTCTTGTTAC  
GGTGTCCAGTGGCAAACCAGGTAGTGGTAAACCCGGAAGCGGCAAGCCCGGGAGC  
GGTAAACCTGGTAGCGACATCGTCATGACTCAAAGCCCTGACTCACTCGCCGTGAGC  
CTGGGAGAGCGTGCAACGCTATCTTGTTCGGGCCTCTCAGGATGTCGGAAGTGTGTA  
GACTGGTATCAACAGAAACCTGACCAATCACCAAACTCCTGATTTATTGGGCCTCA  
ACACGTCACACAGGAGTGCCAGATAGGTTACAGGTAGTGGCAGTGGAACTGATTT  
TACTTTGACAATTAGCAGCCTGCAAGCCGAAGATGTAGCCGTTTACTTCTGTCAACA  
ATATAACTCATACCCACTAACGTTCCGGTGCCGGGACGAAGGTAGAGATTAATTCGT  
GCCTGTGTTCTCCAGCTAAGCCACTACCACCCCGCTCCAAGGCCGCCACGCC  
CGCTCCTACTATTGCTAGTCAGCCTTTAAGTTTACGACCCGAAGCTTGCAGGCCCGC  
CGCCGGCGGCGCTGTGCACACCAGGGGGCTTGATTTTGCCTGCGACTTTTGGGTATT  
GGTAGTGGTGGGCGGAGTTTTAGCCTGCTACAGCCTCCTGGTAACAGTGGCTTTTAT  
CATCTTTTGGGTGAGGAAACGATGGCAGAACGAGAAGCTCGGGTTGGATGCCGGGG  
ATGAATATGAAGATGAAAACCTTTATGAAGGCCTGAACCTGGACGACTGCTCCATG  
TATGAGGACATCTCCCGGGCCTCCAGGGCACCTACCAGGATGTGGGCAGCCTCAA  
CATAGGAGATGTCCAGCTGGAGAAGCCGTGA

pWF-88:

(SEQ ID NO: 51)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTEYTIHWVRQAPGQSLEWMGNINP

NNGGTTYNQKFQGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGGTL  
 VTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATLSCRASQDVGTAVD  
 WYQQKPDQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQYNS  
 YPLTFGAGTKVEIKFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT  
 RGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENL  
 YEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP-

pWF-89:

(SEQ ID NO: 52)

GAGGTTCAACTTGTTCAATCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCCCGGGGCATCTG  
 TGAAAGTATCATGCAAAACATCCGGCTATACGTTTACCGAATACACCATTCACTGGG  
 TCAGACAGGCTCCCGGTCAAAGCCTCGAATGGATGGGAAATATTAACCCTAACAAT  
 GGCGGAACCATATAATCAGAAATTCCAAGGCCGAGTGACGATAACTGTCGATAA  
 GAGTACGTCCACAGCTTACATGGAACTCAGCTCTTTGAGATCCGAAGACACTGCAGT  
 TTATTATTGTGCAGCTGGATGGAACTTCGACTATTGGGGACAAGGGACTCTTGTTAC  
 GGTGTCCAGTGGCAAACCAGGTAGTGGTAAACCCGGAAGCGGCAAGCCCCGGGAGC  
 GGTAACCTGGTAGCGACATCGTCATGACTCAAAGCCCTGACTCACTCGCCGTGAGC  
 CTGGGAGAGCGTGCAACGCTATCTTGTTCGGGCCTCTCAGGATGTCGGAAGTGTGTA  
 GACTGGTATCAACAGAAACCTGACCAATCACCAAACTCCTGATTTATTGGGCCTCA  
 ACACGTCACACAGGAGTGCCAGATAGGTTACAGGTAGTGGCAGTGGAAGTATTT  
 TACTTTGACAATTAGCAGCCTGCAAGCCGAAGATGTAGCCGTTTACTTCTGTCAACA  
 ATATAACTCATACCCACTAACGTTCCGGTGCCGGGACGAAGGTAGAGATTAATTCGT  
 GCCTGTGTTCTCCAGCTAAGCCACTACCACCCCGCTCCAAGGCCGCCACGCC  
 CGCTCCTACTATTGCTAGTCAGCCTTTAAGTTTACGACCCGAAGCTTGCAGGCCCGC  
 CGCCGGCGGCGCTGTGCACACCAGGGGGCTTGATTTTGCCTGCGACTTTTGGGTATT  
 GGTAGTGGTGGGCGGAGTTTTAGCCTGCTACAGCCTCCTGGTAACAGTGGCTTTTAT  
 CATCTTTTGGGTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGGCATGGAGGAAGATCACA  
 CCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGACATAGTGACGCTG  
 CGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGAGTGA

pWF-89:

(SEQ ID NO: 53)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYTIHWVRQAPGQSLEWMGNINP  
 NNGGTTYNQKFQGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGGTL  
 VTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATLSCRASQDVGTAVD  
 WYQQKPDQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQYNS  
 YPLTFGAGTKVEIKFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT  
 RGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVLDKDDSKAGMEEDHTY  
 EGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE-

pWF-391:

(SEQ ID NO: 54)

GAGGTTCAACTTGTTCAATCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCCCGGGGCATCTG

TGAAAGTATCATGCAAAACATCCGGCTATACGTTTACCGAATACACCATTCACTGGG  
 TCAGACAGGCTCCCGGTCAAAGCCTCGAATGGATGGGAAATATTAACCCTAACAAT  
 GGCGGAACCACATATAATCAGAAATTCCAAGGCCGAGTGACGATAACTGTCGATAA  
 GAGTACGTCCACAGCTTACATGGAACTCAGCTCTTTGAGATCCGAAGACACTGCAGT  
 TTATTATTGTGCAGCTGGATGGAACTTCGACTATTGGGGACAAGGGACTCTTGTTAC  
 GGTGTCCAGTGGCAAACCAGGTAGTGGTAAACCCGGAAGCGGCAAGCCCGGGAGC  
 GGTAACCTGGTAGCGACATCGTCATGACTCAAAGCCCTGACTCACTCGCCGTGAGC  
 CTGGGAGAGCGTGCAACGCTATCTTGTCGGGCCTCTCAGGATGTCGGAAGTCTGTA  
 GACTGGTATCAACAGAAACCTGACCAATCACCAAAACTCCTGATTTATTGGGCCTCA  
 ACACGTCACACAGGAGTGCCAGATAGGTTACAGGTAGTGGCAGTGGAAGTCTGATTT  
 TACTTTGACAATTAGCAGCCTGCAAGCCGAAGATGTAGCCGTTTACTTCTGTCAACA  
 ATATAACTCATACCCACTAACGTTCCGGTGCCGGGACGAAGGTAGAGATTAAGGCG  
 CTGGTAGTGGCGGTAAGTGGAGCCACCCTCAATTTGAGAAGGGCGGGTCAGGCGGA  
 TCAGGTGGTAGTGGTGGGTCCAAGTGGAGCCATCCGCAATTTGAAAAGGGCGGAAG  
 CGGCGGTTCCGGCGGTTCCAGGCGGTAGCAACTGGTCACATCCGCAATTTGAGAAAG  
 GCGGGTCAGGCGGCGGGTTTTGGGCTCTCGTGGTGGTGGCTGGAGTGCTTTTCTGCT  
 ATGGCCTGCTGGTAACCGTGGCCCTTTGTGTAATCTGGACCGATAAAGACGATGGAA  
 AAGCCGGGATGGAAGAAGACCATACCTACGAGGGGCTCAATATTGATCAAACCGCC  
 ACGTATGAAGACATTGTAACACTGCGCACAGGTGAGGTCAAGTGGTCCGTCCGGTGA  
 ACACCCAGGACAAGAATAA

pWF-391:

(SEQ ID NO: 55)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKTSQYTFTEYTIHWVRQAPGQSLEWMGNINP  
 NNGGTTYNQKFQGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGTL  
 VTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATLSCRASQDVGTAVD  
 WYQQKPDQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQYNS  
 YPLTFGAGTKVEIKGAGSGGNWVSHYPQFEKGGSGGSGGSGGSGNWSHPQFEKGGSGGSGG  
 SGGSNWSHPQFEKGGSGGGFWALVAVVAGVLFYGLLVTVALCVIWDKDDGKAGME  
 EDHTYEGLNIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE -

pWF-394:

(SEQ ID NO: 56)

GAAGTCCAATTGGTTGAAAGCGGTGGTGGACTCGTCAAACCTGGCGGTAGCC  
 TTAAACTTTCATGTGCCGCAAGCGGCTTCACGTTTAGTAACTATGCTATGAGTTGGG  
 TCCGCCAAAGTCCAGAAAAGCGCCTCGAATGGGTGGCGGAGATCTCTGGAGGAGGA  
 ACATATACATATTATCCAGACACCATGACCGGTAGGTTTACAATCTCAAGAGACAAC  
 GCTAAGAACACCCTGTACCTGGAAATGTCAAGCCTGAGATCAGAAGATACGGCCAT  
 GTATTATTGTACGCGCCTACTCGACTATTGGGGTCAAGGAACTCCGTGACGGTGTG  
 AAGCGGAGGAGGTGGGAGCGGAGGAGGCGGAAGTGGCGGTGGTGGCTCTGGTGGC  
 GGTGGAAGTGATATAGTGATGACGCAAGCTGCCTTTTCAAACCTGTTACTTTGGGG  
 ACTAGCGCATCAATCTCCTGTAGGTCCAGCAAATCTTTGCTGCACAGTAATGGAATC

ACCTATCTTTTCTGGTATTTGCAAAAGCCTGGGCAGAGCCCGCAACTGCTGATCTAT  
CAAATGTCAAATCTTGCTTCCGGAGTTCCAGACCGCTTCTCAAGTTCCGGGTCCGGC  
ACTGATTTTACCTTGAGAATTTCTAGGGTTCGAAGCTGAAGACGTCGGTGTCTATTAT  
TGC GCGCAAAACCTTGAGCTTCCATACACCTTCGGGGGGGGCACAAAACCTTGAGAT  
CAAGGGCGCTGGGAGCGGCGGGAATTGGAGTCATCCACAATTCGAAAAGGGTGGGT  
CCGGCGGCAGTGGTGGGAGCGGCAGGAGTAACTGGTCACATCCCCAGTTTGAGAAA  
GGCGGTAGTGGTGGCAGCGGCAGTGGTGGCAGTAATTGGAGCCATCCCCAATT  
CGAAAAGGGCGGTTCCGGCGGCAGGATTTTGGGCTCTTGTTGTGGTGGCCGGAGTATT  
GTTTTGCTATGGCCTGCTCGTTACAGTGGCATTGTGCGTAATTTGGACTGATAAAGA  
CGACGGCAAAGCCGGGATGGAAGAAGATCACACCTATGAGGGGCTTAATATAGATC  
AAACAGCCACATATGAAGATATTGTGACTCTAAGGACTGGAGAGGTTAAATGGAGT  
GTGGGTGAGCATCCAGGACAAGAATAA

pWF-394:

(SEQ ID NO: 57)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQSPPEKRLWVAEISGG  
GTYYTYPDTMTGRFTISRDNKNTLYLEMSLRSEDAMYYCTRLLDYLWQGQTSVTVS  
SGGGSSGGGSSGGGSSGGGSSDIVMTQAAFVSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNGITYLF  
WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAAGVDFSSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNL  
LPYTFGGGTKLEIKGAGSGGNWVHPQFEKGGSGGSGGSGGSGNWSHPQFEKGGSGGSGG  
SGGSGNWSHPQFEKGGSGGFWALVAVVAGVLFYGLLVTVVAVLWTDKDDGKAGME  
EDHTYEGLNIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE-

pWF-396:

(SEQ ID NO: 58)

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAGGG  
TCACCATCTCCTGCTCTGGAACCAGGTCCAACATTGGGAGTGATTATGTTTCCTGGT  
ACCAACACCTCCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCGTTTATGGCGATAATCTGCGAC  
CCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGG  
GCATCACCGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGCACATGGGAT  
TACACCCTGAATGGTGTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTTCT  
AGAGGTGGTGGTGGTAGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCTCGAGAT  
GGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC  
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGG  
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGT  
AGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGATAA  
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG  
TATATTACTGTGCGCGCACTTCTTACCTGAACCATGGTGTACTGGGGTCAAGGTA  
CTCTGGTGACCGTGTCTAGCGCCGCTGCATTCGTGCCTGTGTTCCCTCCAGCTAAGCC  
CACTACCACCCCGCTCCAAGGCCGCCACGCCCGCTCCTACTATTGCTAGTCAGCC  
TTTAAGTTTACGACCCGAAGCTTGCAGGCCCGCCGCCGGCGGCGCTGTGCACACCAG  
GGGGCTTGATTTTGCCTGCGACTTTTGGGTATTGGTAGTGGTGGGCGGAGTTTTAGC

CTGCTACAGCCTCCTGGTAACAGTGGCTTTTATCATCTTTTGGGTGAGGAAACGATG  
GCAGAACGAGAAGCTCGGGTTGGATGCCGGGGATGAATATGAAGATGAAAACCTTT  
ATGAAGGCCTGAACCTGGACGACTGCTCCATGTATGAGGACATCTCCCGGGGCCTCC  
AGGGCACCTACCAGGATGTGGGCAGCCTCAACATAGGAGATGTCCAGCTGGAGAAG  
CCGTGA

pWF-396:

(SEQ ID NO: 59)

QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGTRSNIQSDYVSWYQHLPGTAPKLLVYGDNLNLR  
PSGIPDRFSASKSGTSATLGITGLQTGDEADYICGTWDYTLNGVVFVGGGKLTVLGSRG  
GGGSGGGGSGGGGSLEMAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ  
APGKGLEWVSVIYSGGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA  
RTSYLNHGDYWGQGLVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA  
CRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRKRWQNEKLG  
DAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTQYQDVGSLNIGDVQLEKP-

pWF-397:

(SEQ ID NO: 60)

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAGGG  
TCACCATCTCCTGCTCTGGAACCAGGTCCAACATTGGGAGTGATTATGTTTCCTGGT  
ACCAACACCTCCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCGTTTATGGCGATAATCTGCGAC  
CCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGG  
GCATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGCACATGGGAT  
TACACCCTGAATGGTGTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTTCT  
AGAGGTGGTGGTGGTAGCGGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCTCGAGAT  
GGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC  
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGG  
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGT  
AGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGATAA  
TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG  
TATATTACTGTGCGCGCACTTCTTACCTGAACCATGGTATTACTGGGGTCAAGGTA  
CTCTGGTGACCGTGTCTAGCGCCGCTGCATTCGTGCCTGTGTTCCCTCCAGCTAAGCC  
CACTACCACCCCGCTCCAAGGCCGCCACGCCCGCTCCTACTATTGCTAGTCAGCC  
TTTAAGTTTACGACCCGAAGCTTGCAGGCCCGCCGCGCGGCGCTGTGCACACCAG  
GGGGCTTGATTTTGCCTGCGACTTTTGGGTATTGGTAGTGGTGGGCGGAGTTTTAGC  
CTGCTACAGCCTCCTGGTAACAGTGGCTTTTATCATCTTTTGGGTGCTGGACAAGGA  
TGACAGCAAGGCTGGCATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACC  
AGACAGCCACCTATGAGGACATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCT  
GTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGAGTGA

pWF-397:

(SEQ ID NO: 61)

QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGTRSNIQSDYVSWYQHLPGTAPKLLVYGDNLNLR

PSGIPDRFSASKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDYTLNGVVFGGGTKLTVLGSRG  
 GGGSGGGGSGGGGSLEMAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ  
 APGKGLEWVSVIYSGGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA  
 RTSYLNHGDIYWGQGLVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA  
 CRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVLDKDDSKAGME  
 EDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

pWF-460:

(SEQ ID NO: 62)

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAGGG  
 TCACCATCTCCTGCTCTGGAACCAGGTCCAACATTGGGAGTGATTATGTTTCCTGGT  
 ACCAACACCTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCGTTTATGGCGATAATCTGCGAC  
 CCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGG  
 GCATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGCACATGGGAT  
 TACACCCTGAATGGTGTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTTCT  
 AGAGGTGGTGGTGGTAGCGGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCTCGAGAT  
 GGCCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGG  
 TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGT  
 AGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGATAA  
 TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG  
 TATATTACTGTGCGCGCACTTCTTACCTGAACCATGGTGTACTGGGGTCAAGGTA  
 CTCTGGTGACCGTGTCTAGCCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCT  
 GCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCACAAGCCCA  
 AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG  
 AGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA  
 CAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTG  
 TCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAACAAGTGCAA  
 GGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGG  
 GCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACC  
 AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCC  
 GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGCAACTACAAGACCACCCCCCAGT  
 GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCA  
 GGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC  
 CACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCGAGCTGCAACTGGAGGAGAGCTG  
 TGCGGAGGGCGCAGGACGGGGAGCTGGACGGGCTGTGGACGACCATCACCATCTTCA  
 TCACACTCTTCCCTGTAAAGCGTGTGCTACAGTGCCACCGTCACCTTCTTCAAGGTGA  
 AGTGGATCTTCTCCTCGGTGGTGGACCTGAAGCAGACCATCATCCCCGACTACAGGA  
 ACATGATCGGACAGGGGGCCTGA

pWF-460:

(SEQ ID NO: 63)

QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGTRSNIGSDYVSWYQHLPGTAPKLLVYGDNL  
 PSGIPDRFSASKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDYTLNGVVFVGGGKLTVLGSRG  
 GGGSGGGGSGGGGSLEMAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ  
 APGKGLEWVSVIYSGGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA  
 RTSYLNHGDIYWGQGLVTVSSPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR  
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG  
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE  
 ALHNHYTQKSLSLPELQLEESCAEAQDGLDGLWTTITIFITLFLLSVCYSATVTFKVK  
 WIFSSVVDLKQTIIPDYRNMIGQGA

pWF-428:

(SEQ ID NO: 64)

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAGGG  
 TCACCATCTCCTGCTCTGGAACCAGGTCCAACATTGGGAGTGATTATGTTTCCTGGT  
 ACCAACACCTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCGTTTATGGCGATAATCTGCGAC  
 CCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGG  
 GCATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGCACATGGGAT  
 TACACCCTGAATGGTGTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCA  
 GCCCAAGGCCAACCCCACTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGC  
 CAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGT  
 GGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCAAACCCT  
 CCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAG  
 CAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGT  
 GGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

pWF-428:

(SEQ ID NO: 65)

QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGTRSNIGSDYVSWYQHLPGTAPKLLVYGDNL  
 PSGIPDRFSASKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDYTLNGVVFVGGGKLTVLGQPK  
 ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSN  
 NKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

pWF-429:

(SEQ ID NO: 66)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGG  
 TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGT  
 AGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGATAA  
 TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG  
 TATATTACTGTGCGCGCACTTCTTACCTGAACCATGGTGATTACTGGGGTCAAGGTA  
 CTCTGGTGACCGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC  
 CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC

TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT  
 GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT  
 GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACA  
 AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC  
 CCACACCTGCCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCT  
 GTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCT  
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTG  
 GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACA  
 GCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCAGGACTGGCTGAACGGC  
 AAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGAC  
 CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCCT  
 CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTC  
 TACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATA  
 CAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCT  
 GACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGC  
 ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGAGCTG  
 CAACTGGAGGAGAGCTGTGCGGAGGGCGCAGGACGGGGAGCTGGACGGGCTGTGGA  
 CGACCATCACCATCTTCATCACACTTCTCTGTTAAGCGTGTGCTACAGTGCCACCGT  
 CACCTTCTTCAAGGTGAAGTGGATCTTCTCCTCGGTGGTGGACCTGAAGCAGACCAT  
 CATCCCCGACTACAGGAACATGATCGGACAGGGGGCCTGA

pWF-429:

(SEQ ID NO: 67)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVIYS  
 GGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTSYLNHGDIYWGQ  
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ  
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLL  
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPLEESCAEAQDGEIDGL  
 WTTITIFITLFLLSVCYSATVTFKVKWIFSSVVDLQKTIIPDYRNMIGQGA-

mu CXCL13

(SEQ ID NO: 68)

ATGAGACTTTCAACAGCAACACTCCTCCTGTTGCTGGCTTCATGTCTGAGCCC  
 TGGTCATGGTATTTTGGAGGCCCACTATACAAATCTCAAATGTCGGTGTTCAGGCGT  
 AATATCCACCGTAGTCGGCCTGAACATTATCGATAGGATTCAGGTTACACCCCCGG  
 GAACGGATGTCCTAAGACCGAGGTGGTGATTTGGACCAAGATGAAGAAGGTCATTT  
 GTGTGAACCCACGGGCTAAATGGCTGCAGCGTCTTTTTCGACACGTGCAGTCCAAG  
 AGCTTGTCCAGCACACCTCAGGCCCCAGTTAGCAAGCGACGTGCAGCC

mu CXCL13

(SEQ ID NO: 69)

MRLSTATLLLLLASCLSPGHGILEAHYTNLKCRCSGVISTVVGLNIIDRIQVTPPGN  
GCPKTEVVIWTKMKKVICVNPRAKWLQRLLRHVQSKSLSSTPQ APVSKRRAA  
mu FLT3LG

(SEQ ID NO: 70)

ATGACAGTGCTGGCCCCCGCGTGGTCTCCCAATAGCTCACTCCTCCTCTTGCT  
GCTACTGCTCAGCCCATGCCTCAGGGGCACCCCCGATTGTTACTTCAGCCACAGCCC  
AATCTCCTCCAACCTTCAAAGTGAAATTTAGGGAACTGACCGACCACCTGCTGAAAG  
ATTATCCTGTGACTGTGGCAGTGAACCTGCAAGACGAAAAGCATTGTAAGGCGCTA  
TGGAGCCTCTTTCTTGCCCAACGATGGATTGAGCAACTCAAACTGTAGCCGGAAGC  
AAAATGCAGACGCTACTGGAGGACGTGAATACTGAGATTCCTTCGTTACCAGTTGT  
ACTTTCCAGCCACTGCCAGAGTGTCTCAGGTTTGTGCAGACTAATATCAGCCACCTG  
CTGAAGGATACTTGCACCCAGCTCCTGGCTCTCAAGCCTTGTATAGGCAAGGCTTGT  
CAAAATTTTAGCAGGTGTCTCGAAGTCCAGTGCCAGCCAGATTCATCCACACTGCTG  
CCGCCCCGAAGCCCTATCGCACTCGAAGCGACAGAGTTGCCAGAGCCTCGTCCCAG  
ACAGCTTCTGCTGCTGCTACTTCTGCTGCTGCCGCTAACTCTGGTGCTACTTGCTGCC  
GCCTGGGGCCTCAGATGGCAACGCGCCAGACGCCGAGGCGAACTCCACCCTGGGGT  
GCCACTGCCATCCCACCCA

mu FLT3LG

(SEQ ID NO: 71)

MTVLAPAWSPNSSLLLLLLLLLSPCLRGTDCYFSPHSHPISSNFKVKFRELTDHLLKD  
YPVTVAVNLQDEKHCKALWSLFLAQRWIEQLKTVAGSKMQTLLEDVNTEIHFVTSCTF  
QPLPECLRFVQTNISHLLKDTCTQLLALKPCIGKACQNF SRCLEVQCQPDSSTLLPPRSPI  
ALEATELPEPRPRQLLLLLLLLLLPLTLVLLAAWGLRWQRARRRGELHPGVPLPS HP

mu XCL1

(SEQ ID NO: 72)

ATGCGACTCTTGTTGTTGACTTTTCTCGGAGTGTGCTGCCTGACACCCTGGGT  
CGTAGAGGGAGTTGGCACTGAAGTACTAGAAGAGTCCTCCTGCGTTAACCTGCAGA  
CACAGCGGCTCCAGTCCAGAAAATTAAGACCTACATTATATGGGAAGGAGCAATG  
CGAGCGGTGATTTTTGTGACCAAGAGGGGTCTCAAGATTTGCGCGGACCCTGAGGC  
CAAGTGGGTCAAAGCAGCTATTAAGACAGTAGACGGAAGAGCCTCCACCAGGAAG  
AATATGGCAGAACTGTACCGACCGGTGCGCAGCGGTCAACATCTACCGCAATCAC  
ACTCACCGGC

mu XCL1

(SEQ ID NO: 73)

MRLLLLTLFLGVCCLTPWVVEGVGTEVLEESSCVNLQTQRLPVQKIKTYIIWEGA  
MRAVIFVTKRGLKICADPEAKWVKAAIKTVDGRASTRKNMAETVPTGAQRSTSTAI  
TLTG

Tim4(ECD) мыши-Fc IgG2a мыши

(SEQ ID NO: 74)

ATGAGCAAGGGCCTTCTCCTGCTGTGGCTAGTAACTGAATTGTGGTGGTTGTA  
 CCTGACACCTGCCGCTAGTGAGGACACCATCATTGGTTTCCTTGGGCAGCCCGTCAC  
 CCTCCCTTGCCATTACCTAAGCTGGAGCCAGTCACGGAACCTCTATGTGCTGGGGAAA  
 GGGGTCATGCCCTAATTCCAAGTGCAACGCCGAGCTGTTGCGCACGGACGGCACCA  
 GAATAATCTCAAGAAAGTCCACCAAGTATACGCTGCTCGGCAAGGTGCAATTCGGT  
 GAAGTGAGCTTGACCATAAGTAACACCAACCGCGGTGACTCCGGAGTTTATTGTTGC  
 AGGATCGAAGTGCCAGGCTGGTTTAACGACGTGAAGAAAAACGTGCGGCTGGAAC  
 GAGGAGGGCAACTACGACCAAGAAACCAACAACCACGACGAGACCTACCACCACT  
 CCTTACGTGACAACCACGACACCGGAGCTGTTGCCAACTACCGTCATGACAACATCT  
 GTGTTGCCAACTACCACCCCCCCCCAAACGCTCGCGACAACCTGCCTTTTCCACAGCC  
 GTTACCACATGTCCTTCCACCACCCCAGGCTCTTTTTCTCAAGAACTACCAAGGGA  
 TCAGCTTTTACCACCGAGTCTGAAACTCTCCCAGCAAGTAATCACTCACAGCGGTCA  
 ATGATGACCATCAGCACAGACATCGCTGTCTTGAGACCTACTGGCAGCAATCCAGG  
 CATTCTGCCCTCCACTTCACAGCTGACTACCCAAAAGACTACACTAACCACCAGCGA  
 AAGTCTGCAGAAAACCTACAAAGAGCCATCAAATAAACTCCCAGGACTCCCAGAG  
 GGCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTG  
 GACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGA  
 GCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAG  
 ATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAG  
 AGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCATCCAGCACCAAGG  
 ACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCCAGCG  
 CCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATA  
 TGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCA  
 TGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAA  
 ACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTC  
 ATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAAGTGGGTGGAAAGAAATAGCTACT  
 CCTGTTCAAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACACACGACTAAGAGCTTCTCCC  
 GGACTCCGGGTAAA

Tim4(ECD) мыши-Fc IgG2a мыши

(SEQ ID NO: 75)

MSKGLLLLWLVTTELWWLYLTPAASEDTIIGFLGQPVTLPCHYLSWSQSRNSMCW  
 GKGSCPNSKCNALLRDTGTRIISRKSTKYTLLGKVQFGEVSLTISNTNRGDSGVYCCRIE  
 VPGWFNDVKKNVRLRRAATTKKPTTTTRPTTTPYVTTTTPELLPTTVMTTSVLPTTTP  
 PQLATTAFAVTTCPSTTPGSFSQETTKGSAFTTESETLPASNHSQRSMMTISTDIAVL  
 RPTGSNPGILPSTSQLTTQKTTLTSESLOKTTKSHQINSRQTPRGPTIKPCPPCKCPAPNL  
 LGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRE  
 DYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP  
 PEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLR  
 VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

mu 4-1BB-L

(SEQ ID NO: 76)

ATGGATCAGCATACTGGACGTGGAAGATACAGCCGATGCCAGACACCCTG  
 CTGGAACGTCCTGTCCCAGCGACGCTGCCCTGCTCAGAGACACCGGGCTGCTCGCAG  
 ATGCTGCTCTGCTGAGTGATACCGTTCGGCCAACTAACGCGGCCCTACCCACAGATG  
 CCGCATATCCCGCGGTAATGTCAGGGACCGGGAAGCTGCCTGGCCACCGGCCCTC  
 AATTTCTGCTCTAGACATCCGAACTGTACGGTCTGGTCGCACTGGTACTGCTGCTA  
 CTTATAGCAGCTTGTGTTCCCATATTTACCCGCACTGAACCCAGACCCGCTCTACTA  
 TTACAACTTCACCAAACCTTGGGCACACGTGAAAACAATGCAGATCAGGTTACCCCTG  
 TAAGTCATATTGGATGCCCAACACCACACAACAGGGAAGTCCGGTGTGTTGCAAAA  
 CTCCTTGCTAAGAATCAGGCTTCACTGTGTAACACTACTCTTAATTGGCACTCACA  
 GACGGGGCCGGGAGTAGCTATCTCAGCCAAGGTCTCCGCTATGAAGAAGATAAGAA  
 AGAGTTGGTGGTGGACAGCCCAGGACTCTACTACGTCTTCTGGAGCTAAAATAA  
 GCCCACTTTTACTAACACTGGACATAAGGTCCAAGGTTGGGTGTCCCTCGTACTTC  
 AAGCTAAACCCAGGTGGACGACTTCGATAACCTGGCGTTGACAGTTGAGCTCTTTC  
 CTTGCTCTATGGAAAATAAGCTCGTGGATCGGAGCTGGTCTCAACTGTTGCTGCTTA  
 AAGCCGGTCATCGTCTGTCTGTTGGACTACGCGCATACTTGCATGGAGCCCAGGACG  
 CATATCGTGATTGGGAACTGAGCTACCCGAATACCACTAGCTTTGGACTATTTCTTG  
 TTAAACCAGATAATCCTTGGGAG

mu 4-1BB-L

(SEQ ID NO: 77)

MDQHTLDVEDTADARHPAGTSCPSDAALLRDTGLLADAALLSDTVRPTNAALP  
 TDAAYPAVNVRDREAAWPPALNFCSRHPKLYGLVALVLLLLIAACVPIFTRTEPRPALT  
 TTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLCNTTLNWHWSQDG  
 AGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPFTNTGCHKVQGWVSLVLQAKP  
 QVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRD  
 WELSYPNNTTSFGLFLVKPDNPWE

LIGHT мыши (мутант с отсутствием расщепления)

(SEQ ID NO: 78)

ATGGAGAGCGTAGTGCAACCCAGCGTATTTGTGGTGGATGGACAGACCGACA  
 TCCCATTACAGACGCTTGAACAGAACCACCGAAGAAGGCGGTGCGGCACCGTCCAG  
 GTGTCCCTCGCTCTCGTGCTGCTGCTTGGTGTGCTGGCCTCGCAACACAAGGGTGGTTT  
 CTTTTGAGACTCCATCAACGCTTGGGAGACATAGTGGCCACCTGCCTGATGGTGGG  
 AAGGGCTCTTGGCAGGACCAGCGATCACACCAGGCTAACCCCGCCGCTCACCTGAC  
 AGGGGCGAATGCCAGCTTGATCGGAATAGGTGGGCCGCTGCTGTGGGAACTAGGC  
 TTGGACTTGCCTTTCTGAGAGGGCTTACATAACCATGACGGAGCCCTCGTAACAATGG  
 AGCCTGGTTATTACTACGTGTACAGTAAGGTGCAGCTTTCTGGAGTCGGGTGTCCCC  
 AGGGGCTGGCTAACGGACTGCCATCACTCATGGACTATACAAACGCACATCCAGA  
 TATCCTAAAGAGCTGGAACCTGTTGGTGTCCCGTAGGAGCCCGTGTGGCAGGGCCAA  
 CTCTTCCCGTGTGTGGTGGGACTCCTCTTTTCTGGGCGGCGTGGTCCATCTGGAAGCT  
 GGTGAGGAAGTCGTCGTAAGAGTACCTGGAAACCGTCTGGTTCGCCCCCGCGATGG

CACCAGGTCCTACTTCGGAGCTTTCATGGTA

LIGHT мыши (мутант с отсутствием расщепления)

(SEQ ID NO: 79)

MESVVQPSV FVVDGQTDIPFRRLEQNHRRRRCGTVQVSLALVLLLGAGLATQG  
WFLRLRHQRLGDIV AHL PDGGKGSWQDQRSHQANPA AHLTGANASLIGIGGPLLWETR  
LGLAFLRGLTYHDGALVTMEPGYYYVYSKVQLSGV GCPQGLANGLPITHGLYKRTSRY  
PKELELLVSRRSPCGRANSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVPGNRLVRPRDGTR  
SYFGAFMV

IL12 мыши (трансмембранная форма)

(SEQ ID NO: 80)

ATGTGCCACAGAACTCACAATTTCTTGGTTCGCAATCGTCCTGCTGGTGTG  
ACCCCTGATGGCAATGTGGGAGTTGGAAAAGGATGTATACGTCGTCGAGGTCGACT  
GGACACCTGACGCTCCGGGTGAACTGTCAACCTCACTTGCGATACTCCTGAAGAG  
GACGACATCACGTGGACGAGCGACCAGCGACATGGAGTGATAGGGTCTGGCAAGAC  
GCTTACTATCACGGTTAAGGAATTTCTCGACGCAGGGCAGTACACATGTCACAAGG  
GCGGCGAGACTCTGAGCCACTCCCATTTGCTGCTGCACAAGAAGGAGAATGGTATC  
TGGTCTACCGAAATCCTGAAGAATTTTAAGAACAAGACTTTTCTGAAATGCGAGGCC  
CCAAATTATTCCGGACGTTTCACTTGCAGTTGGCTCGTTCAAAGAAATATGGACTTG  
AAATTTAACATTAATCCAGCTCTTCATCTCCTGACAGCAGGGCCGTA ACTTGTGGA  
ATGGCTTCATTGTCAGCTGAGAAAGTTACGCTTGACCAAAGGGATTATGAGAAATA  
CAGCGTGAGTTGCCAGGAAGATGTGACATGTCCAACGGCAGAGGAAACGTTGCCAA  
TTGAGCTCGCTTTGGAAGCTCGTCAACAAAACAAGTATGAAA ACTATAGTACTAGCT  
TCTTCATACGGGACATCATCAAACCAGATCCACCTAAGAATTTGCAGATGAAGCCTC  
TGAAGAATTCACAAGTCGAGGTATCCTGGGAATACCCAGATTCATGGTCCACTCCTC  
ATAGTTACTTTAGCCTGAAATTTCTTTGTACGCATACAGCGGAAGAAGGAGAAAATG  
AAGGAGACGGAAGAAGGCTGCAATCAGAAAGGCGCTTTTCTTGTTGAAAAGACGAG  
CACTGAGGTTCAATGCAAAGGCGGGAATGTATGTGTTCAAGCCCAAGATAGGTATT  
ATAATAGCTCCTGCTCTAAGTGGGCTTGC GTACCATGCAGAGTTAGAAGTGGCTCAA  
CCTCAGGCTCCGGAACCTGGTTCCGGTGAAGGTTCCACAAAAGGGCGTGTGATT  
CCTGTGTCCGGCCCAGCTAGGTGTCTCTCCAGTCACGGAATCTCCTGAAAACCACG  
GATGACATGGTAAAGACAGCTAGGGAGAACTCAAGCACTACTCCTGCACAGCTGA  
GGATATCGATCATGAGGACATCACCAGGGACCAGACATCCACTCTGAAA ACTTGCC  
TGCCTTTGGA ACTCCACAAGAACGAATCTTGTCTGGCAACGCGTGAAACGAGTTCTA  
CTACAAGAGGGTCCTGTCTTCCCCCTCAA AAGACAAGCCTTATGATGACCTTGTGTC  
TCGGTAGCATTATGAGGACCTAAAGATGTATCAAACCGAGTTTCAGGCTATCAATG  
CAGCGCTCCAGAATCATAACCATCAGCAGATCATTCTTGACAAAGGAATGCTCGTG  
GCCATTGATGAACTAATGCAGAGCCTAAACCACAATGGCGAGACTCTTCGACAGAA  
ACCGCCTGTGGGCGAGGCCGATCCATATAGAGTCAA AATGAACTGTGTATTCTCCT  
GCATGCATTTAGTACTCGTGTAGTGACTATTAACAGAGTGATGGGTTACCTTTCCTC  
AGCTAATACTTGTCTCTTTGGCGCTGGGTTCCGGCGCCGTCATAACGGTTGTTGTC

ATCGTGGTAATAATCAAGTGCTTTTGCAAGCACAGGTCTTGTTTTCGCAGGAATGAA  
GCCTCTAGAGAAACAAATAATTCACCTGACCTTTGGCCCCGAAGAAGCTCTTGCAGA  
GCAAACGGTGTTCCTC

IL12 мыши (трансмембранная форма)

(SEQ ID NO: 81)

MCPQKL TISWFAIVLLVSPLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTP  
EEDDITWTS DQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGW  
STEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWL VQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASL  
SAEKVTL DQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIP  
DPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQK  
GAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGSTSGSGKPGSGEG  
STKGRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKCLKHYSCTAEDIDHEDITRDQSTL  
KTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAIN  
AALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQLSNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLH  
AFSTRVVTINRVMGYLSSANTLVLF GAGFGAVITVVVIVVIIKCFCKHRSCFRRNEASRE  
TNNSLTFGP EEALAEQTVFL

IL12 мыши (секретируемая форма)

(SEQ ID NO: 82)

ATGTGTCAGTCACGCTATCTTCTCTTCTGCTACTCTGGCCTTGCTCAATCAC  
TTGTCCCTTGCTCGTGTGATTCTGTGTCCGGCCCAGCTAGGTGTCTCTCCAGTCAC  
GGAATCTCCTGAAAACCACGGATGACATGGTAAAGACAGCTAGGGAGAACTCAAG  
CACTACTCCTGCACAGCTGAGGATATCGATCATGAGGACATCACCAGGGACCAGAC  
ATCCACTCTGAAAACCTGCCTGCCTTTGGA ACTCCACAAGAACGAATCTTGTCTGGC  
AACGCGTGAAACGAGTTCTACTACAAGAGGGTCCTGTCTTCCCCCTCAAAGACAA  
GCCTTATGATGACCTTGTGTCTCGGTAGCATTTATGAGGACCTAAAGATGTATCAAA  
CCGAGTTTCAGGCTATCAATGCAGCGCTCCAGAATCATAACCATCAGCAGATCATTC  
TTGACAAAGGAATGCTCGTGGCCATTGATGAACTAATGCAGAGCCTAAACCACAAT  
GGCGAGACTCTTCGACAGAAACCGCCTGTGGGCGAGGCCGATCCATATAGAGTCAA  
AATGAAACTGTGTATTCTCCTGCATGCATTTAGTACTCGTGTAGTGACTATTAACAG  
AGTGATGGGTTACCTTTCTCAGCTGGAAGCGGCGCCACCAACTTCTCCCTGCTGAA  
GCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCCATGTGCCACAGAACTCACAA  
TTTCTTGGTTCGCAATCGTCCTGCTGGTGTCAACCCTGATGGCAATGTGGGAGTTGG  
AAAAGGATGTATACGTCGTCGAGGTGACTGGACACCTGACGCTCCGGGTGAAACT  
GTCAACCTCACTTGCGATACTCCTGAAGAGGACGACATCACGTGGACGAGCGACCA  
GCGACATGGAGTGATAGGGTCTGGCAAGACGCTTACTATCACGGTTAAGGAATTTCT  
CGACGCAGGGCAGTACACATGTCACAAGGGCGGCGAGACTCTGAGCCACTCCCATT  
TGCTGCTGCACAAGAAGGAGAATGGTATCTGGTCTACCGAAATCCTGAAGAATTTTA  
AGAACAAGACTTTTCTGAAATGCGAGGCCCAAATTATTCCGGACGTTTCACTTGCA  
GTTGGCTCGTTCAAAGAAATATGGACTTGAAATTTAACATTAATCCAGCTCTTCAT  
CTCCTGACAGCAGGGCCGTA ACTTGTGGAATGGCTTCATTGTCAGCTGAGAAAGTTA

CGCTTGACCAAAGGGATTATGAGAAATACAGCGTGAGTTGCCAGGAAGATGTGACA  
 TGTTCAACGGCAGAGGAAACGTTGCCAATTGAGCTCGCTTTGGAAGCTCGTCAACA  
 AAACAAGTATGAAAACCTATAGTACTAGCTTCTTCATACGGGACATCATCAAACCAG  
 ATCCACCTAAGAATTTGCAGATGAAGCCTCTGAAGAATTCACAAGTCGAGGTATCCT  
 GGGAATACCCAGATTCATGGTCCACTCCTCATAGTTACTTTAGCCTGAAATTCTTTGT  
 ACGCATAACAGCGGAAGAAGGAGAAAATGAAGGAGACGGAAGAAGGCTGCAATCAG  
 AAAGGCGCTTTTCTTGTGAAAAGACGAGCACTGAGGTTCAATGCAAAGGCGGGAA  
 TGTATGTGTTCAAGCCCAAGATAGGTATTATAATAGCTCCTGCTCTAAGTGGGCTTG  
 CGTACCATGCAGAGTTAGAAGT

IL12 мыши (секретируемая форма)

(SEQ ID NO: 83)

MCQSRYLFLATLALLNHLSLARVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREK  
 LKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLM  
 MTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQLNHNGETLR  
 QKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGSGATNFSLLKQAGDVEE  
 NPGPMCPQKLTISWFAIVLLVSPLMAMWELEKD VYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPE  
 EDDITWTSQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWS  
 TEILKNFKNKTFKCEAPNYSGRFTCSWL VQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLS  
 AEKVTLDRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIKPD  
 PPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKG  
 AFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQ AQDRYYNSSCSKWACVPCRV RS

IFN альфа A2 мыши

(SEQ ID NO: 84)

ATGGCCAGGCTTTGCGCTTTTCTCGTCATGCTGATCGTCATGAGTTACTGGTC  
 CATTTGCAGCCTCGGATGTGATCTGCCCCACACCTACAACCTGCGCAACAAACGAGC  
 TCTCAAAGTGTTGGCCCAAATGAGGCGGTTGCCCTTCCTTTCTGTCTCAAAGACAG  
 GCAAGATTTTGGATTTCCACTAGAGAAAGTAGACAATCAACAGATACAGAAAGCTC  
 AAGCTATCCCCGTGTTGAGGGACTTGACTCAACAGACGTTGAATCTATTTACTAGCA  
 AGGCCAGCTCTGCTGCTTGGAAATGCCACCCTTCTTGACTCATTTTGCAATGACCTAC  
 ATCAACAACCTGAATGATCTCCAAACATGTTTGATGCAGCAGGTAGGTGTCCAAGAA  
 CCCCCGCTTACTCAGGAAGACGCCCTTCTGGCTGTCCGCAAGTACTTTCACAGAATC  
 ACAGTGTACCTGCGCGAAAAGAAACACTCCCCCTGCGCTTGGGAAGTGGTCAGGGC  
 CGAGGTTTGGCGAGCCCTGAGTAGCTCCGTCAATCTCCTTCCTCGGTTGTCCGAGGA  
 GAAAGAG

IFN альфа A2 мыши

(SEQ ID NO: 85)

MARLCAFLVMLIVMSYWSICSLGCDLPHTYNLRNKRALKVLAQMRRLPFLSCLK  
 DRQDFGFPLEKVDNQQIQKAQAIPVLRDLTQQTLNLFTSKASSAAWNATLLDSFCNDLH  
 QQLNDLQTCLMQQVGVQEPPLTQEDALLAVRKYFHRTVYLREKKHSPCAWEVRAE  
 VWRALSSSVNLLPRLSEEKE

mu CD80

(SEQ ID NO: 86)

ATGGCTTGCAACTGTCAGCTCATGCAAGATACTCCCCTGCTTAAGTTTCCCTG  
 CCCTAGACTCATTCTCCTCTTCGTCCTTCTCATTTCGCCTAAGCCAGGTGAGTTCCGAT  
 GTGGATGAACAACTGAGTAAATCTGTCAAGGATAAAGTTCTGCTCCCATGCCGCTAC  
 AATAGCCCCCATGAGGACGAGTCCGAAGATAGGATTTACTGGCAGAAACATGATAA  
 GGTGGTGCTATCCGTCATTGCCGGTAAATTGAAGGTGTGGCCCGAATATAAGAATA  
 GAACCCTGTATGACAACACAACCTTATAGCCTAATCATCCTCGGTCTCGTACTGAGCG  
 ACCGAGGTACTIONACTCATGCGTTGTGCAGAAGAAGGAGCGCGGAACATACGAAGTC  
 AAGCACCTTGCATTGGTGAAATTGTCAATAAAAGCTGACTTTTCAACTCCTAATATT  
 ACTGAATCAGGTAACCCTTCCGCAGACACTAAAAGAATTACATGCTTCGCCTCTGGC  
 GGGTTTCCCAAACCACGGTTCTCTTGGCTAGAGAATGGGAGAGAACTTCCAGGTATC  
 AATACAACCATCTCTCAAGACCCAGAATCAGAACTGTACACCATCTCCAGCCAACCTC  
 GATTTCAATACCACAAGAAATCATAACAATAAAATGTCTGATAAAGTACGGAGATGC  
 ACATGTCTCTGAAGATTTACATGGGAGAAACCACCAGAGGACCCGCCAGACAGCA  
 AGAATACACTTGTCTCTTTGGCGCTGGGTTCGGCGCCGTCATAACGGTTGTTGTCA  
 TCGTGGTAATAATCAAGTGCTTTTGCAAGCACAGGTCTTGTTTTCGCAGGAATGAAG  
 CCTCTAGAGAAACAAATAATTCAGTACTGACCTTTGGCCCCGAAGAAGCTCTTGCAGAGC  
 AAACGGTGTTTCTC

mu CD80

(SEQ ID NO: 87)

MACNCQLMQDTPLLKFPCLLILFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCR  
 YNSPHEDESEDRIYWQKHDKVVLVSVIAGKLVWPEYKNRTLYDNTTYSLILGLVLSDR  
 GTYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKP  
 RFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDHVS  
 DFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFAGFGAVITVVVIVVIKCFCKHRSCFRR NEASRETNNS  
 LTFGPPEALAEQTVFL

mu CD40-L

(SEQ ID NO: 88)

ATGATCGAACTTATTCCCAACCCTCACCGCGCTCAGTAGCAACTGGCCTACC  
 AGCCAGCATGAAGATATTCATGTACCTCTTGACTGTATTCTTGATCACGCAAATGAT  
 TGGTAGTGTTTTGTTTCGCCGTTTATCTCCACAGGCGCCTGGATAAAGTTGAAGAAGA  
 GGTTAATCTCCATGAAGACTTCGTGTTTATTAAGAACTCAAAGATGTAACAAAG  
 GTGAGGGATCTCTGTCTCTTCTGAACTGTGAGGAGATGCGACGGCAATTCGAGGACC  
 TCGTAAAAGACATAACTCTCAACAAAGAAGAGAAGAAAGAAAACCTTTTCGAGATG  
 CAACGGGGCGACGAGGACCCTCAAATTGCCGCACATGTCGTTTCTGAAGCGAATTC  
 CAATGCCGCGTCCGTGCTCCAGTGGGCGAAGAAGGGATACTACACGATGAAGAGCA  
 ACCTTGTGATGCTTGAAAATGGCAAGCAGCTCACAGTTAAACGCGAGGGACTCTAC  
 TATGTATACACCCAAGTGACCTTTTGTTCACACCGGGAGCCAAGTAGCCAACGCCCCG  
 TTCATCGTTGGGCTGTGGCTCAAGCCTTCTTCAGGGAGTGAACGAATCCTTCTCAAG

GCAGCCAACACGCATTCCAGCAGCCAACTGTGTGAGCAACAATCCGTGCATCTTGG  
CGGGGTCTTTGAGCTGCAAGCGGGCGCCTCTGTGTTTCGTGAATGTTACCGAAGCCAG  
CCAGGTTATCCACCGCGTGGGTTTTAGTAGTTTTGGCCTGCTCAAGCTG

mu CD40-L

(SEQ ID NO: 89)

MIETYSQPSRSVATGLPASMKIFMYLLTVFLITQMIGSVLFAVYLHRRLDKVEEE  
VNLHEDFVFIKKLKRCNKGEGSLNCEEMRRQFEDLVKDITLNKEEKKENSFEMQRG  
DEDPQIAAHVVSEANSNAASVLQWAKKGYITMKSNLVMLENGKQLTVKREGLYYVY  
TQVTFCSNREPSSQRPFIVGLWLKPSSGSERILLKAANTHSSSQLCEQQS VHLLGGVFELQ  
AGASVFNVTASQVIHRVGFSSFGLLKL

mu IL21

(SEQ ID NO: 90)

ATGGAGCGTACTCTGGTCTGCCTTGTTGTGATATTCTTGGGGACAGTTGCACA  
CAAATCATCACCCCAAGGACCGGATAGACTCCTCATAACGCTGCGCCATCTGATTGA  
CATTGTCGAGCAGTTGAAGATTTATGAGAACGACCTGGACCCTGAACTATTGAGCGC  
GCCTCAAGACGTCAAAGGGCATTGCGAGCATGCTGCATTTGCATGTTTTAGAAAGC  
TAAGCTCAAACCAAGTAATCCCGGTAACAATAAAACATTCATCATCGACCTGGTGG  
CCCAACTAAGACGCCGGTTGCCGGCGCGCCGGGGTGGTAAGAAACAGAAACATATT  
GCTAAATGCCCTCTTGCGACTCTTACGAGAAAAGGACACCTAAGGAATTCCTCGAA  
CGATTGAAATGGTTGTTGCAGAAGATGATCCATCAACATCTGAGC

mu IL21

(SEQ ID NO: 91)

MERTLVCLVVIFLGTVAHKSSPQGPDRLLIRLRHLIDIVEQLKIYENDLDPELLSAP  
QDV KGHCEHAIFA CFQKAKLKPSNPGNNKTFIIDLVAQLRRRLPARRGGKKQK  
HIAKPCSDSYEK RTPKEFLERLKWLLQKM IHQHLS

mu CCL21

(SEQ ID NO: 92)

ATGGCACAAATGATGACACTGTCCCTACTTAGTCTAGTTCTAGCTTTGTGTAT  
TCCCTGGACTCAAGGCAGTGACGGAGGAGACAAGACTGCTGCCTCAAATATTCTC  
AAAAGAAAATCCCTTATTCTATAGTCCGAGGTTACCGTAAGCAAGAACCGAGTCTA  
GGTTGTCCTATCCCCGCAATCCTCTTTCTACCACGGAAACATAGCAAACCAGAATTG  
TGCGCCAACCCAGAAGAGGGTTGGGTCCAAAATTTGATGAGGCGCCTTGACCAACC  
ACCGGCCCGGGTAAACAATCACCGGGGTGTCGGAAGAATAGGGGTACATCAAAT  
CCGGGAAGAAAGGGAAGGGGAGTAAGGGCTGTAAGAGAACGGAACAAACTCAACC  
TAGCAGAGGT

mu CCL21

(SEQ ID NO: 93)

MAQMMTSLLSLVLALCIPWTQGS DGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPS  
LGCPIPAFLPRKHSKPELCANPEEGWVQNL MRRLDQPPAPGKQSPGCRKNRGTSKSG  
KKGKGSKGCKRTEQTQPSRG

scFv к CD3 мыши-трансмембранный

(SEQ ID NO: 94)

ATGGAAACCGACACATTGCTCCTCTGGGTTCTCCTTCTATGGGTCCCCGGTTC  
 CACCGGAGATATCCAAATGACACAATCACCCAGCAGCCTGCCTGCCTCTCTGGGCG  
 ACCGCGTTACCATCAATTGTCAAGCTTCCCAAGATATAAGTAATTATCTCAACTGGT  
 ACCAGCAAAAGCCCGGTAAAGCGCCTAAATTGCTGATTTATTATACTAATAAACTCG  
 CAGATGGAGTTCCTAGTAGATTTTCTGGTTCAGGGAGTGGACGGGACTCCAGTTTTA  
 CCATATCAAGTCTGGAATCCGAGGATATCGGCAGCTACTATTGCCAGCAATATTATA  
 ATTACCCTTGGACTTTTGGACCCGGGACTAACTTGAGATCAAAGAGGGCGGAGGA  
 GGCAGTGGTGGTGGTGGATCAGGCGGCGGTGGTAGTGAGGTACAACCTCGTGGAATC  
 AGGCGGCGGACTGGTCCAACCCGGCAAGAGCCTTAACTCTCTTGTGAGGCCAGTG  
 GATTTACATTCAGCGGTTATGGAATGCACTGGGTGAGACAAGCTCCCGGCAGGGGC  
 CTAGAATCAGTGGCGTACATCACAGCTCATCAATAAACATTAATAACGCTGATGCA  
 GTCAAGGGCCGGTTTACTGTATCCCGCGACAACGCTAAGAATCTTCTCTTTCTGCAA  
 ATGAACATACTTAAGAGCGAGGATACTGCCATGTATTATTGTGCCCGCTTCGATTGG  
 GATAAGAATTATTGGGGACAAGGCACCATGGTTACCGTTAGTAGTCCAAACATCAC  
 ATCAAATAATAGCAACCCCGTGGAAGGGGACGACTCTGTTTCACTCACCTGTGATTC  
 CTATACCGATCCTGATAATATCAACTATCTATGGTCTCGTAAACGGTGAAAGTCTCAG  
 CGAAGGCGACCGGTTGAAACTCTCCGAAGGTAACAGAACCCTTACGCTTCTGAACG  
 TCACCCGGAACGATACCGGGCCCTATGTTTGCGAAACTAGGAACCCTGTTAGCGTGA  
 ATCGTAGCGACCCTTTCTCCCTAAATAATACTCTAGTGCTATTCGGAGCGGGATTTCG  
 GTGCCGTCATCACAGTAGTCGTTATTGTAGTCATTATTAATGCTTTTGTAAACATAG  
 GTCTTGCTTCAGAAGAAATGAGGCCAGCCGTGAAACTAATAATTCCCTGACCTTTGG  
 GCCCGAAGAAGCTTTGGCTGAACAGACTGTGTTTCTC

scFv к CD3 мыши-трансмембранный

(SEQ ID NO: 95)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLPASLGDRVINCQASQDISNYLN  
 WYQQKPGKAPKLLIYYTNKLADGVPSRFSGSGSGRDSSTISSLESEDIGSYQCQYYNY  
 PWTFGPGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGLSLKLSCEASGFTFS  
 GYGMHWVRQAPGRGLESVAYITSSSINIKYADAVKGRFTVSRDNAKNLLFLQMNILKSE  
 DTAMYYCARFDWDKNYWGQGMVTVSSPNITSNNSNPVEGDDSVSLTCDSTDPDNI  
 NYLWSRNGESLSEGDRLKLSGNRTLTLNVTRNDTGPYVCETRNPSVSVNRSDFSLNN  
 TLVLFGAGFGAVITVVVIVVIKCFCKHRSCFRRNEASRETNNSLTFGPPEALAEQTVFL

TSLP мыши

(SEQ ID NO: 96)

ATGGTTCTTCTCAGGAGCCTCTTCATCCTGCAAGTACTAGTACGGATGGGGCT  
 AACTTACAACCTTTTCTAACTGCAACTTCACGTCAATTACGAAAATATATTGTAACAT  
 AATTTTTCATGACCTGACTGGAGATTTGAAAGGGGCTAAGTTCGAGCAAATCGAGG  
 ACTGTGAGAGCAAGCCAGCTTGTCTCCTGAAAATCGAGTACTATACTCTCAATCCTA  
 TCCCTGGCTGCCCTTCACTCCCCGACAAAACATTTGCCCGGAGAACAAGAGAAGCCC

TCAATGACCACTGCCAGGCTACCCTGAAACTGAGAGAAATGACGGTACTCAGGAA  
 ATGGCACAAGAAGTCCAAAACATCTGCCTGAATCAAACCTCACAAATTCTAAGATT  
 GTGGTATTCCTTCATGCAATCTCCAGAA

TSLP *мышь*

(SEQ ID NO: 97)

MVLLRSLFILQVLVRMGLTYNFSNCNFTSITKIYCNIFHDLTGDLKGAKFEQIED  
 CESKPACLLKIEYYTLNPIPGCPSLPDKTFARRTREALNDHCPGYPETERNDGTQEMAQE  
 VQNICLNQTSQILRLWYSFMQSPE

GM-CSF *мышь*

(SEQ ID NO: 98)

ATGTGGCTGCAGAATTTACTTTTTCTGGGCATTGTGGTCTACAGCCTCTCAGC  
 ACCCACCCGCTCACCCATCACTGTCACCCGGCCTTGAAGCATGTAGAGGCCATCAA  
 AGAAGCCCTGAACCTCCTGGATGACATGCCTGTCACGTTGAATGAAGAGGTAGAAG  
 TCGTCTCTAACGAGTTCTCCTTCAAGAAGCTAACATGTGTGCAGACCCGCCTGAAGA  
 TATTCGAGCAGGGTCTACGGGGCAATTTACCAAACCTCAAGGGCGCCTTGAACATG  
 ACAGCCAGCTACTACCAGACATACTGCCCCCAACTCCGGAAACGGACTGTGAAAC  
 ACAAGTTACCACSTATGCGGATTTTCATAGACAGCCTTAAAACCTTTCTGACTGATAT  
 CCCCTTTGAATGCAAAAAACCAGGCCAAAAA

GM-CSF *мышь*

(SEQ ID NO: 99)

MWLQNLLFLGIVVYLSAPTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVE  
 VVSNEFSFKKLTVCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYQTYCPPTPETDCETQV  
 TTYADFIDSLKTFLTDIPFECKKPGQK

IFN *гамма мышь*

(SEQ ID NO: 100)

ATGAACGCTACACACTGCATCTTGGCTTTGCAGCTCTTCCTCATGGCTGTTTC  
 TGGCTGTTACTGCCACGGCACAGTCATTGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACTATTT  
 TAACTCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAGTCTCTTCTTGGATATCTGGAGGA  
 ACTGGCAAAAAGGATGGTGACATGAAAATCCTGCAGAGCCAGATTATCTCTTTCTACC  
 TCAGACTCTTTGAAGTCTTGAAGACAATCAGGCCATCAGCAACAACATAAGCGTC  
 ATTGAATCACACCTGATTACTACCTTCTTCAGCAACAGCAAGGCGAAAAAGGATGC  
 ATTCATGAGTATTGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAGGTCCAGCGCCAAGCATT  
 CAATGAGCTCATCCGAGTGGTCCACCAGCTGTTGCCGGAATCCAGCCTCAGGAAGC  
 GGAAAAGGAGTCGCTGC

IFN *гамма мышь*

(SEQ ID NO: 101)

MNATHCILALQLFLMAVSGCYCHGTVIESLESNNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWR  
 NWQKDGMKILQSQIISFYLRRLFVLDKNQAISNNISVIESHLITTFNSKAKKDAFMSI  
 AKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSLRKRKRSRC

mu IL7

(SEQ ID NO: 102)

ATGTTCCATGTTTCTTTTAGATATATCTTTGGAATTCCTCCACTGATCCTTGTT  
 CTGCTGCCTGTCACATCATCTGAGTGCCACATTAAGACAAAGAAGGTAAAGCATA  
 TGAGAGTGTACTGATGATCAGCATCGATGAATTGGACAAAATGACAGGAACTGATA  
 GTAATTGCCCGAATAATGAACCAAACCTTTTTTAGAAAACATGTATGTGATGATACAA  
 AGGAAGCTGCTTTTCTAAATCGTGCTGCTCGCAAGTTGAAGCAATTTCTTAAAATGA  
 ATATCAGTGAAGAATTCAATGTCCACTTACTAACAGTATCACAAGGCACACAAACA  
 CTGGTGAAGTGCACAAGTAAGGAAGAAAAAACGTAAAGGAACAGAAAAAGAATG  
 ATGCATGTTTCTAAAGAGACTACTGAGAGAAATAAAAACTTGTGGAATAAAATTT  
 TGAAGGGCAGTATA

mu IL7

(SEQ ID NO: 103)

MFHVSFRYIFGIPPLILVLLPVTSSSECHIKDKEGKAYESVLMISIDELDKMTGTDSN  
 CPNNEPNFFRKHVCDTKEAFLNRAARKLKQFLKMNISEEFNVHLLTVSQGTQTLVN  
 CTSKEEKNVKEQKNDACFLKRLLEIKTCWNKILKGS

ICOS-L мыши

(SEQ ID NO: 104)

ATGCAGCTAAAGTGTCCCTGTTTTGTGTCCTTGGGAACCAGGCAGCCTGTTTG  
 GAAGAAGCTCCATGTTTCTAGCGGGTCTTTTCTGGTCTTGGTCTGTTCTTGCTGCTG  
 TTGAGCAGCCTCTGTGCTGCCTCTGCAGAGACTGAAGTCGGTGCAATGGTGGGCAGC  
 AATGTGGTGTCTCAGCTGCATTGACCCCCACAGACGCCATTTCAACTTGAGTGGTCTG  
 TATGTCTATTGGCAAATCGAAAACCCAGAAGTTTCGGTGACTIONTACTACCTGCCTTAC  
 AAGTCTCCAGGGATCAATGTGGACAGTTCCTACAAGAACAGGGGCCATCTGTCCCT  
 GGACTCCATGAAGCAGGGTAACTTCTCTCTGTACCTGAAGAATGTCACCCCTCAGGA  
 TACCCAGGAGTTCACATGCCGGGTATTTATGAATACAGCCACAGAGTTAGTCAAGAT  
 CTTGGAAGAGGTGGTCAGGCTGCGTGTGGCAGCAAACCTTCAGTACACCTGTCATCA  
 GCACCTCTGATAGCTCCAACCCGGGCCAGGAACGTACCTACACCTGCATGTCCAAG  
 AATGGCTACCCAGAGCCCAACCTGTATTGGATCAACACAACGGACAATAGCCTAAT  
 AGACACGGCTCTGCAGAATAACACTGTCTACTTGAACAAGTTGGGCCTGTATGATGT  
 AATCAGCACATTAAGGCTCCCTTGGACATCTCGTGGGGATGTTCTGTGCTGCGTAGA  
 GAATGTGGCTCTCCACCAGAACATCACTAGCATTAGCCAGGCAGAAAGTTTCACTG  
 GAAATAACACAAAGAACCCACAGGAAACCCACAATAATGAGTTAAAAGTCCTTGTC  
 CCCGTCCTTGCTGTACTGGCGGCAGCGGCATTTCGTTTCTTCATCATATACAGACGC  
 ACGCGTCCCCACCGAAGCTATACAGGACCCAAGACTGTACAGCTTGAAGTTACAGA  
 CCACGCC

ICOS-L мыши

(SEQ ID NO: 105)

MQLKPCFVSLGTRQPVWKKLHVSSGFFSGLGLFLLLLSSLCAASAETEVEGAMV  
 GSNVVLSCIDPHRRHFNL SGLYVYWQIENPEVSVTYYPYKSPGINVDSSYKNRGHLSL  
 DSMKQGNFSLYLKNVTPQDTQEFTCRVFMNTATELVKILEEVVRLRVAANFSTPVISTS

DSSNPGQERTYTCMSKNGYPEPNLYWINTTDNSLIDTALQNNTVYLNKLGLYDVISTLR  
 LPWTSRQDVLCCVENVALHQNITSISQAESFTGNNTKNPQETHNNELKVLVPVLAVLAA  
 AAFVFSIIYRTRPHRSYTGPKTVQLELTD HA

mu CD47

(SEQ ID NO: 106)

ATGTGGCCCTTGGCGGGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCCTGCTGCTGCGGTTCAGC  
 TCAACTACTGTTTAGTAACGTCAACTCCATAGAGTTCACTTCATGCAATGAAACTGT  
 GGTTCATCCCTTGCATCGTCCGTAATGTGGAGGCGCAAAGCACCGAAGAAATGTTTGT  
 GAAGTGGAAGTTGAACAAATCGTATATTTTCATCTATGATGGAAATAAAAATAGCA  
 CTA CTACAGATCAAAACTTTACCAGTGCAAAAATCTCAGTCTCAGACTTAATCAATG  
 GCATTGCCTCTTTGAAAATGGATAAGCGCGATGCCATGGTGGGAAACTACACTTGCG  
 AAGTGACAGAGTTATCCAGAGAAGGCAAAACAGTTATAGAGCTGAAAAACCGCAC  
 GGTTTCGTGGTTTTCTCCAAATGAAAAGATCCTCATTGTTATTTTCCCAATTTTGGCT  
 ATACTCCTGTTCTGGGGAAAGTTTGGTATTTTAACTCAAATATAAATCCAGCCAT  
 ACGAATAAGAGAATCATTCTGCTGCTCGTTGCCGGGCTGGTGCTCACAGTCATCGTG  
 GTTGTGGAGCCATCCTTCTCATCCCAGGAGAAAAGCCCGTGAAGAATGCTTCTGGA  
 CTTGGCCTCATTGTAATCTCTACGGGGATATTAATACTACTTCAGTACAATGTGTTTA  
 TGACAGCTTTTGAATGACCTCTTTCACCATTGCCATATTGATCACTCAAGTGCTGG  
 GCTACGTCCTTGCTTTGGTTCGGGCTGTGTCTCTGCATCATGGCATGTGAGCCAGTGC  
 ACGGCCCCCTTTTGATTTACAGGTTTGGGGATCATAGCTCTAGCAGAACTACTTGGAT  
 TAGTTTATATGAAGTTTGTGCTTCCAACCAGAGGACTATCCAACCTCCTAGGAATA  
 GG

mu CD47

(SEQ ID NO: 107)

MWPLAAALLGSCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCNETVVIPCIVRNVEAQSTEEMF  
 VKWKLNKSIFYDGNKNSTTTDQNFTSAKISVSDLINGIASLKMDKRDAMVGNYTCEV  
 TELSREGKTVIELKNRTVSWFSPNEKILIVIFPILAILLFWGKFGILTLKYKSSHTNKRIILL  
 VAGLVLTIVVVVGAILLIPGEKPVKNASGLGLIVISTGILILLQYNVFMTAFGMTSFTIAILI  
 TQVLGYVLALVGLCLCIMACEPVHGPLLISGLGIIALAEGLVYMKFVASNQRITQPPR  
 NR

Альфа-саркогликан мыши:

(SEQ ID NO: 108)

ATGGCAGCAGCAGTAACTTGGATACCTCTCCTGGCAGGTCTCCTGGCAGGAC  
 TGAGGGACACCAAGGCCAGCAGACA ACTTTACACCTACTTGTGGGTCGTGTGTTT  
 TGCATCCTTTGGAACATGCCACCTTCTGCGCCTTCCAGAACACGTTGCGGTGCCAC  
 CCACTGTCCGACTCACCTACCACGCTCACCTCCAGGGACATCCAGACCTGCCAGGT  
 GGCTGCACTACACACAGCGCAGTCCCTATAACCCTGGCTTCTCTACGGCTCCCCCA  
 CTCCAGAAGATCGTGGGTACCAAGTCATCGAGGTACAGCCTACAATCGAGACAGT  
 TTTGACACCACTAGACAGAGGCTGCTGCTGCTGATTGGGGACCCCGAAGGTCCCCG  
 GTTGCCATAACCAAGCTGAGTTCCTGGTGCGCAGCCATGATGTGGAGGAGGTGCTGCC

CACCACACCTGCCAACCGCTTCCTCACCGCCTTGGGGGGACTGTGGGAGCCAGGAG  
 AGCTTCAGCTGCTCAACATCACTTCCGCCTTGGACCGGGGAGGCCGAGTCCCTCTTC  
 CTATTGAGGGACGGAAGGAAGGGGTATACATTAAGGTAGGCTCTGCCACACCCTTC  
 TCCACCTGCCTGAAGATGGTGGCGTCGCCCCGACAGCTATGCCCGTTGTGCCCAGGGA  
 CAGCCTCCACTACTGTCCTGCTACGACACTTTGGCACCCCACTTCCGCGTTGACTGGT  
 GCAATGTGTCTCTGGTAGACAAGTCAGTACCCGAGCCCCTGGATGAGGTACCTACTC  
 CAGGCGATGGGATCTTGGAGCACGACCCGTTCTTCTGCCACCCCACTGAAGCCACAG  
 ACCGAGACTTCTGACAGATGCCTTGGTGACCCTCTTGGTGCCTTTGTTGGTGGCTCT  
 GCTGCTTACTCTGTTGCTGGCTTACATCATGTGCTTTCGGCGTGAAGGACGGCTGAA  
 GAGAGACATGGCCACCTCTGACATCCAGATGTTTCACCACTGTTCCATCCATGGGAA  
 TACAGAAGAGCTTCGGCAGATGGCAGCCAGCCGAGAGGTGCCCCGGCCTCTTTCCA  
 CCTTGCCCATGTTTAATGTTTCGTACAGGAGAGCGGTTACCTCCCCGAGTAGACAGCG  
 CACAGATGCCTCTTATCCTGGACCAGCAC

Альфа-саркогликан мыши:

(SEQ ID NO: 109)

MAAAVTWIPLLAGLLAGLRDTKAQQTLLHLLVGRVVFVHPLEHATFLRLPEHVA  
 VPPTVRLTYHAHLQGHPLPRWLHYTQRSPYNPGFLYGSPTPEDRGYQVIEVTAYNRDS  
 FDTTRQRLLLLIGDPEGPRLPYQAEFLVRSHDVEEVLPPTPANRFLTALGGLWEPGELQL  
 LNITSALDRGGRVPLPIEGRKEGVYIKVGSATPFSTCLKMVASPDSYARCAQGQPPLLSC  
 YDTLAPHFRVDWCNVSLVDKSVPEPLDEVPTPGDGILEHDPFFCPPTTEATDRDFLTDALV  
 TLLVPLLVALLLTLLLAYIMCFRREGRLKRDMATSDIQMFHHC SIHGNTTEELRQMAASR  
 EVPRPLSTLPMFNVRTGERLPPRVDSAQM PLILDQH

Mu FGF10

(SEQ ID NO: 110)

ATGTGGAAATGGATACTGACACATTGTGCCTCAGCCTTTCCCCACCTGCCGGG  
 CTGCTGTTGCTGCTTCTTGTGCTTTTTTGGTGTCTTCGTTCCCTGTCACCTGCCAAG  
 CTCTTGGTCAGGACATGGTGTACAGGAGGCCACCAACTGCTCTTCTTCCCTCCTCGT  
 CCTTCTCCTCTCCTTCCAGTGCGGGAAGGCATGTGCGGAGCTACAATCACCTCCAAG  
 GAGATGTCCGCTGGAGAAGGCTGTTCTCCTTACCAAGTACTTTCTCACGATTGAGA  
 AGAACGGCAAGGTCAGCGGGACCAAGAATGAAGACTGTCCGTACAGTGTCTTGGAG  
 ATAACATCAGTGGAAATCGGAGTTGTTGCCGTCAAAGCCATCAACAGCAACTATTA  
 CTAGCCATGAACAAGAAGGGGAAACTCTATGGCTCAAAGAGTTTAACAACGACT  
 GTAAGCTGAAAGAGAGAATAGAGGAAAATGGATAACAACACCTATGCATCTTTAAC  
 TGGCAGCACAATGGCAGGCAAATGTATGTGGCATTGAATGGAAAAGGAGCTCCCAG  
 GAGAGGACAAAAACAAGAAGGAAAAACACCTCTGCTCACTTCTTCCCATGACGA  
 TCCAAACA

Mu FGF10

(SEQ ID NO: 111)

MWKWILTHCASAFPHLPGCCCCFLLLFLVSSFPVTCQALGQDMVSQEATNCSSS  
 SSSFSSPSSAGRHVRSYNHLQGDVRRRLFSFTKYFLTIEKNGKVSGTKNEDCPYSVLEI

TSVEIGVVAVKAINSYYLAMNKKGKLYGSKEFNNDCKLKERIEENGYNTYASFNWQH  
NGRQMYVALNGKGAPRRGQKTRRKNTSAHFLPMTIQT

Агрин мыши

(SEQ ID NO: 112)

ATGCCCTCCTCTGCCACTGGAACACAGACCCAGGCAGCAGCCTGGTGCCTCCG  
TGCTGGTTCGGTACTTCATGATCCCCTGCAACATCTGCTTGATCCTCTTGGCTACTTC  
TACGTTGGGCTTTGCGGTGCTGCTTTTCCTCAGCAACTACAAACCTGGGATCCACTTC  
ACAGCAGCGCCTTCTATGCCTCCTGATGTGTGCAGGGGAATGTTATGTGGCTTTGGT  
GCTGTGTGTGAACCTAGTGTGAGGATCCAGGCCGGCCTCCTGTGTGTGCAAGAAG  
AATGTCTGCCCTGCTATGGTAGCTCCTGTGTGTGGCTCAGATGCTTCCACCTATAGC  
AACGAGTGTGAGCTACAGCGTGCACAGTGCAACCAGCAACGGCGCATCCGCCTACT  
CCGCCAAGGGCCATGTGGGTCCCAGGACCCCTGTGCCAATGTGACCTGCAGTTTCGG  
TAGTACCTGTGTACCTTCAGCCGATGGACAGACCGCCTCGTGTCTGTGTCCTACAAC  
CTGCTTTGGGGCCCCTGATGGCACAGTGTGTGGCAGTGATGGTGTGACTACCCTAG  
TGAGTGCCAGCTGCTCCGTCATGCCTGTGCCAACCAGGAGCACATCTTTAAGAAGTT  
CGATGGTCCTTGTGACCCCTGCCAGGGCAGCATGTCAGACCTGAATCATATTTGCCG  
GGTGAACCCACGTACACGGCACCCAGAAATGCTTCTGCGGCCTGAGAACTGCCCCG  
CCCAACACACACCTATCTGTGGAGATGATGGGGTCACCTATGAAAACGACTGTGTC  
ATGAGCCGTATAGGTGCAGCCCGTGGCCTGCTTCTCCAGAAAGTGCCTCTGGTCAA  
TGCCAGACTCGAGACCAGTGCCCGGAGACCTGCCAGTTTAACTCTGTATGCCTGTCC  
CGCCGCGGCCGTCCCCACTGTTCTGCGATCGCGTCACCTGTGATGGGGCTTACAGG  
CCAGTGTGTGCCAGGATGGGCACACGTATGACAATGACTGTTGGCGCCAACAGGC  
CGAGTGTGACAACAGCAGACCATTCCCCCAAGCACCAGGGCCCCTGTGACCAGA  
CCCCATCCCCGTGCCGTGGAGCGCAGTGTGCATTTGGGGCAACATGCACAGTGAAG  
AATGGGAAAGCTGTGTGCGAGTGCCAGCGGGTGTGCTCGGGCGGCTACGATCCTGT  
GTGCGGCAGTGATGGTGTCACTTACGGCAGTGTGTGCGAGCTGGAATCCATGGCCTG  
TACCCTTGGGCGGGAAATCCGAGTGGCCCGCAGAGGACCGTGTGACCGATGTGGGC  
AGTGCCGTTTGGATCCTTGTGCGAGGTGGAGACTGGACGCTGTGTGTGCCCTCTG  
AGTGTGTGGAGTCAGCCAGCCCGTATGTGGCTCTGACGGACACACATATGCTAGTG  
AATGTGAGCTGCATGTCCACGCCTGTACACACCAGATCAGCCTATACGTGGCCTCAG  
CCGGACACTGCCAGACCTGTGGAGAAACAGTTTGTACCTTTGGGGCTGTGTGCTCAG  
CTGGACAGTGTGTATGTCCCCGTTGTGAGCACCCCCACCTGGCCCTGTGTGCGGCA  
GTGATGGCGTCACCTACCTCAGTGCCTGTGAGCTCCGAGAGGCTGCCTGTCAGCAGC  
AGGTACAAATTGAGGAGGCCCGTGCAGGGCCGTGTGAGCCGGCTGAGTGTGGCTCA  
GGGGGCTCTGGGTCTGGGGAAGACAATGCGTGTGAGCAGGAGCTGTGTGCGCAGCA  
TGGTGGTGTCTGGGATGAGGACTCAGAAGACGGGCCGTGTGTCTGTGACTTTAGTTG  
CCAGAGTGTCTTAAAAGCCCAGTGTGTGGCTCAGATGGAGTCACCTATAGCACGG  
AGTGCCATCTGAAGAAGGCCAGATGTGAAGCGCGGCAAGAGCTGTACGTCGCTGCT  
CAGGGAGCCTGCCGGGGCCCTACCTTGGCTCCACTGCTACCTATGGCCTCCCCACAC  
TGTGCCCAAACCCCTATGGCTGCTGCCAGGACAATGTCACTGCTGCCAGGGTGTG

GGCTTGGCTGGCTGTCCCAGCACCTGCCATTGCAACCCACACGGCTCCTATAGCGGC  
ACTTGTGACCCAGTCACAGGGCAGTGCTCCTGCCGACCAGGTGTAGGAGGCCTCAG  
GTGTGATCGCTGTGAGCCTGGCTTCTGGAACCTCCGTGGCATTGTACCCGATGGACA  
TAGTGGTTGCACTCCCTGCAGCTGTGACCCTCGGGGTGCTGTAAGAGATGACTGTGA  
GCAGATGACTGGATTGTGTTCCCTGTAGACCTGGTGTGGCTGGTCCCAAGTGTGGGCA  
GTGTCCAGATGGTCAAGCCCTGGGCCATCTTGGCTGTGAAGCAGATCCCACAACACC  
AGTGACTTGTGTGGAAATGCACTGTGAGTTTGGCGCCTCCTGCGTAGAGGAGGCTGG  
TTTTGCCCAGTGTGTCTGCCAACTCTCACATGTCCAGAGGCTAACTCTACCAAGGT  
CTGTGGATCAGATGGTGTACATAACGGCAATGAATGCCAGCTGAAGACCATTGCCT  
GCCGCCAGCGTCTGGACATCTCCATTCAGAGTCTTGGTCCATGCCGGGAGAGTGTTG  
CTCCTGGGGTTTCCCCTACATCTGCATCTATGACCACCCCAAGGCATATCCTGAGCA  
GGAACTGGCGTCTCCCCACAGCAGCCTTCTCTGTCTCCAGCACTACTGCCCATG  
ATTGGCCCACCCATTACCCACATCACCTCAGACCGTAGTCGGCACCCCCAGGAGCA  
CTGCAGCCACACCCTCTGATGTGGCCAGTCTTGTACAGCGATCTTCAGGGAATCTG  
GCAGCACCAACGGCAGTGGCGATGAGGAGCTCAGTGGCGATGAGGAGGCCAGTGG  
GGCGGGTCTGGGGGACTTGAGCCCCGGTGGGCAGCGTTGTGGTGACCCACGGGC  
CACCCATCGAGAGGGCTTCCCTGTTACAACCTCACCTTTGGGGCTGCTGCTCAGATGGCA  
AGACACCCTCACTGGACTCAGAAGGCTCCAACCTGTCCAGCTACCAAGGCATTCCAG  
GGCGTGCTGGAGCTTGAGGGGGTTCGAGGGACAGGAACCTGTTCTACACACCAGAGAT  
GGCTGACCCCAAGTCAGAGTTGTTTGGGGAGACTGCAAGGAGCATTGAGAGCACGC  
TGACGACCTGTTCCGGAATTCGGATGTTAAGAAGGACTTCTGGAGCATCCGCCTAC  
GGAACTGGGGCCTGGCAAATTAGTCCGTGCCATTGTGGATGTTCACTTTGACCCCA  
CCACAGCCTTCCAGGCACCAGATGTGGGTGAGGCCTTGCTCCAACAGATCCAGGTAT  
CCAGGCCGTGGGCCCTGGCAGTGAGGAGGCCTCTGCGGGAGCATGTGCGATTCTTG  
GACTTTGACTGGTTTCCCCTTTTTTTACGGGAGCTGCAACAGGAACACAGCTGCT  
GTGGCCACAGCCAGAGCCACCACTGTGAGCCGACTGTCTGCCTCTTCTGTCACCCCA  
CGAGTCTACCCAGTTACACCAGCCGGCCTGTTGGCAGAACTACGGCACCCGCTAACC  
ACTCGCCGGCCACCAACCACTACCGCCAGTATTGACCGACCTCGGACTCCAGGCCCG  
CAACGGCCCCAAAGTCCTGTGATTCCCAGCCTTGCTCCACGGAGGTACCTGCCAG  
GACCTGGATTCTGGCAAGGGTTTCAGCTGCAGCTGTACTGCAGGCAGGGCTGGCACT  
GTCTGTGAGAAAGTGCAGCTCCCCTCTGTGCCAGCTTTTAAGGGCCACTCCTTCTTG  
GCCTTCCCCACCCTCCGAGCCTACCACACGCTGCGTCTGGCACTAGAATTCCGGGCG  
CTGGAGACAGAGGGACTGCTGCTCTACAATGGCAATGCACGTGGCAAAGATTTCT  
GGCTCTGGCTCTGTTGGATGGTCATGTACAGTTCAGGTTTCGACACGGGCTCAGGGCC  
GGCGGTGCTAACAAGCTTAGTGCCAGTGGAACCGGGACGGTGGCACCGCCTCGAGT  
TGTACGGCATTGGCGGCAGGGCACACTTTCTGTGGATGGCGAGGCTCCTGTTGTAG  
GTGAAAGTCCGAGTGGCACTGATGGCCTCAACTTGGACACGAAGCTCTATGTGGGT  
GGTCTCCAGAAGAACAAGTTGCCACGGTGCTTGATCGGACCTCTGTGGGCATCGGC  
CTGAAAGGATGCATTCGTATGTTGGACATCAACAACCAGCAGCTGGAGCTGAGCGA  
TTGGCAGAGGGCTGTGGTTCAAAGCTCTGGTGTGGGGGAATGCGGAGACCATCCCT

GCTCACCTAACCCCTGCCATGGCGGGGCCCTCTGCCAGGCCCTGGAGGCTGGCGTGT  
 TCCTCTGTCAGTGCCACCTGGCCGCTTTGGCCAACTTGTGCAGATGAAAAGAACC  
 CCTGCCAACCGAACCCCTGCCACGGGTCAGCCCCCTGCCATGTGCTTTCCAGGGGTG  
 GGGCCAAGTGTGCGTGCCCCCTGGGACGCAGTGGTTCCTTCTGTGAGACAGTCCTGG  
 AGAATGCTGGCTCCCGGCCCTTCTGGCTGACTTTAATGGCTTCTCCTACCTGGA  
 ACTGAAAGGCTTGCACACCTTCGAGAGAGACCTAGGGGAGAAGATGGCGCTGGAGATG  
 GTGTTCTTGGCTCGTGGGCCAGTGGCTTACTCCTCTACAATGGGCAGAAGACGGAT  
 GGCAAGGGGGACTTTGTATCCCTGGCCCTGCATAACCGGCACCTAGAGTTCCGCTAT  
 GACCTTGGCAAGGGGGCTGCAATCATCAGGAGCAAAGAGCCCATAGCCCTGGGCAC  
 CTGGGTTAGGGTATTCCTGGAACGAAATGGCCGCAAGGGTGCCCTTCAAGTGGGTG  
 ATGGGCCCCGTGTGCTAGGGGAATCTCCGAAATCCCGCAAGGTCCCGCACACCATG  
 CTCAACCTCAAGGAGCCCCTCTATGTGGGGGGAGCTCCTGACTTCAGCAAGCTGGCT  
 CGGGGCGCTGCAGTGGCCTCCGGCTTTGATGGTGCCATCCAGCTGGTGTCTCTAAGA  
 GGCCATCAGCTGCTGACTCAGGAGCATGTGTTGCGGGCAGTAGATGTAGCGCCTTTT  
 GCAGGCCACCCTTGTACCCAGGCCGTGGACAACCCCTGCCTTAATGGGGGCTCCTGT  
 ATCCCGAGGGAAGCCACTTATGAGTGCCTGTGTCCTGGGGGCTTCTCTGGGCTGCAC  
 TGCGAGAAGGGGATAGTTGAGAAGTCAGTGGGGGACCTAGAAACACTGGCCTTTGA  
 TGGGCGGACCTACATCGAGTACCTCAATGCTGTGACTGAGAGCGAGCTGACCAATG  
 AGATCCAGCCCCCGAACTCTGGATTCCCGGGCCCTTTTCAGTGAGAAAGCGCTGC  
 AGAGCAACCACTTTGAGCTGAGCTTACGCACTGAGGCCACGCAGGGGCTGGTGCTG  
 TGGATTGGAAAGGTTGGAGAACGTGCAGACTACATGGCTCTGGCCATTGTGGATGG  
 GCACCTACA  
 ACTGAGCTATGACCTAGGCTCCAGCCAGTTGTGCTGCGCTCCACTGT  
 GAAGGTCAACACCAACCGCTGGCTTCGAGTCAGGGCTCACAGGGAGCACAGGGGAAG  
 GTTCCCTTCAGGTGGGCAATGAAGCCCCTGTGACTGGCTCTTCCCCGCTGGGTGCCA  
 CACAATTGGACACAGATGGAGCCCTGTGGCTTGGAGGCCTACAGAAGCTTCTCTGTG  
 GGGCAGGCTCTCCCCAAGGCCTATGGCACGGGTTTTGTGGGCTGTCTGCGGGACGTG  
 GTAGTGGGCCATCGCCAGCTGCATCTGCTGGAGGACGCTGTCACCAAACCAGAGCT  
 AAGACCCTGCCCCACTCTCTGA

Агрин мыши

(SEQ ID NO: 113)

MPPLPLEHRPRQPGASVLVRYFMIPCNICLILLATSTLGFAVLLFLSNYKPGIHFT  
 AAPSMPPDVCRGMLCGFGAVCEPSVEDPGRASCVCKKNVCPAMVAPVCGSDASTYSN  
 ECELQRAQC�QRRIRLLRQGPCGSRDPCANVTCSFGSTCVPSADGQTASCLCPTTCFG  
 APDGTVCGSDGVDYPSECQLLRHACANQEHIFKKFDGPCDPCQGSMSDLNHICRVNPRT  
 RHPEMLLRPENCPAQHTPICGDDGVTYENDCVMSRIGAARGLLLQKVRSGQCQTRDQC  
 PETCQFNSVCLSRGRPHCS  
 CDRVTCDGAYRPVCAQDGHTYDND  
 CWRQQAECRQQQTI  
 PPKHQGPCDQTPSPCRGAQCAF  
 GATCTVKNGKAVCECQRVCSGGYDPVCGSDGVTYGS  
 VCELESMACTLGREIRVARRGPCDRCGQCRFGSLCEVETGRCVCPSECVESAQPVCGSD  
 GHTYASECELHVHACTHQISLYVASAGHCQTCGETVCTFGAVCSAGQCVCPRCEHPPPG  
 PVCSDGVTYLSACELREAACQQQVQIEEARAGPCEPAECGSGGSGSGEDNACEQELCR

QHGGVWDEDESEDGPCVCFDFSCQSVLKSPVCGSDGVTYSTECHLKKARCEARQELYVA  
 AQGACRGPTLAPLLPMASPHCAQTPYGCCQDNVTAAQGVGLAGCPSTCHCNPHGSYSG  
 TCDPVTGQCSCRPGVGGRLRCRCEPGFWNFRGIVTDGHSCTPCSCDPRGAVRDDCEQ  
 MTGLCSCRPGVAGPKCGQCPDGQALGHLGCEADPTTPVTCVEMHCEFGASCVEEAGFA  
 QCVCPILTTCPEANSTKVCSDGVTYGNQCQLKTIACRQRLDISIQSLGPCRESVAPGVSP  
 TSASMTTPRHILSRTLASPHSSLPLSPSTTAHDWPTPLPTSPQTVVGTTPRSTAATPSDVASL  
 ATAFRESGSTNGSGDEELSGDEEASGGGSGGLEPPVGSVVVTHGPPIERASCYNSPLGC  
 CSDGKTPSLDSEGSNCPATKAFQGVLELEGVEGQELFYTPEMADPKSELFGETARSIEST  
 LDDLFRNSDVKKDFWSIRLRELGPGLVRAIVDVHFDPTTAFQAPDVGQALLQQIQVSR  
 PWALAVRRPLREHVRFLDFDWFTFFTTGAATGTTAAVATARATTVSRLSASSVTPRVYP  
 SYTSRPVGRRTTAPLTTRRPPTTTASIDRPRTPGPQRPPKSCDSQPCLHGGTCQDLDSGKGF  
 SCCTAGRAGTVCEKVQLPSVPAFKGHSFLAFPTLRAHYHTLRLALEFRALETEGLLLYN  
 GNARGKDFLALALLDGHVQFRFDTGSGPAVLTSLVPVEPGRWHRLELSRHRQGTLSV  
 DGEAPVVGESPSGTDGLNLDTKLYVGGLEEQVATVLDRTSVGIGLKGCIIRMLDINNQQ  
 LELSDWQRAVVQSSGVGECGDHPCSPNPCHGGALCQALEAGVFLCQCPPGRFGPTCAD  
 EKNPCQPNPCHGSAPCHVLSRGGAKCACPLGRSGSFCETVLENAGSRPFADFNGFSYLE  
 LKGLHTFERDLGEKMALEMVFLARGPSGLLLYNGQKTDGKGFVSLALHNRHLEFRYD  
 LGKGAAIIRSKEPIALGTWVRVFLERNRKGALQVGDGPRVLGESPKSRKVPHTMLNLK  
 EPLYVGGAPDFSKLARGAAVASGFDGAIQLVSLRGHQLLTQEHVLAVDVAPFAGHPC  
 TQAVDNPCLNGGSCIPREATYECLCPGGFSGLHCEKGIVEKSVGDLETAFDGRTYIEYL  
 NAVTESELTNEIPAPETLDSRALFSEKALQSNHFELSLRTEATQGLVLWIGKVERADYM  
 ALAIVDGHQLSYDLGSQPVVLRSTVKVNTNRWLRVRAHREHREGSLQVNEAPVTGS  
 SPLGATQLDTDGALWLGGLQKLPVGQALPKAYGTGFVGLRDVVVGHRLHLEDAV  
 TKPELRPCPTL

Mu IL10

(SEQ ID NO: 114)

ATGCCTGGCTCAGCACTGCTATGCTGCCTGCTCTTACTGACTGGCATGAGGAT  
 CAGCAGGGGCCAGTACAGCCGGAAGACAATAACTGCACCCACTTCCCAGTCGGCC  
 AGAGCCACATGCTCCTAGAGCTGCGGACTGCCTTCAGCCAGGTGAAGACTTTCTTTC  
 AAACAAAGGACCAGCTGGACAACATACTGCTAACCGACTCCTTAATGCAGGACTTT  
 AAGGGTTACTTGGGTTGCCAAGCCTTATCGGAAATGATCCAGTTTTACCTGGTAGAA  
 GTGATGCCCCAGGCAGAGAAGCATGGCCCAGAAATCAAGGAGCATTGAATTCCCT  
 GGGTGAGAAGCTGAAGACCCTCAGGATGCGGCTGAGGCGCTGTCATCGATTTCTCC  
 CCTGTGAAAATAAGAGCAAGGCAGTGGAGCAGGTGAAGAGTGATTTTAATAAGCTC  
 CAAGACCAAGGTGTCTACAAGGCCATGAATGAATTTGACATCTTCATCAACTGCATA  
 GAAGCATAACATGATGATCAAAATGAAAAGCTAA

Mu IL10

(SEQ ID NO: 115)

MPGSALLCCLLLLTMGRISRQYSREDNNCTHFPVGQSHMLLELRTAFSQQVKTFF  
 QTKDQLDNILLTDSLMOQDFKGYLGCQALSEMIQFYLVEVMPQAEKHGPEIKEHLNSLGE

KLKTLRMRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKSDFNKLQDQGVYKAMNEFDIFINCIEAYM  
MIKMKS

Mu MYDGF (C19orf10)

(SEQ ID NO: 116)

ATGGCAGCCCCAGCGGAGGCTTCTGGACTGCGGTGGTCCTGGCGGCCGAG  
CGCTGAAATTGGCCGCGCTGTGTCCGAGCCCACCACCGTGCCATTTGACGTGAGGC  
CCGGAGGGGTCTGTCATTCGTTCTCCCAGGACGTAGGACCCGGGAACAAGTTTACA  
TGTACATTCACCTACGCTTCCCAAGGAGGGACCAACGAGCAATGGCAGATGAGCCT  
GGGGACAAGTGAAGACAGCCAGCACTTTACCTGTACCATCTGGAGGCCCCAGGGGA  
AATCCTACCTCTACTTCACACAGTTCAAGGCTGAGTTGCGAGGTGCTGAGATCGAGT  
ATGCCATGGCCTACTCCAAAGCCGATTTGAGAGAGAGAGTGATGTCCCCCTGAAA  
AGTGAGGAGTTTGAAGTGACCAAGACAGCAGTGTCTCACAGGCCTGGGGCCTTCAA  
AGCTGAGCTCTCCAAGCTGGTGATCGTAGCCAAGGCGGCACGCTCGGAGCTGTGA

Mu MYDGF (C19orf10)

(SEQ ID NO: 117)

MAAPSGGFWTAVVLAALAAALKLAAAVSEPTTVPFDVRPGGVVHSFSQDVGPNGK  
FTCTFTYASQGGTNEQWQMSLGTSEDSQHFTCTIWRPQGKSYLYFTQFKAELRGAEIEY  
AMAYSKAAFERESDVPLKSEEFVTKTAVSHRPGAFKAELSKLVIVAKAARSEL

pWF-521

(SEQ ID NO: 118)

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAGGG  
TCACCATCTCCTGCTCTGGAACCAGGTCCAACATTGGGAGTGATTATGTTTCCTGGT  
ACCAACACCTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCGTTTATGGCGATAATCTGCGAC  
CCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGG  
GCATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGCACATGGGAT  
TACACCCTGAATGGTGTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCA  
GCCCAAGGCCAACCCCACTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGC  
CAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGT  
GGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCAAACCCT  
CCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAG  
CAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGT  
GGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTTCAGGCGCCGGATCTGGTGGAACTGGA  
GTCATCCCCAATTCGAGAAGGGCGGAAGCGGTGGGAGTGGCGGGTCCGGTGGAAAGC  
AACTGGTCACACCACAATTCGAGAAAGGCGGTTCTGGCGGATCTGGTGGATCTGG  
CGGAAGTAACTGGTCTCATCCTCAATTCGAAAAGGGCGGAAGCGGTGGCGGCAGGC  
TAGGTGGAGGCTCAGTGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG  
CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTAT  
GCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTAT  
TTATAGCGGTGGTAGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCAT  
CTCCAGAGATAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG

AGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGCGCACTTCTTACCTGAACCATGGTGATTACT  
 GGGGTCAAGGTACTCTGGTGACCGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT  
 TCCCCCTGGCACCTCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC  
 TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTG  
 ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC  
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA  
 CGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGC  
 TGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACC  
 CTCCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCC  
 CGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCA  
 ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGA  
 GCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACT  
 GGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCC  
 ATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACA  
 CCCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGG  
 TGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC  
 GAGAACAATAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCT  
 GTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCACT  
 GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTG  
 TCCCCCGAGCTGCAACTGGAGGAGAGCTGTGCGGAGGCGCAGGACGGGGAGCTGG  
 ACGGGCTGTGGACGACCATCACCATCTTCATCACACTCTTCTGTTAAGCGTGTGCT  
 ACAGTGCCACCGTCACCTTCTTCAAGGTGAAGTGGATCTTCTCCTCGGTGGTGGACC  
 TGAAGCAGACCATCATCCCCGACTACAGGAACATGATCGGACAGGGGGCCTGA

pWF-521

(SEQ ID NO: 119)

QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGTRSNIGSDYVSWYQHLPGTAPKLLVYGDNLR  
 PSGIPDRFSASKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDYTLNGVVFGGGKLTVLGQPK  
 ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSN  
 NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSGAGSGGNWSHPQFEK  
 GGS GGS GGS GGS NWSHPQFEK GGS GGS GGS GGS NWSHPQFEK GGS GGS GRLGGGSVQV  
 QLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVIYSGGSSTYY  
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTSYLNHGDIYWGQGLVTVSS  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
 SRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLPELQLEESCAEAQDGELDGLWTTITIFITL  
 FLLSVCYSATVTFKVKWIFSSVVDLQTIIPDYRNMIQGA

pWF-533

(SEQ ID NO: 120)

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAGGG  
 TCACCATCTCCTGCTCTGGAACCAGGTCCAACATTGGGAGTGATTATGTTTCCTGGT  
 ACCAACACCTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCGTTTATGGCGATAATCTGCGAC  
 CCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACGTGAGCCACCCTGG  
 GCATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGCACATGGGAT  
 TACACCCTGAATGGTGTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAAtttcaGC  
 CTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG  
 GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG  
 TGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC  
 AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCAGCAGCTTGG  
 GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC  
 AAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGC

pWF-533

(SEQ ID NO: 121)

QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGTRSNIQSDYVSWYQHLPGTAPKLLVYGDNLR  
 PSGIPDRFSASKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDYTLNGVVFGGGKLTVLSSAS  
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
 YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

pWF-534

(SEQ ID NO: 122)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC  
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGG  
 TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGT  
 AGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGATAA  
 TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG  
 TATATTACTGTGCGCGCACTTCTTACCTGAACCATGGTGATTACTGGGGTCAAGGTA  
 CTCTGGTGACCGTGTCTAGCGCCTCCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC  
 ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT  
 CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA  
 ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC  
 AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA  
 AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT  
 GTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCC  
 TCCGTGTTCTGTTCCCCCACAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCC  
 GAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAA  
 CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAG  
 CAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTG  
 GCTGAACGGCAAGGAATAACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCA  
 TCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC

CTGCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCTGACCTGTCTGGTG  
 AAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGA  
 GAACAATAACAAGACCACCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT  
 ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACAGCTGC  
 AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTC  
 CCCCAGCTGCAACTGGAGGAGAGCTGTGCGGAGGGCGCAGGACGGGGAGCTGGAC  
 GGGCTGTGGACGACCATCACCATCTTCATCACACTCTTCCTGTTAAGCGTGTGCTAC  
 AGTGCCACCGTCACCTTCTTCAAGGTGAAGTGGATCTTCTCCTCGGTGGTGGACCTG  
 AAGCAGACCATCATCCCCGACTACAGGAACATGATCGGACAGGGGGCCTGA

pWF-534

(SEQ ID NO: 123)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVIYS  
 GGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTSYLNHGDYWGQ  
 GTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN  
 SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKT  
 HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD  
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLPELQLEESCAEAQD  
 GELDGLWTTITIFITLFLLSVCYSATVTFKVKWIFSSVVDLQTIIPDYRNMIGQGA

mu IL15

(SEQ ID NO: 124)

ATGAAAATTTTGAAACCATATATGAGGAATACATCCATCTCGTGCTACTTGTG  
 TTTCTTCTAAACAGTCACTTTTTAACTGAGGCTGGCATTTCATGTCTTCATTTTGGGC  
 TGTGTCAGTGTAGGTCTCCCTAAAACAGAGGCCAACTGGATAGATGTAAGATATGA  
 CCTGGAGAAAATTGAAAGCCTTATTCAATCTATTTCATATTGACACCACTTTATACAC  
 TGACAGTGACTTTCATCCAGTTGCAAAGTTACTGCAATGAACTGCTTTCTCCTGGA  
 ATTGCAGGTTATTTTACATGAGTACAGTAACATGACTCTTAATGAAACAGTAAGAAA  
 CGTGCTCTACCTTGCAAACAGCACTCTGTCTTCTAACAAGAATGTAGCAGAATCTGG  
 CTGCAAGGAATGTGAGGAGCTGGAGGAGAAAACCTTCACAGAGTTTTTGCAAAGCT  
 TTATACGCATTGTCCAAATGTTTCATCAACACGTCC

mu IL15

(SEQ ID NO: 125)

MKILKPYMRNTSISCYLCFLLNSHFLTEAGIHVFILGCVSVGLPKTEANWIDVRYD  
 LEKIESLIQSIHIDTTLTYTDSDFHPSCKVTAMNCFLELQVILHEYSNMTLNETVRNVLYL  
 ANSTLSSNKNVAESGCKECELEEKTFTEFLQSFIRIVQMFINTS

**ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ**

[0155] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и

индивидуально указаны как включенные посредством ссылки. Однако цитирование ссылочного источника в настоящем документе не следует рассматривать как подтверждение того, что такой ссылочный источник является прототипом настоящего изобретения. В той мере, в какой любые из определений или терминов, приведенных в ссылочных источниках, включенных посредством ссылки, отличаются от терминов и обсуждений, представленных в настоящем документе, настоящие термины и определения имеют преимущественную силу.

#### ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0156] Приведенное выше письменное описание считается достаточным для того, чтобы специалист в данной области техники мог реализовать изобретение на практике. В вышеприведенном описании и примерах подробно описаны некоторые предпочтительные варианты осуществления изобретения и описан наилучший вариант, предусмотренный авторами изобретения. Следует, однако, принимать во внимание, что независимо от того, насколько подробно вышеизложенное может выглядеть в тексте, изобретение может быть реализовано многими способами, и изобретение должно быть истолковано в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

[0157] Следующие примеры, включая проведенные эксперименты и полученные результаты, представлены только в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

#### ПРИМЕРЫ

##### **Пример 1. Конструкции химерного антигенного рецептора для В-клеток (CAR-V) для связывания PSMA.**

[0158] **Конструкции ДНК.** Были разработаны иллюстративные конструкции CAR-V для распознавания простатспецифического мембранного антигена («PSMA»). PSMA представляет собой антиген, экспрессия которого выше на клетках рака предстательной железы, чем на других нераковых клетках. Были созданы различные конструкции, включающие внеклеточный домен, который содержал scFv, специфичный к PSMA, внеклеточную шарнирную область из CD8, трансмембранный домен CD28 и различные внутриклеточные сигнальные домены. Список конструкций приведен в таблице 6.

**ТАБЛИЦА 6**

<b>Конструкция</b>	<b>Описание</b>
pWF-82	pTLPW-SFFV-XENP14484 scFv-hCD8H-hCD28M-hCD19E (SEQ ID NO: 39 и 40)
pWF-83	pTLPW-SFFV-XENP14484 scFv-hCD8H-hCD28M-hCD40E (SEQ ID NO: 41 и 42)
pWF-84	pTLPW-SFFV-XENP14484 scFv-hCD8H-hCD28M-h(CD40+CD79b)E (SEQ ID NO: 43 и 44)
pWF-85	pTLPW-SFFV-XENP14484 scFv-hCD8H-hCD28M-h(CD40+CD137)E

	(SEQ ID NO: 45 и 46)
pWF-86	pTLPW-SFFV-XENP14484 scFv-hCD8H-hCD28M-h(CD40+F <sub>c</sub> γr2a)E (SEQ ID NO: 47)
pWF-87	pTLPW-SFFV-XENP14484 scFv-hCD8H-hCD28M-h(hMyd88+CD40)E (SEQ ID NO: 48 и 49)
pWF-88	pTLPW-SFFV-XENP14484 scFv-hCD8H-hCD28M-hCD79aE (SEQ ID NO: 50 и 51)
pWF-89	pTLPW-SFFV-XENP14484 scFv-hCD8H-hCD28M-hCD79bE (SEQ ID NO: 52 и 53)

[0159] **Экспрессия CAR-B к PSMA на клетках HEK-293.** Конструкции, кодирующие pWF82-pWF89, использовали для получения лентивируса в клетках Lentix с использованием набора для приготовления лентивируса Takara. Экспрессию различных конструкций CAR-B измеряли с помощью проточной цитометрии с использованием антител, специфичных к PSMA (биотин-PSMA, Sinobiological), и результаты показаны на ФИГ. 5.

[0160] **Экспрессия CAR-B к PSMA в В-клетках человека.** Для измерения экспрессии и связывания CAR-B к PSMA в В-клетках были созданы две дополнительные конструкции:

**ТАБЛИЦА 7**

<b>Конструкция</b>	<b>Описание</b>
pWF-391	pMMLV(LTR)-промотор hEF1a-анти hPSMA(XENP14484)-CBCR (SEQ ID NO: 54 и 55)
pWF-394	pMMLV(LTR)-промотор hEF1a-анти саркогликан CBCR1 (SEQ ID NO: 56 и 57)

[0161] Для получения ретровируса использовали вектор на основе MMLV. Ретровирус использовали для заражения В-клеток мыши, выделенных из селезенки. После трансдукции В-клетки дополнительно размножали на фидерных клетках, экспрессирующих CD40L и растворимый IL-4. Экспрессию CAR-B к PSMA определяли с использованием рекомбинантного биотина-PSMA. Меченый PE стрептавидин использовали для обнаружения связывания PSMA в клетках HEK-293.

[0162] **Результаты.** Результаты этого эксперимента представлены на ФИГ. 7 и демонстрируют, что можно создать мышиную В-клетку, экспрессирующую CAR-B, которая может специфично связываться с антигеном. Например, В-клетки, экспрессирующие pWF391, связывались с PSMA, тогда как В-клетки, экспрессирующие pWF394, не связывались с PSMA (pWF394 был разработан для связывания саркогликана, а не PSMA).

**Пример 2. Конструкции химерного антигенного рецептора на В-клетках (В-CAR) для связывания GPC3.**

[0163] **Конструкция ДНК.** Были сконструированы иллюстративные конструкции сVCR для распознавания глипикана-3 (GPC-3). Глипикан-3 экспрессируется на клетках гепатоклеточной карциномы, но не на большинстве нераковых клеток. Были созданы различные конструкции, включающие внеклеточный домен, который содержал scFv, специфичный к GPC-3, внеклеточную шарнирную область из CD8, трансмембранный домен CD28 и различные внутриклеточные сигнальные домены. Был сконструирован дополнительный CAR-B к PSMA в качестве контроля для этих экспериментов. Список конструкций приведен в таблице 8.

**ТАБЛИЦА 8**

<b>Конструкция</b>	<b>Описание</b>
pWF-396	pMMLV(LTR)-промотор hEF1a-анти-GPC3 scFv-hCD8H-hCD28M-hCD79aE (SEQ ID NO: 58 и 59)
pWF-397	pMMLV(LTR)-промотор hEF1a-анти-GPC3 scFv-hCD8H-hCD28M-hCD79bE (SEQ ID NO: 60 и 61)
pWF-398	pMMLV(LTR)-промотор hEF1a-анти-hPSMA(XENP14484) scFv-hCD8H-hCD28M-hCD79aE (SEQ ID NO: 62 и 63)

[0164] **Экспрессия анти-GPC-3 на клетке НЕК-293.** Lentивирусные трансдукции использовали для экспрессии белков CAR-B к GPC3 на поверхности клеток HEK293. Экспрессию определяли с помощью проточной цитометрии с антиидиотипическим антителом, специфичным к GPC-3 (Eureka Therapeutics).

[0165] **Экспрессия CAR-B к GPC-3 в В-клетках человека.** Кодированные конструкции CAR-B pWF 396, 397 и 398 использовали для получения ретровируса MMLV. Этот ретровирус использовали для трансдукции В-клеток мыши, выделенных с помощью отрицательной селекции (Stem Cell Technologies) и активированных в течение 24 часов путем совместного культивирования с клетками HeLa, экспрессирующими CD40L, и добавления растворимого IL-4. Через 48 часов после трансдукции экспрессию подтверждали с помощью проточной цитометрии. Экспрессию CAR-B обнаруживали с использованием антиидиотипического антитела к GPC3 человека. Антиидиотипическое антитело было получено от Eureka Therapeutics.

[0166] **Результаты.** В-клетки мыши, экспрессирующие CAR-B к GPC-3, pWF-396 и 397, были экспрессированы и специфично связаны антиидиотипическим антителом к GPC3.

**Пример 3. Вариант аденовируса F35, экспрессирующий GFP**

[0167] Было показано, что вариант аденовируса F35, экспрессирующий GFP, эффективно инфицирует В-клетки человека. В-клетки человека выделяли из периферической крови. В-клетки инфицировали аденовирусом, кодирующим GFP, в объеме 0, 1, 3, 10 мкл.

**Пример 4. Экспрессия CAR-B in vivo в месте опухоли**

[0168] В-клетки мыши трансдуцировали для экспрессии CAR-B к GPC-3, а затем in vitro подвергали электропорации мРНК, кодирующей репортер люциферазы. Эти

модифицированные клетки внутривенно вводили мышам с иммунодефицитом с развившимися опухолевыми клетками НерG2, экспрессировавшими GPC-3. В несколько моментов времени после инфузии состояние мышей контролировали с помощью визуализации на приборе IVIS. Покадровая визуализация будет измерять накопление модифицированных В-клеток в развившейся опухоли, чтобы установить, что экспрессия CAR-В определенной специфичности наделяет В-клетки способностью осуществлять хоминг и накапливаться в опухоли, экспрессирующей GPC-3.

**Пример 5. Доставка полезных нагрузок в опухолевые клетки**

[0169] Проводили большое скрининговое исследование для изучения влияния полезных нагрузок на фибробласты NIH3T3 в модели CT26. Полезные нагрузки включали различные иммуномодуляторы, включая цитокины и хемокины. Сначала мышам BALB/c инъецировали опухоли CT26 в их левый и правый бок. См. ФИГ. 8. Двенадцать и шестнадцать дней спустя мышам в опухоль в правом боку вводили инъекции различных комбинаций 4-5 полезных нагрузок. Объем опухолей измеряли в течение вплоть до 35 дней.

[0170] **Получение модели опухоли BALB/C CT26.** В общей сложности 139 мышам инъецировали опухоли CT26 в их левый и правый бок.

[0171] **Выбор полезной нагрузки.** Двенадцать пептидов были идентифицированы по их способности (i) рекрутировать и активировать дендритные клетки; (ii) инициировать хоминг и направление дендритных клеток и Т-клеток в место опухоли; и (iii) активировать эффекторные Т-клетки. Отобранные полезные нагрузки перечислены в таблице 9.

**ТАБЛИЦА 9**

Полезная нагрузка	SEQ ID NO:
FLT3L	70, 71
XCL1	72, 73
TIM4-Fc	74, 75
CXCL13	68, 69
mCCL21	92, 93
mCD80 - мембраносвязанный	86, 87
mCD40L - мембраносвязанный	88, 89
mIFN $\alpha$ A2	84, 85
mIL-12	80, 81
mIL-21	90, 91
мутант mLIGHT	78, 79
M4-1BBL - мембраносвязанный	76, 77
mIL-15	124, 125

[0172] Каждой мышам давали либо комбинацию из 4-5 полезных нагрузок, либо все 12 полезных нагрузок, либо клетки 3T3 (без полезной нагрузки), либо физиологический

раствор в качестве контроля. Всего было двадцать семь групп (n=5 мышей/группа). Экспериментальные группы приведены в таблице 10.

**ТАБЛИЦА 10**

<b>№ группы</b>	<b>Введение</b>
1	FLT3L, XCL1, CXCL13, TIM4-Fc, TLR
2	FLT3L, XCL1, CXCL13, CD80-MB
3	FLT3L, XCL1, CXCL13, CD40L-MB, TLR
4	FLT3L, XCL1, CXCL13, IL-12 и TM
5	FLT3L, XCL1, CXCL13, 4-1BBL-MB
6	FLT3L, XCL1, CXCL13, IFN $\alpha$ A2
7	FLT3L, XCL1, LIGHT, TIM4-Fc
8	FLT3L, XCL1, LIGHT, CD80-MB
9	FLT3L, XCL1, LIGHT, CD40L-MB, TLR
10	FLT3L, XCL1, LIGHT, IL-12 и TM
11	FLT3L, XCL1, LIGHT, 4-1BBL-MB
12	FLT3L, XCL1, LIGHT, IFN $\alpha$ A2
13	FLT3L, XCL1, IL-21, TIM4-Fc
14	FLT3L, XCL1, IL-21, CD80-MB
15	FLT3L, XCL1, IL-21, CD40L-MB
16	FLT3L, XCL1, IL-21, IL-12 и TM
17	FLT3L, XCL1, IL-21, 4-1BBL-MB
18	FLT3L, XCL1, IL-21, IFN $\alpha$ A2
19	FLT3L, XCL1, CCL21, TIM4-Fc
20	FLT3L, XCL1, CCL21, CD80-MB
21	FLT3L, XCL1, CCL21, CD40L-MB
22	FLT3L, XCL1, CCL21, IL-12 и TM
23	FLT3L, XCL1, CCL21, 4-1BBL-MB
24	FLT3L, XCL1, CCL21, IFN $\alpha$ A2
25	Все полезные нагрузки
26	Физиологический раствор
27	Клетки 3t3 (без полезной нагрузки)

[0173] **Дозирование.** На момент первой инъекции объем опухолей составлял от 100 мм<sup>3</sup> до 150 мм<sup>3</sup>. Для групп, получивших 4 полезных нагрузки, каждую полезную нагрузку доставляли из расчета  $2,5 \times 10^5$  клеток на инъекцию для доставки в общей сложности  $10^6$  клеток. Для групп, получивших 5 полезных нагрузки, каждую полезную нагрузку

доставляли из расчета [х] клеток на инъекцию для доставки в общей сложности  $3 \times 10^6$  клеток. Пятую полезную нагрузку вводили совместно с поли(I:C), аналогом двухцепочечной РНК. Полезные нагрузки инъецировали интратуморально. Вводимый объем составлял 50 мкл для всех групп, кроме группы поли (I:C) и большой группы с 12 полезными нагрузками, где объем составлял 150 мкл.

[0174] **Процедуры для введения полезных нагрузок.** Клетки собирали с версеном (не в присутствии трипсина). После сбора клетки подсчитывали, центрифугировали и ресуспендировали в объеме, который можно было довести до  $20 \times 10^6$ /мл после повторного подсчета клеток. Все полезные нагрузки доводили до  $20 \times 10^6$ /мл. Обеспечивали агонист TLR (invivogen, кат. № vac-pic) путем ресуспендирования лиофилизированного порошка в воде. Агонист TLR ресуспендировали в концентрации 10 мг/мл и нагревали до 70 °С, а затем оставляли на 1 час при комнатной температуре перед использованием. Доза агониста TLR составляла 50 мкг в 50 мкл.

[0175] **Результаты.** Результаты изображены на ФИГ. 9-11. Несколько комбинаций полезных нагрузок, введенных ипсилатерально, продемонстрировали противоопухолевую активность в контралатеральных опухолях, проявляющуюся в замедлении роста опухоли в этой модели. В группах 3, 8 и 21 наблюдалось наиболее значительное нарушение роста опухоли в течение 30 дней.

**Пример 6. Модифицированные В-клетки, которые экспрессируют и секретируют полезные нагрузки.**

[0176] **План эксперимента.** Модель опухоли CT26 у мышей BALB/c использовали для оценки эффективности модифицированных В-клеток, экспрессирующих различную полезную нагрузку, в отношении объема опухоли и выживаемости. Мышам инъецировали опухолевые клетки в объеме 100 мкл. На 6 день, когда объем опухоли достигал 175 мм<sup>3</sup>, мышам вводили модифицированные В-клетки, экспрессирующие различные полезные нагрузки, как описано ниже. Объем опухолей и выживаемость измеряли в течение 17 дней.

[0177] **Выделение РВМС мышей.** РВМС или спленоциты мышей выделяли из крови или селезенки, соответственно. РВМС выделяли с использованием лимфолита-М (CedarLane, кат. № CL5030). Спленоциты выделяли путем ручного разделения клеток через нейлоновое сито для клеток на 70 мкм. Затем В-клетки выделяли из РВМС или спленоцитов с помощью иммуномагнитной отрицательной селекции с использованием набора для выделения В-клеток мыши EasySep® (Stem Cell Technologies, кат. № 19854).

[0178] **Выбор полезных нагрузок.** Последовательности нуклеиновых кислот, экспрессирующие пептиды или белки полезных нагрузок, трансфицировали или трансдуцировали в выделенные В-клетки. Следующие двенадцать пептидов были идентифицированы по их способности (i) рекрутировать и активировать дендритные клетки; (ii) инициировать хоминг и направление дендритных клеток и Т-клеток в место опухоли; и (iii) активировать эффекторные Т-клетки. Отобранные полезные нагрузки перечислены в таблице 9.

[0179] Каждой мышам давали комбинацию из 4-5 полезных нагрузок, либо

выделенные В-клетки (без полезной нагрузки), либо физиологический раствор в качестве контроля. Всего было двадцать семь групп (n=5 мышей/группа). Экспериментальные группы приведены в таблице 11.

**ТАБЛИЦА 11**

№ группы	Введение
3	FLT3L, XCL1, CXCL13, CD40L-MB, TLR
8	FLT3L, XCL1, mLIGHT, CD80-MB
21	FLT3L, XCL1, CCL21, CD40L-MB
26	Физиологический раствор
27	В-клетки (без полезной нагрузки)

[0180] Получение В-клеток, экспрессирующих полезную нагрузку. Для трансфекции очищенные или культивированные В-клетки промывали и суспендировали в среде Cytoporation Medium T (ВТХ, кат. № 47-0002) в концентрации от  $5 \times 10^6$  до  $25 \times 10^6$  клеток на мл и смешивали с 7,5-50 мкг РНК (конструкции РНК были разработаны и приготовлены самостоятельно или приобретены у TriLink с использованием CleanCap® и полностью замещены псевдо-U). 200 мкл суспензии клеток/РНК подвергали электропорации с использованием системы для электропорации ВТХ Agilpulse®.

[0181] **Дозирование.** На момент первой инъекции объем опухолей составлял от 100 мм<sup>3</sup> до 150 мм<sup>3</sup>. Для групп, получивших 4 полезных нагрузки, каждую полезную нагрузку доставляли из расчета  $2,5 \times 10^5$  клеток на инъекцию для доставки в общей сложности  $10^6$  клеток. Для групп, получивших 5 полезных нагрузок, каждую полезную нагрузку доставляли из расчета  $2,5 \times 10^5$  клеток на инъекцию для доставки в общей сложности  $1,25 \times 10^6$  клеток. Полезные нагрузки инъецировали внутритуморально. Вводимый объем составлял 50 мкл для групп, получивших 4 полезных нагрузки, вводимый объем составлял 100 мкл для групп, получивших 5 полезных нагрузок.

[0182] **Процедуры для введения полезных нагрузок.** Клетки собирали с версенном (не в присутствии трипсина). После сбора клетки подсчитывали, центрифугировали и ресуспендировали в объеме, который можно было довести до  $20 \times 10^6$ /мл. Все полезные нагрузки доводили до  $20 \times 10^6$ /мл. Обеспечивали агонист TLR (InvivoGen, кат. № vac-pic) путем ресуспендирования лиофилизированного порошка в воде. Агонист TLR ресуспендировали в концентрации 10 мг/мл и нагревали до 70 °С, а затем оставляли на 1 час при комнатной температуре перед использованием. Доза агониста TLR составляла 50 мкг в 50 мкл.

#### **Пример 7. Противоопухолевая активность внутритуморально инъецированных В-клеток**

[0183] Спленоциты мышей получали и выделяли путем ручного разделения клеток с использованием нейлонового сита для клеток на 70 мкм. Использовали аутологичных (BALB/c) или аллогенных (C57Bl/6) мышей-доноров (приведенные данные относятся к использованию аллогенных В-клеток). В-клетки выделяли из указанных выше спленоцитов

с помощью иммуномагнитной отрицательной селекции с помощью набора для выделения В-клеток мыши EasySep® (Stem Cell Technologies®, кат. № 19854).

[0184] В-клетки инъецировали либо (i) свежими, либо (ii) предварительно стимулированными в течение 16-24 часов в ростовой среде (RPMI, 10% FBS, 1% пенициллин/стрептомицин, 5 нг/мл рекомбинантного мышинового IL-4, 100 мкМ бета-меркаптоэтанола) посредством 5 мкг/мл липополисахарида. Затем  $5 \times 10^6$  В-клеток внутритуморально инъецировали в мышиную модель СТ26 и измеряли противоопухолевые ответы в дистальной (абскопальной) опухоли. Опухоли имплантировали в 0 день, а на 6 день наблюдали пальпируемую опухолевую массу. Лечение начинали на 6 день внутритуморально. Результаты показаны на фиг. 12.

**Пример 8. Экспрессия химерного антигенного рецептора (CAR) в В-клетках с использованием электропорации РНК для получения CAR В-клеток**

[0185] РВМС или спленциты мышей выделяли из крови или селезенки следующим образом. РВМС мышей выделяли с использованием лимфолита-М (CedarLane, кат. № CL5030), а спленциты выделяли путем ручного разделения клеток посредством пропускания через нейлоновое сито для клеток на 70 мкм. Затем В-клетки выделяли соответственно из РВМС или спленцитов с помощью иммуномагнитной отрицательной селекции с использованием набора для выделения В-клеток мыши EasySep® (Stem Cell Technologies, кат. № 19854).

[0186] Затем В-клетки стимулировали в течение 16-24 часов в ростовой среде (RPMI, 10% FBS, 1% пенициллин/стрептомицин, 5 нг/мл рекомбинантного мышинового IL-4 и 100 мкМ бета-меркаптоэтанола) посредством 5-15 мкг/мл липополисахарида. Затем В-клетки трансдуцировали или трансфицировали с использованием известных методик (вирусная трансфекция или электропорация) для достижения либо стабильной, либо временной экспрессии сBCR (CAR-B). Strep II-метка была включена для посттрансляционного обнаружения. Иллюстративные сBCR (CAR-B) представляют собой следующие:

1. XENP PSMA sBCR (3X strep II-метка)
2. HuHEL10 sBCR (3X strep II-метка)
3. D1.3-M3 HEL sBCR (3X strep II-метка)

[0187] Для трансфекции очищенные или культивированные В-клетки промывали и суспендировали в среде Cytoporation Medium T (VTX, кат. № 47-0002) в концентрации от  $5 \times 10^6$  до  $25 \times 10^6$  клеток на мл и смешивали с 7,5-50 мкг РНК (конструкции РНК были разработаны и приготовлены самостоятельно или приобретены у TriLink с использованием CleanCap® и полностью замещены псевдо-U). Получали 200 мкл суспензии клеток/РНК и подвергали электропорации с использованием системы для электропорации VTX Agilpulse®. Затем клетки промывали в PBS и готовили для в/в инъекции иммунокомпетентным мышам с развившимися опухолевыми клетками HepG2, экспрессировавшими соответствующий антиген (например, GPC3, HEL, PSMA). Трансляцию и экспрессию представляющего интерес белка затем измеряли с использованием антитела к Strep II-метке. Результаты показаны на фиг. 13. На фиг. 13 по

оси X показана сила сигнала экспрессии, измеренная с помощью проточной цитометрии, а по оси Y отложен процент клеток, экспрессирующих желаемый представляющий интерес белок (PSMA, HEL).

[0188] Этот эксперимент демонстрирует, что желаемая последовательность(и) РНК успешно трансфицируется или трансдуцируется (соответственно), РНК успешно транслируется, и желаемый представляющий интерес белок экспрессируется на клеточной поверхности.

**Пример 9. Модифицированные В-клетки, экспрессирующие интегрин и хоминг-рецепторы**

[0189] Конструкции нуклеиновой кислоты, экспрессирующие интегрин, хоминг-рецептор или и то, и другое, конструируют с использованием известных способов. В-клетки мыши и человека трансфицируют или трансдуцируют (соответственно) конструкциями нуклеиновой кислоты для экспрессии интегрина, хоминг-рецептора или и того, и другого. Эти модифицированные клетки внутривенно вводят мышам или человеку-хозяину. Покадровая визуализация будет измерять накопление модифицированных В-клеток в представляющем интерес сайте/мишени, например, в ткани для хоминга или ткани-мишени, в очаге воспаления в определенном месте или ткани, или в опухоли или микроокружении опухоли, чтобы подтвердить, что экспрессия интегрина и/или хоминг-рецептора с определенной специфичностью хоминга наделяет В-клетки способностью осуществлять хоминг и накапливаться в представляющем интерес сайте/мишени, куда желательна доставка терапевтических полезных нагрузок. Проводят скрининговое исследование в соответствии с методиками из примера 5 для изучения доставки и воздействия полезных нагрузок в представляющем интерес сайте/мишени.

**Пример 10. Изменение перемещения В-клеток**

[0190] Выделенные В-клетки культивируют с определенной концентрацией полностью транс-ретиноевой кислоты (ПТРК) или ее производных, которые индуцируют экспрессию интегрина  $\alpha 4\beta 7$  и хоминг-рецептора CCR9. После этого В-клетки собирают и вводят мышам внутривенно. Имеются две экспериментальные группы мышей-реципиентов. Первой группе мышей предварительно вводят DSS или TNBS, чтобы вызвать воспаление кишечника. Второй группе мышей не вводят DSS или TNBS. Предварительное введение DSS или TNBS вызывает воспаление, подобное наблюдаемому при кишечных заболеваниях человека. Введенные В-клетки, обработанные ПТРК или ее производным, будут осуществлять хоминг в области воспаления, соответствующие их потенциалу хоминга, из-за повышенной экспрессии интегрина  $\alpha 4\beta 7$  и хоминг-рецептора CCR9.

**Пример 11. Модифицированные В-клетки, экспрессирующие иммуноингибирующие молекулы.**

[0191] Конструкции нуклеиновых кислот, экспрессирующие иммуноингибирующую молекулу, выбранную из IL-10, TGF- $\beta$ , PD-L1, PD-L2, LAG-3 и TIM-3 или любых их комбинаций, конструируют с помощью известных методик. В-клетки мыши и человека трансфицируют или трансдуцируют (соответственно) конструкциями

нуклеиновой кислоты для экспрессии одной или более иммуноингибирующих молекул, перечисленных выше. Эти модифицированные клетки внутривенно вводят мышам или человеку-хозяину. Покадровая визуализация будет измерять накопление модифицированных В-клеток в представляющем интерес сайте/мишени, например, в ткани для хоминга или ткани-мишени, в очаге воспаления в определенном месте или ткани, или в опухоли или микроокружении опухоли, чтобы подтвердить, что воспаление в сайте и аутоиммунная активность В-клеток, локализованных в этом сайте, снижены, что приводит к положительному терапевтическому ответу.

#### **Пример 12. Активация В-клеток с помощью TLR**

[0192] В-клетки обрабатывают агонистами TLR и/или модифицируют для экспрессии конститутивно активного TLR для применения при повышении активности В-клеток для иммунных ответов и обеспечения высокоактивных эффекторных В-клеток для повышения антигенспецифических иммунных ответов у субъекта. Выделенные В-клетки мыши или человека обрабатывают *in vitro* агонистом TLR одновременно или до введения В-клеток. В некоторых случаях В-клетки мыши или человека обрабатывают более чем одним агонистом TLR.

[0193] Модифицированную В-клетку, трансфицированную или трансдуцированную конструкцией CAR-V из предыдущих примеров или без нее, конструируют для экспрессии одного или более конститутивно активных TLR. Каждый TLR вводят в модифицированную В-клетку (трансдуцированную или трансфицированную с использованием известных методов) в виде конструкции ДНК под контролем конститутивно активированного пути транскрипции. Модифицированную В-клетку, экспрессирующую один или более конститутивно активных TLR (с конструкцией CAR-V или без нее), также обрабатывают одним или более агонистами TLR одновременно или до введения модифицированных В-клеток нуждающемуся в этом субъекту или пациенту. Покадровая визуализация и другие известные методы будут измерять накопление модифицированных В-клеток в желаемом месте и подтверждать экспрессию TLR и любого экспрессированного CAR-V определенной специфичности.

[0194] Этот эксперимент продемонстрирует, что желаемые последовательности ДНК, кодирующие определенные представляющие интерес TLR, успешно трансфицируются или трансдуцируются (соответственно) в В-клетки с конструкцией CAR-V или без нее и обрабатываются агонистами TLR или без них, РНК успешно транслируется, желаемые TLR экспрессируются в В-клетках для обеспечения высокоактивных эффекторных В-клеток, повышая активность В-клеток в части иммунных ответов.

#### **Пример 13. Презентация антигенов в молекулах HLA класса I и класса II с использованием В-клеток, электропорированных РНК**

[0195] **Конструкции мРНК.** Конструируют иллюстративные конструкции мРНК путем слияния определенного антигена, например, опухолевого антигена или антигена инфекционного заболевания, с нацеливающим сигналом лизосомального белка LAMP1 для нацеливания этого определенного антигена на лизосомы и презентации этого антигена

одновременно и эффективно в молекулах HLA как класса I, так и класса II. Опухолевые антигены и антигены инфекционных заболеваний хорошо известны в данной области техники и могут включать любой представляющий интерес антиген, против которого желателен иммунный ответ. Получают различные конструкции мРНК, кодирующие по меньшей мере один определенный представляющий интерес антиген, слитый с нацеливающим сигналом LAMP1, который способен одновременно и эффективно презентировать определенный антиген в молекулах HLA как класса I, так и класса II при трансфекции в подходящую иммунную клетку.

[0196] **План эксперимента.** Выделенные В-клетки мыши или человека подвергают электропорации *in vitro* конструкцией мРНК, описанной выше (т. е. кодирующей определенный представляющий интерес антиген, слитый с нацеливающим сигналом LAMP1) с использованием известных методик электропорации мРНК. В некоторых случаях В-клетки мыши или человека также трансдуцируют или трансфицируют с использованием известных методик конструкцией CAR-V в соответствии с любым из приведенных выше примеров. В-клетки, электропорированные мРНК, трансдуцированные представляющей интерес конструкцией CAR-V или без нее, внутривенно вводят мыши- или человеку-хозяину. Покадровая визуализация будет измерять накопление модифицированных В-клеток в желаемом месте, а также подтверждать экспрессию CAR-V определенной специфичности. Трансляцию и экспрессию определенных представляющих интерес опухолевых антигенов или антигенов инфекционных заболеваний измеряют с использованием известных способов, чтобы установить, что представляющие интерес антигены нацелены на лизосомы и презентуются одновременно и эффективно молекулами HLA как класса I, так и класса II.

[0197] Этот эксперимент продемонстрирует, что желаемая последовательность(и) мРНК, кодирующая определенные представляющие интерес антигены, слитые с нацеливающим сигналом, успешно трансфицируется в В-клетки (которые, при желании, также трансдуцируются конструкцией CAR-V), мРНК успешно транслируется, и электропорированные и модифицированные В-клетки одновременно и эффективно презентуют определенный представляющий интерес антиген в молекулах HLA как класса I, так и класса II для повышения антигенспецифических иммунных ответов у субъекта.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная модифицированная В-клетка, способная экспрессировать интегрин, хоминг-антитело, белок, рецептор или их комбинации, где указанный интегрин, хоминг-антитело, белок или рецептор естественным образом не экспрессируется в В-клетке или экспрессируется на более высоких уровнях по сравнению с естественной экспрессией в В-клетке; и где указанный интегрин, хоминг-антитело, белок, рецептор или их комбинации привлечены к представляющему интерес сайту или мишени.

2. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 82, где интегрин, хоминг-антитело, белок и рецептор выбраны из CLA (гликоформа PSGL-1), CLA (гликоформа PSGL-1), CCR10, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR9, CD43E, CD44, c-Met, CXCR3, CXCR4, LFA-1, LFA-1 ( $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ ), лигандов селектина, VLA-4, VLA-4 ( $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ ) и  $\alpha\text{4}\beta\text{7}$  или их комбинаций.

3. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 83, где представляющий интерес сайт представляет собой ткань для хоминга или ткань-мишень, очаг воспаления в определенном месте или ткани, или опухоль или микроокружение опухоли, куда желательна доставка полезных нагрузок.

4. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 84, где ткань для хоминга или ткань-мишень выбрана из кожи, кишечника (кишечного тракта, толстой кишки, брыжеечных лимфатических узлов (БЛУ), пейеровой бляшки (ПБ), тонкой кишки), печени, легкого, костного мозга, сердца, периферического лимфатического узла (ЛУ), ЦНС (центральная нервная система), вилочковой железы и костного мозга.

5. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 85, где представляющая интерес мишень выбрана из CXCL16, CCL17, CCL17(22), CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), CCL21, CCL25, CCL27, CCL28, CCL4, CCL5, CD62E, CD62P, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CXCL16, CXCL9/CXCL10, CXCR3, E/P-селектина, E-селектина, GPR15L, HGF, гиалуроната, ICAM-1, лигандов для CCR1, 2, 5, MAdCAM, MAdCAM-1, PNA $\beta$ , VAP-1, VCAM и VCAM-1 или их комбинаций.

6. Способ лечения пациента, включающий введение выделенной модифицированной В-клетки по п. 82.

7. Способ по п. 87, дополнительно включающий введение соединения или его производного, где соединение или его производное способно повышать экспрессию интегрина, хоминг-антитела, белка и рецептора или их комбинаций.

8. Способ по п. 88, где соединение или его производное способно изменять перемещение В-клеток к представляющему интерес сайту или мишени у пациента.

9. Способ по п. 89, где соединение представляет собой полностью транс-ретиноевую кислоту (ПТРК) или ее производное.

10. Выделенная модифицированная В-клетка, способная экспрессировать иммуноингибирующую молекулу, где указанная иммуноингибирующая молекула естественным образом не экспрессируется в В-клетке или экспрессируется на более высоких уровнях по сравнению с естественной экспрессией в В-клетке.

11. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 91, где указанная

иммуноингибирующая молекула выбрана из IL-10, TGF- $\beta$ , PD-L1, PD-L2, LAG-3 и TIM-3 или их комбинаций.

12. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 92, где указанная иммуноингибирующая молекула способна снижать воспаление и аутоиммунную активность В-клеток в представляющем интерес сайте или мишени у пациента.

13. Способ лечения пациента, включающий введение выделенной модифицированной В-клетки по п. 91.

14. Способ по п. 94, где указанная иммуноингибирующая молекула выбрана из IL-10, TGF- $\beta$ , PD-L1, PD-L2, LAG-3 и TIM-3 или их комбинаций.

15. Способ по п. 95, где указанная иммуноингибирующая молекула способна снижать воспаление и аутоиммунную активность В-клеток в представляющем интерес сайте или мишени у пациента.

16. Способ по п. 96, дополнительно включающий введение соединения или его производного, способного повышать экспрессию интегрина, хоминг-антитела, белка, рецептора или их комбинаций в В-клетке.

17. Способ по п. 97, где указанное соединение или его производное способно изменять перемещение В-клеток к представляющему интерес сайту или мишени у пациента.

18. Способ по п. 98, где указанное соединение представляет собой полностью транс-ретиновую кислоту (ПТРК) или ее производное.

19. Выделенная модифицированная В-клетка, где выделенная модифицированная В-клетка обработана соединением или его производным, где указанное соединение или его производное способно повышать экспрессию интегрина, хоминг-антитела, белка, рецептора или их комбинаций в В-клетках.

20. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 100, где указанное соединение или его производное способно изменять перемещение В-клеток к представляющему интерес сайту или мишени у пациента.

21. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 101, где указанное соединение представляет собой полностью транс-ретиновую кислоту (ПТРК) или ее производное.

22. Способ лечения пациента, включающий введение выделенной модифицированной В-клетки по п. 100, где указанное соединение или его производное способно (i) повышать экспрессию интегрина, хоминг-антитела, белка, рецептора или их комбинаций в В-клетках и (ii) изменять перемещение В-клеток к представляющему интерес сайту или мишени у пациента.

23. Способ по п. 103, где указанное соединение представляет собой полностью транс-ретиновую кислоту (ПТРК) или ее производное.

24. Выделенная модифицированная В-клетка, способная экспрессировать по меньшей мере один или более конститутивно активных толл-подобных рецепторов (TLR), где указанный TLR естественным образом не экспрессируется в В-клетке или экспрессируется на более высоких уровнях по сравнению с естественной экспрессией в В-

клетке.

25. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 105, где указанный TLR выбран из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и TLR13 или их комбинаций.

26. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 106, где указанный TLR способен повышать активность В-клеток для повышения иммунных ответов у пациента.

27. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 107, где указанный TLR способен обеспечивать высокоактивные эффекторные В-клетки для повышения иммунных ответов у пациента.

28. Способ лечения пациента, включающий введение выделенной модифицированной В-клетки по п. 105, где указанная иммуноингибирующая молекула способна снижать воспаление и аутоиммунную активность В-клеток в представляющем интерес сайте или мишени у пациента.

29. Способ по п. 109, где указанный TLR выбран из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и TLR13 или их комбинаций.

30. Способ по п. 110, где указанный TLR способен (i) повышать активность В-клеток и (ii) обеспечивать высокоактивные эффекторные В-клетки для повышения иммунных ответов у пациента.

31. Способ по п. 111, дополнительно включающий введение пациенту по меньшей мере одного или более агонистов TLR.

32. Выделенная модифицированная В-клетка, где выделенная модифицированная В-клетка обработана по меньшей мере одним или более агонистами TLR.

33. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 113, где указанный агонист TLR способен (i) повышать активность В-клеток и (ii) обеспечивать высокоактивные эффекторные В-клетки для повышения иммунных ответов у пациента.

34. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 114, где указанный агонист TLR связывается с одним или более TLR, выбранными из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 и TLR13 или их комбинаций.

35. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 115, где указанный агонист TLR выбран из CpG-богатых олигонуклеотидов, миметиков двухцепочечной РНК, полиинозиновой кислоты:полицитидиловой кислоты (поли-I:C).

36. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 116, где указанный агонист TLR включает CpG-олигонуклеотиды.

37. Способ лечения пациента, включающий введение выделенной модифицированной В-клетки по п. 113.

38. Способ по п. 118, где указанный агонист TLR способен (i) повышать активность В-клеток и (ii) обеспечивать высокоактивные эффекторные В-клетки для повышения иммунных ответов у пациента.

39. Способ по п. 119, где указанный агонист TLR связывается с одним или более TLR, выбранными из TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10,

TLR11, TLR12 и TLR13 или их комбинаций.

40. Способ по п. 120, где указанный агонист TLR выбран из CpG-богатых олигонуклеотидов, миметиков двухцепочечной РНК, полиинозиновой кислоты:полицитидиловой кислоты (поли-И:С).

41. Способ по п. 121, где указанный агонист TLR включает CpG-олигонуклеотиды.

42. Выделенная модифицированная В-клетка, где указанная В-клетка подвергнута электропорации мРНК, кодирующей по меньшей мере один или более антигенов, слитых с нацеливающим сигналом.

43. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 123, где указанный антиген (i) естественным образом не презентуется В-клеткой, (ii) естественным образом не презентуется В-клеткой одновременно в молекулах HLA как класса I, так и класса II, или (iii) естественным образом не презентуется В-клеткой с высокой эффективностью в молекулах HLA как класса I, так и класса II.

44. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 124, где указанный нацеливающий сигнал представляет собой нацеливающий сигнал лизосомального белка.

45. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 125, где указанный нацеливающий сигнал представляет собой нацеливающий сигнал лизосома-ассоциированного мембранного белка-1 (LAMP1).

46. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 126, где указанный антиген способен нацеливаться на лизосомы и одновременно и эффективно презентироваться в молекулах HLA как класса I, так и класса II.

47. Выделенная модифицированная В-клетка по п. 127, где указанные В-клетки способны повышать антигенспецифические иммунные ответы у пациента.

48. Способ лечения пациента, включающий введение выделенной модифицированной В-клетки по п. 123.

49. Способ по п. 129, где указанный антиген (i) естественным образом не презентуется В-клеткой, (ii) естественным образом не презентуется В-клеткой одновременно в молекулах HLA как класса I, так и класса II, или (iii) естественным образом не презентуется В-клеткой с высокой эффективностью в молекулах HLA как класса I, так и класса II.

50. Способ по п. 130, где указанный нацеливающий сигнал представляет собой нацеливающий сигнал лизосомального белка.

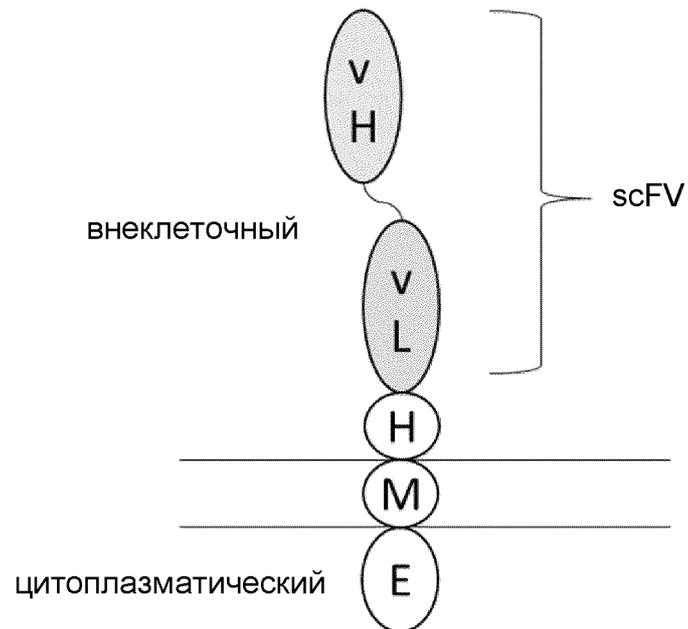
51. Способ по п. 131, где указанный нацеливающий сигнал представляет собой нацеливающий сигнал лизосома-ассоциированного мембранного белка-1 (LAMP1).

52. Способ по п. 132, где указанный антиген способен нацеливаться на лизосомы и одновременно и эффективно презентироваться в молекулах HLA как класса I, так и класса II.

53. Способ по п. 133, где указанные В-клетки способны повышать антигенспецифические иммунные ответы у пациента.

По доверенности

Пример sBCR на клеточной  
мембране



vH: переменная область тяжелой цепи

vL: переменная область легкой цепи

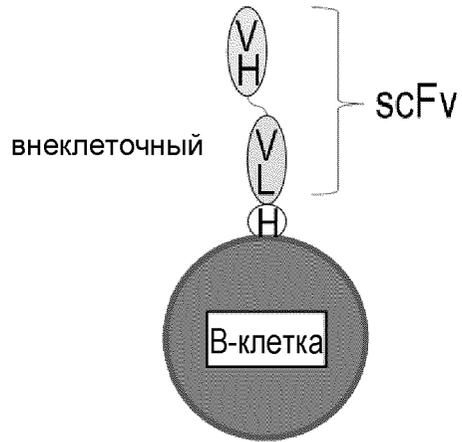
H: шарнирная область

M: трансмембранный домен

E: цитоплазматический сигнальный домен

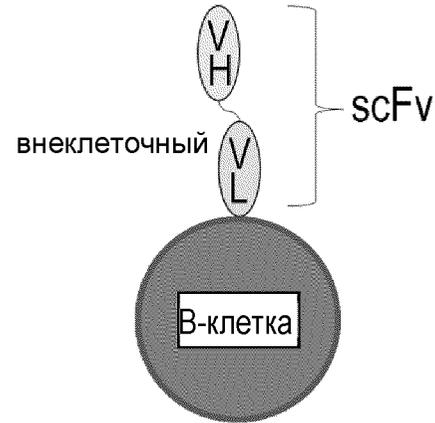
ФИГ. 1

### Сконструированные В-клетки с хоминг-доменом



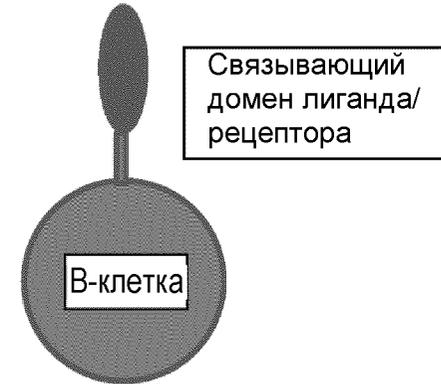
Сконструированная В-клетка со связывающим доменом scFv и необязательным шарнирным доменом (линкером)

ФИГ. 2А



Сконструированная В-клетка со связывающим доменом scFv, непосредственно связанным с клеткой

ФИГ. 2В



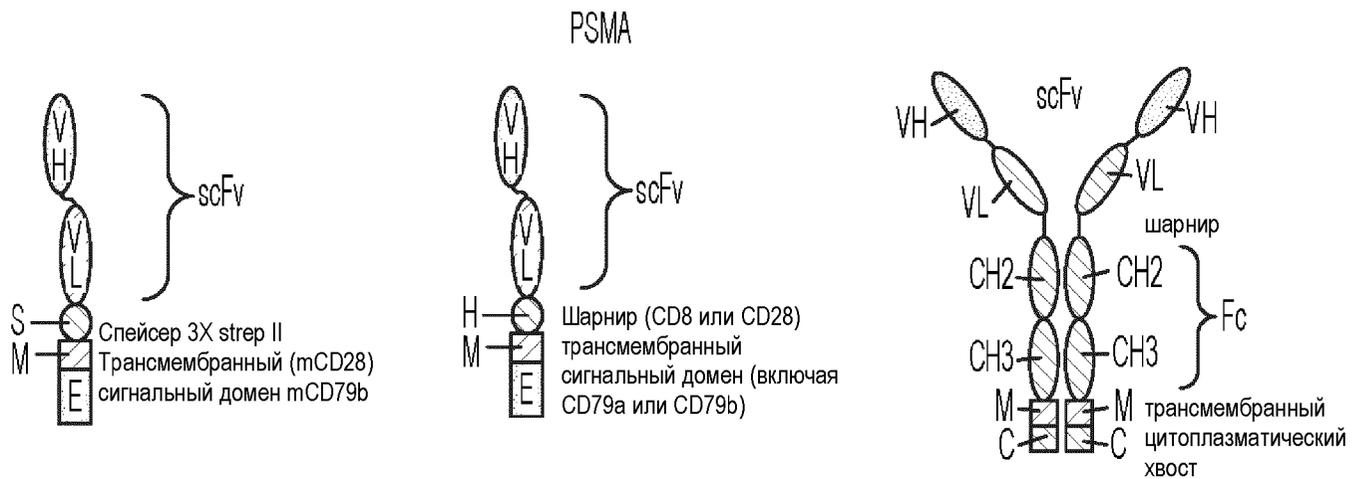
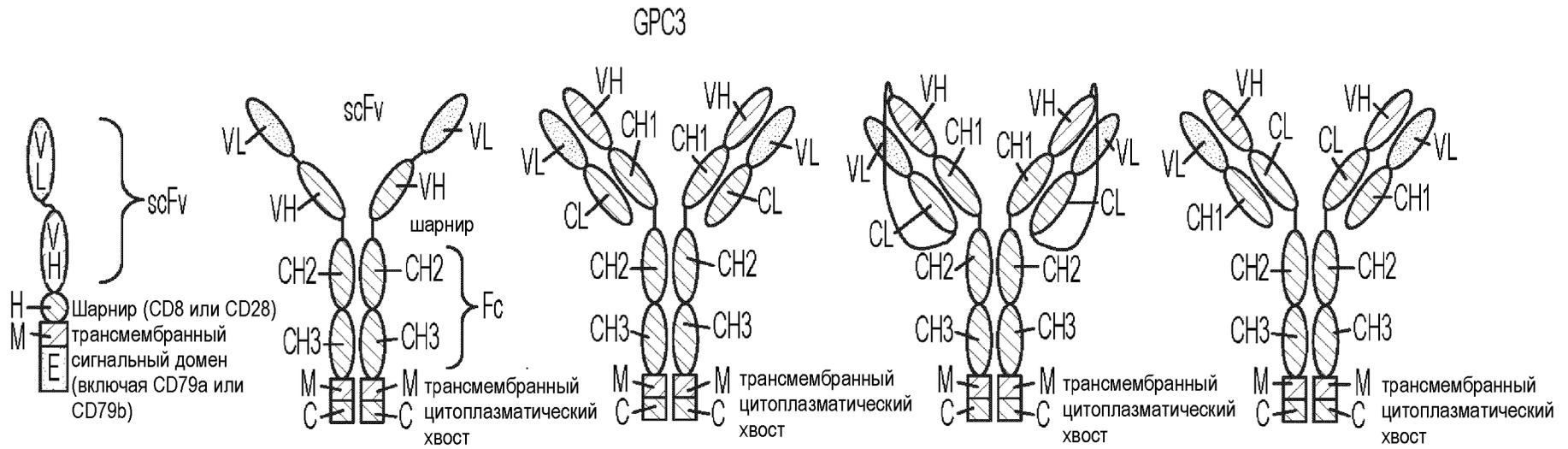
Сконструированная В-клетка со связывающим доменом лиганда/рецептора, непосредственно связанным с клеткой

ФИГ. 2С

Примеры sBCR (химерного В-клеточного рецептора)

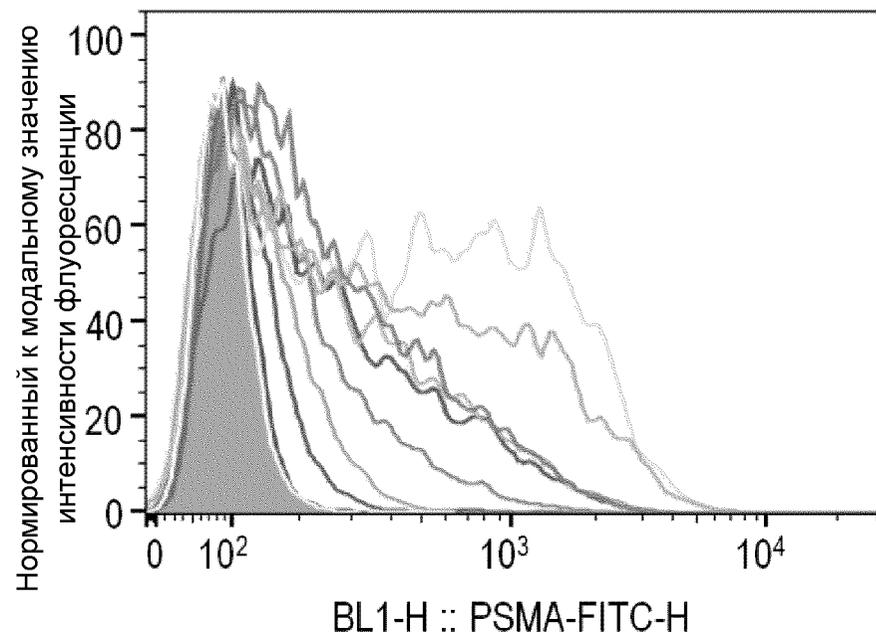
scFv к GPC3	Шарнир	Трансмембранный	Сигнальный домен
scFv к PSMA	Шарнир	Трансмембранный	Сигнальный домен

ФИГ. 3

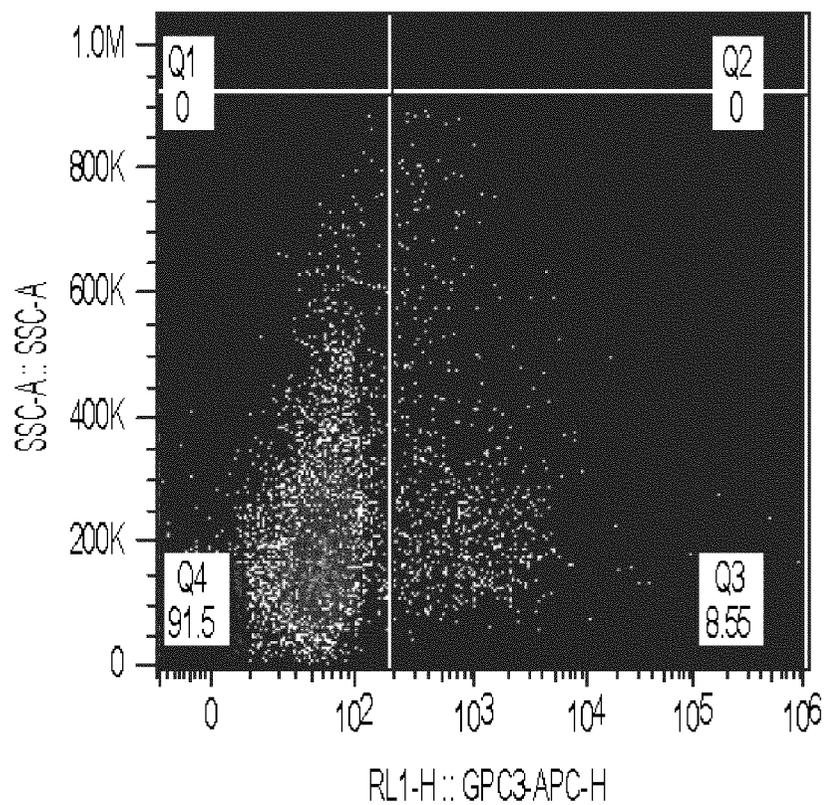


ФИГ. 4

	Название образца	Геометрич. среднее : BL1-H
	Контроль без PSMA.fsc	97.5
■	Контроль с PSMA.fsc	102
□	82.fcs	246
□	83.fcs	243
□	84.fcs	347
□	85.fcs	422
□	86.fcs	119
□	87.fcs	136
□	88.fcs	251
□	89.fcs	175

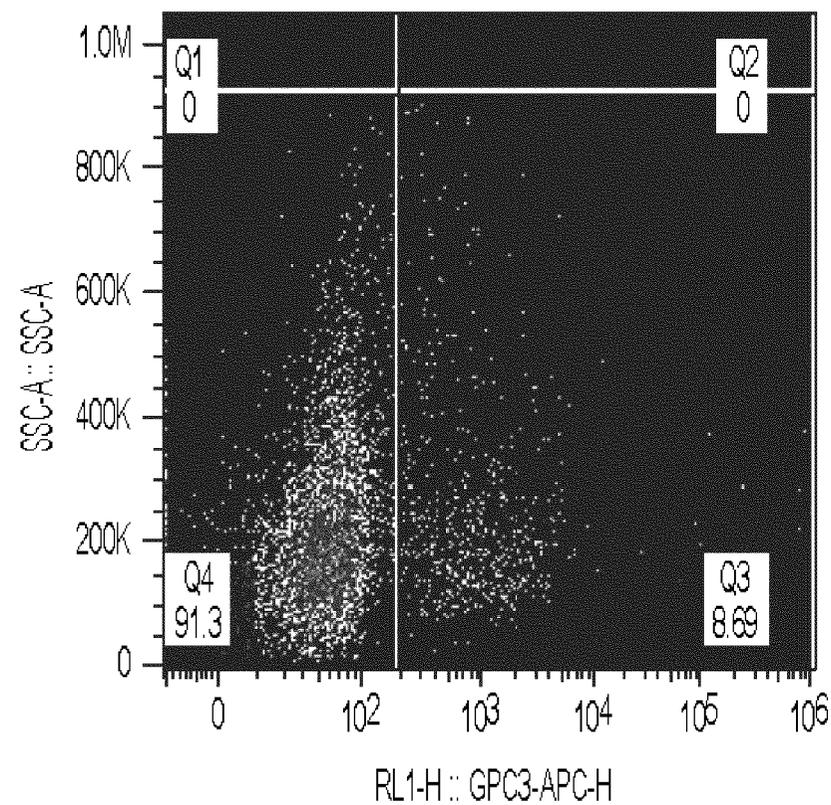


ФИГ. 5



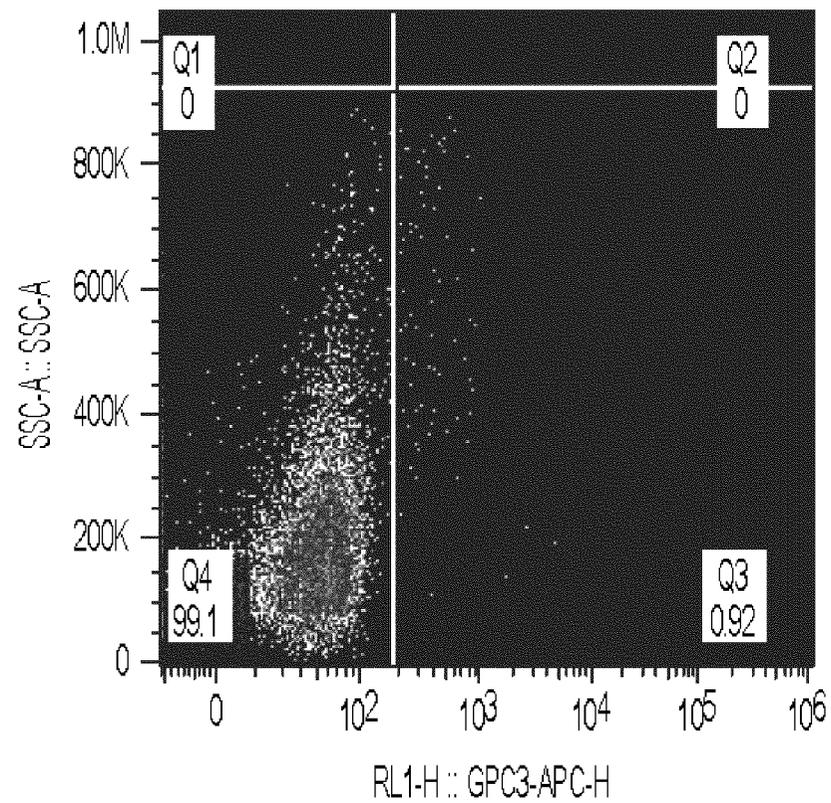
8-wf1-396-gp3-hcd8-cd28tm-cd79a.fcs  
 CD19-бриллиантовый фиолетовый 421-Н,  
 FSC-Н, субпопуляция 8469

ФИГ. 6А



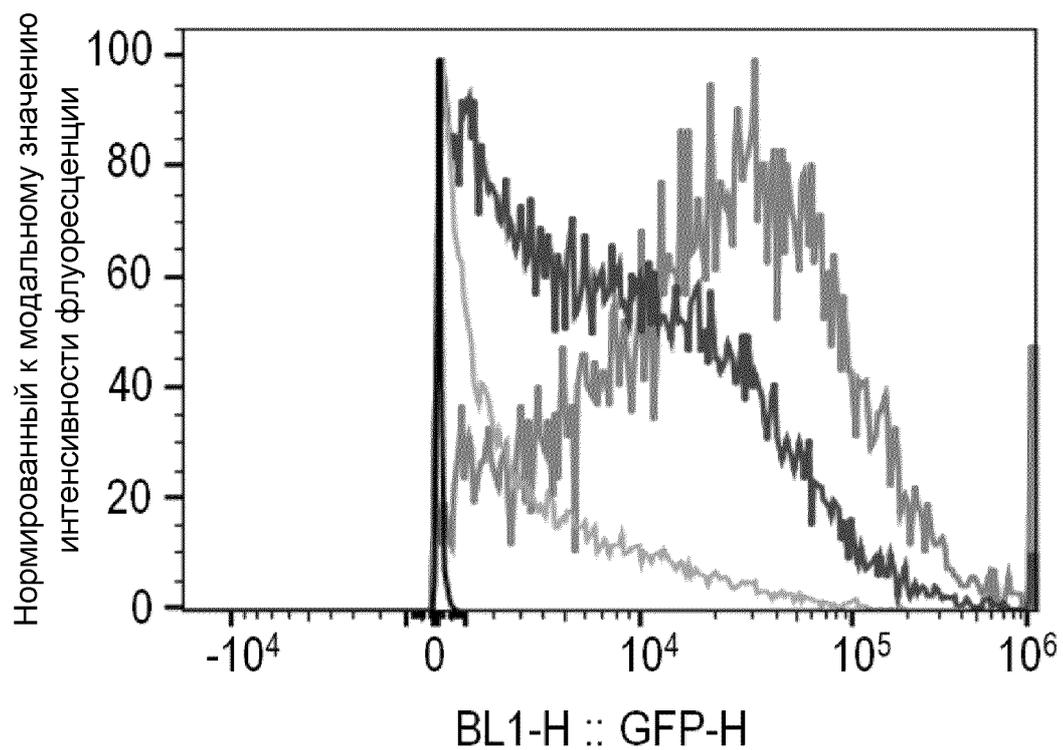
9-wf1397-antigp3-hcd8-cd28tm-cd79b.fcs  
 CD19-бриллиантовый фиолетовый 421-  
 Н, FSC-Н, субпопуляция 6594

ФИГ. 6В



10-wf1-398-psma-hcd8-tmcd28-h79a.fcs  
CD19-бриллиантовый фиолетовый 421-Н, FSC-Н,  
субпопуляция 9304

ФИГ. 6С



	Название образца	Геометрич. среднее : BL1-H	Количество
■	0.fcs	CD19-бриллиантовый фиолетовый 421-H+	32219
■	1.fcs	CD19-бриллиантовый фиолетовый 421-H+	17033
■	3.fcs	CD19-бриллиантовый фиолетовый 421-H+	12890
■	10.fcs	CD19-бриллиантовый фиолетовый 421-H+	4820

ФИГ. 7



ФИГ. 8

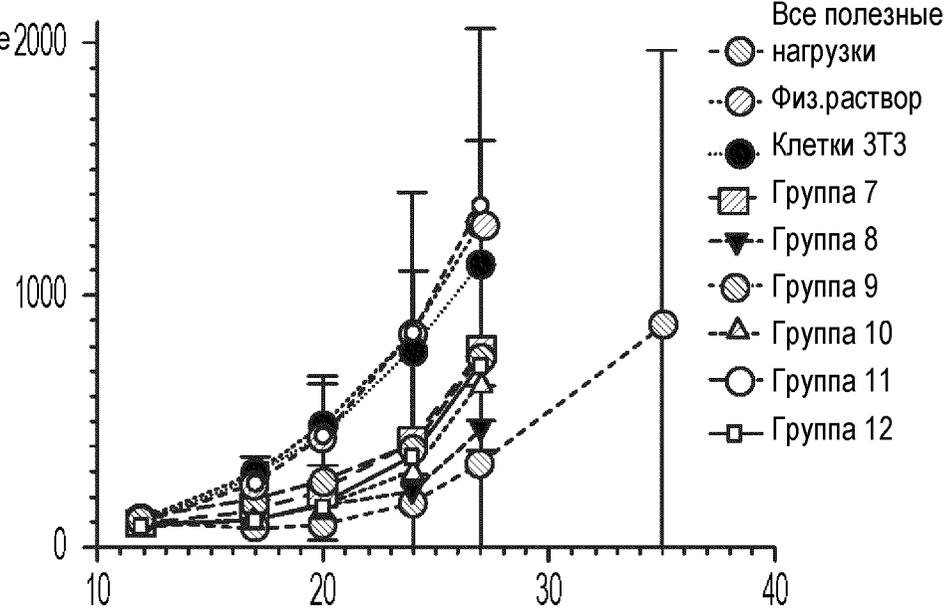
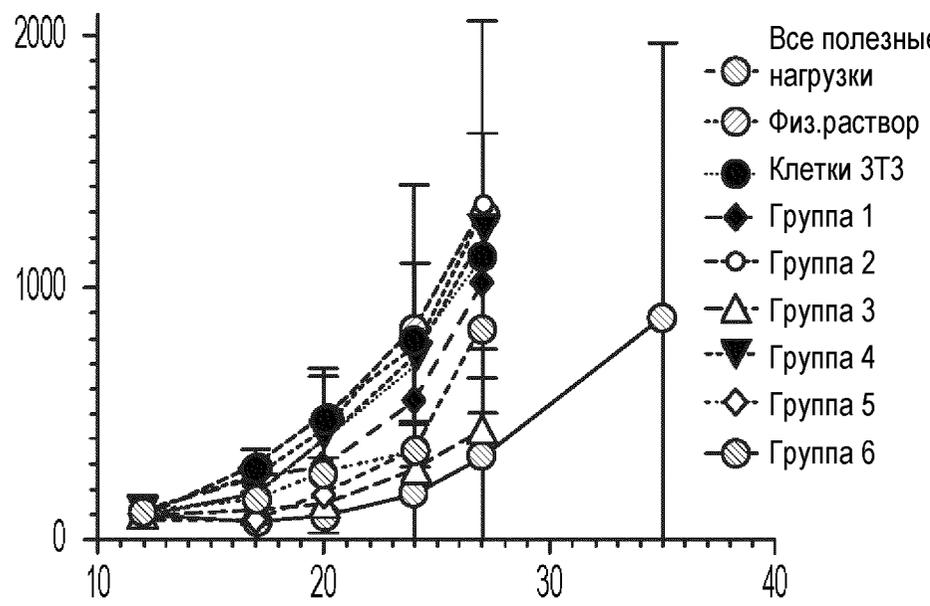
CXCL13 – среднее для 5 мышей

LIGHT – среднее для 5 мышей



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L
XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1
CXCL13	CXCL13	CXCL13	CXCL13	CXCL13	CXCL13	mLIGHT	mLIGHT	mLIGHT	mLIGHT	mLIGHT	mLIGHT
TIM4-Fc	CD80-MB	CD40L-MB	IL-12 and TM	4-1BBL-MB	mIFNA2	TIM4-Fc	CD80-MB	CD40L-MB	IL-12 and TM	4-1BBL-MB	mIFNA2
TLR		TLR						TLR			

ФИГ. 9



⊘ Все полезные нагрузки = все 12 полезных нагрузок, кроме агониста TLR

Walking Fish Therapeutics Inc. 2019 Confidential

ФИГ. 9 (продолжение)

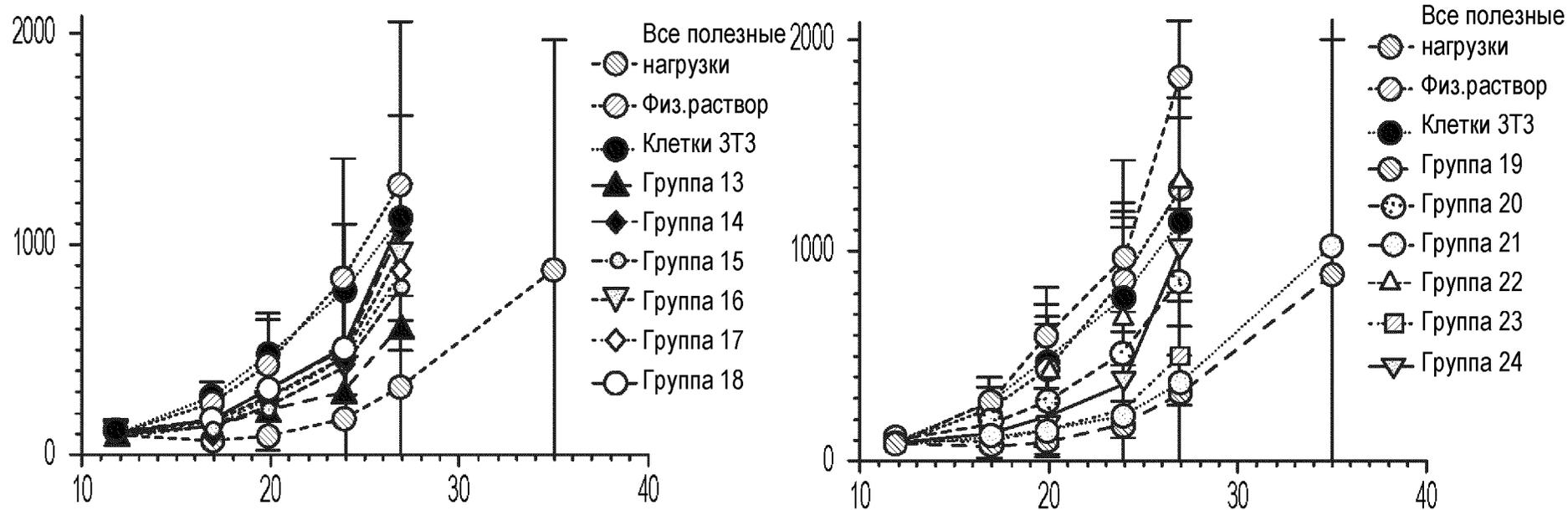
IL-21 – среднее для 5 мышей

CCL21 – среднее для 5 мышей



13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L	FLT3L
XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1	XCL1
IL-21	IL-21	IL-21	IL-21	IL-21	IL-21	CCL21	CCL21	CCL21	CCL21	CCL21	CCL21
TIM4-Fc	CD80-MB	CD40L-MB	IL-12 and TM	4-1BBL-MB	m IFN A2	TIM4-Fc	CD80-MB	CD40L-MB	IL-12 and TM	4-1BBL-MB	m IFN A2

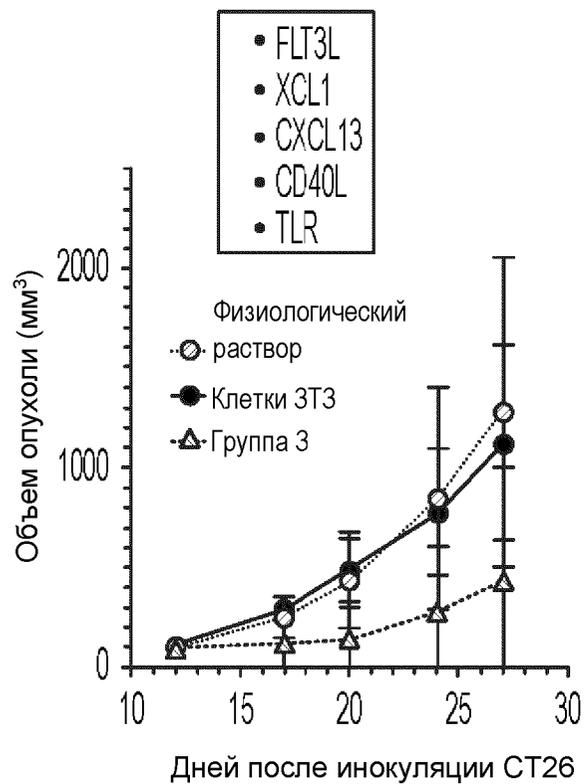
ФИГ. 10



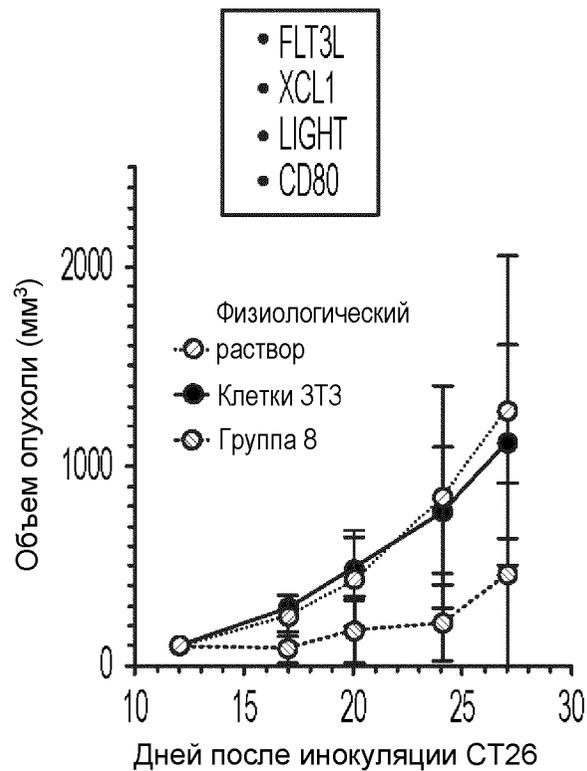
⊗ Все полезные нагрузки = все 12 полезных нагрузок, кроме агониста TLR

Walking Fish Therapeutics Inc. 2019 Confidential

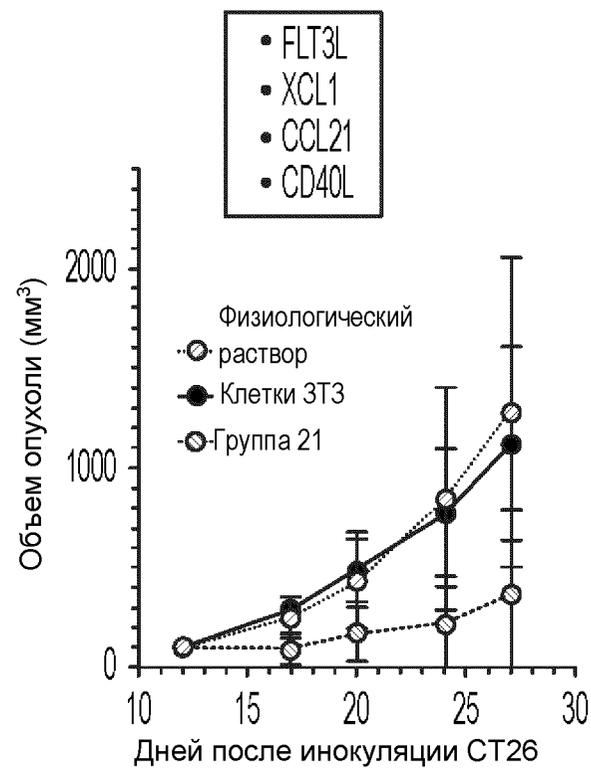
ФИГ. 10 (продолжение)



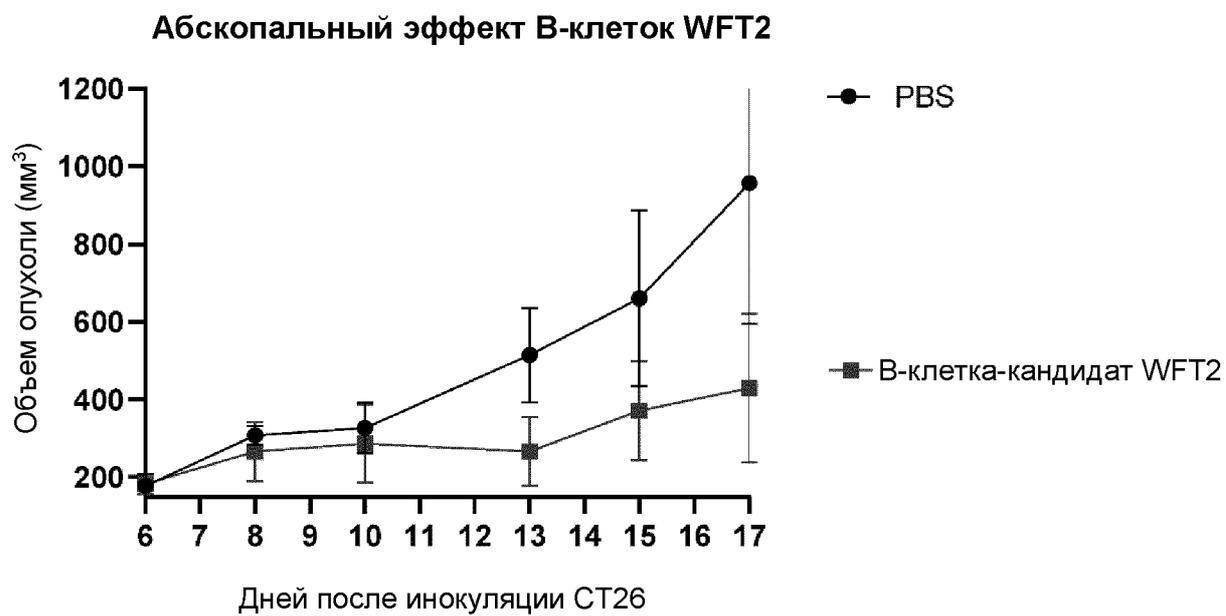
ФИГ. 11А



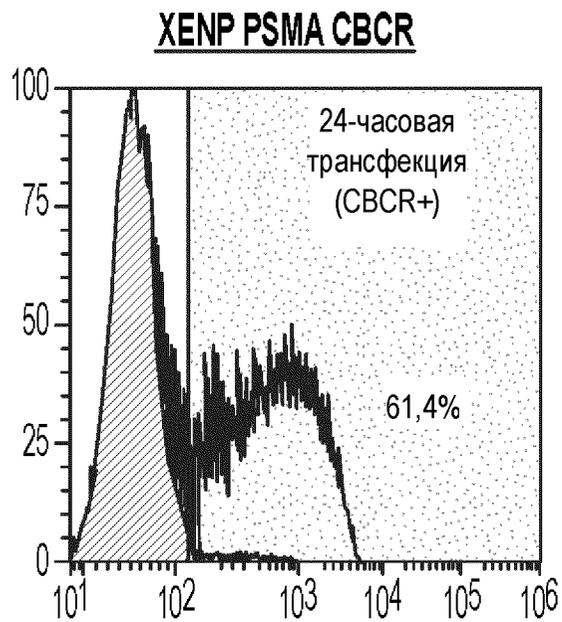
ФИГ. 11В



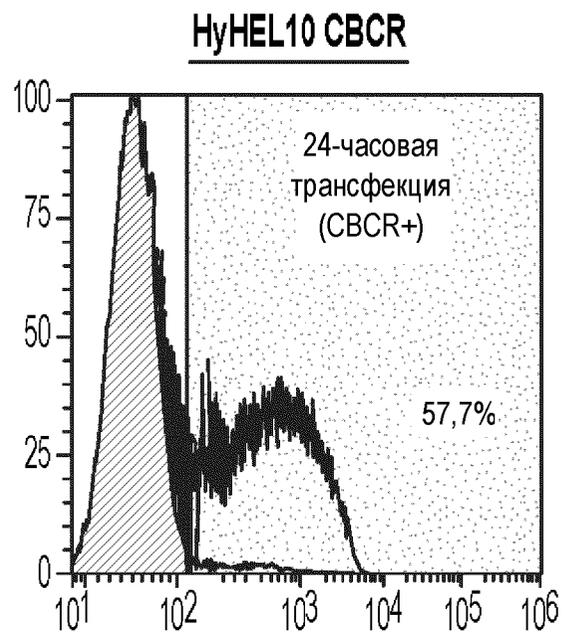
ФИГ. 11С



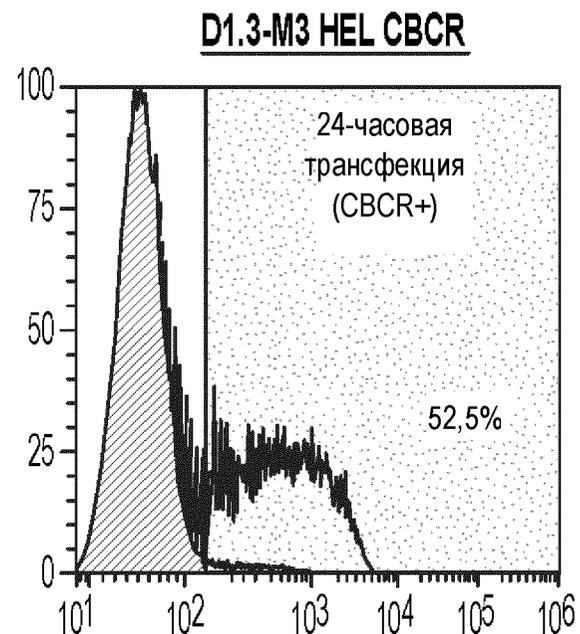
ФИГ. 12



ФИГ. 13А



ФИГ. 13В



ФИГ. 13С