



(51) МПК  
*C07K 14/705* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 15/85* (2006.01)  
*C12N 9/00* (2006.01)  
*A61K 35/17* (2015.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК

*C07K 14/70503* (2020.08); *C07K 16/28* (2020.08); *C07K 19/00* (2020.08); *C12N 5/0638* (2020.08); *C12N 15/1082* (2020.08); *A61K 35/17* (2020.08); *A61P 35/00* (2020.08); *C07K 2317/622* (2020.08); *C07K 2319/03* (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2016136370, 16.02.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
16.02.2015

Дата регистрации:  
24.08.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
14.02.2014 US 61/940,339

(43) Дата публикации заявки: 19.03.2018 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 24.08.2021 Бюл. № 24

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 14.09.2016

(86) Заявка РСТ:  
US 2015/016057 (16.02.2015)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2015/123642 (20.08.2015)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спаская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КУПЕР Лоуренс Дж. Н. (US),  
КОРНГОЛД Ана Беатриц (US),  
РАБИНОВИЧ Брайан А. (US),  
СИНГХ Харджеет (US),  
ОЛИВАРЕС Саймон (US)

(73) Патентообладатель(и):

БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС СИСТЕМ  
(US)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2013280220 A1, 24.10.2013. WO 2013063419 A2, 02.05.2013. WO 2013176915 A1, 28.11.2013. US 2013266551 A1, 10.10.2013. ЛИКАРЬ Ю. Н. и др., Использование мутированного варианта человеческой деоксицитидинкиназы в качестве репортерного гена для оценки адаптивной Т-клеточной терапии, Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии, (см. прод.)

**(54) ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к CD19-специфическому полипептиду химерного антигенного рецептора (CAR), кодируемому последовательностью ДНК с SEQ ID NO:5, нуклеотидами 1-1485 SEQ ID NO:5 или

нуклеотидами 67-1485 SEQ ID NO:5, и может быть использовано в медицине. Изобретение позволяет получить Т-клетки, нацеленные на CD19, которые можно использовать для эффективной терапии CD19+ злокачественных новообразований. 11 н. и 6 з.п. ф-лы, 42 ил., 2 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

2012, V. 11, N. 2, с.23-31. КОРЖ В.П., ПОИСК ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСПОЗОНА  $T_{ol2}$  КАК ПРИМЕР ЭВОЛЮЦИОННОГО СИНТЕЗА ГЕНОМИКИ И БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ, ОНТОГЕНЕЗ, 2008, V.39, N.2, с.94-99. JIN Z. et al., The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor, Gene Therapy, 2011, V. 18, N.9, p.849-856.

R U 2 7 5 3 9 6 5 C 2

R U 2 7 5 3 9 6 5 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 14/705* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 15/85* (2006.01)  
*C12N 9/00* (2006.01)  
*A61K 35/17* (2015.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 14/70503* (2020.08); *C07K 16/28* (2020.08); *C07K 19/00* (2020.08); *C12N 5/0638* (2020.08); *C12N 15/1082* (2020.08); *A61K 35/17* (2020.08); *A61P 35/00* (2020.08); *C07K 2317/622* (2020.08); *C07K 2319/03* (2020.08)

(21)(22) Application: 2016136370, 16.02.2015

(24) Effective date for property rights:  
16.02.2015Registration date:  
24.08.2021

Priority:

(30) Convention priority:  
14.02.2014 US 61/940,339

(43) Application published: 19.03.2018 Bull. № 8

(45) Date of publication: 24.08.2021 Bull. № 24

(85) Commencement of national phase: 14.09.2016

(86) PCT application:  
US 2015/016057 (16.02.2015)(87) PCT publication:  
WO 2015/123642 (20.08.2015)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spaskaya, 25, stroenie 3,  
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i  
Partnery"

(72) Inventor(s):

KUPER Lourens Dzh. N. (US),  
KORNGOLD Ana Beatrits (US),  
RABINOVICH Brajan A. (US),  
SINGKH Khardzheet (US),  
OLIVARES Sajmon (US)

(73) Proprietor(s):

BORD OF RIDZHENTS, DZE YUNIVERSITI  
OF TEKHAS SISTEM (US)**(54) CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS AND THEIR PRODUCTION METHODS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, specifically to CD19 specific polypeptide of chimeric antigen receptor (CAR) encoded by DNA sequence with SEC ID NO:5, 1-1485 SEQ ID NO:5 nucleotides or 67-1485 SEQ ID NO:5

nucleotides; it can be used in medicine.

EFFECT: invention allows for obtaining T-cells targeted to CD19, which can be used for the effective therapy of CD19+ malignant neoplasms.

17 cl, 42 dwg, 2 tbl, 5 ex

RU 2 753 965 C 2

RU 2 753 965 C 2

## ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

По данной заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США № 61/940339, поданной 14 февраля 2014 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится, главным образом, к области молекулярной биологии и медицины. Более конкретно, оно относится к способам получения химерных антигенных рецепторов (CAR).

### ОПИСАНИЕ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ

Адоптивный перенос Т-клеток является перспективным терапевтическим подходом, который может быть использован для лечения рака. Адоптивный перенос Т-клеток включает выделение и наращивание антигенспецифических Т-клеток, которые способны избирательно уничтожать клетки опухолей. Как правило, Т-клетки выделяют из организма субъекта и культивируют *in vitro*. Химерный антигенный рецептор (CAR) можно вводить в Т-клетку *in vitro* для направления Т-клетки, после повторного введения ее в организм субъекта, на избирательное уничтожение клеток опухолей, основанное на экспрессии антигена (например, Wieczorek *et al.* 2013; Berry *et al.*, 2013).

Одна из проблем, связанных с адоптивным переносом Т-клеток, заключается в том, что существует значительная вариабельность в том, какой CAR может работать более эффективно у конкретных популяций пациентов, например, при лечении конкретной формы рака. Вследствие очень большого числа различных возможных CAR, способных проявлять терапевтическую активность против рака, которые потенциально могут быть получены, в настоящее время клиницистам очень трудно предвидеть, какой CAR может проявлять терапевтическую активность против конкретного вида рака или подвида рака. Ввиду значительного терапевтического потенциала адоптивного переноса Т-клеток, существует явная потребность в усовершенствованных способах идентификации и получения новых CAR.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам получения CAR, и по изобретению предложены конкретные CAR. В некоторых аспектах предложены способы получения большого числа CAR, которые можно подвергать скринингу на активность против конкретного вида рака или подвида рака; таким образом, можно получать и идентифицировать CAR, проявляющий улучшенный терапевтический потенциал против конкретного вида рака или подвида рака. Предложенные в настоящем документе CAR можно вводить в качестве терапии субъекту или пациенту-человеку, например, для лечения рака.

Клинические данные свидетельствуют о том, что конкретная конструкция химерного антигенного рецептора (CAR), направляющего Т-клетки к определенному ассоциированному с опухолью антигену (ТАА), может иметь разный терапевтический потенциал у разных пациентов. Например, CD19-специфические CAR второго поколения, активируемые через химерные CD28/CD3-дзета или CD137/CD3-дзета, могут приводить к превосходным клиническим результатам, когда аутологичные генетически модифицированные Т-клетки вводят пациентам с острым, но не хроническим, лейкозом В-клеточной линии. Для решения этой проблемы в настоящем документе предложены способы получения видов CAR, которые могут проявлять улучшенный противоопухолевый эффект для конкретной опухоли.

Например, в настоящем документе предложены способы, которые можно использовать для получения и скрининга большого числа CAR на их способность лечить

рак у конкретного пациента; таким образом, способы можно использовать для персонализации терапии для пациента и выбора конкретного CAR, обладающего улучшенным терапевтическим потенциалом для конкретного пациента или подгруппы пациентов с конкретной формой рака. В клиническом подходе к генной терапии можно использовать электроперенос ДНК плазмид из системы транспозонов «спящая красавица» (Sleeping Beauty (SB)), например, для уменьшения стоимости и сложности при производстве индивидуальных конструкций CAR для небольших подгрупп пациентов. В таких способах персонализации CAR+ Т-клеток можно использовать получение большого числа молекул CAR, которые можно подвергать скринингу и оценивать их способность приносить пользу конкретному пациенту.

В некоторых аспектах предложены способы для высокопроизводительной сборки молекул CAR с использованием системы тройной сайт-специфической рекомбинации (также называемой платформой «EZ-CAR»). В некоторых вариантах осуществления эти способы могут позволять осуществлять быстрое комбинирование 3 компонентов прототипа CAR из (i) одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), определяющего специфичность, (ii) каркаса/шарнира, который присоединяет scFv, выступающий над поверхностью клетки, и (iii) одного или более внутриклеточных сигнальных доменов. Например, как показано в приведенных ниже примерах, CD19-специфический CAR, который активируется через химерный CD28/CD3-дзета, был получен с использованием платформы EZ CAR параллельно с CD19RCD28m $\zeta$  CAR+ Т-клетками клинической категории (CG CAR).

В некоторых вариантах осуществления CAR, предложенный в настоящем документе или полученный способами по настоящему изобретению, может быть совместно экспрессирован в Т-клетке с мембраносвязанным IL-15. Таким образом, Т-клетка может выживать или существовать в состоянии покоя без существенной пролиферации *in vitro* или *in vivo*. Напротив, как описано ранее, Т-клетки, экспрессирующие CAR, как правило, погибают, когда цитокины выводят из системы *in vitro*, и эта гибель клеток может служить в качестве меры обеспечения безопасности в определенных случаях, когда Т-клетки вводят в клинической практике. Проллиферацию Т-клеток, как правило, измеряют с использованием теста с автономными клетками. Таким образом, в отличие от некоторых ранее идентифицированных CAR, в случае которых Т-клетки не способны сохраняться *in vitro* без антигенной стимуляции, в настоящем документе предложены CAR, которые могут индуцировать цитотоксичность без автономного роста *in vitro*. В зависимости от конкретного нужного варианта осуществления CAR, полученный способами по настоящему изобретению или предложенный в настоящем документе, может быть экспрессирован в Т-клетке либо с совместной экспрессией в Т-клетке мембраносвязанного IL-15, либо без нее.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к композиции, содержащей: (а) множество первых векторов, кодирующих один или более отличающихся антигенсвязывающих доменов; (b) множество вторых векторов, кодирующих один или более отличающихся шарнирных доменов; и (с) множество третьих векторов, кодирующих один или более отличающихся эндодоменов; при этом по меньшей мере два из первых, вторых и третьих векторов включают множество из двух или более векторов, кодирующих отличающиеся антигенсвязывающие домены, шарнирные домены и/или эндодомены, соответственно, и кроме того, при этом векторы содержат сайты для гомологичной рекомбинации, позволяющие получать четвертый вектор, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR).

В настоящем изобретении применительно к белковым доменам и полипептидам,

таким как антигенсвязывающие домены, шарнирные домены, трансмембранные домены и эндодомены, термин «отличающиеся» означает домены, имеющие, содержащие или состоящие из разных полипептидных (аминокислотных) последовательностей.

Например, два «отличающихся» антигенсвязывающих домена могут связывать один и тот же антиген (фактически, даже один и тот же эпитоп на этом антигене), однако антигенсвязывающие домены являются «отличающимися», если составляющие их аминокислотные последовательности отличаются друг от друга. Аналогично, два «отличающихся» антигенсвязывающих домена, различающиеся по составляющим их аминокислотным последовательностям, также могут специфически связывать разные антигены и эпитопы. И наоборот, описанные в настоящем документе две молекулы (полипептиды) с идентичными аминокислотными последовательностями не являются «отличающимися» полипептидами.

В некоторых вариантах осуществления множество первых векторов кодируют множество отличающихся антигенсвязывающих доменов, множество вторых векторов кодируют один шарнирный домен, и множество третьих векторов кодируют множество отличающихся эндодоменов. В некоторых вариантах осуществления множество первых векторов кодируют множество отличающихся антигенсвязывающих доменов, множество вторых векторов кодируют множество отличающихся шарнирных доменов, и множество третьих векторов кодируют множество отличающихся эндодоменов. В некоторых вариантах осуществления множество первых векторов кодируют множество отличающихся антигенсвязывающих доменов, множество вторых векторов кодируют множество отличающихся шарнирных доменов, и множество третьих векторов кодируют один эндодомен. В некоторых вариантах осуществления множество первых векторов кодируют один антигенсвязывающий домен, множество вторых векторов кодируют множество отличающихся шарнирных доменов, и множество третьих векторов кодируют множество отличающихся эндодоменов. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены содержат или состоят из scFv. Третьи векторы могут кодировать трансмембранный домен. Вторые векторы могут кодировать трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит множество пятых векторов, кодирующих один или более трансмембранных доменов; при этом первые векторы, вторые векторы, третьи векторы и пятые векторы содержат сайты гомологичной рекомбинации для получения четвертого вектора, кодирующего химерный антигенный рецептор (CAR). Первый вектор может содержать первую последовательность и второй сайт гомологичной рекомбинации. Второй вектор может содержать вторую последовательность гомологичной рекомбинации и третью последовательность гомологичной рекомбинации. Третий вектор может содержать третью последовательность гомологичной рекомбинации и четвертую последовательность гомологичной рекомбинации. Четвертый вектор содержит первую последовательность гомологичной рекомбинации и четвертую последовательность гомологичной рекомбинации. Первый вектор, второй вектор и/или третий вектор могут кодировать транспозазу. Транспозаза может представлять собой Tc1-подобную транспозазу лососевых (SB). В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4 или все из первого вектора, второго вектора, третьего вектора, четвертого вектора и/или пятого вектора представляют собой транспозонный вектор «спящая красавица» (SB) или piggyBac. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления первый вектор, второй вектор, третий вектор, четвертый вектор и/или пятый вектор не является транспозонным

вектором «спящая красавица» (SB) или piggyBac; например, в некоторых вариантах осуществления CAR можно получать без использования вектора «спящая красавица» (SB) или piggyBac, и тогда CAR впоследствии может быть вставлен в вектор, подходящий для трансфицирования Т-клеток (например, вставлен в вектор «спящая красавица» (SB), как описано, например, в публикации Singh *et al.*, 2015). Тем не менее, в некоторых вариантах осуществления создание CAR, уже присутствующего в векторе, который подходит для трансфицирования Т-клеток, может упрощать процесс или уменьшать количество этапов, необходимых как для создания CAR, так и для трансфицирования Т-клетки. Отличающиеся антигенсвязывающие домены могут избирательно связывать разные антигены. В некоторых вариантах осуществления отличающиеся антигенсвязывающие домены избирательно связывают один и тот же антиген. Антигенсвязывающий домен может избирательно связывать CD19, универсальный антиген (мышь), HER-3, GD2, Gp75, белок CS1, мезотелин, фосфатидилсерин, cMyc, CD22, CD4, CD44v6, CD45, CD28, CD3, CD3e, CD123, CD138, CD52, CD56, CD74, CD30, Gp75, CD38, CD33, CD20, слитый продукт Her1/HER3, GD2, углевод, *Aspergillus*, ROR1, c-MET, EGFR, дектин, эбола, грибок, GP, HERV-K (HERVK), NY-ESO-1, VEGF-R2, TGF- $\beta$ 2R, IgG4, биотин или O-AcGD2. Отличающиеся антигенсвязывающие домены могут состоять из, или содержать scFv. Шарнирная область может состоять из, или содержать 12 ак пептид (GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCT; SEQ ID NO: 1), t-20 ак пептид, IgG4 Fc  $\Delta$ EQ, IgG4 Fc  $\Delta$ Q, (t-12 ак+t-20 ак), mKate, phiLov, dsRed, Venus, eGFP, CH3 HA, (CD8 $\alpha$ +t-20 ак), двойной t-20 ак, (t-20 ак+CD8 $\alpha$ ), (CD8 $\alpha$ +лейциновая застежка Basep1), (CD8 $\alpha$ +лейциновая застежка Acid1), 2D3, CD8 $\alpha$  или IgG4 Fc. По меньшей мере один из эндодоменов может содержать CD3 $\zeta$ . По меньшей мере один из эндодоменов может содержать один или более доменов ITAM. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из эндодоменов содержит (CD28+CD3 $\zeta$ ), (CD28+CD27+CD3 $\zeta$ ), (CD28+OX40+CD3 $\zeta$ ), (CD28+4-1BB+CD3 $\zeta$ ), (CD28+CD27+OX40+CD3 $\zeta$ ), (CD28+4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$ ), (CD28+4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$ ), (4-1BB+CD3 $\zeta$ ), (4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$ ), (4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$ ), (CD27+CD3 $\zeta$ ), (CD27+OX40+CD3 $\zeta$ ), (CD28 $\Delta$ +CD3 $\zeta$ ), (CD28 $\Delta$ +CD27+CD3 $\zeta$ ), (CD28 $\Delta$ +OX40+CD3 $\zeta$ ), (CD28 $\Delta$ +4-1BB+CD3 $\zeta$ ), (CD28 $\Delta$ +4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$ ), (CD28 $\Delta$ +CD27+OX40+CD3 $\zeta$ ), (CD28 $\Delta$ +4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$ ), (4-1BB+ICOS+CD3 $\zeta$ ), (CD28+ICOS+CD3 $\zeta$ ), (ICOS+CD3 $\zeta$ ), CD3 $\zeta$  или только CD28. В некоторых вариантах осуществления CAR можно тестировать на активность, например, с использованием платформы iQue<sup>TM</sup> Screener (IntelliCyt, Albuquerque, NM). В некоторых вариантах осуществления CAR можно оценивать на наличие одной или более характеристик (например, жизнеспособности, повышающей регуляции сигналов активации, повышающей регуляции CD25, высвобождения цитокинов и/или уничтожения клеток) при экспрессии в клетках, таких как Т-клетки, с использованием такого метода, как, например, проточная цитометрия.

Другой аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей коллекцию векторов, кодирующих химерные антигенные рецепторы, которые кодируют множество отличающихся антигенсвязывающих доменов, шарнирных доменов и эндодоменов, при этом векторы в указанной коллекции рандомизированы в отношении указанных доменов.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения множества векторов, каждый из которых кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), включающему: (i) получение композиции, содержащей множество векторов по настоящему изобретению (например, описанных выше); и (ii) создание для композиции условий, достаточных для того, чтобы отличающиеся антигенсвязывающие домены,

шарнирные домены и/или эндодомены, содержащиеся в, или кодируемые указанными векторами, могли рекомбинировать за счет гомологичной рекомбинации, с получением множества четвертых векторов, при этом каждый из указанных четвертых векторов кодирует CAR. Способ может дополнительно включать осуществление экспрессии CAR в клетке. Способ может дополнительно включать тестирование CAR на активность. В некоторых вариантах осуществления один или более из первых векторов кодируют область scFv. В некоторых вариантах осуществления один или более из третьих векторов кодируют трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления один или более из вторых векторов кодируют трансмембранный домен. Способ может дополнительно включать произвольное включение за счет рекомбинации пятого вектора, кодирующего трансмембранный домен, для образования совместно с указанными первыми векторами, вторыми векторами и третьими векторами указанного четвертого вектора. В некоторых вариантах осуществления указанные первые векторы и указанные вторые векторы произвольно соединяются из множества векторов, кодирующих множество отличающихся областей scFv и множество отличающихся шарнирных областей. В некоторых вариантах осуществления указанные первые векторы и указанные третьи векторы произвольно соединяются из множества векторов, кодирующих множество отличающихся областей scFv и множество отличающихся эндодоменов. В некоторых вариантах осуществления указанные вторые векторы и указанные третьи векторы произвольно соединяются из множества векторов, кодирующих множество отличающихся шарнирных областей и множество отличающихся эндодоменов. В некоторых вариантах осуществления указанные первые векторы, указанные вторые векторы и указанные третьи векторы произвольно соединяются из множества векторов, кодирующих множество отличающихся областей scFv, множество отличающихся шарнирных областей и множество отличающихся эндодоменов. Способ может дополнительно включать получение указанных четвертых векторов за счет произвольного соединения указанных первых векторов из первой библиотеки векторов, кодирующих множество областей scFv, произвольного соединения указанных вторых векторов из второй библиотеки векторов, кодирующих множество областей scFv, и произвольного соединения указанных третьих векторов из третьей библиотеки векторов, кодирующих множество эндодоменов, с образованием указанного четвертого вектора, кодирующего CAR. Первые векторы могут содержать первую последовательность и второй сайт гомологичной рекомбинации. Вторые векторы могут содержать вторую последовательность гомологичной рекомбинации и третью последовательность гомологичной рекомбинации. Третьи векторы могут содержать третью последовательность гомологичной рекомбинации и четвертую последовательность гомологичной рекомбинации. Третьи векторы могут содержать третью последовательность гомологичной рекомбинации и четвертую последовательность гомологичной рекомбинации. Четвертые векторы могут содержать первую последовательность гомологичной рекомбинации и четвертую последовательность гомологичной рекомбинации. Первые векторы, вторые векторы и/или третьи векторы могут кодировать транспозазу. В некоторых вариантах осуществления шестой вектор кодирует транспозазу, и при этом способ включает внедрение, введение электропорацией или трансфицирование одного или более из указанных четвертых векторов и указанного шестого вектора в клетку. Транспозаза может представлять собой Tc1-подобную транспозазу лососевых (SB). Способ может дополнительно включать культивирование или содержание клеток, трансфицированных CAR, в присутствии искусственных антигенпредставляющих клеток (иАПК), которые могут стимулировать размножение



CAR-экспрессирующих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления все из области scFv, шарнирной области и эндодомена закодированы в транспозонном векторе «спящая красавица» (SB) или piggyBac. В некоторых вариантах осуществления все из первого вектора, второго вектора и/или третьего вектора произвольно соединены за счет

5 указанной рекомбинации из множества векторов, кодирующих множество отличающихся областей scFv, шарнирных областей и эндодоменов. В некоторых вариантах осуществления все из указанных первых векторов, вторых векторов и третьих векторов содержат транспозон; и при этом указанное соединение за счет гомологичной рекомбинации представляет собой сайт-специфическую рекомбинацию. В некоторых

10 вариантах осуществления все из первых векторов и вторых векторов имеют первый сайт гомологичной рекомбинации; и при этом все из вторых векторов и третьих векторов имеют второй сайт гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления первые векторы имеют третий сайт рекомбинации, и при этом четвертые векторы имеют четвертый сайт рекомбинации, причем третий сайт рекомбинации и четвертый сайт

15 рекомбинации могут создавать возможность гомологичной рекомбинации в клетке. Клетка может представлять собой Т-клетку, такую как, например, альфа-бета Т-клетка, гамма-дельта Т-клетка или НК-клетка, или НКТ-клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой плюрипотентную клетку, такую как, например, стволовая клетка или индуцированная плюрипотентная стволовая клетка.

20 В некоторых вариантах осуществления клетка получена из стволовой клетки, индуцированной плюрипотентной стволовой клетки или стволовой клетки. Клетка может представлять собой Т-клетку или НК-клетку, полученную из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления указанные отличающиеся антигенсвязывающие домены включают по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6,

25 7, 8, 9 или более scFv, которые избирательно узнают разные антигены. В некоторых вариантах осуществления указанные отличающиеся антигенсвязывающие домены включают по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более scFv, которые избирательно узнают (то есть, специфически связывают) один и тот же антиген. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены избирательно (специфически) связывают

30 CD19, универсальный антиген (мышь), HER-3, GD2, Gp75, белок CS1, мезотелин, фосфатидилсерин, cMyc, CD22, CD4, CD44v6, CD45, CD28, CD3, CD3e, CD123, CD138, CD52, CD56, CD74, CD30, Gp75, CD38, CD33, CD20, слитый продукт Her1/HER3, GD2, углевод, *Aspergillus*, ROR1, c-MET, EGFR, дектин, эбола, грибок, GP, HERV-K, NY-ESO-1, VEGF-R2, TGF-b2R, IgG4, биотин или O-AcGD2. В некоторых вариантах осуществления

35 указанные антигенсвязывающие домены содержат или состоят из scFv. Шарнирная область может кодировать 12 ак пептид (GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCC TTGCCCT; SEQ ID NO: 1), t-20 ак пептид, IgG4 Fc ΔEQ, IgG4 Fc ΔQ, (t-12 ак+t-20 ак), mKate, phiLov, dsRed, Venus, eGFP, CH3 HA, (CD8α+t-20 ак), двойной t-20 ак, (t-20 ак+CD8α), (CD8α+лейциновая застежка Basep1), (CD8α+лейциновая застежка Acid1), 2D3,

40 CD8α или IgG4 Fc. Эндодомен может кодировать CD3ζ. Эндодомен может кодировать один или более доменов ITAM. В некоторых вариантах осуществления эндодомен кодирует (CD28+CD3ζ), (CD28+CD27+CD3ζ), (CD28+OX40+CD3ζ), (CD28+4-1BB+CD3ζ), (CD28+CD27+OX40+CD3ζ), (CD28+4-1BB+CD27+CD3ζ), (CD28+4-1BB+OX40+CD3ζ), (4-1BB+CD3ζ), (4-1BB+OX40+CD3ζ), (4-1BB+CD27+CD3ζ), (CD27+CD3ζ), (CD27+OX40+CD3ζ), (CD28Δ+CD3ζ), (CD28Δ+CD27+CD3ζ), (CD28Δ+OX40+CD3ζ), (CD28Δ+4-1BB+CD3ζ), (CD28Δ+4-1BB+OX40+CD3ζ), (CD28Δ+CD27+OX40+CD3ζ), (CD28Δ+4-1BB+CD27+CD3ζ), (4-1BB+ICOS+CD3ζ), (CD28+ICOS+CD3ζ), (ICOS+CD3ζ), CD3ζ или только CD28. В некоторых вариантах осуществления CAR можно тестировать на активность,

например, с использованием платформы iQue™ Screener (IntelliCyt, Albuquerque, NM). В некоторых вариантах осуществления CAR можно оценивать на наличие одной или более характеристик (например, жизнеспособности, повышающей регуляции сигналов активации, повышающей регуляции CD25, высвобождения цитокинов и/или уничтожения клеток) при экспрессии в клетках, таких как Т-клетки, с использованием такого метода, как, например, проточная цитометрия. В некоторых вариантах осуществления указанная активность включает способность CAR избирательно связывать раковую клетку, избирательно связывать патоген, избирательно связывать клетку, вовлеченную в аутоиммунное заболевание, или стимулировать активацию Т-клетки, разрушение Т-клетки, дифференциацию Т-клетки, пролиферацию Т-клетки, дедифференциацию Т-клетки, движение Т-клетки, продукцию цитокинов Т-клеткой или уничтожение Т-клеткой.

В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой рак яичника, лимфому, почечноклеточный рак, В-клеточное злокачественное новообразование, CLL, В-ALL, ALL, лейкоз, В-клеточное злокачественное новообразование или лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, вялотекущую В-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, AML, рак шейки матки, рак молочной железы, колоректальный рак, рак яичника, нейробластому, рак кожи, меланому, рак легкого, остеосаркому, глиому, опухоль из эпителиальных клеток, рак предстательной железы или педиатрический рак. Патоген может представлять собой вирус, грибок или бактерию. В некоторых вариантах осуществления указанное тестирование включает визуализацию отдельной клетки, генетический анализ отдельной клетки, оценку отдельной Т-клетки или популяций Т-клеток; количественную оценку специфического уничтожения или серийного уничтожения, экспрессии гена, экспрессии белка, движения к или от мишени, пролиферации, индуцированной активацией гибели клеток, секреции цитокинов или секреции хемокинов. Способ может дополнительно включать выбор отдельного CAR из указанного множества векторов на основании свойства отдельного CAR. Способ может дополнительно включать терапевтическое введение отдельного CAR субъекту. Субъект может быть млекопитающим, таким как, например, человек.

Другой аспект настоящего изобретения относится к полипептиду, содержащему или состоящему из CAR 217 (SEQ ID NO: 2), CAR 194 (SEQ ID NO: 3), CAR 212 (SEQ ID NO: 4), CAR 213 (SEQ ID NO: 5), CAR 265 (SEQ ID NO: 6), CAR 214 (SEQ ID NO: 56), CAR 215 (SEQ ID NO: 57), CAR 216 (SEQ ID NO: 58), CAR 218 (SEQ ID NO: 59), CAR 193 (SEQ ID NO: 55) или CAR 268 (SEQ ID NO: 7).

Другой аспект настоящего изобретения относится к трансформированной Т-клетке, экспрессирующей полипептид, содержащий или состоящий из CAR 217 (SEQ ID NO: 2), CAR 194 (SEQ ID NO: 3), CAR 212 (SEQ ID NO: 4), CAR 213 (SEQ ID NO: 5), CAR 265 (SEQ ID NO: 6), CAR 214 (SEQ ID NO: 56), CAR 215 (SEQ ID NO: 57), CAR 216 (SEQ ID NO: 58), CAR 218 (SEQ ID NO: 59), CAR 193 (SEQ ID NO: 55) или CAR 268 (SEQ ID NO: 7). Клетка может представлять собой иммортализованную клетку. Т-клетка может представлять собой альфа-бета Т-клетку, гамма-дельта Т-клетку, НК-клетку, NKT-клетку, стволовую клетку, клетки, полученные из стволовых клеток, включая клетки иммунной системы.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтическому препарату, содержащему трансформированную Т-клетку по настоящему изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей химерный антигенный рецептор, содержащий или состоящий из CAR 217 (SEQ ID NO: 2), CAR 194 (SEQ ID NO: 3), CAR 212 (SEQ ID NO: 4), CAR 213 (SEQ ID NO: 5), CAR 265 (SEQ ID NO: 6), CAR 214 (SEQ ID NO: 56), CAR 215 (SEQ ID NO: 57), CAR

216 (SEQ ID NO: 58), CAR 218 (SEQ ID NO: 59), CAR 193 (SEQ ID NO: 55) или CAR 268 (SEQ ID NO: 7). Нуклеиновая кислота может содержаться в Т-клетке, такой как, например, альфа-бета Т-клетка, гамма-дельта Т-клетка, НК-клетка, НКТ-клетка, стволовая клетка или Т-клетка, полученная из плюрипотентной клетки. Т-клетка может  
5 содержаться в фармацевтически приемлемом носителе или эксципиенте.

Другой аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей библиотеку разных кодирующих CAR векторов, при этом векторы в указанной библиотеке рандомизированы в отношении отличающихся антигенсвязывающих доменов, шарнирных доменов и/или эндодоменов. В некоторых вариантах  
10 осуществления библиотека рандомизирована в отношении отличающихся антигенсвязывающих доменов, шарнирных доменов и эндодоменов. В некоторых вариантах осуществления библиотека рандомизирована в отношении отличающихся антигенсвязывающих доменов и эндодоменов. В некоторых вариантах осуществления библиотека  
15 рандомизирована в отношении отличающихся шарнирных доменов и эндодоменов.

Примеры антигенсвязывающих доменов, шарнирных областей, трансмембранных доменов и эндодоменов, которые могут быть использованы в способах по настоящему изобретению для получения CAR, приведены ниже в таблице 1. Антигенсвязывающие  
20 домены, шарнирные области, трансмембранные домены и эндодомены приведены в таблице 1 лишь в качестве неограничивающих примеров, и предполагается, что можно выбирать практически любой антигенсвязывающий домен (например, нацеленный на злокачественную клетку, бактерию, грибок, вирус, или инфицированную вирусом  
25 клетку), нужный для конкретного клинического применения. В таблице 1 приведена мишень антигенсвязывающего домена (например, «CD19» может означать область scFv, которая избирательно связывает CD19). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит или состоит из scFv, которая избирательно связывает антиген. Если нужно, можно рандомизировать часть scFv (например, часть  
30 вариабельной области scFv). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен избирательно связывает белок. Альтернативно, антигенсвязывающий домен может избирательно связывать углевод, экспрессированный на мишени, такой как, например, грибок, вирус, бактерия или злокачественная клетка. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит  
35 или состоит из дектина-1, который может избирательно связывать  $\beta$ -глюканы и углевод, присутствующий в клеточных стенках грибков. В некоторых вариантах осуществления CAR может избирательно связывать вирус, например, CAR может связывать вирусный белок, такой как белок оболочки вируса гепатита (например, Krebs *et al.*, 2013). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой цитокин. Антигенсвязывающий домен может избирательно связывать белок, углевод  
40 или сахар. В некоторых вариантах осуществления CAR получают из множества антигенсвязывающих доменов, которые избирательно связывают одну мишень, антиген, или антигенсвязывающие домены могут иметь перекрывающиеся антигены. В некоторых вариантах осуществления CAR получают из множества антигенсвязывающих доменов, которые избирательно связывают разные мишени или антигены. Эндодомен в CAR  
45 может приводить к возникновению ингибирующего сигнала (например, PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, ITIM, SHP-1, LAIR-1, TIGIT, Siglecs) или стимулирующего сигнала (например, CD27, CD28, ICOS, CD134, CD137, LCK, DAP10, ITAM, ZAP-70, LAT, SLP-76, цитокины, а также рецепторы цитокинов; а также комбинации и мутации) в клетке,

экспрессирующей CAR, такой как, например, Т-клетка или клетка - естественный киллер (NK). Когда антигенсвязывающая область избирательно узнает антиген, эндодомен может заставлять или стимулировать клетку (например, Т-клетку или NK-клетку), содержащую CAR, активировать уничтожение, миграцию, дифференциацию, дедифференциацию клетки, или приводить к индукции апоптозного сигнала в клетке. Апоптозный сигнал может включать или представлять собой апоптозный сигнал CTLA4 и/или апоптозный сигнал PD1 (белок программируемой гибели 1). В некоторых вариантах осуществления более одного отдельного CAR может быть экспрессировано в клетке, такой как, например, Т-клетка или NK-клетка. Например, первый CAR и второй CAR могут экспрессироваться в клетке, при этом первый CAR избирательно связывает антиген на здоровой клетке и индуцирует ингибирующий сигнал через первый эндодомен (например, снижая вероятность того, что Т-клетка или NK-клетка повредит здоровую клетку), а второй CAR избирательно связывает антиген на клетке-мишени (например, злокачественной клетке, грибок, инфицированной вирусом клетке, бактерии) и индуцирует стимулирующий сигнал через второй эндодомен (например, стимулируя или вызывая уничтожение клетки-мишени Т-клеткой или NK-клеткой). CAR, полученный способами по настоящему изобретению, можно встраивать в целевую клетку, такую как, например, Т-клетка или NK-клетка, в виде интегрирующей ДНК (например, путем электропорации и гомологичной рекомбинации с помощью вектора или системы транспозазы/транспозона) или в виде не интегрирующей ДНК или РНК (например, вирусная доставка мРНК с использованием такого вирусного вектора, как, например, лентивирус или ретровирус). В некоторых вариантах осуществления Т-клетка, кодирующая CAR по настоящему изобретению, представляет собой иммортализованную клетку; такие иммортализованные клетки можно использовать для оценки или измерения терапевтического потенциала или токсичности CAR. Таким образом, множество CAR можно подвергать скринингу на желательный фармакологический профиль, токсичность в отношении безвредных клеток или патогенов, отсутствие токсичности для здоровых клеток и/или терапевтическую эффективность.

**Таблица 1. Молекулы ДНК, которые можно комбинировать в качестве антигенсвязывающего домена-шарнирного-сигнального доменов для создания CAR**

Антигенсвязывающий домен (например, ScFv, который избирательно связывает мишени, перечисленные ниже)	
	CD19 (мышь) (например, SEQ ID NO: 8)
	CD19 (человека) (например, SEQ ID NO: 9)
	CD19 (гуманизированный)
35	Универсальный антиген (мышь) (Rushworth <i>et al.</i> , 2014)
	CD22 (например, scFv из Jabbour <i>et al.</i> , 2014 или Kong <i>et al.</i> , 2014)
	CD4 (например, scFv из Humblet-Baron <i>et al.</i> , 2015)
	CD44v6 (например, scFv из Leung 2010 или Verel 2002)
	CD45 (например, scFv из Shin <i>et al.</i> , 2011)
40	CD28 (например, scFv из Czerwiński <i>et al.</i> , 2015)
	CD3 (например, SEQ ID NO: 10)
	CD3ε (например, scFv из моноклонального антитела SPV-T3b, Life Technologies, Carlsbad, CA)
	CD123 (например, SEQ ID NO: 11)
	CD138 (например, scFv из Sun <i>et al.</i> , 2007)
	CD52 (например, scFv из Wang <i>et al.</i> , 2015)
45	CD56 (например, scFv из Kaufmann <i>et al.</i> , 1997)
	CD74 (например, scFv из Kaufman <i>et al.</i> , 2013)
	CD30 (например, SEQ ID NO: 12)
	Grp75 (например, scFv из Patel <i>et al.</i> , 2008)
	CD38 (например, scFv из de Weers <i>et al.</i> , 2011)

	CD33 (например, scFv из Manero <i>et al.</i> , 2013)
	CD20 (например, scFv из Le Garff-Tavernier <i>et al.</i> , 2014 или Winiarska <i>et al.</i> , 2014)
	Слитый продукт Her1/HER3 (например, scFv из Sarup <i>et al.</i> , 2008)
	HER-3 (например, SEQ ID NO: 13)
5	GD2 (например, SEQ ID NO: 14)
	Углеводы (такие как углевод <i>Aspergillus</i> ), например, scfv из Stynen <i>et al.</i> , 1991)
	ROR1 (например, SEQ ID NO: 15)
	c-MET (например, scFv из Zhuang <i>et al.</i> , 2014)
	cMyc (например, SEQ ID NO: 16)
	EGFR (например, scFv из Funakoshi <i>et al.</i> , 2014)
10	Дектин (например, эктодомен дектина 1, SEQ ID NO: 17)
	Сайт связывания дектина-1
	Вирус Эбола (например, scFv из Audet <i>et al.</i> , 2014 или Qiu <i>et al.</i> , 2012)
	Грибковые антигены (например, scFv из Guimarães <i>et al.</i> , 2011)
	GP (Qiu <i>et al.</i> , 2012)
	Gp75 (например, TA99, SEQ ID NO: 18)
15	HERV-K (HERVK) (например, SEQ ID NO: 19)
	NY-ESO-1 (например, scFv из Schultz-Thater <i>et al.</i> , 2000)
	VEGF-R2 (например, scFv из Zhang <i>et al.</i> , 2002)
	TGF-b2R (например, scFv из Leung, 2011)
	IgG4 (например, scFv из Curtin <i>et al.</i> , 2015)
	Биотин (например, scFv из Vincent <i>et al.</i> , 1993)
20	О-АсGD2 (например, scFv из Goldberg <i>et al.</i> , 2014 или Ahmed <i>et al.</i> , 2014)
	Белок CS1 (например, элтозумаб или huLuc63, SEQ ID NO: 20)
	Мезотелин (например, с использованием scFv SS-1, SEQ ID NO: 21)
	Фосфатидилсерин (например, scFv из Gerber <i>et al.</i> , 2011)
	<b>Шарнир/Каркас</b>
25	12 ак (пептид) (например, SEQ ID NO: 1)
	t-20 ак (пептид) (например, SEQ ID NO: 22)
	CD8 $\alpha$ (например, SEQ ID NO: 23)
	IgG4 Fc (например, SEQ ID NO: 24)
	2D3 (например, SEQ ID NO: 25)
	IgG4 Fc $\Delta$ EQ (IgG4Fc N40Q) (например, SEQ ID NO: 26)
30	IgG4 Fc $\Delta$ Q (IgG4Fc L18E N40Q) (например, SEQ ID NO: 27)
	t-12 ак+t-20 ак
	mKate (например, SEQ ID NO: 28)
	phiLov (например, SEQ ID NO: 29)
	dsRed (например, SEQ ID NO: 30)
	Venus (например, SEQ ID NO: 31)
35	eGFP (например, SEQ ID NO: 32)
	CH3 HA (например, SEQ ID NO: 33)
	mTFP-1 (например, SEQ ID NO: 34)
	CD8 $\alpha$ +t-20 ак
	Двойной t-20 ак
	t-20 ак+CD8 $\alpha$
40	CD8 $\alpha$ +лейциновая застежка Baser1 (например, SEQ ID NO: 35)
	CD8 $\alpha$ +лейциновая застежка Acid1 (например, SEQ ID NO: 36)
	<b>Трансмембранный домен</b>
	CD28 (например, SEQ ID NO: 37)
45	CD137 (4-1BB) (например, SEQ ID NO: 38)
	CD8 $\alpha$ (например, SEQ ID NO: 39)
	CD3 $\zeta$ (например, SEQ ID NO: 40)
	<b>Эндодомен (сигнальный домен)</b>
	CD28+CD3 $\zeta$

	CD28+CD27+CD3 $\zeta$
	CD28+OX40+CD3 $\zeta$
	CD28+4-1BB+CD3 $\zeta$
	CD28+CD27+OX40+CD3 $\zeta$
5	CD28+4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$
	CD28+4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$
	4-1BB+CD3 $\zeta$
	4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$
	4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$
	CD27+CD3 $\zeta$
10	CD27+OX40+CD3 $\zeta$
	CD28 $\Delta$ +CD3 $\zeta$
	CD28 $\Delta$ +CD27+CD3 $\zeta$
	CD28 $\Delta$ +OX40+CD3 $\zeta$
	CD28 $\Delta$ +4-1BB+CD3 $\zeta$
	CD28 $\Delta$ +4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$
15	CD28 $\Delta$ +CD27+OX40+CD3 $\zeta$
	CD28 $\Delta$ +4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$
	4-1BB+ICOS+CD3 $\zeta$
	CD28+ICOS+CD3 $\zeta$
	ICOS+CD3 $\zeta$
	CD3 $\zeta$
20	Только CD28

$\zeta$  - дзета;  $\Delta$  - мутант; примечание=4-1BB также называют CD137; «+» означает слияние разных областей.

Например, в некоторых вариантах осуществления можно использовать следующие антигенсвязывающие домены, шарниры/каркасы, трансмембранные домены и  
 25 эндодомены, которые приведены в таблице 2. Примеры последовательностей, входящих в сигнальные домены, например, в таблице 1 или таблице 2, включают CD27 (SEQ ID NO: 41), CD28 (SEQ ID NO: 42), CD28 $\Delta$  (SEQ ID NO: 43), CD134 (OX40) (SEQ ID NO: 44), CD137 (41BB) (SEQ ID NO: 45), ICOS (SEQ ID NO: 46) и CD3-дзета (SEQ ID NO: 47).  
 Примеры анти-EGFR доменов scFv, приведенных в таблице 2, включают нимотуксимаб  
 30 (SEQ ID NO: 48) и цетуксимаб (SEQ ID NO: 49). В качестве примера scFv против фосфатидилсерина, приведенных в таблице 2, можно назвать бавитуксимаб (SEQ ID NO: 50).

**Таблица 2: Пример библиотек, используемых для создания CAR**

35	ScFv
	Против белка CS1
	Против мезотелина (SS-1)
	Против CD123
	Против CD19 человека
	Против CD19 мыши
40	Против CD3
	Против CD30
	Против дектина
	Против G2D
	Против Gr75
	Против HERVK
45	Против CD22
	Против ROR-1
	Против EGFR
	Против HER-3
	Против фосфатидилсерина

	<b>Шарнир/Каркас</b>
	t-12 ак (пептид)
	t-20 ак (пептид)
	CD8 $\alpha$
5	IgG4 Fc
	IgG4 Fc $\Delta$ EQ
	IgG4 Fc $\Delta$ Q
	t-12 ак+t-20 ак
	mKate
	phiLov
10	dsRed
	Venus
	eGFP
	CH3 HA
	CD8 $\alpha$ +t-20 ак
	Двойной t-20 ак
15	t-20 ак+CD8 $\alpha$
	CD8 $\alpha$ +лейциновая застежка Basep1
	CD8 $\alpha$ +лейциновая застежка Acid1
	<b>Трансмембранный домен</b>
	CD28
	4-1BB
20	CD3 $\zeta$
	<b>Сигнальный домен</b>
	CD28+CD3 $\zeta$
	CD28+CD27+CD3 $\zeta$
	CD28+OX40+CD3 $\zeta$
	CD28+4-1BB+CD3 $\zeta$
25	CD28+CD27+OX40+CD3 $\zeta$
	CD28+4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$
	CD28+4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$
	4-1BB+CD3 $\zeta$
	4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$
	4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$
30	CD28 $\Delta$ +CD3 $\zeta$
	CD28 $\Delta$ +CD27+CD3 $\zeta$
	CD28 $\Delta$ +OX40+CD3 $\zeta$
	CD28 $\Delta$ +4-1BB+CD3 $\zeta$
	CD28 $\Delta$ +4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$
	CD28 $\Delta$ +CD27+OX40+CD3 $\zeta$
35	CD28 $\Delta$ +4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$
	4-1BB+ICOS+CD3 $\zeta$
	CD28+ICOS+CD3 $\zeta$
	ICOS+CD3 $\zeta$
	CD3 $\zeta$
40	Только CD28

Используемый в настоящем документе термин «химерные антигенные рецепторы (CAR)» или «CAR» включает искусственные Т-клеточные рецепторы, химерные Т-клеточные рецепторы или химерные иммунорецепторы. CAR, как правило, представляют собой сконструированные рецепторы, которые могут придавать искусственную специфичность конкретной иммунной эффекторной клетке. CAR можно использовать для придания специфичности моноклонального антитела Т-клетке, за счет этого создается возможность получения большого количества специфических Т-клеток, например, для использования в адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления CAR придают клетке специфичность в отношении ассоциированного с

опухолью антигена. В предпочтительных вариантах осуществления CAR содержат эндодомен (содержащий внутриклеточный домен активации), трансмембранный домен, шарнирную или каркасную область и внеклеточный домен, содержащий направляющий домен (например, scFv из моноклонального антитела). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный направляющий домен может представлять собой лиганд рецептора (например, пептид, который избирательно связывает белковый рецептор). В некоторых вариантах осуществления можно делать мишенью злокачественные клетки путем перенаправления специфичности Т-клеток за счет использования CAR, специфического для злокачественных клеток (например, путем использования анти-CD19 scFv для нацеливания на раковые клетки В-линии дифференцировки).

Примеры областей scFv, шарнирных/каркасных областей, трансмембранных доменов и эндодоменов приведены в таблице 1, и примеры соответствующих последовательностей также приведены в настоящем документе. Обратите внимание, что в таблице 1 области scFv могут означать множество областей scFv для конкретной мишени (например, «CD19» в таблице 1 может означать одну последовательность моноклонального антитела или в некоторых предпочтительных вариантах осуществления это может означать множество областей scFv, полученных из моноклональных антител, которые избирательно направлены на CD19). Предполагается, что способы по настоящему изобретению можно использовать для получения CAR, представляющего собой, например, продукт слияния любого сочетания области scFv, шарнира/каркаса, трансмембранного домена и эндодомена из таблицы 1. Например, в некоторых вариантах осуществления CAR может содержать область scFv, избирательно направленную на CD19 (например, происходящую из мышинового, человеческого или гуманизированного моноклонального антитела), которая слита с шарнирной/каркасной областью IgG4 Fc, трансмембранным доменом CD28 и эндодоменом, содержащим CD28 и CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления CAR может содержать область scFv, избирательно направленную на ROR1, которая слита с шарнирной/каркасной областью IgG4 Fc, трансмембранным доменом CD28 и эндодоменом, содержащим CD28 и CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления CAR может содержать область scFv, избирательно направленную на ROR1, которая слита с шарнирной/каркасной областью IgG4 Fc, трансмембранным доменом CD28 и эндодоменом, содержащим 4-1BB и CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления CAR может содержать область scFv, избирательно направленную на CD19 (например, происходящую из мышинового, человеческого или гуманизированного моноклонального антитела), которая слита с шарнирной/каркасной областью IgG4 Fc, трансмембранным доменом CD28 и эндодоменом, содержащим CD28 и CD3 $\zeta$ .

Используемый здесь термин «антиген» означает молекулу, которая может быть связана антителом или Т-клеточным рецептором. Антиген, как правило, можно использовать для вызывания гуморального иммунного ответа и/или клеточного иммунного ответа, приводящего к продуцированию В и/или Т-лимфоцитов.

При использовании в настоящем описании форма единственного числа существительных может означать «один или более». При использовании в формуле изобретения настоящего документа в сочетании со словом «содержащий» форма единственного числа существительных может означать «один или более чем один».

Слово «или» в формуле изобретения используют в значении «и/или», если специально не указано, что это слово означает исключительно альтернативные варианты, или что альтернативные варианты являются взаимоисключающими, хотя в описании изобретения имеет силу определение, означающее только альтернативные варианты и «и/или». При



использовании здесь «другой» может означать по меньшей мере второй или более.

В тексте данной заявки слово «примерно» используют для указания на то, что значение включает присущую погрешность устройства, способа, используемого для определения значения, или вариацию, которая существует среди субъектов исследования.

5 Другие цели, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего далее подробного описания. Следует понимать, однако, что подробное описание и конкретные примеры, демонстрирующие предпочтительные варианты осуществления изобретения, приведены исключительно с иллюстративной целью, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема  
10 изобретения станут очевидными для специалистов в данной области из этого подробного описания.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Следующие чертежи составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации некоторых аспектов настоящего изобретения.

15 Изобретение может быть лучше понято при ссылке на один или более из этих чертежей в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, приведенным в настоящем документе.

Фиг. 1. Клонированные векторы, используемые для сборки CAR с использованием трех донорских плазмид, экспрессирующих (i) конкретные scFv, (ii) внеклеточные шарниры и (iii) эндодомены. Данный подход будет адаптирован для создания панелей CAR, различающихся по шарнирной, трансмембранной и внутриклеточной областям. Выполняют конструирование молекул CAR из компонентов scFv, IgG4 Fc (длинный шарнир) или CD8a (средний шарнир), или только пептида (короткий шарнир) и CD3ζ в сочетаниях с разными сигнальными доменами с использованием системы тройных сайтов рекомбинации. Происходит рекомбинация библиотеки scFv, отдельных каркасов и сигнальных доменов, закодированных в трех донорских плаزمиде (исходные клоны), для экспрессии ДНК вектора. Этот подход позволяет получать множество видов CAR в формате scFv-В-каркас-С-сигнальный домен(ы).

30 Фиг. 2А-В: (фиг. 2А). Экспрессия CAR (Fc) и CD8<sup>+</sup> в Т-клетках через 66 дней после электропорации, определенная методом проточной цитометрии. Клетки были размножены в присутствии иАПК, нагруженных антигеном CD19 (клон 4); (фиг. 2В).

Лизис CD19<sup>+</sup> EL-4 сравнивали с фоновым лизисом CD19<sup>neg</sup> EL-4 в 4-ч анализе с высвобождением хрома при использовании CD19CAR<sup>+</sup> Т-клеток клинической категории (CG), CD19CAR<sup>+</sup> Т-клеток, полученных методом тройных сайтов рекомбинации (EZ CAR), и CAR<sup>neg</sup> Т-клеток. CAR<sup>neg</sup> Т-клетки были размножены в присутствии облученных и нагруженных анти-CD3 (ОКТ3) иАПК клона №4, полученных из клеток K562.

40 Фиг. 3: Конструкции CAR. CAR 212=SEQ ID NO: 4; CAR 213=SEQ ID NO: 5; CAR 214=SEQ ID NO: 56; CAR 215=SEQ ID NO: 57; CAR 216=SEQ ID NO: 58; CAR 217=SEQ ID NO: 2; CAR 218=SEQ ID NO: 59; CAR 193=SEQ ID NO: 55.

Фиг. 4: Отслеживаемые плазмиды «спящая красавица».

Фиг. 5: Экспрессия CAR.

Фиг. 6: Кинетика экспрессии CAR.

Фиг. 7: Фенотип.

45 Фиг. 8А-В: Расширенный фенотип представлен на фиг. 8А и фиг. 8В.

Фиг. 9: Вестерн-блот анализ.

Фиг. 10: Кинетика размножения.

Фиг. 11: Кратность размножения: Общее количество клеток.

Фиг. 12: Кратность размножения: CAR+ Т-клетки.

Фиг. 13: Цитотоксичность.

Фиг. 14: 4-1BB CAR: Цитотоксичность.

Фиг. 15: ТМ домен: Цитотоксичность.

5 Фиг. 16: Спейсер (IgG4 против CD8): Цитотоксичность.

Фиг. 17: Продукция IFN- $\gamma$ .

Фиг. 18: 4-1BB CAR: продукция IFN- $\gamma$ .

Фиг. 19: ТМ домен: продукция IFN- $\gamma$ .

Фиг. 20: Спейсер (IgG4 против CD8): продукция IFN- $\gamma$ .

10 Фиг. 21: Безопасность: ПЦР для транспозазы SB11.

Фиг. 22: Безопасность: число копий CAR (кПЦР).

Фиг. 23: Безопасность: Автономный рост. Как показано на фигуре, наблюдается отсутствие автономного роста.

Фиг. 24: Конструкция CAR. Пример CAR приведен на правой стороне фигуры.

15 Фиг. 25: CD3-дзета. Искомая=SEQ ID NO: 51; исследуемая - верх=SEQ ID NO: 52; исследуемая - центр=SEQ ID NO: 53; исследуемая - низ=SEQ ID NO: 54.

Фиг. 26: Конструкции CAR.

Фиг. 27: CAR.

Фиг. 28: Экспрессия CAR.

20 Фиг. 29: Кинетика размножения.

Фиг. 30: Кинетика размножения.

Фиг. 31: Цитотоксичность.

Фиг. 32: Цитотоксичность.

Фиг. 33: Маркеры памяти. Показан процент экспрессии CD27, CD62L, CD28 и CCR7

25 на CAR<sup>+</sup> Т-клетках (экспрессионные конструкции показаны на фиг. 26).

Фиг. 34: Продукция IFN- $\gamma$ .

Фиг. 35: Продукция IFN- $\gamma$  (РМА-иономицин)

Фиг. 36: Автономный рост.

Фиг. 37: Число копий CAR.

30 Фиг. 38: Число копий CAR.

Фиг. 39: Число копий CAR.

Фиг. 40А-Е: Была проведена трансфекция клеток 293-НЕК плазмидами, несущими ДНК CAR (pSBSO EZ CAR) методом с липофектаминоном. Трансфицированные клетки анализировали методом проточной цитометрии после окрашивания анти-Fc или анти-идиотипическими (анти-CD19 svFv) антителами.

35 Фиг. 41А-В: фиг. 41А. Nalm-6; EL-4 CD19+ клетки; опухолевые клетки пациента с MCL и CLL (мишени), и ранее были модифицированы для экспрессии GFP.  $5 \times 10^3$  клеток-мишеней инкубировали с CD19RIgG4CD28CAR Т-клетками, CD19RCD8 $\alpha$ CD28 CAR Т-клетками и CAR<sup>neg</sup> Т-клетками (используемыми в качестве контроля) в возрастающих концентрациях в течение 4 часов. Через 4 часа клетки были перенесены в устройство iQue компании IntelliCyt и анализ данных был проведен с использованием его запатентованного программного обеспечения. Фиг. 42В. Графики представляют процент уничтожения CAR Т-клетками клеток опухолей. Соотношение между эффекторными

40 клетками и клетками-мишенями находилось в диапазоне от 0 до 40 клеток.

Фиг. 42:  $5 \times 10^3$  клеток-мишеней (EL-4 CD19+ гранзим В клеточный репортер) инкубировали с CD19RIgG4CD28CAR Т-клетками клинической категории, EZ CD19RCD8 $\alpha$ CD28 CAR Т-клетками и CAR<sup>neg</sup> Т-клетками (используемыми в качестве

контроля) в возрастающих концентрациях в течение 4 и 10 часов. После завершения инкубации клетки были перенесены в устройство iQue компании IntelliCyt и анализ данных был проведен с использованием его запатентованного программного обеспечения. Графики представляют процент уничтожения CAR Т-клетками клеток  
5 опухолей. Соотношение между эффекторными клетками и клетками-мишенями находилось в диапазоне от 0 до 20 клеток.

## ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе предложены способы получения химерных антигенных рецепторов (CAR). В способе используют множество векторов, каждый из которых кодирует антигенсвязывающий домен (например, область scFv), шарнирную область, трансмембранную область и/или эндодомен. Например, в некоторых вариантах осуществления первый вектор кодирует антигенсвязывающий домен, второй вектор кодирует шарнирную область, и третий вектор кодирует эндодомен. В некоторых  
15 вариантах осуществления трансмембранная область закодирована либо во втором векторе, в третьем векторе, либо в четвертом векторе. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления векторы способны к гомологичной рекомбинации, с образованием нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, шарнирную область, трансмембранную область и  
20 эндодомен. Таким образом, можно создавать множество CAR и проводить скрининг на желаемую активность, такую как, например, избирательное узнавание и уничтожение раковой клетки, экспрессирующей антиген, который избирательно связывается CAR. Затем CAR может экспрессироваться в клетке, такой как Т-клетка или клетка-естественный киллер (NK), в виде интегрирующей нуклеиновой кислоты (например,  
25 ДНК, интегрированной в геном хозяина с использованием транспозазы/транспозона) или в виде не интегрирующей нуклеиновой кислоты (например, мРНК, доставляемой с помощью вирусного вектора, такого как лентивирус или ретровирус). Т-клетку или НК-клетку, экспрессирующую CAR, затем можно вводить в фармацевтическом препарате или эксципиенте субъекту, такому как пациент-человек, для лечения или предотвращения  
30 заболевания (например, рака, грибковой инфекции, бактериальной инфекции или вирусной инфекции).

### I. Получение библиотеки

Библиотеки, кодирующие множество областей scFv, шарнирных/каркасных областей, трансмембранных доменов и эндодоменов (сигнальных доменов), можно получать  
35 методами, известными специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления множество возможностей существует для двух или трех из областей scFv, шарнирных/каркасных областей и эндодоменов (сигнальных доменов). В некоторых вариантах осуществления множество возможностей существует для двух, трех или всех из областей scFv, шарнирных/каркасных областей, трансмембранных  
40 доменов и эндодоменов (сигнальных доменов). Примеры областей scFv, шарнирных/каркасных областей, трансмембранных доменов и эндодоменов (сигнальных доменов) приведены, например, в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления библиотека может кодировать множество scFv, которые направлены на разные антигены, такие как несколько противораковых или направляющих на опухоль антигенов; в других  
45 вариантах осуществления библиотека может кодировать множество разных scFv, которые избирательно связывают одну мишень (например, один противораковый антиген, такой как CD19, и так далее). Таким образом, способы можно использовать либо для определения, какой направляющий на опухоль конструктор может действовать

более эффективно для конкретного клеточного образца (например, для использования в персонализированной медицине), либо способы можно использовать для идентификации нового CAR, который действует более эффективно при направлении на конкретный антиген. Область scFv, как правило, содержит переменную легкую (VL) и переменную тяжелую (VH) цепь, полученные из антитела. В некоторых вариантах осуществления части областей VL и VH можно рандомизировать, если необходимо. Общие способы получения библиотек включают, например, создание дрожжевых библиотек, бактериальных, фаговых библиотек, инфильтрирующих В-клеток, гибридом (в том числе из клеток человека и грызунов) или библиотек из клеток лам, верблюдов, библиотек из клеток лошадей, а также *in silico* методы (смотри, например, Lennard, 2002).

В некоторых вариантах осуществления проводят слияние разных векторов, кодирующих scFv, шарнирную/каркасную область, трансмембранный домен и эндодомен, с образованием одного вектора, кодирующего CAR. Слияние может осуществляться за счет опосредованной транспозоном гомологичной рекомбинации.

Например, в некоторых вариантах осуществления векторы, кодирующие scFv, шарнирную/каркасную область, трансмембранный домен и/или эндодомен, могут представлять собой ДНК плазмиды «спящая красавица» (SB) или piggyBac. ДНК плазмиды «спящая красавица» (SB) и piggyBac описаны, например, в публикациях Maiti *et al.* (2013), Singh *et al.* (2008) и Huls *et al.* (2013). В некоторых вариантах осуществления транспозон опосредован Tc1-подобной транспозазой лососевых (SB). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления вектор, кодирующий CAR, трансфицирован или включен в Т-клетки субъекта, такого как пациент-человек с раком, методами, описанными в публикациях Singh *et al.*, 2014 или Huls *et al.* Например, ДНК векторы, полученные с помощью системы «спящая красавица» (SB), можно использовать, чтобы избежать расходов и производственных сложностей, связанных с трансдуцированием Т-клеток рекомбинантными вирусными векторами. После электропорации транспозон/транспозаза может повышать эффективность интеграции плазмид, используемых для экспрессии CAR и других трансгенов, в Т-клетки. Система SB, скомбинированная с искусственными антигенпредставляющими клетками (иАПК), позволяет избирательно наращивать и производить CAR(+) Т-клетки, подходящие для использования в организме человека. В некоторых вариантах осуществления за синхронным электропереносом двух ДНК плазмид, транспозона SB (кодирующего интересующий CAR) и транспозазы SB (например, SB11), может следовать отбор стабильных интегрантов путем добавления каждые 7 дней (цикл стимуляции)  $\gamma$ -облученных иАПК в присутствии растворимых рекомбинантных человеческих IL-2 и IL-21. Например, можно проводить 4 цикла (28 дней непрерывного культивирования) для достижения подходящих для клинического применения количеств Т-клеток, стабильно экспрессирующих интересующий CAR. Систему транспозон/транспозаза можно использовать для доставки Т-клеток, экспрессирующих CAR, как описано, например, в публикации Hackett *et al.*

## II. Химерные антигенные рецепторы

Варианты осуществления настоящего изобретения включают получение и идентификацию нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид антигенспецифического химерного антигенного рецептора (CAR). В некоторых вариантах осуществления CAR является гуманизированным для уменьшения иммуногенности (hCAR).

В некоторых вариантах осуществления CAR может узнавать эпитоп, состоящий из области, общей между одним или более антигенами. Распознающие структуру рецепторы, такие как дектин-1, можно использовать для создания специфичности в

отношении углеводного антигена. В конкретных вариантах осуществления связывающая область может содержать определяющие комплементарность области моноклонального антитела, переменные области моноклонального антитела и/или его антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления связывающая область представляет собой scFv. В другом варианте осуществления пептид (например, цитокин), который связывается с рецептором или клеточной мишенью, может быть включен в качестве возможной или заменяющей scFv области в связывающую область CAR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления CAR можно создавать из множества векторов, кодирующих множество областей scFv и/или других направляющих белков. Определяющая комплементарность область (CDR) представляет собой короткую аминокислотную последовательность, присутствующую в переменных доменах белков - рецепторов антигена (например, иммуноглобулина и Т-клеточного рецептора), которая соответствует антигену и, таким образом, обеспечивает рецептору специфичность для конкретного антигена. Каждая полипептидная цепь рецептора антигена содержит три области CDR (CDR1, CDR2, и CDR3). Поскольку рецепторы антигена, как правило, состоят из двух полипептидных цепей, у каждого антигенного рецептора имеется шесть CDR, которые вступают в контакт с антигеном - каждая тяжелая и легкая цепь содержит три CDR. Поскольку большинство вариаций в последовательности, связанных с избирательностью иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора, как правило, имеют место в областях CDR, эти области иногда называют гиперпеременными доменами. Среди них, область CDR3 обладает наибольшей переменной, поскольку она закодирована за счет рекомбинации областей VJ (VDJ в случае тяжелой цепи и  $\alpha\beta$  цепи TCR).

Кодирующая CAR нуклеиновая кислота, полученная по настоящему изобретению, может содержать один или более генов, либо генных фрагментов человека для усиления клеточной иммунотерапии для пациентов-людей. В некоторых вариантах осуществления полноразмерная кДНК CAR или кодирующая область может быть получена способами, описанными в настоящем документе. Антигенсвязывающие области или домены могут содержать фрагмент цепей VH и VL одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), происходящего из конкретного человеческого моноклонального антитела, таких как те, которые описаны в патенте США 7109304, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит антигенсвязывающие домены человеческого антигенспецифического антитела. В некоторых вариантах осуществления область scFv представляет собой антигенспецифическую scFv, закодированную последовательностью, которая оптимизирована в соответствии с частотой использования кодонов, свойственной человеку, для экспрессии в человеческих клетках.

Конструкция антигенсвязывающего домена CAR может быть мультимерной, такой как диатело или мультимеры. Мультимеры могут быть образованы за счет перекрестного спаривания переменных частей легкой и тяжелой цепей в структуру, которая может быть названа диателом. В некоторых вариантах осуществления шарнирная часть CAR может быть укорочена или исключена (то есть, с образованием CAR, который содержит только антигенсвязывающий домен, трансмембранную область и внутриклеточный сигнальный домен). Множество шарнирных областей можно использовать по настоящему изобретению, например, приведенных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область может иметь первый остаток цистеина, сохраненный или мутированный за счет замены на остаток пролина или серина, или быть укорочена вплоть до первого остатка цистеина. Fc-часть может быть

делетирована из scFv, используемой в качестве антигенсвязывающей области для получения CAR в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая область может кодировать только один из Fc-доменов, например, или CH2, или CH3 домен из человеческого иммуноглобулина. Также можно включать шарнир, CH2 и CH3 область человеческого иммуноглобулина, которые были модифицированы для улучшения димеризации и олигомеризации. В некоторых вариантах осуществления шарнирная часть может содержать или состоять из пептида длиной 8-14 аминокислот (например, пептид 12 ак), части CD8 $\alpha$  или IgG4 Fc. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен может быть подвешен к клеточной поверхности с использованием домена, который способствует олигомеризации, такого как CD8-альфа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен может быть подвешен к клеточной поверхности с использованием домена, который узнается моноклональным антителом (мАт) клона 2D3 (мАт клона 2D3 описано, например, в публикации Singh *et al.*, 2008).

Эндодомен или внутриклеточный сигнальный домен CAR, как правило, может вызывать или стимулировать активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, содержащей CAR. Например, эндодомен может стимулировать такую эффекторную функцию Т-клетки, как, например, цитолитическая активность или хелперная активность, включая секрецию цитокинов. Эффекторная функция у «необученной» Т-клетки, Т-клетки памяти или Т-клетки типа клетки памяти, может включать антиген-зависимую пролиферацию. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» или «эндодомен» относится к части CAR, которая может передавать сигнал эффекторной функции и/или направлять клетку на выполнение специализированной функции. Хотя, как правило, целый внутриклеточный сигнальный домен может быть включен в CAR, в некоторых случаях можно включать укороченную часть эндодомена. Как правило, эндодомены включают укороченные эндодомены, при этом укороченный эндодомен сохраняет способность к передаче сигнала эффекторной функции в клетке.

В некоторых вариантах осуществления эндодомен содержит дзета-цепь Т-клеточного рецептора или любую из ее гомологов (например, эта, дельта, гамма или эпсилон), MB1 цепь, B29, Fc RIII, Fc RI, а также сочетание сигнальных молекул, например, CD3 $\zeta$  и CD28, CD27, 4-1BB, DAP-10, OX40, а также их сочетания, а также другие аналогичные молекулы и фрагменты. Можно использовать внутриклеточные сигнальные фрагменты других членов семейств активирующих белков, таких как Fc $\gamma$ RIII и Fc $\epsilon$ RI. Примеры этих альтернативных трансмембранных и внутриклеточных доменов можно найти, например, в публикациях Gross *et al.* (1992), Stancovski *et al.* (1993), Moritz *et al.* (1994), Hwu *et al.* (1995), Weijtens *et al.* (1996) и Hekele *et al.* (1996), полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления эндодомен может содержать человеческий внутриклеточный домен CD3 $\zeta$ .

Антигенспецифический внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен предпочтительно связаны с помощью трансмембранного домена. Трансмембранные домены, которые можно включать в CAR, включают, например, человеческие IgG4 Fc шарнирную и Fc-области, человеческий трансмембранный домен CD4, человеческий трансмембранный домен CD28, трансмембранный человеческий домен CD3 $\zeta$ , или мутантный по цистеину человеческий домен CD3 $\zeta$ , или трансмембранные домены из человеческого трансмембранного сигнального белка, такого как, например, CD16 и CD8, и рецептор эритропоэтина. Примеры трансмембранных доменов приведены,

например, в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления эндодомен содержит последовательность, кодирующую костимулирующие рецепторы, такие как, например, модифицированный внутриклеточный сигнальный домен CD28 или костимулирующий рецептор CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10 или 4-1BB (CD137). В некоторых вариантах осуществления как первичный сигнал, иницируемый CD3  $\zeta$ , так и дополнительный сигнал, обеспечиваемый человеческим костимулирующим рецептором, можно включать в CAR для более эффективной активации трансформированных Т-клеток, что может способствовать улучшению персистенции *in vivo* и терапевтическому успеху адоптивной иммунотерапии. Как указано в таблице 1, эндодомен или внутриклеточный рецепторный сигнальный домен может содержать дзета-цепь CD3, одну или в сочетании с костимулирующими сигнальными доменами Fc $\gamma$  RIII, такими как, например, CD28, CD27, DAP10, CD137, OX40, CD2, 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления эндодомен содержит часть или все из одного или более из дзета-цепи TCR, CD28, CD27, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , ICOS/CD278, IL-2R $\beta$ /CD122, IL-2R $\alpha$ /CD132, DAP10, DAP12 и CD40. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4 или более цитоплазматических доменов можно включать в эндодомен. Например, установлено, что в некоторых CAR по меньшей мере два или три сигнальных домена, слитые вместе, могут приводить к аддитивному или синергетическому эффекту.

В некоторых аспектах можно получать выделенный сегмент нуклеиновой кислоты и экспрессионную кассету, содержащую последовательности ДНК, кодирующие CAR. Можно использовать различные векторы. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления с помощью вектора можно доставлять ДНК, кодирующую CAR, в иммунные клетки, такие как Т-клетки. Экспрессия CAR может происходить под контролем регулируемого эукариотического промотора, такого как, например, промотор MNDU3, промотор CMV, промотор EF1-альфа или промотор убиквитина. Кроме того, вектор может содержать селективный маркер, если не по другой причине, то для облегчения манипуляций *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления CAR может быть экспрессирован *in vitro* с мРНК, транскрибированной с ДНК-матрицы.

Молекулы химерного антигенного рецептора являются рекомбинантными и характеризуются их способностью как связывать антиген, так и передавать сигналы активации за счет фрагментов активации иммунорецепторов (ITAM), имеющихся в их цитоплазматической части. Рецепторные конструкторы, в которых используют антигенсвязывающий фрагмент (например, полученный из одноцепочечных антител (scFv)), имеют дополнительное преимущество, являясь «универсальными», поскольку они могут связывать нативный антиген на поверхности клетки-мишени независимо от HLA образом. Например, можно осуществлять слияние конструкторов scFv с последовательностями, кодирующими внутриклеточную часть дзета-цепи ( $\zeta$ ) комплекса CD3, гамма-цепи Fc-рецептора и sky тирозинкиназы (Eshhar *et al.*, 1993; Fitzer-Attas *et al.*, 1998). Эффекторные механизмы перенаправленных Т-клеток, включая узнавание опухоли и лизис за счет CTL, были отмечены для нескольких мышинных и человеческих систем антиген-scFv:  $\zeta$  (Eshhar *et al.*, 1997; Altenschmidt *et al.*, 1997; Brocker *et al.*, 1998).

Антигенсвязывающая область может, например, быть из человеческих или не принадлежащих человеку scFv. Одной из возможных проблем при использовании антигенсвязывающих областей, не принадлежащих человеку, например, из мышинных моноклональных антител, является сниженная эффекторная функция в организме человека и сниженная способность проникать в опухолевые массы. Кроме того, моноклональные антитела, отличные от человеческих, могут узнаваться в организме

хозяина-человека как чужеродный белок и, таким образом, повторяющиеся инъекции таких чужеродных антител могут являться причиной индукции иммунных ответов, приводящих к причиняющим вред реакциям гиперчувствительности. В случае мышинных моноклональных антител этот эффект был назван ответом «антитела человека против антител мыши» (НАМА). В некоторых вариантах осуществления при включении последовательностей человеческого антитела или scFv в CAR может иметь место небольшой, или вовсе отсутствовать, НАМА ответ по сравнению с использованием некоторых мышинных антител. Аналогично, включение человеческих последовательностей в CAR можно использовать для уменьшения или избегания риска опосредованного иммунной системой узнавания или элиминации эндогенными Т-клетками, которые имеются у реципиента и могут узнавать процессированный антиген в контексте HLA.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит: а) внутриклеточный сигнальный домен, б) трансмембранный домен, в) шарнирную область и д) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающую область. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен и трансмембранный домен закодированы с эндодоменом в одном векторе, который может быть слит (например, посредством транспозон-направленной гомологичной рекомбинации) с вектором, кодирующим шарнирную область, и вектором, кодирующим антигенсвязывающую область. В других вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область и трансмембранная область могут быть закодированы двумя отдельными векторами, которые являются слитыми (например, посредством транспозон-направленной гомологичной рекомбинации).

В некоторых вариантах осуществления антигенспецифическая часть CAR, также называемая внеклеточным доменом, содержащая антигенсвязывающую область, избирательно направлена на ассоциированный с опухолью антиген. Ассоциированный с опухолью антиген может быть любого типа при условии, что он экспрессирован на клеточной поверхности клеток опухолей. Примеры ассоциированных с опухолью антигенов, на которые могут быть направлены CAR, полученные в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, CD19, CD20, канцероэмбриональный антиген, альфафетопротеин, СА-125, MUC-1, CD56, EGFR, c-Met, АКТ, Her2, Her3, эпителиальный опухолевый антиген, ассоциированный с меланомой антиген, мутантный p53, мутантный ras, дектин-1 и так далее. В некоторых вариантах осуществления эта антигенспецифическая часть CAR представляет собой scFv. Примеры направленных на опухоли scFv приведены в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления CAR может быть совместно экспрессирован с мембраносвязанным цитокином, например, для улучшения персистенции в случае низкого количества ассоциированного с опухолью антигена. Например, CAR может быть совместно экспрессирован с мембраносвязанным IL-15.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный ассоциированный с опухолью антиген, такой как, например, HA-1, сурвивин, WT1 и p53, может являться мишенью для CAR. Это может быть достигнуто при использовании CAR, экспрессированного на универсальной Т-клетке, которая узнает процессированный пептид, происходящий из внутриклеточного ассоциированного с опухолью антигена, в контексте HLA. Кроме того, универсальную Т-клетку можно генетически модифицировать для экспрессии спаренного Т-клеточного рецептора, который узнает процессированный внутриклеточный ассоциированный с опухолью антиген в контексте HLA.



Патоген, узнаваемый CAR, может быть патогеном практически любого типа, однако в некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой грибок, бактерию или вирус. Иллюстративные вирусные патогены включают патогены из семейств *Adenoviridae*, вирус Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловирус (CMV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), JC вирус, BK вирус, HSV, семейство вирусов HHV, *Picornaviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae*, *Flaviviridae*, *Retroviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Papovaviridae*, полиомавирус, *Rhabdoviridae* и *Togaviridae*. Иллюстративные патогенные вирусы являются возбудителями оспы, гриппа, эпидемического паротита, кори, ветряной оспы, лихорадки эбола и краснухи.

Иллюстративные патогенные грибки включают *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* и *Stachybotrys*. Иллюстративные патогенные бактерии включают *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *E. coli*, *Rickettsia*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Chlamydia*, *Spirochetes* и *Salmonella*. В некоторых вариантах осуществления рецептор дектин-1 для патогенов можно использовать для создания CAR, который узнает углеводную структуру на клеточной стенке такого грибка, как *Aspergillus*. В другом варианте осуществления можно создавать CAR на основе антитела, узнающего вирусные детерминанты (например, гликопротеины из CMV и вируса эбола), для остановки вирусной инфекции и патологии.

В некоторых вариантах осуществления «голую» ДНК или подходящий вектор, кодирующий CAR, можно вводить в Т-клетки субъекта (например, Т-клетки, полученные от пациента-человека с раком или другим заболеванием). Способы стабильного трансфицирования Т-клеток методами электропорации с использованием «голой» ДНК известны в данной области. Смотри, например, патент США № 6410319. «Голая» ДНК, как правило, означает ДНК, кодирующую химерный рецептор по настоящему изобретению, содержащуюся в плазмидном экспрессионном векторе в правильной ориентации для экспрессии. В некоторых вариантах осуществления использование «голой» ДНК может сокращать время, необходимое для получения Т-клеток, экспрессирующих CAR, полученными способами по настоящему изобретению.

Альтернативно, можно использовать вирусный вектор (например, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор или лентивирусный вектор) для введения химерного конструкта в Т-клетки. Как правило, вектор, кодирующий CAR, который используют для трансфицирования Т-клетки от субъекта, не должен реплицироваться в Т-клетках субъекта. Известно большое число векторов на основе вирусов, в случае которых число копий вируса, поддерживаемое в клетке, является достаточно низким, чтобы сохранялась жизнеспособность клетки.

Иллюстративные векторы включают векторы рFB-нео (STRATAGENE®), а также векторы на основе HIV, SV40, EBV, HSV или BPV.

После того, как установлено, что трансфицированная или трансдуцированная Т-клетка способна экспрессировать CAR в виде поверхностного мембранного белка с нужной регуляцией и на нужном уровне, можно определять, является ли химерный рецептор функциональным в клетке-хозяине для обеспечения индукции нужного сигнала. Впоследствии трансдуцированные Т-клетки можно возвращать или вводить субъекту для активации противоопухолевых ответов у субъекта. Для облегчения введения трансдуцированные Т-клетки можно включать в фармацевтическую композицию или включать в имплантат, подходящий для введения *in vivo*, с соответствующими носителями или разбавителями, которые предпочтительно являются фармацевтически приемлемыми. Способы получения такой композиции или имплантата описаны в данной области (смотри, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16е издание, Mack, ed.

(1980)). Когда это целесообразно, трансдуцированные Т-клетки, экспрессирующие CAR, можно формулировать в препарат в полутвердой или жидкой форме, такой как капсула, раствор, инъекция, ингаляционное средство или аэрозоль, обычным образом для соответствующего им пути введения. Можно использовать способы, известные в данной области, для предотвращения или сведения к минимуму высвобождения и абсорбции композиции до того, как она достигнет целевой ткани или органа, либо для гарантии своевременного высвобождения композиции. Как правило, предпочтительно использовать фармацевтически приемлемую форму, которая не лишает эффективности клетки, экспрессирующие химерный рецептор. Таким образом, желательно, чтобы Т-клетки были включены в фармацевтическую композицию, содержащую сбалансированный солевой раствор, такой как сбалансированный солевой раствор Хэнкса или обычный солевой раствор.

### III. Искусственные антигенпредставляющие клетки

В некоторых случаях иАПК полезны для получения основанных на CAR терапевтических композиций и препаратов клеточной терапии. Для общего руководства по получению и использованию антигенпредставляющих систем смотри, например, патенты США №№ 6225042, 6355479, 6362001 и 6790662; публикации патентных заявок США №№ 2009/0017000 и 2009/0004142, а также международную публикацию № WO 2007/103009).

иАПК можно использовать для наращивания Т-клеток, экспрессирующих CAR. При встрече с опухолевым антигеном сигналы, доставляемые Т-клеткам антигенпредставляющими клетками, могут влиять на программирование Т-клеток и их последующую терапевтическую эффективность. Это обстоятельство стимулировало усилия по разработке искусственных антигенпредставляющих клеток, позволяющих осуществлять контроль над сигналами, поступающими к Т-клеткам (Turtle *et al.*, 2010). Помимо интересующих антитела или антигена, системы иАПК также могут содержать по меньшей мере одну экзогенную вспомогательную молекулу. Можно использовать любое подходящее число и сочетание вспомогательных молекул. Вспомогательную молекулу можно выбирать из таких вспомогательных молекул, как костимулирующие молекулы и молекулы адгезии. Иллюстративные костимулирующие молекулы включают CD70 и B7.1 (также называемую B7 или CD80), которые могут связываться с молекулами CD28 и/или CTLA-4 на поверхности Т-клеток, тем самым оказывая влияние, например, на размножение Т-клеток, Th1 дифференциацию, кратковременное выживание Т-клеток и секрецию цитокинов, таких как интерлейкин (IL)-2 (смотри Kim *et al.*, 2004). Молекулы адгезии могут включать углевод-связывающие гликопротеины, такие как селектины, трансмембранные связывающие гликопротеины, такие как интегрины, кальций-зависимые белки, такие как кадгеринины, а также однопроходные трансмембранные белки суперсемейства иммуноглобулинов (Ig), такие как молекулы межклеточной адгезии (ICAM), которые стимулируют, например, контакт клетки с клеткой или клетки с матриксом. Иллюстративные молекулы адгезии включают LFA-3 и ICAM, такие как ICAM-1. Устройства, методы и реагенты, полезные для отбора, клонирования, получения и экспрессии иллюстративных вспомогательных молекул, включая костимулирующие молекулы и молекулы адгезии, описаны, например, в патентах США №№ 6225042, 6355479 и 6362001.

Клетки, выбранные для получения из них иАПК, предпочтительно дефектны по внутриклеточному процессингу антигена, внутриклеточной направленной миграции пептидов и/или внутриклеточному нагружению пептидами молекул МНС класса I или класса II, или являются пойкилотермными (то есть, менее чувствительными к колебаниям

температуры, чем линии клеток млекопитающих), либо обладают как дефектами, так и пойкилотермными свойствами. Предпочтительно, клетки, выбранные для получения из них иАПК, также лишены способности экспрессировать по меньшей мере один эндогенный аналог (например, эндогенную молекулу МНС класса I или класса II, и/или эндогенные вспомогательные молекулы, описанные выше) для экзогенных молекул МНС класса I или класса II и вспомогательных молекул, которые вводят в клетки. Кроме того, иАПК предпочтительно сохраняют дефекты и пойкилотермные свойства, которые имеются у клеток до того, как их модифицируют для получения иАПК. Иллюстративные иАПК либо представляют собой, либо происходят из линии клеток, дефицитной по транспортеру, ассоциированному с процессингом антигенов (ТАР), такой как линия клеток насекомых. Иллюстративной пойкилотермной линией клеток насекомых является линия клеток дрозофилы, такая как линия клеток Schneider 2 (например, Schneider, J.m 1972). Иллюстративные способы получения, наращивания и культивирования клеток Schneider 2 описаны в патентах США №№ 6225042, 6355479 и 6362001.

иАПК можно подвергать циклу замораживания-размораживания. Например, иАПК можно замораживать, создавая контакт соответствующего сосуда, содержащего иАПК, с подходящим количеством жидкого азота, твердого диоксида углерода (сухого льда) или аналогичного низкотемпературного материала так, чтобы замораживание происходило быстро. Затем замороженные иАПК размораживают, либо извлекая иАПК из низкотемпературного материала и перенося в условия обычной комнатной температуры, либо применяя метод ускоренного размораживания, в котором для сокращения времени размораживания используют умеренно теплую водяную баню или теплую руку. Кроме того, иАПК можно замораживать и хранить в течение длительного периода времени до размораживания. Замороженные иАПК также можно размораживать и затем лиофилизировать до дальнейшего использования. Консерванты, которые могут неблагоприятно влиять на процедуру замораживания-размораживания, такие как диметилсульфоксид (ДМСО), полиэтиленгликоли (ПЭГ) и другие консерванты, предпочтительно не должны содержаться в среде, содержащей иАПК, которые подвергают циклу замораживания-размораживания, или должны быть в значительной степени удалены, например, путем переноса иАПК в среду, практически лишенную таких консервантов.

В других предпочтительных вариантах осуществления ксеногенная нуклеиновая кислота и нуклеиновая кислота, эндогенная для иАПК, могут быть инактивированы путем сшивки, так что практически никакого клеточного роста, репликации или экспрессии нуклеиновой кислоты не происходит после инактивации. Например, иАПК можно инактивировать после экспрессии экзогенных молекул МНС и вспомогательных молекул, представления таких молекул на поверхности иАПК и нагружения представленных МНС молекул выбранным пептидом или пептидами. Соответственно, такие инактивированные и нагруженные выбранным пептидом иАПК, хотя и практически неспособные к пролиферации или репликации, могут сохранять функцию представления выбранного пептида. Сшивку также может приводить к получению иАПК, которые практически свободны от загрязняющих микроорганизмов, таких как бактерии и вирусы, без существенного снижения антигенпредставляющей функции иАПК. Таким образом, сшивку можно использовать для сохранения важных АПК функций у иАПК, при этом устраняя беспокойство по поводу безопасности препарата клеточной терапии, разработанного с использованием иАПК. Для получения информации о методах, имеющих отношение к сшивке и иАПК, смотри, например,

публикацию патентной заявки США № 20090017000, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### IV. Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области должно быть понятно, что методы, раскрытые в следующих далее примерах, представляют собой методы, которые, как установлено авторами изобретения, хорошо подходят для осуществления на практике изобретения и, таким образом, могут считаться предпочтительными методами для этого. Однако специалисты в данной области, в свете настоящего раскрытия, должны признать, что множество изменений можно вносить в раскрытые конкретные варианты осуществления и все еще получать подобный или аналогичный результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

##### Пример 1

###### *Материалы и методы*

###### Получение ДНК плазмид клинической категории

Транспозон SB, CoOpCD19RCD28 ζ/pSBSO, экспрессирует оптимизированный по кодонам для человека (CoOp) CoOpCD19RCD28ζ CAR 2го поколения под контролем гибридного композитного промотора EF-1/HTLV (InvivoGen), состоящего из фактора элонгации 1a (EF-1a [Kim *et al.*, 1990] и 5'-нетранслируемой области вируса Т-клеточного лейкоза человека (HTLV) [Singh *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2010]. Получение этой ДНК плазмиды описано на фигуре 1. Транспозаза SB, SB11, под промотором цитомегаловируса (CMV) экспрессируется в цис-форме с ДНК плазмиды pCMV-SB11 (Singh *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2008). Обе плазмиды были полностью секвенированы и изготовлены в Waisman Clinical Biomanufacturing Facility (Madison, WI) с использованием канамицина для отбора бактериального штамма DH5a *E. coli*.

###### Получение ДНК плазмид с тройной сайт-специфической рекомбинацией - EZ-собранных-CAR

С использованием последовательности ДНК из CAR, описанного выше (CoOpCD19RCD28z/pSBSO), части: CD19 ScFv, шарнир IgG4 Fc и трансмембранную и цитозольную части домена CD28, конъюгированные с сигнальным доменом CD3ζ, фланкировали сайтами рекомбинации лямбда, синтезировали с помощью Genart (Life Technologies) в виде ПЦР-продуктов. Эти три части индивидуально вставляли в плазмиды pDonors221 (с помощью фермента BP клоназы (оба реагента от компании Invitrogen)). Проводили рекомбинацию трех плазмид с использованием тройной сайт-специфической рекомбинации плазмиды «спящая красавица» при помощи фермента LR PLUS клоназы (Invitrogen), с получением EZ-сбранного CD19CD28ζ CAR в формате scFv-В-каркас-С-сигнальный домен(ы) (фиг. 1).

###### Подсчет клеток

Анализ с исключением трипанового синего использовали для различения живых и мертвых клеток и подсчета на приборе Cellometer (Nexcelom Bioscience) (Singh *et al.*, 2011).

###### Выделение МКПК

Продукты лейкофереза от двух здоровых доноров-добровольцев мужского пола приобретали у компании Key Biologics LLC (Memphis, TN). Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли в системе Biosafe Sepax (Eysins, Switzerland), адаптированной авторами изобретения для работы в соответствии с требованиями cGMP. Вкратце, после закрытия всех зажимов в устройстве CS-900, 100 мл фиколла (GE Healthcare) асептически переносили с помощью 60-мл шприцев в мешок с градиентом

плотности среды («мешок с фиколлом») через соединитель с люэровской насадкой, и трубку термически запаивали с помощью ручного устройства для запаивания (Sebra, модель № 2380). Устройство было подключено с помощью иглы к 1000-мл мешку, содержащему буфер CliniMACS (PBS/ЭДТА, Miltenyi, каталожный № 70026) с 20 мл 25% человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) (Baxter) (2% по объему, промывочный буфер), для промываний, мешку для конечного продукта [300-мл переносной пакет с переходником (Baxter/Fenwal 4R2014)] и мешку с реагентом/кровью. Используя протокол разделения в градиенте плотности (v126), поршень шприца помещали в центрифужную камеру и покрывали Sepax иАПК (клон № 4) для избирательного размножения CAR+ Т-клеток. Использовали с-облученные иАПК для увеличения количества генетически модифицированных Т-клеток. Размороженные иАПК от WCV наращивали в СМ вплоть до 60 дней в мешках для культивирования клеток VueLife и собирали, используя процедуру сбора Biosafe Sepax II. Вкратце, устройство CS-490.1 соединяли с 300-мл мешком для конечного продукта (переносным пакетом) через соединитель с люэровской насадкой. Разделительную камеру устанавливали в углубление, трубку вставляли в оптический датчик и запорные краны устанавливали в Т-положении. После подключения линии датчика давления мешок с продуктом и мешки с супернатантом/плазмой подвешивали на держателе. В меню Sepax выбирали модифицированный протокол PBSCv302 и входной объем обрабатываемого продукта (начальный объем) устанавливали на #840 мл. После валидации и тестирования устройства начинали процедуру. После завершения мешки удаляли, зажимы закрывали и устройство удаляли. Клетки из мешка с конечным продуктом асептически извлекали, дважды промывали промывочной средой (10% ЧСА в Plasmalyte) и подсчитывали. иАПК облучали (100 Гр) с использованием облучающего устройства CIS BIO International (IBL-437 каталожный № 09433) и замораживали для более позднего использования в среде для криоконсервации, используя морозильную камеру с контролируемой скоростью замораживания (Planer Kryo 750). Нагруженные анти-CD3 (ОКТ3) иАПК клона № 4, полученные из клеток K562, использовали для наращивания контрольных (CARneg) аутологичных Т-клеток, не подвергнутых генетической модификации. Полученные из культуры иАПК инкубировали в течение ночи в бессывороточной среде X-Vivo 15 (каталожный № 04-744Q, Lonza), содержащей 0,2% ацетилцистеина (Acetadote, Cumberland Pharmaceuticals), называемой средой для нагружения (LM). На следующий день клетки промывали, облучали (100 Гр) с использованием облучающего устройства Gamma Cell 1000 Elite Cs-137 (MDS Nordion), ресуспендировали в LM в концентрации  $10^6$  клеток/мл вместе с очищенными антителами против CD3 человека (клон-ОКТ3, 16-0037-85, eBioscience) функциональной категории в количестве 1 мг/ $10^6$  клеток и инкубировали при осторожном перемешивании на 3-D вращающем устройстве (Lab-Line) при температуре 4°C в течение 30 минут. После трех промываний LM клетки использовали в экспериментах или замораживали аликвотами в парах жидкого азота для последующего использования.

#### Изготовление CAR+ Т-клеток

Размороженные МКПК ресуспендировали в (i) наборе человеческих Т-клеток (каталожный № VPA-1002, Lonza; 100 мкл для  $2 \times 10^7$  клеток в одной кювете) с (ii) ДНК плазмидой (CoOpCD19RCD28/pSBSO), кодирующей транспозон CD19RCD28 CAR (15 мкг сверхспиральной ДНК на  $2 \times 10^7$  МКПК на кювету), и (iii) ДНК плазмидой (pCMVSB11), кодирующей транспозазу SB11 (5 мкг сверхспиральной ДНК на  $2 \times 10^7$  МКПК на кювету). Эту смесь немедленно переносили в кювету (Lonza), подвергали

электропорации (определяя день 0 культивирования) с использованием устройства Nucleofector II (программа U-14, Amaha/Lonza), оставляли в 10% полной среде RPMI на 2-3 часа и, после замены половины среды, инкубировали в течение ночи при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день клетки собирали, подсчитывали,

5 определяли фенотип методом проточной цитометрии и совместно культивировали с облученными и АПК в соотношении 1:2 (CAR+ Т-клетка:иАПК), что соответствовало дню 1 культивирования и началу 7-дневного цикла стимуляции. IL-21 (каталожный № AF-200-21, ReproTech) и IL-2 (каталожный № NDC 65483-116-07, Novartis) добавляли по схеме понедельник-среда-пятница, начиная со дня 1 и дня 7, соответственно. НК-клетки  
10 могут предотвращать увеличение количества CAR+ Т-клеток, особенно если их избыточный рост происходит на ранних этапах процесса культивирования. Вследствие этого, проводили истощение по CD56, если количество CD3<sup>neg</sup>CD56<sup>+</sup> клеток возрастало на 10%, с использованием гранул для CD56 (каталожный № 70206, Miltenyi Biotec, 20 мл гранул/10<sup>7</sup> клеток) на колонках LS (каталожный № 130-042-401, Miltenyi Biotec) в буфере CliniMACS, содержащем 25% ЧСА (80 мл/10<sup>7</sup> клеток).

#### Получение контрольных CAR<sup>neg</sup> Т-клеток

В качестве контроля, 5×10<sup>6</sup> суррогатно трансфицированных МКПК совместно культивировали с облученными и нагруженными анти-CD3 (ОКТ3) и АПК клона #4,  
20 полученными из клеток K562, в соотношении 1:1 в 7-дневном цикле стимуляции. Во все культуры добавляли IL-21 (30 нг/мл), начиная со дня 1 культивирования, и IL-2 (50 Ед/мл), начиная через 7 дней после начала культивирования. Впоследствии все цитокины добавляли через день.

#### Иммунологический фенотип клеток

25 Клетки окрашивали с помощью антител в 100 мл буфера для FACS (2% ЭБС, 0,1% азида натрия) в течение 30 минут при температуре 4°C. Сбор данных производили с использованием прибора FACSCalibur (BD Bioscience) и анализировали с помощью программы FCS Express 3.00.0612.

#### Анализ с высвобождением хрома

30 Т-клетки оценивали на их цитотоксичность в стандартном 4-часовом анализе с высвобождением хрома, используя <sup>51</sup>Cr-меченые клетки-мишени. Т-клетки высевали в тройном повторе при плотности 1×10<sup>5</sup>, 0,5×10<sup>5</sup>, 0,25×10<sup>5</sup>, 0,125×10<sup>5</sup> в планшет (Costar). После инкубации 50 мкл супернатанта собирали в LumaPlate (Perkin Elmer), просчитывали  
35 на приборе TopCount NXT (Perkin Elmer), и процент специфического лизиса рассчитывали по формуле:

$$\frac{\text{Экспериментальное высвобождение } ^{51}\text{Cr} - \text{Спонтанное высвобождение } ^{51}\text{Cr}}{\text{Максимальное высвобождение } ^{51}\text{Cr} - \text{Спонтанное высвобождение } ^{51}\text{Cr}} \times 100$$

40 Спонтанное и максимальное высвобождение определяли путем количественного определения хрома в кондиционированном супернатанте от клеток-мишеней, инкубированных с СМ или 0,1% Triton X-100 (Sigma), соответственно, и 0,0625×10<sup>5</sup> клеток/лунку с 5×10<sup>3</sup> клеток-мишеней в 96-луночном V-донном планшете (Manufacturee  
45 Novo Software, Thornhill, Ontario, Canada).

#### Пример 2

##### Получение CD19<sup>+</sup> CAR

CD19<sup>+</sup> CAR получали с использованием способа, описанного выше в примере 1

(называемого способом «EZ»). Эти CD19<sup>+</sup> CAR (CD19CAR) сравнивали с CD19CAR клинической категории («CG»), полученными описанным ранее способом.

Данные показали, что система тройной сайт-специфической рекомбинации позволяла получать CD19CAR (EZ), аналогичные CD19CAR клинической категории (CG). Следы, оставленные сайтами рекомбинации в плаزمиде, не мешали экспрессии и функционированию CAR (фиг. 2A-B).

### Пример 3

*Получение CAR, содержащих трансмембранные домены (CD8, CD28) и сигнальные домены (CD28, 4-1BB)*

Различные протестированные CAR продемонстрировали сходные показатели размножения, цитотоксичности и Th1 цитотоксичности. CD19-BB-z продемонстрировал продуцирование Th2 цитокинов на более низком уровне; *in vivo* он был эффективным в контроле заболевания у мышей (Molecular Therapy 17 (8): 1453-1464, 2009). Тем не менее, существует опасение, связанное с тем, что клетки-мишени сохранялись *in vitro* без антигенной стимуляции.

CAR, используемые в клинике, приведены ниже в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению не имеет конкретную конструкцию, показанную ниже в таблице 2. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению можно использовать для получения другого вида CAR, имеющего характеристики CAR, указанного ниже в таблице 2, который, тем не менее, отличается от CAR, в настоящее время используемых в клинике.

**Таблица 2: CAR в клинике**

Клиническое испытание	UPenn	Cooper (MDACC)
Способ переноса гена	лентивирус	электропорация/«спящая красавица»
scfv получены из	FMC63	FMC63
Каркас	CD8-альфа	IgG4
Длина области	69 ак	230 ак
Трансмембранный	CD8-альфа	CD8
Сигнальный эндодомен(ы) CAR	CD137 и CD3-дзета	CD28 и CD3-дзета
Метод культивирования	гранулы CD3/CD28	иАПК K562
Цитокин	IL-2	IL-2 и IL-21
Время культивирования	14 дней	28 дней
Экспрессия трансгена во введенном продукте	4-23%	>80%

Дизайн конкретных конструкторов CAR показан на фиг. 3. На фиг. 3 приведены схематические изображения различных CAR, полученных с использованием сочетания CD19 scfv, шарнира CD8 $\alpha$  или стебля IgG4 Fc, трансмембранного (ТМ) домена CD8 или ТМ CD28, или ТМ CD137 и с сигнализацией через эндодомен CD28 или CD137 наряду с эндодоменом CD3-дзета.

Конструкторы CAR, показанные на фиг. 3, затем клонировали в плазмиды «спящая красавица», содержащие маркеры SIM и FRA для отслеживания в исследованиях конкурентной репопуляции при амплификации с использованием обычного праймера CVseq7. Отслеживаемые плазмиды «спящая красавица» приведены на фиг. 4.

Конструкторы CAR, показанные на фиг. 3, вводили электропорацией в Т-клетки с использованием Амаха Nucleofector II и совместно культивировали с иАПК в течение 28 дней в присутствии цитокинов (IL2, IL-21). Показана экспрессия CAR в день после электропорации (день 1) и через 28 дней совместного культивирования с иАПК (день 28). Приведены точечные диаграммы для CD3 и CAR, при этом CD3 и анти-CD19 scfv специфические Ат были использованы для распознавания Т-клеток и CAR. Результаты

экспрессии CAR показаны на фиг. 5.

Конструкты CAR, показанные на фиг. 3, оценивали на экспрессию CAR в течение 28 дней, и результаты приведены. Через 21 день большинство культур демонстрировали экспрессию CAR >80%. Кинетика экспрессии CAR показана на фиг. 6.

5 Процент экспрессии для CD4 и CD8 Т-клеток в культурах после нуклеофекции CAR с фиг. 3 показан после 28 дней совместного культивирования с иАПК. Результаты для этих фенотипов показаны на фиг. 7.

10 Через 28 дней совместного культивирования CAR<sup>+</sup> Т-клетки (экспрессирующие CAR, показанные на фиг. 3) оценивали на экспрессию маркеров, связанных с памятью (CD45RA, CCR7, CD27), активацией (CD69, HLA-DR), цитотоксическими свойствами (перфорин, гранзим В), истощением/старением (CD57, KLRG1, PD1) и адгезией (CD39, CD150). Результаты для этого расширенного фенотипа приведены на фиг. 8А-В.

15 CAR<sup>+</sup> Т-клетки (экспрессирующие CAR, показанные на фиг. 3) оценивали на экспрессию CD3ζ методом вестерн-блоттинга. Клеточные лизаты разделяли электрофорезом в денатурирующих условиях, выполняли перенос, и экспрессию химерного CD3ζ измеряли с использованием первичных мышиных мАт против CD3ζ человека и HRP-конъюгированных антител козы против IgG мыши, используя субстрат SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity. Наблюдали полосы химерного CD3ζ на  
20 уровне 52, 71 и 78 кДа в зависимости от размера конструктов CAR. Эти результаты вестерн-блоттинга приведены на фиг. 9.

Т-клетки, в которые электропорацией были введены конструкты CAR (показанные на фиг. 3), стимулировали при помощи иАПК K562 в день 1 и затем каждые 7 дней в течение 28 дней. В конце каждого цикла стимуляции клетки подсчитывали, используя  
25 метод с исключением трипанового синего, и фенотипировали на экспрессию CD3 и CAR. Графики, приведенные на фиг. 10, показывают полученное количество клеток для всех, CD3 и CAR<sup>+</sup> Т-клеток с течением времени.

Было измерено размножение клеток. Кратность размножения для всех клеток (фиг. 11) и CAR<sup>+</sup> (фиг. 12) Т-клеток рассчитывали в день 14, 21 и 28 совместного  
30 культивирования путем сравнения количеств с результатами для дня 1 (после электропорации). Результаты приведены на фиг. 11 и фиг. 12.

Была измерена цитотоксичность для CAR-экспрессирующих Т-клеток (CAR<sup>+</sup> Т-клеток). CAR<sup>+</sup> Т-клетки (экспрессирующие CAR, показанные на фиг. 3) оценивали на  
35 их цитотоксичность против CD19<sup>+</sup> опухолевых клеток-мишеней (Daudiβ<sub>2</sub>m, NALM-6 и CD19<sup>+</sup> EL-4) по сравнению с CD19<sup>neg</sup> EL-4 в стандартном 4-часовом анализе с высвобождением хрома. Результаты приведены на фиг. 13, фиг. 14, фиг. 15 и фиг. 16.

40 Определяли внутриклеточное продуцирование IFN-γ. CAR<sup>+</sup> Т-клетки (экспрессирующие конструкты, показанные на фиг. 3) инкубировали с (CD19<sup>+</sup> и CD19<sup>neg</sup>) стимулирующими клетками в присутствии ингибитора белкового транспорта в течение 4-6 часов, фиксировали, пермеабилizировали и окрашивали специфическими для IFN-γ мАт. РМА-иономицин использовали в качестве положительного контроля. Результаты для внутриклеточного продуцирования IFN-γ показаны на фиг. 17, фиг. 18, фиг. 19 и  
45 фиг. 20.

Выполняли ПЦР для транспозазы SB11. ДНК, выделенную из CAR<sup>+</sup> Т-клеток (фиг. 3), амплифицировали с использованием специфических для SB11 праймеров в термоциклере. Ген GAPDH использовали в качестве гена «домашнего хозяйства», и



линеаризованную плазмиду pCMV-SB11, геномную ДНК из клеток Jurkat, экспрессирующих SB11, использовали в качестве положительных контролей. CAR<sup>neg</sup> клетки (без ДНК) использовали в качестве отрицательных контролей. Эти результаты ПЦР приведены на фиг. 21.

5 Число копий CAR определяли с использованием количественной ПЦР (кПЦР). Количество интегрированного трансгена CAR в клетках (с конструктами CAR, показанными на фиг. 3) оценивали путем амплификации геномной ДНК с использованием праймеров и зондов, специфичных для стебля IgG4 Fc и инвертированных/прямых повторов (IR/DR). Ген РНКазы Р использовали в качестве  
10 внутреннего контроля, и клетки линии Jurkat, экспрессирующие одну копию CAR, использовали для построения стандартной кривой. Результаты приведены на фиг. 22.

Затем CAR+ Т-клетки изучали на наличие или отсутствие автономного роста. Аномальный рост CAR+ Т-клеток (экспрессирующих конструкты CAR, показанные на фиг. 3) отслеживали и измеряли путем культивирования Т-клеток в отсутствие цитокинов и иАПК. Клетки подсчитывали каждые 7 дней, и процентную долю живых/мертвых  
15 клеток (со дня 1) рассчитывали и строили график. Как показано на фиг. 23, более 80% Т-клеток погибали ко дню 14, что свидетельствовало об отсутствии автономного роста.

Различные CAR могли быть экспрессированы (>80%), размножены (~10<sup>10</sup>) и являлись  
20 цитотоксическими (~60%, Daudi) в сходной степени. Каркасные домены (IgG4 или CD8α) были использованы для создания CAR и не влияли на экспрессию или активность. Трансмембранные домены (CD8, CD28) не влияли на активность. Трансмембранный домен 4-1BB (216) влиял на экспрессию (анти-scFv Ат), но не на цитотоксичность и продуцирование цитокинов. Сочетание сигнальных доменов, CD28 и 4-1BB, не имело  
25 аддитивного эффекта. CAR+ Т-клетки проявляли фенотип клеток памяти/эффекторных клеток. CAR, содержащие только 4-1BB домен (212, 214, 217), отличались более высокой экспрессией CCR7 по сравнению с другими. Клетки экспрессировали маркеры, характерные для памяти (CD27-hi, CD45RA-hi, CCR7-lo), активации (CD69-med, HLA-DR-hi), цитолиза (гранзим-hi, перфорин-lo) и адгезии (CD39-hi, CD150-lo), однако  
30 наблюдались незначительные количества ингибиторных маркеров (CD57, PD1, KLRG1). Все CAR, включая те, что содержали домен 4-1BB, были лишены транспозазы SB11 и не были способны к автономной пролиферации.

#### Пример 4

##### *Получение CAR, содержащих CD3-дзета*

35 В данном примере описаны CAR, содержащие CD3ζ. Общая схема дизайна CAR приведена на фиг. 24. На фиг. 24 показано сравнение дизайна CAR (фиг. 24, справа) с молекулой антитела (фиг. 24, слева).

Последовательности CD3ζ приведены на фиг. 25. Последовательность CD3-дзета и ее изоформы приведены на фиг. 25. Конструкции CAR содержали CD3-дзета (изоформу  
40 1), которая образует один из сигнальных фрагментов эндодомена и имеет три ITAM.

Конкретные конструкты CAR показаны на фиг. 26 и фиг. 27. На фиг. 26 приведено схематическое изображение CD19-специфических CAR, имеющих длинный (IgG4), средний (шарнир CD8α) и короткий (IgG 12 ак) стебли, которые сигнализируют через эндодомены CD28 или CD137. Номенклатура молекул CAR с разными стеблями и  
45 сигнальными фрагментами приведена на фиг. 27.

Была измерена экспрессия CAR. Экспрессию CAR (показанных на фиг. 26) измеряли в день после электропорации (день 1) и через 28 дней совместного культивирования с иАПК (день 28). Точечные диаграммы для CD3 и CAR (при измерении с помощью CD19 scfv-специфического МАТ) представлены на фиг. 28.

Была измерена кинетика размножения для CAR. Т-клетки, в которые электропорацией были введены конструкторы CAR (показанные на фиг. 26), совместно культивировали с иАПК в 7-дневном цикле стимуляции. Клетки подсчитывали и оценивали на экспрессию CD3 и CAR. Результаты приведены на фиг. 29 и фиг. 30.

5 Была измерена цитотоксичность CAR<sup>+</sup> Т-клеток. После 28 дней совместного культивирования CAR<sup>+</sup> Т-клетки (экспрессирующие конструкторы, показанные на фиг. 26) оценивали на цитотоксичность против опухолевых клеток-мишеней в анализе с высвобождением хрома. Как показано на фиг. 31, процент цитотоксичности измеряли при разных соотношениях эффектора и мишени для CD19RCD28 (CAR 194) и  
10 CD19RCD137 (CAR 217) CAR в отношении CD19<sup>+</sup> и CD19<sup>neg</sup> опухолевых клеток-мишеней. Как показано на фиг. 32, были получены данные для процента лизиса CD19<sup>+</sup> EL-4 CAR<sup>+</sup> Т-клетками (экспрессирующими конструкторы CAR, показанные на фиг. 26) при соотношении Э:М, составляющем 20:1. Изменяли процент экспрессии CD27, CD62L,  
15 CD28 и CCR7 на CAR<sup>+</sup> Т-клетках (экспрессирующих конструкторы, показанные на фиг. 26), и результаты приведены на фиг. 33.

Для CAR<sup>+</sup> Т-клеток измеряли внутриклеточное продуцирование цитокинов. Стимулирующие клетки (CD19<sup>+</sup> и CD19<sup>neg</sup>) инкубировали с CAR<sup>+</sup> Т-клетками  
20 (экспрессирующими CAR, показанные на фиг. 26) в течение 4 часов в присутствии ингибитора белкового транспорта и окрашивали с помощью mAb к IFN-γ и IL-2. РМА-иономицин служил в качестве положительного контроля, и Т-клетки в отдельности служили в качестве отрицательного контроля. На фиг. 34 показана процентная доля продуцирующих IFN-γ клеток после стимуляции. На фиг. 35 показано разрушение  
25 продуцирующих IFN-γ и/или IL-2 клеток после инкубации со стимулирующим клетки коктейлем (РМА-иономицин).

CAR<sup>+</sup> Т-клетки изучали на наличие или отсутствие автономного роста. CAR<sup>+</sup> Т-клетки (экспрессирующие CAR, показанные на фиг. 26), оценивали на отсутствие у них  
30 способности к аномальному росту без внешней стимуляции (цитокины и иАПК) в течение 18 дней. Через 18 дней более 80% клеток были мертвыми, что свидетельствовало об отсутствии нежелательного роста. Как показано на фиг. 36, наблюдалось отсутствие автономного роста.

В CAR<sup>+</sup> Т-клетках определяли число копий CAR. Число копий интегрированных молекул CAR оценивали с использованием праймеров/зондов, специфичных для областей  
35 IgG4-Fc и IR/DR, методом кПЦР. Как показано на фиг. 37, число копий интегрированных CAR (CAR, показанных на фиг. 26) определяли с использованием зонда для IR/DR. На фиг. 38 и фиг. 39 сводные данные по числу копий CAR приведены в таблице и в графической форме для конструкторов CAR (как для конструкторов CAR, показанных на  
40 фиг. 3, так и конструкторов CAR, показанных на фиг. 26), протестированных в двух отдельных экспериментах (P491; C714 и GCR357861).

Эти данные демонстрируют, что CAR с разными спейсерами могут быть экспрессированы, и клетки могут расти *in vitro* в системе культивирования, описанной в настоящем документе. Установлено, что все CAR отличаются сходной экспрессией.  
45 Максимальную цитотоксичность в отношении CD19<sup>+</sup> EL-4 наблюдали в случае CAR с шарнирной областью CD8. Сходную экспрессию CD62L и CD28 наблюдали в случае всех протестированных CAR. Высокую частоту интеграции, определенную по числу копий CAR, наблюдали для всех CAR, за исключением CAR, содержащих стебель IgG4

Fc. Отсутствие автономного роста и SB11 определяли методом ПЦР. В отличие от предыдущих сообщений, включение спейсера 12aa в CAR не придавало улучшенные функциональные свойства в данных исследованиях.

### Пример 5

#### 5 Быстрая сборка CAR из основных компонентов

Авторы изобретения создали CD19-специфический CAR, который активируется через химерный CD28/CD3-дзета, с использованием платформы EZ CAR параллельно с CD19RCD28m $\zeta$  CAR+ Т-клетками клинической категории (CG CAR). Последовательности CAR, как CD28/CD3- $\zeta$  клинической категории, так и EZ CAR CD19RCD28m $\zeta$ , включали в транспозонные векторы «спящая красавица» и вводили электропорацией в Т-клетки. После электропорации Т-клетки культивировали в присутствии CD19+ искусственных антигенпредставляющих клеток (также называемых активирующими и способствующими размножению клетками, или АиПК) для антиген-специфического размножения Т-клеток. Экспрессию CAR на поверхности Т-клеток измеряли каждую неделю методом проточной цитометрии (экспрессия Fc+), результаты свидетельствовали о сходной экспрессии CAR в CD19 CAR Т-клетках клинической категории и EZ CD19 CAR Т-клетках. Также проводили анализ с высвобождением хрома (CRA) для оценки киллерной функции CD19 CAR+ Т-клеток, полученных с использованием платформы EZ CAR, в отношении клеток опухолей. Через 4 часа инкубации процент специфического лизиса клеток, как установлено, составлял 52% в случае EZ CAR Т-клеток и 49% в случае CG CAR Т-клеток.

Данные результаты свидетельствуют о том, что с использованием описанных способов были получены функциональные CAR<sup>+</sup> Т-клетки. Затем авторы изобретения осуществили быструю сборку CAR с использованием способов, описанных выше, в сочетании с библиотекой плазмид, содержащих следующие три компонента молекулы CAR: (i) анти-CD19 scFv (ii) 5 шарниров различных размеров (длинный - IgG4a и IgG4 ΔEQ, средний - CD8 $\alpha$ , короткий - t-20 ак и t-12 ак) и (iii) разные сочетания 7 сигнальных доменов (CD27, CD28, CD28 $\Delta$ Y<sup>173</sup>→F<sup>173</sup>, CD134, CD137, CD278) с доменом CD3 $\zeta$ . Трансфицирование клеток НЕК 293 плазмидой, содержащей трансген CAR, использовали для скрининга 27 разных конструкторов CAR с целью подтверждения экспрессии белка CAR на клеточной поверхности. Было проведено высокопроизводительное тестирование отдельных молекул CAR с использованием iQue<sup>TM</sup> Screener (Intellicyt, Albuquerque, NM), высокопроизводительного проточного цитометра, при этом анализы на цитотоксичность проводили с использованием сконструированных клеток-мишеней, экспрессирующих флуоресцентный репортер гранзим В или GFP. Результаты представлены на фиг. 40А-Е.

Проводили дополнительные эксперименты для скрининга молекул CAR с использованием iQue<sup>TM</sup> от компании IntelliCyt. Прибор iQue<sup>TM</sup> выполняет высокопроизводительную проточную цитометрию, комплементарную технологию, которая позволяет получать информацию путем изучения больших популяций клеток с использованием возможностей мультиплексирования и анализа каждой клетки. Авторы изобретения адаптировали данную технологию для получения информации о терапевтическом потенциале Т-клеток, модифицированных панелями CAR. Т-клетки из лунок можно окрашивать на жизнеспособность, а также на сигналы активации (например, повышающую регуляцию CD25), высвобождение цитокинов и уничтожение клеток. Таким образом, авторы изобретения адаптировали iQue Screener и использовали его возможности для выполнения мультиплексного определения цитокинов с помощью

гранул и для клеточных анализов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эту технологию можно использовать для тестирования большого количества разных CAR T-клеток, полученных с использованием платформы EZ CAR. С помощью прибора iQue™ от компании IntelliCyt были получены данные эксперимента, в котором 2 популяции CAR T-клеток оценивали на их способность к уничтожению клеток-мишеней. Результаты представлены на фиг. 41А-В и фиг. 42. Эти результаты показывают, что молекулы CAR были активны и что метод с прибором iQue™ можно эффективно использовать для оценки активности CAR.

Все способы, раскрытые и заявленные в настоящем документе, можно применять и осуществлять без излишнего экспериментирования в свете настоящего описания. Хотя композиции и способы по данному изобретению описаны применительно к предпочтительным вариантам осуществления, специалистам в данной области будет понятно, что можно использовать вариации в способах и в этапах или в последовательности этапов способов, описанных в настоящем документе, без отклонения от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет понятно, что реагенты, описанные в настоящем документе, могут быть заменены определенными реагентами, которые являются как химически, так и физиологически родственными, и при этом будут получены такие же или аналогичные результаты. Все такие заменители - аналоги и модификации, очевидные для специалистов в данной области, считаются находящимися в пределах сущности, объема и концепции изобретения, которые определены в прилагаемой формуле изобретения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Все приведенные далее литературные источники, в той степени, в которой они предоставляют иллюстративные, методические или другие детали, дополняющие те, которые изложены в настоящем документе, специально включены в настоящий документ посредством ссылки.

Патентная публикация США № 2009/0017000

Патентная публикация США № 2009/0004142

Патент США № 6225042

Патент США № 6355479

Патент США № 6362001

Патент США № 6410319

Патент США № 6790662

Патент США № 7109304

WO 2007/103009

Ahmed and Cheung, FEBS Lett. 2014 Jan 21; 588(2): 288-97.

Altenschmidt *et al.*, Adoptive transfer of in vitro-targeted, activated T lymphocytes results in total tumor regression, J Immunol. 1997 Dec 1; 159(11): 5509-15.

Audet *et al.*, Sci Rep. 2014 Nov 6; 4: 6881.

Berry *et al.* Adoptive immunotherapy for cancer: the next generation of gene-engineered immune cells. Tissue Antigens. 2009 Oct; 74(4): 277-89.

Brockner *et al.*, Adv. Immunol., 68: 257, 1998.

Curtin *et al.*, MAbs. 2015 Jan 2; 7(1): 265-75.

Czerwiński *et al.*, Drug Metab Dispos. 2015 Jan; 43(1): 42-52.

Davies J.K., Singh H., Huls H., Yuk D., Lee D.A., *et al.* (2010) Combining CD19 redirection and alloenergization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. Cancer Res 70: 3915-3924.

de Weers *et al.*, J Immunol. 2011 Feb 1; 186(3): 1840-8.

Duong *et al.*, (2013) Engineering T Cell Function Using Chimeric Antigen Receptors Identified Using a DNA Library Approach. PLOS ONE 8(5): e63037.

5 Eshhar *et al.*, Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. Proc Natl Acad Sci US A.; 90(2): 720-4, 1993.

Eshhar, Tumor-specific T-bodies: towards clinical application. Cancer Immunol Immunother. 1997 Nov-Dec; 45(3-4): 131-6, 1997.

10 Fitzer-Attas *et al.*, Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors: optimal design for T cell activation. J Immunol. 1998 Jan 1; 160(1): 145-54, 1998.

Funakoshi *et al.*, Cancer Treat Rev. 2014 Dec; 40(10): 1221-9.

Gerber *et al.*, Clin Cancer Res. 2011 Nov 1; 17(21): 6888-96.

Goldberg *et al.*, J Clin Oncol. 2014 May 10; 32(14): 1445-52.

15 Gross *et al.*, Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10024-10028, 1989.

Gross *et al.* (1992) Endowing T cells with antibody specificity using chimeric T cell receptors. FASEB J. 1992 Dec; 6(15): 3370-8.

Hackett *et al.*, A transposon and transposase system for human application, Mol Ther. 2010 Apr; 18(4): 674-83).

20 Hekele *et al.* Growth retardation of tumors by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes reprogrammed by CD44v6-specific scFv:zeta-chimera. Int J Cancer. 1996 Oct 9; 68(2): 232-8, 1996.

25 Huls *et al.*, Clinical Application of Sleeping Beauty and Artificial Antigen Presenting Cells to Genetically Modify T Cells from Peripheral and Umbilical Cord Blood. J. Vis. Exp., doi: 10.3791/50070, 2013.

Huls *et al.* «Clinical application of Sleeping Beauty and artificial antigen presenting cells to genetically modify T cells from peripheral and umbilical cord blood» J Vis Exp. 2013 Feb 1; (72): e50070.

Humblet-Baron and Baron, Immunol Cell Biol. 2015 Feb 10. doi: 10.1038/icb.2014.120.

30 Hwu *et al.* (1995) In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. Cancer Res. 1995 Aug 1; 55(15): 3369-73.

Ikeda *et al.*, Clin Cancer Res. 2009 Jun 15; 15(12): 4028-37.

Jabbour *et al.*, Am J Hematol, 2014 Nov 18.

Kaufmann *et al.*, Hum Pathol. 1997 Dec; 28(12): 1373-8.

35 Kaufman *et al.*, Br J Haematol. 2013 Nov; 163(4): 478-86.

Kim D.W., Uetsuki T., Kaziro Y., Yamaguchi N., Sugano S. (1990) Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. Gene 91: 217-223.

Kim *et al.*, 2004, Nature, Vol. 22(4), pp. 403-410.

Kim *et al.*, Immunology. 2010 Aug; 130(4): 545-55.

40 Kong *et al.*, Leuk Res. 2014 Nov; 38(11): 1320-6.

Krebs *et al.*, T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice. Gastroenterology. 2013 Aug; 145(2): 456-65.

Le Garff-Tavernier *et al.*, Haematologica. 2014 Dec 31.

45 Lennard S., Standard protocols for the construction of scFv libraries. Methods Mol Biol. 2002; 178: 59-71.

Leung, Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD), Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2013, 2010 Mar 25.

Leung 2011, IRDye800CW-anti-CD105 TRC105 chimeric monoclonal antibody. Molecular

Imaging and Contrast Agent Database (MICAD). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2013, 2011 Dec 01.

Maiti *et al.*, Sleeping beauty system to redirect T-cell specificity for human applications. *J Immunother.* 36(2): 112-23, 2013.

5 Manero *et al.*, *Haematologica.* 2013 Feb; 98(2): 217-21.

*Molecular Therapy* 17 (8): 1453-1464, 2009.

Moritz *et al.* (1994) Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 May 10; 91(10): 4318-22.

Patel *et al.*, *Anticancer Res.* 2008 Sep-Oct; 28(5A): 2679-86.

10 Qiu *et al.*, *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(3): e1575.

Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16e издание, Mack, ed. (1980).

Rushworth *et al.*, (2014) «Universal Artificial Antigen Presenting Cells to Selectively Propagate T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptor Independent of Specificity» *J Immunother.* May; 37(4): 204-13.

15 Sarup *et al.*, *Mol Cancer Ther.* 2008 Oct; 7(10): 3223-36.

Schneider, J. *Embryol. Exp. Morph.* 1972 Vol 27, pp. 353-365.

Schultz-Thater *et al.*, *Br J Cancer.* 2000 Jul; 83(2): 204-8.

Shin *et al.*, *Immune Netw.* 2011 Apr; 11(2): 114-22.

Singh *et al.*, Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty  
20 system. *Cancer Res.*, 68: 2961-2971, 2008.

Singh H., Figliola M.J., Dawson M.J., Huls H., Olivares S., *et al.* (2011) Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies. *Cancer Res* 71: 3516-3527.

Singh *et al.* «A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify  
25 clinical-grade T cells to target CD19». *Immunol Rev.* 2014 Jan; 257(1): 181-90.

Singh *et al.*, «Manufacture of T cells using the Sleeping Beauty system to enforce expression of a CD19-specific chimeric antigen receptor». *Cancer Gene Ther.* 2015 Jan 16.

Stancovski *et al.* (1993).

Stynen *et al.*, *Fungal Cell Wall and Immune Response*, NATO ASI Series Volume 53, 1991,  
30 pp 181-193.

Sun *et al.*, *Cell Mol Immunol.* 2007 Jun; 4(3): 209-14.

Turtle *et al.*, «Artificial antigen-presenting cells for use in adoptive immunotherapy», *Cancer J.* 2010 Jul-Aug; 16(4): 374-81.

Verel, *Int J Cancer.* 2002 May 20; 99(3): 396-402.

35 Vincent and Samuel, *Journal of Immunological Methods*, Volume 165, Issue 2, 15 October 1993, Pages 177-182.

Wang *et al.*, *Immunology.* 2015 Feb; 144(2): 254-62.

Weijtens *et al.* (1996) Single chain Ig/gamma gene-redredirected human T lymphocytes produce cytokines, specifically lyse tumor cells, and recycle lytic capacity. *J Immunol.* 1996 Jul 15; 157  
40 (2): 836-43.

Wieczorek *et al.*, *Genetically Modified T Cells for the Treatment of Malignant Disease.* *Transfus Med Hemother.* 2013 Dec; 40(6): 388-402.

Winiarska *et al.*, *MAbs.* 2014; 6(5): 1300-13.

Zhuang *et al.*, *Cancer Cell Int.* 2014 Nov 30; 14(1): 109.

45 Zhang *et al.*, *Angiogenesis.* 2002; 5(1-2): 35-44.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

<130> UTFC.P1231WO  
 <140> НЕИЗВЕСТНО  
 <141> 2015-02-16  
 <150> 61/940,339  
 5 <151> 2014-02-14  
 <160> 59  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 36  
 10 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид  
 <400> 1  
 15 gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcct 36  
 <210> 2  
 <211> 2037  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 20 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид  
 <400> 2  
 atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60  
 atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120  
 25 gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180  
 aagccccgacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240  
 cccagccggg ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300  
 gagcaggagg acatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacacctt 360  
 ggcggcggaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420  
 30 ggcgagggca gcaccaaggg cgagggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc 480  
 cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc 540  
 gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggctggagt ggctgggctg gatctggggc 600  
 agcgagacca cctactacaa cagcgccttg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660  
 agcaagagcc aggtgttctt gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720  
 35 tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780  
 accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgccctgcc 840  
 cccgagttcc tgggcggacc cagcgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg 900  
 atgatcagcc ggacccccga ggtgacctgt gtggtggtgg acgtgtcca ggaggacccc 960  
 gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc 1020  
 40 cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag 1080  
 gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaagggcct gccagcagc 1140  
 atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcggg agccccaggt gtacaccctg 1200  
 ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc 1260  
 ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac 1320  
 45 aagaccacc cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag caggctgacc 1380  
 gtggacaaga gccgggtggca ggagggcaac gtctttagct gctccgtgat gcacgaggcc 1440  
 ctgcacaacc actacacca gaagagcctg tccctgagcc tgggcaagat gttctgggtg 1500  
 ctggctcgtgg tgggtggcgt gctggcctgc tacagcctgc tggtgacagt ggccttcac 1560

	atcttttggg	tgaagagagg	ccggaagaaa	ctgctgtaca	tcttcaagca	gcccttcatg	1620
	cggcccgtgc	agaccaccca	ggaagaggac	ggctgcagct	gccggtccc	cgaggaagag	1680
	gaaggcggct	gcgaactgcg	ggtgaagttc	agccggagcg	ccgacgcccc	tgctaccag	1740
	cagggccaga	accagctgta	caacgagctg	aacctgggcc	ggagggagga	gtacgacgtg	1800
5	ctggacaagc	ggagaggccg	ggaccctgag	atgggcggca	agccccggag	aaagaacctt	1860
	caggagggcc	tgtataacga	actgcagaaa	gacaagatgg	ccgaggccta	cagcgagatc	1920
	ggcatgaagg	gcgagcggcg	gaggggcaag	ggccacgacg	gcctgtacca	gggcctgagc	1980
	accgccacca	aggataccta	cgacgccctg	cacatgcagg	ccctgcccc	cagatga	2037
	<210>	3					
10	<211>	2034					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Синтетический олигонуклеотид					
15	<400>	3					
	atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgtgagctgc	cccaccccgc	ctttctgctg	60
	atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcgccagcct	ggcgaccgg	120
	gtgaccatca	gctgccgggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag	180
	aagcccgacg	gcaccgtcaa	gctgctgac	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgtg	240
20	cccagccggt	ttagcggcag	cggctccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg	300
	gagcaggagg	acatcgccac	ctacttttgc	cagcagggca	acacactgcc	ctacaccttt	360
	ggcggcggaa	caaagctgga	gatcaccggc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc	420
	ggcgagggca	gcaccaaggg	cgaggtgaa	ctgcaggaga	gcggccctgg	cctggtggcc	480
	cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgtacc	gtgtccggcg	tgtccctgcc	cgactacggc	540
25	gtgtcctgga	tccggcagcc	ccctaggaag	ggcctggagt	ggctgggctg	gatctggggc	600
	agcgagacca	cctactacaa	cagcgccctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaac	660
	agcaagagcc	aggtgttcct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac	720
	tactgtgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
	accagcgtga	ccgtgtccag	cgagagcaag	tacggccctc	cctgcccccc	ttgccctgcc	840
30	cccgagttcc	tgggcggacc	cagcgtgttc	ctgttcccc	ccaagcccaa	ggacacctg	900
	atgatcagcc	ggacccccga	ggtgacctgt	gtggtggtgg	acgtgtcca	ggaggacccc	960
	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	acaacgcca	gaccaagccc	1020
	cgggaggagc	agttcaatag	cacctaccgg	gtggtgtccg	tgctgaccgt	gctgcaccag	1080
	gactggctga	acggcaagga	atacaagtgt	aaggtgtcca	acaagggcct	gcccagcagc	1140
35	atcgagaaaa	ccatcagcaa	ggccaagggc	cagcctcggg	agccccaggt	gtacacctg	1200
	ccccctagcc	aagaggagat	gaccaagaat	caggtgtccc	tgacctgcct	ggtgaagggc	1260
	ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaacg	gccagcccga	gaacaactac	1320
	aagaccacc	cccctgtgct	ggacagcgac	ggcagcttct	tcctgtacag	caggetgacc	1380
	gtggacaaga	gccggtggca	ggagggcaac	gtctttagct	gctccgtgat	gcacgaggcc	1440
40	ctgcacaacc	actacacca	gaagagcctg	tccctgagcc	tgggcaagat	gttctgggtg	1500
	ctggctcgtg	tgggtggcgt	gctggcctgc	tacagcctgc	tggtgacagt	ggccttcatc	1560
	atcttttggg	tgaggagcaa	gcggagcaga	ggcggccaca	gcgactacat	gaacatgacc	1620
	ccccggaggc	ctggccccac	ccggaagcac	taccagccct	acgccccctc	cagggacttc	1680
	gcccctacc	ggagccgggt	gaagttcagc	cggagcggcg	acgccccctg	ctaccagcag	1740
45	ggccagaacc	agctgtacaa	cgagctgaac	ctgggcccga	gggaggagta	cgacgtgctg	1800
	gacaagcggg	gaggccggga	ccctgagatg	ggcggcaagc	cccggagaaa	gaacctcag	1860
	gagggcctgt	ataacgaact	gcagaaagac	aagatggccg	aggcctacag	cgagatcggc	1920
	atgaagggcg	agcggcggag	gggcaagggc	cacgacggcc	tgtaccaggg	cctgagcacc	1980



gccaccaagg atacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgccccccag atga 2034  
 <210> 4  
 <211> 1491  
 <212> ДНК  
 5 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид  
 <400> 4  
 atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60  
 10 atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120  
 gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180  
 aagccccgacg gcaccgtcaa gctgctgata taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240  
 cccagccggg ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgacct ctccaacctg 300  
 gagcaggagg acatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacacctt 360  
 15 ggcggcgga caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420  
 ggcgagggca gcaccaagg cgagggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc 480  
 cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc 540  
 gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggctggagt ggctgggct gatctggggc 600  
 agcgagacca cctactaca cagcgcctg aagagccggc tgacctcat caaggacaac 660  
 20 agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720  
 tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780  
 accagcgtga ccgtgtccag caagcccacc accaccctg ccccagacc tccaaccca 840  
 gccctacaat tcgccagcca gccctgagc ctgaggcccg aagcctgtag acctgccgt 900  
 ggcggagccg tgcacaccag aggcctggat ttcgcctgcy acatctacat ctggggccct 960  
 25 ctggccggca cctgtggcgt gctgctgctg agcctggtea tcaccctgta ctgcaaccac 1020  
 cggaacaaga gaggccgga gaaactgctg tacatcttca agcagccctt catgcccgc 1080  
 gtgcagacca cccaggaaga ggacggctgc agctgccgt tccccagga agaggaaggc 1140  
 ggctgcgaac tgcgggtgaa gttcagccgg agcgcggcag cccctgccta ccagcagggc 1200  
 cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg ggccggagg aggagtaga cgtgctggac 1260  
 30 aagcggagag gccgggaccc tgagatgggc ggcaagcccc ggagaaagaa cctcaggag 1320  
 ggctgtata acgaactgca gaaagacaag atggccgagg cctacagcga gatcggcatg 1380  
 aagggcgagc ggccggaggg caagggccac gacggcctgt accagggcct gagcaccgcc 1440  
 accaaggata cctacgacgc cctgcacatg caggccctgc ccccagatg a 1491  
 <210> 5  
 35 <211> 1488  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид  
 40 <400> 5  
 atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60  
 atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120  
 gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180  
 aagccccgacg gcaccgtcaa gctgctgata taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240  
 45 cccagccggg ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgacct ctccaacctg 300  
 gagcaggagg acatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacacctt 360  
 ggcggcgga caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420  
 ggcgagggca gcaccaagg cgagggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc 480

cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc 540  
 gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggctggagt ggctgggct gatctggggc 600  
 agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660  
 agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720  
 5 tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780  
 accagcgtga ccgtgtccag caagcccacc accaccctg cccctagacc tccaacccca 840  
 gccctacaa tcgccagcca gccctgagc ctgaggcccg aagcctgtag acctgccct 900  
 ggcggagccg tgcacaccag aggcctggat ttcgcctgcy acatctacat ctggggccct 960  
 ctggccggca cctgtggcgt gctgctgctg agcctgttca tcaccctgta ctgcaaccac 1020  
 10 cggaaatagga gcaagcggag cagagggcggc cacagcgact acatgaacat gaccccccg 1080  
 aggcctggcc ccacccgga gcaactaccag ccctacgccc ctcccaggga cttcgccgcc 1140  
 taccggagcc ggggtgaagt cagccggagc gccgacgccc ctgcctacca gcagggccag 1200  
 aaccagctgt acaacgagct gaacctgggc cggagggag agtacgacgt gctggacaag 1260  
 cggagaggcc gggaccctga gatggcggc aagccccgga gaaagaacc tcaggagggc 1320  
 15 ctgtataacg aactgcagaa agacaagatg gccgaggcct acagcgagat cggcatgaag 1380  
 ggcgagcggc ggaggggcaa gggccacgac ggctgtacc agggcctgag caccgccacc 1440  
 aaggatacct acgacgccct gcacatgcag gccctgcccc ccagatga 1488  
 <210> 6  
 <211> 1380  
 20 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид  
 <400> 6  
 25 atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60  
 atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120  
 gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180  
 aagcccagc gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240  
 cccagccggg ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300  
 30 gagcaggagg acatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacacctt 360  
 ggcggcggaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420  
 ggcgagggca gcaccaagg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc 480  
 cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc 540  
 gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggctggagt ggctgggct gatctggggc 600  
 35 agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660  
 agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720  
 tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780  
 accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgcccttcc 840  
 tgggtgctgg tcgtggtggg tggcgtgctg gcctgctaca gcctgctggt gacagtggcc 900  
 40 ttcacatct tttgggtgag gagcaagcgg agcagaggcg gccacagcga ctacatgaac 960  
 atgaccccc ggaggcctgg ccccacccgg aagcactacc agccctacgc ccctcccagg 1020  
 gacttcgccg cctaccggag ccgggtgaag ttcagccgga gcgccgacgc ccctgcctac 1080  
 cagcagggcc agaaccagct gtacaacgag ctgaacctgg gccggagggga ggagtacgac 1140  
 gtgctggaca agcggagagg ccgggaccct gagatggcg gcaagcccc gagaaagaac 1200  
 45 cctcaggagg gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc ctacagcgag 1260  
 atcggcatga agggcgagcg gcggaggggc aagggccacg acggcctgta ccagggcctg 1320  
 agcaccgcca ccaaggatac ctacgacgcc ctgcacatgc aggcctgcc cccagatga 1380  
 <210> 7

<211> 1383

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

5 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 7

	atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgtgagctgc	cccaccccgc	ctttctgctg	60
	atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcgccagcct	gggcgaccgg	120
	gtgaccatca	gctgccgggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag	180
10	aagccccgacg	gcaccgtcaa	gctgctgatc	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgtg	240
	cccagccggt	ttagcggcag	cggctccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg	300
	gagcaggagg	acatcgccac	ctacttttgc	cagcagggca	acacactgcc	ctacaccttt	360
	ggcggcgga	caaagctgga	gatcaccggc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc	420
	ggcgagggca	gcaccaaggg	cgaggtgaa	ctgcaggaga	gcggccctgg	cctggtggcc	480
15	cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgtacc	gtgtccggcg	tgtccctgcc	cgactacggc	540
	gtgtcctgga	tccggcagcc	ccctaggaag	ggcctggagt	ggctgggctg	gatctggggc	600
	agcgagacca	cctactacaa	cagcgccctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaac	660
	agcaagagcc	aggtgttcct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac	720
	tactgtgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcc	tggactactg	gggccagggc	780
20	accagcgtga	ccgtgtccag	cgagagcaag	tacggccctc	cctgcccccc	ttgccctttc	840
	tgggtgctgg	tcgtggtggg	tggcgtgctg	gcctgctaca	gcctgctggg	gacagtggcc	900
	ttcatcatct	tttgggtgaa	gagaggccgg	aagaaactgc	tgtacatctt	caagcagccc	960
	ttcatgcggc	ccgtgcagac	caccagga	gaggacggct	gcagctgccg	gttccccgag	1020
	gaagaggaag	gcggtcgcga	actgcgggtg	aagttcagcc	ggagcggcca	cgccccctgc	1080
25	taccagcagg	gccagaacca	gctgtacaac	gagctgaacc	tgggcccggag	ggaggagtac	1140
	gacgtgctgg	acaagcggag	aggccgggac	cctgagatgg	gcggcaagcc	ccggagaaag	1200
	aaccctcagg	agggcctgta	taacgaactg	cagaaagaca	agatggccga	ggcctacagc	1260
	gagatcggca	tgaagggcga	gcggcggagg	ggcaagggcc	acgacggcct	gtaccagggc	1320
	ctgagcaccg	ccaccaagga	tacctacgac	gccctgcaca	tgagggccct	gccccccaga	1380
30	tga						1383

<210> 8

<211> 720

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

35 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 8

	atctgcgaca	tccagatgac	ccagagccct	gccagcctgt	ctaccagcct	gggcgagaca	60
	gtgaccatcc	agtgtcaggc	cagcagggac	atctactctg	gcctggcttg	gtatcagcag	120
40	aagccccggca	agagccctca	gctgctgatc	tacggcgcca	gcgacctgca	ggacggcgtg	180
	ccaagcagat	tcagcggcag	cggctccgga	accagttaca	gcctgaagat	caccagcatg	240
	cagaccgagg	acgagggcgt	gtacttctgc	cagcaaggcc	tgacctacc	tagaaccttc	300
	ggaggaggca	ccaagctgga	actgaagggc	ggaggcggaa	gtggaggcgg	aggatctggc	360
	ggcggaggct	ctgaagtgca	gctgcagcag	tctggcgtg	aactggtccg	gcctggcact	420
45	agcgtgaagc	tgtcctgcaa	gggtgtccggc	gacaccatca	ccttctacta	catgcacttc	480
	gtgaagcaga	ggccaggaca	gggcctggaa	tggatcggca	gaatcgacc	tgaggacgag	540
	agcaccaagt	acagcgagaa	gttcaagaac	aaggccaccc	tgaccgccga	caccagcagc	600
	aacaccgcct	acctgaagct	gtctagcctg	acctccgagg	acaccgccac	ctacttttgc	660

	atctacggcg gctactactt cgactactgg ggccagggcg tgatggtcac cgtgtccagc	720
	<210> 9	
	<211> 741	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 9	
10	ctgatccccg acatccagat gaccagacc acctccagcc tgagcgccag cctgggcgac	60
	cggggtgacca tcagctgccg ggccagccag gacatcagca agtacctgaa ctgggtatcag	120
	cagaagccccg acggcaccgt caagctgctg atctaccaca ccagccggct gcacagcggc	180
	gtgcccagcc ggtttagcgg cagcggctcc ggcaccgact acagcctgac catctccaac	240
	ctggagcagg aggacatcgc cacctacttt tgccagcagg gcaacacact gccctacacc	300
	tttggcggcg гаасааагсг ggagatcacc ggcagcacct ccggcagcgg caagcctggc	360
15	agcggcgagg gcagcaccaa gggcgaggtg aagctgcagg agagcggccc tggcctgggtg	420
	gccccagcc agagcctgag cgtgacctgt accgtgtccg gctgtccct gcccgactac	480
	ggcgtgtcct ggatccggca gccccctagg aagggcctgg agtggctggg cgtgatctgg	540
	ggcagcgaga ccacctacta caacagcggc ctgaagagcc ggctgaccat catcaaggac	600
	aacagcaaga gccaggtggt cctgaagatg aacagcctgc agaccgacga caccgccatc	660
20	tactactgtg ccaagcacta ctactacggc ggcagctacg ccatggacta ctggggccag	720
	ggcaccagcg tgaccgtgtc c	741
	<210> 10	
	<211> 723	
	<212> ДНК	
25	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 10	
30	cagatcgtgc tgaccsagag ccccgccatc atgagcgcca gccctggcga gaaggtgacc	60
	atgacctgca gcgccagcag cagcgtgagc tacatgaact ggtatcagca gaagagcggc	120
	accagcccca agcgggtgat ctacgacacc agcaagctgg ccagcggcgt gcccgccac	180
	ttcaggggca gcggatctgg gacttcctac tctctgacca tcagcggcat ggaagccgag	240
	gatgccgcta cttactactg ccagcagtgg agcagcaacc ccttcacctt cggctccggc	300
	accaagctgg ааатсаасгг gggagggcggc ggttccggcg gaggtggctc tggcgggtggc	360
35	ggaagtcaagg tgcagctgca gcagagcggg gccgagctgg ccagacctgg cgcctccgtg	420
	aagatgagct gcaaggccaг cggctacacc ttcaccgggt acaccatgca ctgggtgaag	480
	cagagacccg gccagggcct ggaatggatc ggctacatca accccagccg gggctacacc	540
	ааtacaacc агаагттсаа ggacaaggcc accctgacca ccgacaagag cagcagcacc	600
	gcctacatgc agctgtccag cctgacctcc gaggacagcg ccgtgtacta ctgcgcccgg	660
40	tactacgacg accactactg cctggactac tggggccagg gcaccacact gaccgtgagc	720
	agc	723
	<210> 11	
	<211> 735	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 11	

	ctgatccccg acgtgcagat cacccagagc cccagctacc tggccgccag ccctggcgag	60
	acaatcacca tcaactgccg ggccagcaag agcatcagca aggacctggc ctggtatcag	120
	gaaaagcccc gcaagacca caagctgctg atctacagcg gcagaccct gcagagcggc	180
	atccccagca gattcagcgg cagcggctcc ggaaccgact tcaccctgac catcagcagc	240
5	ctggaacccg aggacttcgc catgtactac tgccagcagc acaacaagta cccctacacc	300
	ttcggcggag gcaccaagct ggaaatcaag ggcagcacct ccggcagcgg caagcctggc	360
	agcggcgagg gcagcacca gggccaggtg cagctgcagc agccaggcgc cgagctgggtg	420
	aaacctggcg cccctgtgaa gctgagctgc aaggccagcg gctacacctt caccaactac	480
	tggatgaact ggatcaagca gaggcccggc agaggcctgg aatggatcgg cagaatcgac	540
10	cccagcgaca gcgagagcca ctacaaccag aagttcaagg acaaggccac actgaccgtg	600
	gacaagagca gcaacaccgc ctacatccag ctgtcttctc tgaccagcga ggacagcgcc	660
	gtgtactatt gcgccagata cgactacgac gacacatgg actactgggg ccagggcacc	720
	agcgtgaccg tgtct	735
	<210> 12	
15	<211> 810	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
20	<400> 12	
	atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtct	60
	agaatggccc aggtgcaact gcagcagtca ggggctgagc tggctagacc tggggcttca	120
	gtgaagatgt cctgcaaggc ttctggctac acctttacta cctacacaat aactgggta	180
	agacggaggc ctggacacga tctggaatgg attggataca ttaatcctag cagtggatgt	240
25	tctgactaca atcaaaactt caagggcaag accacattga ctgcagaca gtcctccaac	300
	acagcctaca tgcaactgaa cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca	360
	agaagagcgg actatggtaa ctacgaatat acctggtttg cttactgggg ccaagggacc	420
	acggtcaccg tctcctcaag tggaggcggc tcagggtggag gtggctctgg cggtgggcga	480
	tcggctcatcg agctcactca gtctccaaaa ttcatgtcca catcagtagg agacagggtc	540
30	aacgtcacct acaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctgggt tcaacaaaa	600
	ccagggcaat ctctaaagt tctgatttac tcggcatctt accgatacag tggagtccct	660
	gatcgcttca caggcagtg atctggaaca gatttcactc tcaccatcag caatgtgcag	720
	tctgaagact tggcagagta tttctgtcag caatatcaca cctatcctct cacgttcgga	780
	gggggacca agctggaaat caaacggtcg	810
35	<210> 13	
	<211> 735	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
40	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 13	
	cagggtgcagc tgggtgcagag cggcggcggc ctggtgcagc atggcggcag cctgcgcctg	60
	agctgcgcgg cgagcggctt taccttttagc agctatgaaa tgaactgggt gcgccaggcg	120
	ccgggcaaaag gcctggaatg ggtgagcggc attagcggca gcggcggcag cacctattat	180
45	gcggatagcg tgaagggccg ctttaccccc attagccggc ataacagcaa aaacaccctg	240
	tatctgcaga tgaaccgcct gcgcgcggaa gataccggcg tgtattattg cgcgcgcgat	300
	aacggctggg aactgaccga ttggatattt gatctgtggg gccgcggcac catggtgacc	360
	gtgagcagcg gcggcggcgg cagcggcggc ggcggcagcg gcggcggcgg cagcgatatt	420

	cagatgaccc agagcccag caccctgagc gcgagcattg gcgatcgcgt gaccattacc	480
	tgccgcgcga gcgaaggcat ttatcattgg ctggcgtggt atcagcagaa accgggcaaa	540
	gcgccgaaac tgctgattta taaagcgagc agcctggcga gcggcgcgcc gagccgcttt	600
	agcggcagcg gcagcggcac cgattttacc ctgaccatta gcagcctgca gccggatgat	660
5	tttgcgacct attattgcca gcagtatagc aactatccgc tgacctttgg cggcggcacc	720
	aaactggaaa ttaaa	735
	<210> 14	
	<211> 747	
	<212> ДНК	
10	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 14	
	gacgttgtga tgaccsagac ccctctgagc ctgcctgtgt ccctgggaga tcaggccagc	60
15	atcagctgca gaagcagcca gagcctgctg aagaacaacg gcaacacctt cctgcactgg	120
	tatctgcaga agtccggcca gtcccccaag ctgctgatct acaagggtgtc caaccggctg	180
	agcggcgtgc ccgatagatt ttctggctct ggagcggca cctacttcac cctgaagatc	240
	agccgggtgg aagccgagga cctgggcgtg tactttctgta gccagagcac ccacatccct	300
	tacaccttcg gcggaggcac caagctggaa ctgaagcggg gcagcacctc cggcagcggc	360
20	aagcctggca gcggcgaggg cagcaccaaag ggcaagtga agctggtgga aagcggcggga	420
	ggcctggtgc tgctggcga ttctctgaga ctgagctgcy ccaccagcga gttcaccttc	480
	accgactact acatgacctg ggtgcgccag cccccagaa aggctctgga atggctgggc	540
	ttcatccgga accgggcca cggctacacc accgagtaca accctagcgt gaagggccgg	600
	ttcacatca gccgggacaa cagccagagc atcctgtacc tgagatgaa caccctgcgg	660
25	accgaggaca gcgccaccta ctactgtgct cgggtgtcca actgggcctt cgactattgg	720
	ggccagggca ccaccctgac cgtgtct	747
	<210> 15	
	<211> 759	
	<212> ДНК	
30	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 15	
	gacatcaaga tgaccsagag cccagctct atgtacgcca gcctgggca gcgcgtgacc	60
35	atcacctgta aagccagccc cgacatcaac agctacctga gctggtcca gcagaagccc	120
	ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaacagac tgggtgatgg cgtgcccagc	180
	agattcagcg gcggaggctc tggccaggac tacagcctga ccatcaactc cctggaatac	240
	gaggacatgg gcatctacta ctgcctgagc tacgacgagt tcccctacac cttcgagggc	300
	ggcacciaagc tggaaatgaa gggcagcaca agcggcagcg gcaagcctgg atctggcagag	360
40	ggaagcacca agggcgaagt gaagctggtg gaatctggcg gcggactcgt gaagcctggc	420
	ggctctctga agctgtcttg tgccgccagc ggcttcacct tcagcageta cgccatgagc	480
	tgggtgcggc agatccccga gaagcggctg gaatgggtgg ccagcatcag cagaggcggga	540
	accacctact accccgactc tgtgaagggc cggttcacca tcagccggga caacgtgcgg	600
	aacatcctgt acctgcagat gagcagcctg cggagcagag acaccgcat gtactactgt	660
45	ggcagatacg actacgacgg ctactatgcc atggattact ggggccaggg caccagcgtg	720
	accgtgtcta gccagggaac ctccgtgaca gtgtccagc	759
	<210> 16	
	<211> 759	

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

5 <400> 16  
 gaagtacatc tggttgagtc tggtgagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt cactatggca tgccttgggt tcgccagact 120  
 ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attggtagtc gtggtactta caccactat 180  
 ccagacagtg tgaagggacg attcaccatc tccagagaca atgacaagaa cgcctgtac 240  
 10 ctgcaaatga acagtctgaa gtctgaagac acagccatgt attactgtgc aagaagaagt 300  
 gaattttatt actacggtaa tacctactat tactctgcta tggactactg gggccaaggc 360  
 accacggtca ccgctctctc aggtggcggg ggcagcggcg gtggtgggtc cgggtggcggc 420  
 ggatctgaca tcgtactcac acagtctcca gctagcctgg ctgtatctct aggacagagg 480  
 gccaccatct cctgcagagc cagcgaaggt gttgataatt atggctttag ttttatgaac 540  
 15 tggttccaac agaaaccagg acagccacc aaactcctca tctatgctat atccaaccga 600  
 ggatccgggg tccctgccag gtttagtggc agtgggtctg ggacagactt cagcctcaac 660  
 atccatcctg tagaggagga tgatcctgca atgtatttct gtcagcaaac taaggaggtt 720  
 ccgtggacgt tcggagctgg caccaagctc gagatcaaa 759

<210> 17

20 <211> 543  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

25 <400> 17  
 atggccatct ggcggagcaa cagcggcagc aacaccctgg aaaacggcta cttcctgagc 60  
 cggaaasaag agaaccacag ccagcccacc cagagcagcc tggaagatag cgtgaccccc 120  
 accaaggccg tgaaaaccac cggcgtgctg tccagcccct gccctcccaa ctggatcatc 180  
 tacgagaaga gctgctacct gttcagcatg agcctgaaca gctgggacgg cagcaagcgg 240  
 30 cagtgctggc agctgggcag caacctgctg aagatcgaca gcagcaacga gctgggcttc 300  
 atcgtgaagc aggtgtccag ccagcccagc aactccttct ggatcggcct gagcaggccc 360  
 cagaccgagg tgccctggct gtgggaggac ggctccacct tcagctccaa cctgttccag 420  
 atccggacca ccgccacaca ggaaaacccc agccccaact gcgtgtggat ccacgtgagc 480  
 gtgatctacg accagctgtg cagcgtgccc agctacagca tctgcgagaa gaaattcagc 540  
 35 atg 543

<210> 18  
 <211> 987  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

40 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 18  
 atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtct 60  
 agacaattcc aagtgaagct ggaggagtct ggggctgagc ttgtgaggcc aggggccttg 120  
 45 gtcaagttgt cctgcaaaac ttctggcttc aacattaaag actacttttt aactgggtg 180  
 agacagaggc ctgaccaggg cctggagtggt attggatgga ttaatcctga taatggtaat 240  
 actgtttatg acccgaagct tcagggcacg gccagtttaa cagcagacac atcctccaac 300  
 acagtctact tgcagctcag cggcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta tttctgtact 360

	cgaggaggact atacttatga aaaggctgct ctggactact ggggtcaggg agcctcagtc	420
	atcgtctcct cagccaaaac aacagcccca tcggtctatc cactggcccc tgtgtgtgga	480
	gatacaactg gctcctcggg gactctagga tgcctgggtca agagatctgg cggtgggcgg	540
	tctggtgggc gtggctccgg cggtgggcgg tctggagctc gacattgtgc tcacacagac	600
5	tccaaatcca tgtccatgtc agtaggagag agggtcacct tgacctgcaa ggccagtgag	660
	aatgtgggta cttatgtttc ctggatatcaa cagaaaaccag agcagtctcc taaactgctg	720
	atatacgggg catccaaccg gtacactggg gtccccgac gcttcacagg cagtggatct	780
	gcaacagatt tactctgac catcagcagt gtgcaggctg aagacctgac agattatcac	840
	tgtggacagg gttacagcta tccgtacacg ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa	900
10	cgggctgatg ctgcaccaac ttatccgcat caccatcatc atcatcatct gcagatatcc	960
	agcacagtgg cggccgctcg agtctag	987
	<210> 19	
	<211> 753	
	<212> ДНК	
15	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 19	
	ctgatcccca tggcccaggt gaagctgcag cagagcggcc ctgatctggt gaagcctggc	60
20	gccagcgtga agatcagctg caaggccagc ggctacagct tcaccggcta ctacatgcac	120
	tgggtgaaac agagccacgg caagagcctg gaatggatcg gcagagtgaa cccaatagc	180
	ggcggcacca gctacaacca gaagttcaag gacaaggcca tcctgaccgt ggacaagagc	240
	agcagcaccg cctacatgga actgcgagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac	300
	tgcgcccggg ccaagggcaa ctacttctac gccatggact actggggcca gggcaccacc	360
25	gtgaccgtgt ctagcagcgg cggaggaagc ggagggggag gatctggcgg aggcggcagc	420
	gatatcgagc tgaccagag ccctagcagc ctggccgtgt cactgggcca gagagccacc	480
	atcagctgca gagcctccga gagcgtggat agccacggca ccagcctgat gactgggat	540
	cagcagaagc ccggccagcc cccaagttc ctgatctacc gggccagcaa cctggaaagc	600
	ggcatccccg ccagattttc cggcagcggc agcagaaccg acttcaccct gaccatcaac	660
30	cccgtggaga cagacgacgt ggccatctac tactgccagc agagcaacga ggaccctccc	720
	acctttggcg gaggcacca gctggaactg aag	753
	<210> 20	
	<211> 732	
	<212> ДНК	
35	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 20	
	gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcggg ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg	60
40	agctgtgccg ccagcggcctt cgacttcagc cggactgga tgagctgggt gcgccaggcc	120
	cctggcaaaag gcctggaatg gatcggcgag atcaaccccc acagcagcac catcaactac	180
	gccccagcc tgaaggacaa gttcatcatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actattgcmc cagaccgcac	300
	ggcaactact ggtacttcga cgtgtggggc cagggcacc tcgtgacagt gtctggcagc	360
45	acaagcggct ctggcaagcc tggatctggc gagggctcta ccaagggcga catccagatg	420
	accagagacc ccagcagcct gtctgccagc gtgggcgaca gagtgacat cacatgcaag	480
	gccagccagg acgtgggaat cgccgtggcc tggatcagc agaaaccgg caaggtgccc	540
	aagctgctga tctactgggc cagcaccaga cacaccggcg tgcccgatag attttccggc	600



	agcggctccg gcaccgactt caccctgaca atcagctccc tgcagcctga ggacgtggcc	660
	acctactact gccagcagta cagcagctac ccctacacct tcggacaggg caccaaggtg	720
	gaaatcaagc gg	732
	<210> 21	
5	<211> 720	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
10	<400> 21	
	caggtgcagc tgcagcagtc tggccccgag ctggaaaaac ctggcgcctc cgtgaagatc	60
	agctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc ggctacacca tgaactgggt caagcagagc	120
	cacggcaaga gcctggaatg gatcggcctg atcaccacct acaacggcgc cagcagctac	180
	аассагаagt tccggggсаа ggccaccctg accgtggaca agtctagcag caccgcctac	240
15	atggacctgc tgagcctgac cagcagggac agcgcctgt acttctgtgc cagaggcggc	300
	tacgacggca gaggcttcga ttattggggc cagggcacca ccgtgacagt gtctagcggg	360
	gtgggaggat ctggcggagg cggaagtggc ggagggggat ctgatatcga gctgaccag	420
	agccccgcca tcatgtctgc tagccctggc gagaaagtga ccatgacctg cagcgcacgc	480
	tccagcgtgt cctacatgca ctggtatcag cagaagtccg gcaccagccc caagcgggtg	540
20	atctacgaca саагсаагсг ggcctctggc gtgcccggca gattttctgg cagcggctcc	600
	ggcaacagct actccctgac aatcagcagc gtggaagccg aggacgacgc cacctactac	660
	tgccagcagt ggagcggcta cccctgact tttggagccg gcaccaagct ggaaatcaag	720
	<210> 22	
	<211> 60	
25	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 22	
30	agccaggaag agatgaccaа гаассагггг тссстгасст gcctcgtgaa gggcttctac	60
	<210> 23	
	<211> 141	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
35	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 23	
	аагсстасса саасссстгс ссссагасст сстасасссг сссстасаат tgccagccag	60
	сстсггтсгс tgaggccccga ggctttaga cctgctgctg gcggagccgt gcacaccaga	120
40	ggactggatt tcgcctgcga с	141
	<210> 24	
	<211> 696	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
45	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 24	
	agcgagagca agtacggccc тссстгсссс сстгсссстг ссссггггт сстгггггга	60

	cccagcgtgt	tcctgttccc	ccccaaagccc	aaggacaccc	tgatgatcag	ccggaccccc	120	
	gaggtgacct	gtgtggtggt	ggacgtgtcc	caggaggacc	ccgaggtcca	gttcaactgg	180	
	tacgtggacg	gcgtggaggt	gcacaacgcc	aagaccaagc	cccgggagga	gcagttcaat	240	
	agcacctacc	gggtggtgtc	cgtgctgacc	gtgctgcacc	aggactggct	gaacggcaag	300	
5	gaatacaagt	gtaaggtgtc	саасааgggc	ctgcccagca	gcatcgagaa	aaccatcagc	360	
	aaggccaagg	gccagcctcg	ggagccccag	gtgtacaccc	tgccccctag	ccaagaggag	420	
	atgaccaaga	atcaggtgtc	cctgacctgc	ctggtgaagg	gcttctaccc	cagcgacatc	480	
	gccgtggagt	gggagagcaa	cggccagccc	gagaacaact	acaagaccac	ccccctgtg	540	
	ctggacagcg	acggcagctt	cttcctgtac	agcaggctga	ccgtggacaa	gagccggtgg	600	
10	caggagggca	acgtcttttag	ctgctccgtg	atgcacgagg	ccctgcacaa	ccactacacc	660	
	cagaagagcc	tgtccctgag	cctgggcaag	atgttc			696	
	<210>	25						
	<211>	60						
	<212>	ДНК						
15	<213>	Искусственная последовательность						
	<220>							
	<223>	Синтетический олигонуклеотид						
	<400>	25						
	agccaggaag	agatgaccaа	gaaccaggtg	tcctgacct	gcctcgtgaa	gggcttctac	60	
20	<210>	26						
	<211>	696						
	<212>	ДНК						
	<213>	Искусственная последовательность						
	<220>							
25	<223>	Синтетический олигонуклеотид						
	<400>	26						
	agcgagagca	agtacggccc	tcctgcccc	ccttgcctg	cccccgagtt	cctgggcgga	60	
	cccagcgtgt	tcctgttccc	ccccaaagccc	aaggacaccc	tgatgatcag	ccggaccccc	120	
	gaggtgacct	gtgtggtggt	ggacgtgtcc	caggaggacc	ccgaggtcca	gttcaactgg	180	
30	tacgtggacg	gcgtggaggt	gcacaacgcc	aagaccaagc	cccgggagga	gcagttccag	240	
	agcacctacc	gggtggtgtc	cgtgctgacc	gtgctgcacc	aggactggct	gaacggcaag	300	
	gaatacaagt	gtaaggtgtc	саасааgggc	ctgcccagca	gcatcgagaa	aaccatcagc	360	
	aaggccaagg	gccagcctcg	ggagccccag	gtgtacaccc	tgccccctag	ccaagaggag	420	
	atgaccaaga	atcaggtgtc	cctgacctgc	ctggtgaagg	gcttctaccc	cagcgacatc	480	
35	gccgtggagt	gggagagcaa	cggccagccc	gagaacaact	acaagaccac	ccccctgtg	540	
	ctggacagcg	acggcagctt	cttcctgtac	agcaggctga	ccgtggacaa	gagccggtgg	600	
	caggagggca	acgtcttttag	ctgctccgtg	atgcacgagg	ccctgcacaa	ccactacacc	660	
	cagaagagcc	tgtccctgag	cctgggcaag	atgttc			696	
	<210>	27						
40	<211>	696						
	<212>	ДНК						
	<213>	Искусственная последовательность						
	<220>							
	<223>	Синтетический олигонуклеотид						
45	<400>	27						
	agcgagagca	agtacggccc	tcctgcccc	ccttgcctg	cccccgagtt	cgaaggcgga	60	
	cccagcgtgt	tcctgttccc	ccccaaagccc	aaggacaccc	tgatgatcag	ccggaccccc	120	
	gaggtgacct	gtgtggtggt	ggacgtgtcc	caggaggacc	ccgaggtcca	gttcaactgg	180	

	tacgtggacg gcggtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc cccgggagga gcagttccag	240
	agcacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag	300
	gaatacaagt gtaaggtgtc caacaagggc ctgcccagca gcatcgagaa aaccatcagc	360
	aaggccaagg gccagcctcg ggagccccag gtgtacaccc tgccccctag ccaagaggag	420
5	atgaccaaga atcaggtgtc cctgacctgc ctggtgaagg gcttctacc cagcgacatc	480
	gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg	540
	ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaggctga cctgggacaa gagccggtgg	600
	caggagggca acgtcttttag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa cctactaccc	660
	cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag atgttc	696
10	<210> 28	
	<211> 711	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 28	
	atgggtgtcca agggcgagga actgatcaaa gaaaacatgc acatgaagct gtacatggaa	60
	ggcaccgtga асаассасса cttcaagtgc accagcgagg gagagggcaa gccctacgag	120
	ggcaccsaga ccatgcggat caaggtggtc gagggcggac ctctgccctt cgccttcgac	180
20	atcctggcca caagcttcat gtacggcagc aagaccttca tcaaccacac ccagggcac	240
	cccgatattct tcaagcagag cttccccgag ggcttcacct gggagagagt gaccacctac	300
	gaggacggcg gcgctgctgac cgccaccsag gacaccagcc tgcaaggacgg ctgcctgatc	360
	tacaacgtga agatccgggg cgtgaacttc cccagcaacg gccccgtgat gcagaagaaa	420
	accctgggct gggagggccag caccgagatg ctgtaccctg ccgatggcgg cctggaaggc	480
25	agagccgaca tggccctgaa actggtcggc ggagggcacc tgatctgcaa cctgaaaacc	540
	acctacagaa gcaagaagcc cgccaagaac ctgaagatgc ccggcgtgta ctacgtggac	600
	cggcggctgg aaaggatcaa agagggccgac aaagaaacct acgtggagca gcacgaggtg	660
	gccgtggccc ggtactgcca cctgccctcc aagctggggc aaaaactgaa c	711
30	<210> 29	
	<211> 333	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
35	<400> 29	
	atgatcgaga agtccttctg gatcaccgac ccccggctgc ccgactacc tatcatcttt	60
	gccagcgacg gcttcctgga actgaccgag tacagccggg aagagatcat gggccggaac	120
	gccagattcc tgcagggccc cgaaacgat caggccaccg tgcaagat ccgggacgcc	180
	atcagggacc agcgggaaac cacagtgcag ctgatcaact acaccaagag cggcaagaag	240
40	ttctggaacc tgctgcatct gcagcccgtg cgggatagaa agggcggcct gcagtacttc	300
	atcggcgtgc agctcgtggg cagcgaccac gtg	333
	<210> 30	
	<211> 675	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 30	

	atggccagca gcgaggacgt gatcaaagaa ttcatgcggt tcaaagtgcg gatggaaggc	60
	agcgtgaacg gccacgagtt cgagattgag ggcgagggcg aaggcagacc ctacgagggg	120
	acacagaccg ccaagctgaa agtgaccaag ggcggacccc tgcccttcgc ctgggatatac	180
	ctgagccccc agttccagta cggcagcaag gtgtacgtga agcaccgccg cgacatcccc	240
5	gactacaaga agctgagctt ccccgagggc ttcaagtggg agagagtgat gaacttcgag	300
	gacggcgggcg tcgtgaccgt gacccaggat agctctctgc aggacggcag cttcatctac	360
	aaagtgaagt ttatcggcgt gaacttcccc agcgacggcc cctgatgca gaaaaagacc	420
	atgggctggg aggccagcac cgagagactg taccctagag atggcgtgct gaagggcgag	480
	atccacaagg ccctgaagct gaaggatggc ggccactacc tgggtgaatt caagagcatc	540
10	tacatggcca agaaacccgt gcagctgccc ggctactact acgtggacag caagctggac	600
	atcaccagcc acaacgagga ctacaccatc gtggaacagt acgagcgggc cgagggccgg	660
	caccatctgt ttctg	675
	<210> 31	
	<211> 717	
15	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 31	
20	atggtgtcca agggcgagga actgttcacc ggcgtggtgc ccatcctggt ggaactggat	60
	ggcgacgtga acggccaca gttcagcgtg tccggcgagg gcgaggcga cgccacatat	120
	ggcaagctga ccctgaagct gatctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ttggcctacc	180
	ctcgtgacca cactgggcta cggcctgcag tgcttcgcca gataccccga ccatatgaag	240
	cagcacgact tcttcaagag cgccatgccc gagggctacg tgcaggaacg gaccatcttc	300
25	tttaaggacg acggcaacta caagaccagg gccgaagtga agttcgaggg cgacaccctc	360
	gtgaaccgga tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaagagg acggcaacat cctgggccac	420
	aagctggagt acaactaca cagccacaac gtgtacatca ccgccgaca gcagaagaac	480
	ggcatcaagg ccaacttcaa gatccggcac aacatcgagg acggcggcgt gcagctggcc	540
	gatcactacc agcagaacac ccctatcggc gacggccctg tgctgctgcc cgacaatcac	600
30	tacctgagct accagagcgc cctgagcaag gaccccaacg agaagcggga ccacatggtg	660
	ctgctggaat tcgtgaccgc cgctggcatc accctgggca tggacgagct gtacaag	717
	<210> 32	
	<211> 717	
	<212> ДНК	
35	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 32	
40	atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
	ggcgacgtaa acggccaca gttcagcgtg tccggcgagg gcgaggcga tgccacctac	120
	ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
	ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
	cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
	ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
45	gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
	aagctggagt acaactaca cagccacaac gtctatatca tggccgaca gcagaagaac	480
	ggcatcaagg tgaacttcaa gatccggcac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
	gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600

	tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc	660
	ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaag	717
	<210> 33	
	<211> 363	
5	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 33	
10	gccaagggcc agcctcggga gccccaggtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg	60
	accaagaatc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggct tctaccccag cgacatcgcc	120
	gtggagtggg agagcaacgg ccagcccagag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg	180
	gacagcgcag gcagcttctt cctgtacagc aggctgaccg tggacaagag ccggtggcag	240
	gagggcaacg tcttttagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag	300
15	aagagcctgt ccctgagcct gggcaagatg ttctacccat acgatgttcc agattacgct	360
	tac	363
	<210> 34	
	<211> 708	
	<212> ДНК	
20	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 34	
	atgggtgagca agggcagga gaccacaatg ggcgtaatca agcccgacat gaagatcaag	60
25	ctgaagatgg agggcaacgt gaatggccac gccttcgtga tcgagggcga gggcgagggc	120
	aagccctacg acggcaccaa caccatcaac ctggaggtga aggagggagc ccccctgccc	180
	ttctcctacg acattctgac caccgcgttc gcctacggca acagggcctt caccaagtac	240
	cccgacgaca tccccaaacta cttcaagcag tccttccccg agggctactc ttgggagcgc	300
	accatgacct tcgaggaca gggcatcgtg aaggtgaagt ccgacatctc catggaggag	360
30	gactccttca tctacgagat acacctcaag ggcgagaact tcccccccaa cggccccgtg	420
	atgcagaaga agaccaccgg ctgggacgcc tccaccgaga ggatgtacgt gcgcgacggc	480
	gtgctgaagg gcgacgtcaa gcacaagctg ctgctggagg gcggcggcca ccaccgcgtt	540
	gacttcaaga ccatctacag ggccaagaag gcggtgaagc tgcccgacta tcactttgtg	600
	gaccaccgca tcgagatcct gaaccacgac aaggactaca acaaggtgac cgtttacgag	660
35	agcgcctgtg cccgcaactc caccgacggc atggacgagc tgtacaag	708
	<210> 35	
	<211> 423	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
40	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 35	
	aagcctacca caaccctgc cccagacct cctacaccgg cccctacaat tgccagccag	60
	cctctgtctc tgaggccccga ggctttaga cctgctgctg gcggagccgt gcacaccaga	120
45	ggactggatt tcgcctgcga caagcctacc acaaccctg ccccagacc tcctacacc	180
	gcccctacaa ttgccagcca gcctctgtct ctgaggcccg aggctttag acctgctgct	240
	ggcggagccg tgcaaccag aggactggat ttcgcctgcg acagcagcg cggcggcggc	300
	agcggcggcg gcggcagcgg cggcggcggc agcgcgcagc tgaaaaaaaa actgcaggcg	360

	ctgaaaaaaaa aaaacgcgca gctgaaatgg aaactgcagg cgctgaaaaa aaaactggcg	420
	cag	423
	<210> 36	
	<211> 423	
5	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 36	
10	aagcctacca сааcccctgc ccccagacct cctacaccgg ccctacaat tgccagccag	60
	cctctgtctc tgaggcccgа ggcttgtaga cctgctgctg gcgгagccgt gcacaccaga	120
	ggactggatt tgcctgcga caagcctacc асааcccctg cccccagacc tcctacacc	180
	gcccctacaа ttgсcagcca gcctctgtct ctgaggcccg агgctttag acctgctgct	240
	ggcgгagccg tgcacaccag агgactggat ttcgcctgcg acagcagcgг cggcgгcgгc	300
15	agcgгcgгcg гсггсagcgг сггсггсггс агсгсccagc tggaaaaаgа gctgcaggcc	360
	ctgгaaaaаg аааасгсtса gctgгаatgg гаactgcagg ctctgгaaaa агagctggcc	420
	cag	423
	<210> 37	
	<211> 69	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 37	
25	tgggtgctgg tсgtggтggg tggсgtgctg gcctgctaca gcctgctggt gacagtggcc	60
	ttcatcatc	69
	<210> 38	
	<211> 81	
	<212> ДНК	
30	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 38	
	attatctcat tcttcctggc cctgacctct accgсcctgc tgtttctgct gttctttctg	60
35	accctgcggт tcagcgtggt г	81
	<210> 39	
	<211> 84	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
40	<220>	
	<223> Синтетический олигонуклеотид	
	<400> 39	
	atctacatct gggсgсcctt ggссgggact tgtggggтcc ttctcctgтc actggttatc	60
	accctttact gсаaccacag гаас	84
45	<210> 40	
	<211> 63	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	

	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	40	
5		ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc atctatggtg tcattctcac tgccttgttc	60
		ctg	63
	<210>	41	
	<211>	144	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
10	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	41	
		cagcggcggg agtacagaag саасааgggc gagagccccg tggaacctgc cgagccttgc	60
		agatacagct gсссагага gгаагаgggc агсассаtcc саатссаgга агаттасgg	120
15		ааgсссgаgс ссgсctgtag ссct	144
	<210>	42	
	<211>	132	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
20	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	42	
		ttttgggtga ggagсааgсg gagсагаggс ggсссаgсg actacatgaa catgaccccc	60
		сggaggсctg gссссасссг гаагсасctac саgссctacg сссctcccag ggacttcgсс	120
25		гсctaccgга гс	132
	<210>	43	
	<211>	132	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
30	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	43	
		ttttgggtga ggagсааgсg gagсагаggс ggсссаgсg acttcatgaa catgaccccc	60
		сggaggсctg gссссасссг гаагсасctac саgссctacg сссctcccag ggacttcgсс	120
35		гсctaccgга гс	132
	<210>	44	
	<211>	108	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	
40	<220>		
	<223>	Синтетический олигонуклеотид	
	<400>	44	
		aggгассага gactgcctcc сgatgсссac ааасctccag гсggсgгааg cttcагаасс	60
		сссатссagg аагаасaggс сгасгсссac агсассctgg ссааgatt	108
45	<210>	45	
	<211>	126	
	<212>	ДНК	
	<213>	Искусственная последовательность	

	<220>		
	<223> Синтетический олигонуклеотид		
	<400> 45		
5	aagcggggca gaaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc ccttcatgcg gcccggtgcag	60	
	accaccsagc aagagcagcg ctgctcctgc agattccccg aggaagaaga aggcggctgc	120	
	gagctg	126	
	<210> 46		
	<211> 102		
	<212> ДНК		
10	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Синтетический олигонуклеотид		
	<400> 46		
15	аагаааааагт асагсагсаг сгтгсасгас сссаасггсг агтакатгтт катгсгггс	60	
	гтгаасасссг ссаагаагтс сагактгасс гасгтгасс тг	102	
	<210> 47		
	<211> 336		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная последовательность		
20	<220>		
	<223> Синтетический олигонуклеотид		
	<400> 47		
25	сгггтгаагт тсагссгггг сгссгасгсс сctgcctacc агсagggcca гаaccagctg	60	
	тасаасгасг тгаассctggg ссггagggггг гagtacгасг тgctggacaа гсггagggгг	120	
	сгггaccctg агатгггсгг саагссссгг агааагаасс сtcaggaggгг сctgtataac	180	
	гаactgcaga аагасаагат ггссгaggггг тасagсггага тсггсатгаа гggсгaggсгг	240	
	сггaggggгса агггссасга сггсctgtac сагггсctга гсaccгссас саaggatacc	300	
	тасгасгссс тгсасатгса ггсссctгссс сссга	336	
	<210> 48		
30	<211> 759		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> Синтетический олигонуклеотид		
35	<400> 48		
	гататтсaga тгасссagag сссгagсagс сtgagсгсга гсгтgggсга тсгсгтгасс	60	
	аттасctгсс гсagсagсса гаасаттгтг саtagсаасг гсаасасста тctggattгг	120	
	татсagсaga ссссгггсаа агсгссгааа сtgctgattt атааagtггг саaccгcttt	180	
	агсггсгтгс сгagссгctt тагсггсagс ггсagсггсга ссгаттттас сtttaccatt	240	
40	агсagсctгс агссггаага таттгсгасс таттаттгct тtcagtatag ссатгtgccг	300	
	тггасctttг гссaggгсас сааactгсag аттасгггсга гсасctсггс агсгггсaaг	360	
	сctггсagсг гсгaggгсag сассаaggгс агссagгтгс агctгсagса гagсггсгсг	420	
	гаagtгaaaa аaccгггсag агсггтгaaa гtgagctгса аaggсagсгг сtataccttt	480	
	accaactatt ататттаттг гgtгсгссag гсгссгггсс агггсctгга атггattггс	540	
45	ггсаттаacc сгассagсгг сггсagсаас тttaacгaaa аатттаaaac ссгсгтгасс	600	
	аттасгсгг атгааagсag сaccaccггг тататггаас тgagсagсct гсгсagсгаа	660	
	гатaccггг тttatттttг сасссгссг ггсctгггг тtgatagсга тggссгсггс	720	
	ттггаттттт гggгссagгг сaccaccггг accгтгagс	759	



<210> 49  
 <211> 732  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 5 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид  
 <400> 49  
 gatattctgc tgaccsagag cccggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga acgcgtgagc 60  
 tttagctgcc gcgsgagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgcacc 120  
 10 aacggcagcc cgcgcctgct gattaaataat gcgagcgaaa gcattagcgg cattccgagc 180  
 cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat ttaccctga gcattaacag cgtggaaagc 240  
 gaagatatg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttggcgcg 300  
 ggcaccaaac tggaactgaa aggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360  
 ggcagcacca agggcagcca ggtgcagctg aaacagagcg gcccgggcct ggtgcagccg 420  
 15 agccagagcc tgagcattac ctgcaccgtg agcggcttta gcctgacca ctatggcgtg 480  
 cattgggtgc gccagagccc gggcaaaaggc ctggaatggc tgggcgtgat ttggagcggc 540  
 ggcaacaccg attataacac cccgtttacc agccgcctga gcattaaca agataacagc 600  
 aaaagccagg tgttttttaa aatgaacagc ctgcagagca acgataccgc gatttattat 660  
 tgcgcgcgcg cgctgacctt ttatgattat gaatttgcgt attggggcca gggcacccctg 720  
 20 gtgaccgtga gc 732  
 <210> 50  
 <211> 726  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 25 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид  
 <400> 50  
 gaagtgcagc tgcagcagag cggccccgaa ctggaaaaac cggcgcgag cgtgaaactg 60  
 agctgcaaaag cgagcggcta tagctttacc ggctataaca tgaactgggt gaaacagagc 120  
 30 catggcaaaa gcctggaatg gattggccat attgatccgt attatggcga taccagctat 180  
 aaccagaaat ttcgcggaac agcgaccctg accgtggata aaagcagcag caccgcgtat 240  
 atgcagctga aaagcctgac cagcgaagat agcgcgggtgt attattgcgt gaaaggcggc 300  
 tattatggcc attggatattt tgatgtgtgg gcgcgggca ccaccgtgac cgtgagcagc 360  
 ggcggaggcg gctctggcgg cggaggatca ggtggcggag gatccgatat tcagatgacc 420  
 35 cagagccccga gcagcctgag cgcgagcctg ggcgaacgcg tgagcctgac ctgccgcgcg 480  
 agccaggata ttggcagcag cctgaaactgg ctgcagcagg gcccggatgg caccattaa 540  
 cgcctgattt atgcgaccag cagcctggat agcggcgtgc cgaacgctt tagcggcagc 600  
 cgcagcggca gcgattatag cctgaccatt agcagcctgg aaagcgaaga ttttgtggat 660  
 tattattgcc tgcagtatgt gagcagcccc cgcacctttg gcgcgggcac caaactggaa 720  
 40 ctgaaa 726  
 <210> 51  
 <211> 111  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 45 <220>  
 <223> Синтетический полипептид  
 <400> 51  
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

RU 2 753 965 C2

1                    5                    10                    15  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
                                  20                    25                    30  
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
 5                    35                    40                    45  
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
                                  50                    55                    60  
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 65                    70                    75                    80  
 10 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr  
                                  85                    90                    95  
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
                                  100                    105                    110  
 <210> 52  
 15 <211> 108  
     <212> БЕЛОК  
     <213> Искусственная последовательность  
     <220>  
     <223> Синтетический полипептид  
 20 <400> 52  
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
                                  20                    25                    30  
 25 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
                                  35                    40                    45  
 Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln  
                                  50                    55                    60  
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu  
 30 65                    70                    75                    80  
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
                                  85                    90                    95  
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
                                  100                    105  
 35 <210> 53  
     <211> 112  
     <212> БЕЛОК  
     <213> Искусственная последовательность  
     <220>  
     <223> Синтетический полипептид  
 40 <400> 53  
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
                                  20                    25                    30  
 45 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
                                  35                    40                    45  
 Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln

RU 2 753 965 C2

	50		55		60														
	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu			
	65					70					75				80				
	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala			
5					85					90					95				
	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg			
				100					105					110					
	<210>		54																
	<211>		111																
10	<212>		БЕЛОК																
	<213>		Искусственная последовательность																
	<220>																		
	<223>		Синтетический полипептид																
	<400>		54																
15	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly			
	1				5					10					15				
	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr			
				20					25					30					
	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys			
20			35					40					45						
	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys			
			50				55					60							
	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg			
	65					70					75				80				
25	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr			
					85					90					95				
	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg				
				100					105					110					
	<210>		55																
30	<211>		2034																
	<212>		ДНК																
	<213>		Искусственная последовательность																
	<220>																		
	<223>		Синтетический олигонуклеотид																
35	<400>		55																
	atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgtgagctgc	cccacccgc	ctttctgctg													60
	atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcgccagcct	ggcgaccgg													120
	gtgaccatca	gctgccgggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag													180
	aagccccgacg	gcaccgtcaa	gctgctgatc	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgtg													240
40	cccagccggt	ttagcggcag	cggctccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg													300
	gagcaggagg	acatcgccac	ctacttttgc	cagcagggca	acacactgcc	ctacaccttt													360
	ggcgggcgga	caaagctgga	gatcaccggc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc													420
	ggcgagggca	gcaccaaggg	cgaggtgaag	ctgcaggaga	gcggccctgg	cctgggtggcc													480
	cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgtacc	gtgtccggcg	tgtccctgcc	cgactacggc													540
45	gtgtcctgga	tccggcagcc	ccctaggaag	ggcctggagt	ggctgggctg	gatctggggc													600
	agcgagacca	cctactacaa	cagcggcctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaac													660
	agcaagagcc	aggtgttcct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac													720
	tactgtgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc													780

	accagcgtga	ccgtgtccag	cgagagcaag	tacggccctc	cctgcccccc	ttgccctgcc	840	
	cccagattcc	tgggcgacc	cagcgtgttc	ctgttcccc	ccaagcccaa	ggacaccctg	900	
	atgatcagcc	ggacccccga	ggtgacctgt	gtggtggtgg	acgtgtccca	ggaggacccc	960	
	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	acaacgccaa	gaccaagccc	1020	
5	cgggaggagc	agttcaatag	cacctaccgg	gtggtgtccg	tgctgaccgt	gctgcaccag	1080	
	gactggctga	acggcaagga	atacaagtgt	aaggtgtcca	acaagggcct	gcccagcagc	1140	
	atcgagaaaa	ccatcagcaa	ggccaagggc	cagcctcggg	agccccaggt	gtacaccctg	1200	
	ccccctagcc	aagaggagat	gaccaagaat	caggtgtccc	tgacctgcct	ggtgaagggc	1260	
	ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaacg	gccagcccga	gaacaactac	1320	
10	aagaccaccc	cccctgtgct	ggacagcgc	ggcagcttct	tccctgtacag	caggctgacc	1380	
	gtggacaaga	gccggtggca	ggagggcaac	gtcttttagct	gctccgtgat	gcacgaggcc	1440	
	ctgcacaacc	actacaccca	gaagagcctg	tccctgagcc	tgggcaagat	gttctgggtg	1500	
	ctggctcgtg	tgggtggcgt	gctggcctgc	tacagcctgc	tggtgacagt	ggccttcctc	1560	
	atcttttggg	tgaggagcaa	gcbgagcaga	ggcggccaca	gcbgactacat	gaacatgacc	1620	
15	ccccggaggc	ctggccccac	ccggaagcac	taccagccct	acgccccctc	cagggacttc	1680	
	gccgcctacc	ggagccgggt	gaagttcagc	cggagcggcc	acgccccctgc	ctaccagcag	1740	
	ggccagaacc	agctgtataa	cgagctgaac	ctgggcccga	gggaggagta	cgacgtgctg	1800	
	gacaagcggg	gaggccggga	ccctgagatg	ggcggcaagc	cccggagaaa	gaaccctcag	1860	
	gagggcctgt	ataacgaact	gcagaaaagc	aagatggccg	aggcctacag	cgagatcggc	1920	
20	atgaagggcg	agcggcggag	gggcaagggc	cagcagcggc	tgtaccaggg	cctgagcacc	1980	
	gccaccaagg	atacctacga	cgccctgcac	atgcaggccc	tgccccccag	atga	2034	
	<210>	56						
	<211>	2040						
	<212>	ДНК						
25	<213>	Искусственная последовательность						
	<220>							
	<223>	Синтетический олигонуклеотид						
	<400>	56						
	atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgtgagctgc	cccaccccgc	ctttctgctg	60	
30	atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcbgcccagcct	gggcbgaccgg	120	
	gtgaccatca	gctgccgggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag	180	
	aagccccagc	gcaccgtcaa	gctgctgatc	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgtg	240	
	cccagccggg	ttagcggcag	cggctccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg	300	
	gagcaggagg	acatcgccac	ctacttttgc	cagcagggca	acacactgcc	ctacaccttt	360	
35	ggcggcggaa	caaagctgga	gatcaccggc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc	420	
	ggcgagggca	gcaccaaggg	cgaggtgaag	ctgcaggaga	gcbgcccctgg	cctggtggcc	480	
	cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgtacc	gtgtccggcg	tgtcccctgcc	cgactacggc	540	
	gtgtcctgga	tccggcagcc	ccctaggaag	ggcctggagt	ggctgggctg	gatctggggc	600	
	agcbgagacca	cctactacaa	cagcbgcccctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaac	660	
40	agcaagagcc	aggtgttcct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac	720	
	tactgtgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcc	tggactactg	gggcbgagggc	780	
	accagcgtga	ccgtgtccag	cgagagcaag	tacggccctc	cctgcccccc	ttgccctgcc	840	
	cccagattcc	tgggcbgacc	cagcgtgttc	ctgttcccc	ccaagcccaa	ggacaccctg	900	
	atgatcagcc	ggacccccga	ggtgacctgt	gtggtggtgg	acgtgtccca	ggaggacccc	960	
45	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	acaacgccaa	gaccaagccc	1020	
	cgggaggagc	agttcaatag	cacctaccgg	gtggtgtccg	tgctgaccgt	gctgcaccag	1080	
	gactggctga	acggcaagga	atacaagtgt	aaggtgtcca	acaagggcct	gcccagcagc	1140	
	atcgagaaaa	ccatcagcaa	ggccaagggc	cagcctcggg	agccccaggt	gtacaccctg	1200	

	ccccctagcc	aagaggagat	gaccaagaat	caggtgtccc	tgacctgcct	ggtgaagggc	1260
	ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaacg	gccagcccga	gaacaactac	1320
	aagaccacc	cccctgtgct	ggacagcgac	ggcagcttct	tcctgtacag	caggctgacc	1380
	gtggacaaga	gccggtggca	ggagggcaac	gtcttttagct	gctccgtgat	gcacgaggcc	1440
5	ctgcacaacc	actacaccca	gaagagcctg	tccctgagcc	tgggcaagat	gatctacatc	1500
	tgggcccctc	tggccggcac	ctgtggcgtg	ctgctgctga	gcctggatcat	caccctgtac	1560
	tgcaaccacc	ggaacaagag	aggccggaag	aaactgctgt	acatcttcaa	gcagcccttc	1620
	atgcgccccg	tgcaagacc	ccaggaagag	gacggctgca	gctgccggtt	ccccgaggaa	1680
	gaggaaggcg	gctgcgaact	gcgggtgaag	ttcagccgga	gcgccgacgc	ccctgcctac	1740
10	cagcagggcc	agaaccagct	gtacaacgag	ctgaacctgg	gccggagggga	ggagtacgac	1800
	gtgctggaca	agcggagag	ccgggaccct	gagatgggcg	gcaagccccg	gagaaagaac	1860
	cctcaggagg	gcctgtataa	cgaactgcag	aaagacaaga	tggccgaggc	ctacagcgag	1920
	atcggcatga	agggcgagcg	gcggaggggc	aagggccacg	acggcctgta	ccagggcctg	1980
	agcaccgcca	ccaaggatac	ctacgacgcc	ctgcacatgc	aggccctgcc	ccccagatga	2040
15	<210>	57					
	<211>	2037					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
20	<223>	Синтетический олигонуклеотид					
	<400>	57					
	atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgtgagctgc	cccaccccgc	ctttctgctg	60
	atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcgccagcct	gggcgaccgg	120
	gtgaccatca	gctgccgggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag	180
25	aagccccgacg	gcaccgtcaa	gctgctgatc	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgtg	240
	cccagccggt	ttagcggcag	cggtctccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg	300
	gagcaggagg	acatcgccac	ctacttttgc	cagcagggca	acacactgcc	ctacaccttt	360
	ggcgggcgga	caaagctgga	gatcaccggc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc	420
	ggcgagggca	gcaccaaggg	cgagggtgaag	ctgcaggaga	gcggccctgg	cctgggtggcc	480
30	cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgtacc	gtgtccggcg	tgtccctgcc	cgactacggc	540
	gtgtcctgga	tccggcagcc	ccctaggaag	ggcctggagt	ggctgggctg	gatctggggc	600
	agcgagacca	cctactacaa	cagcgccctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaac	660
	agcaagagcc	aggtgttcct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac	720
	tactgtgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
35	accagcgtga	ccgtgtccag	cgagagcaag	tacggccctc	cctgcccccc	ttgccctgcc	840
	cccgagttcc	tgggcggacc	cagcgtgttc	ctgttcccc	ccaagcccaa	ggacacctg	900
	atgatcagcc	ggacccccga	ggtgacctgt	gtggtggtgg	acgtgtccca	ggaggacccc	960
	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	acaacgcaa	gaccaagccc	1020
	cgggaggagc	agttcaatag	cacctaccgg	gtggtgtccg	tgctgaccgt	gctgcaccag	1080
40	gactggctga	acggcaagga	atacaagtgt	aaggtgtcca	acaagggcct	gccagcagc	1140
	atcgagaaaa	ccatcagcaa	ggccaagggc	cagcctcggg	agccccaggt	gtacacctg	1200
	ccccctagcc	aagaggagat	gaccaagaat	caggtgtccc	tgacctgcct	ggtgaagggc	1260
	ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaacg	gccagcccga	gaacaactac	1320
	aagaccacc	cccctgtgct	ggacagcgac	ggcagcttct	tcctgtacag	caggctgacc	1380
45	gtggacaaga	gccggtggca	ggagggcaac	gtcttttagct	gctccgtgat	gcacgaggcc	1440
	ctgcacaacc	actacaccca	gaagagcctg	tccctgagcc	tgggcaagat	gatctacatc	1500
	tgggcccctc	tggccggcac	ctgtggcgtg	ctgctgctga	gcctggatcat	caccctgtac	1560
	tgcaaccacc	ggaataggag	caagcggagc	agagggcgcc	acagcgacta	catgaacatg	1620

	accccccgga	ggcctggccc	cacccggaag	cactaccagc	cctacgcccc	tcccagggac	1680
	ttcgccgcct	accggagccg	ggtgaagttc	agccggagcg	ccgacgcccc	tgctaccag	1740
	cagggccaga	accagctgta	caacgagctg	aacctgggccc	ggagggagga	gtacgacgtg	1800
	ctggacaagc	ggagaggccg	ggaccctgag	atgggcggca	agccccggag	aaagaaccct	1860
5	caggagggcc	tgtataacga	actgcagaaa	gacaagatgg	ccgaggccta	cagcgagatc	1920
	ggcatgaagg	gcgagcggcg	gaggggcaag	ggccacgacg	gcctgtacca	gggcctgagc	1980
	accgccacca	aggataccta	cgacgccctg	cacatgcagg	ccctgcccc	cagatga	2037
	<210>	58					
	<211>	2037					
10	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<223>	Синтетический олигонуклеотид					
	<400>	58					
15	atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgtgagctgc	cccacccccg	ctttctgctg	60
	atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcgccagcct	gggcgaccgg	120
	gtgaccatca	gctgccgggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag	180
	aagccccgacg	gcaccgtcaa	gctgctgatc	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgtg	240
	cccagccggt	ttagcggcag	cggtcccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg	300
20	gagcaggagg	acatcgccac	ctacttttgc	cagcagggca	acacactgcc	ctacaccttt	360
	ggcggcgga	caaagctgga	gatcaccggc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc	420
	ggcgagggca	gcaccaaggg	cgaggtgaag	ctgcaggaga	gcggccctgg	cctggtggcc	480
	cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgtacc	gtgtccggcg	tgtccctgcc	cgactacggc	540
	gtgtcctgga	tccggcagcc	ccctaggaag	ggcctggagt	ggctgggctg	gatctggggc	600
25	agcgagacca	cctactacaa	cagcgccctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaac	660
	agcaagagcc	aggtgttcct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac	720
	tactgtgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcca	tggactactg	gggcccaggc	780
	accagcgtga	ccgtgtccag	cgagagcaag	tacggcccctc	cctgcccccc	ttgccctgcc	840
	cccagattcc	tgggcggacc	cagcgtgttc	ctgttcccc	ccaagcccaa	ggacaccctg	900
30	atgatcagcc	ggacccccga	ggtgacctgt	gtggtggtgg	acgtgtccca	ggaggacccc	960
	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	acaacgccaa	gaccaagccc	1020
	cgggaggagc	agttcaatag	cacctaccgg	gtggtgtccg	tgctgaccgt	gctgcaccag	1080
	gactggctga	acggcaagga	atacaagtgt	aaggtgtcca	acaagggcct	gcccagcagc	1140
	atcgagaaaa	ccatcagcaa	ggccaagggc	cagcctcggg	agccccaggt	gtacaccctg	1200
35	ccccctagcc	aagaggagat	gaccaagaat	caggtgtccc	tgacctgcct	ggtgaagggc	1260
	ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaacg	gccagcccga	gaacaactac	1320
	aagaccaccc	cccctgtgct	ggacagcgac	ggcagcttct	tctgtacag	caggctgacc	1380
	gtggacaaga	gccggtggca	ggagggcaac	gtcttttagct	gctccgtgat	gcacgaggcc	1440
	ctgcacaacc	actacaccca	gaagagcctg	tccctgagcc	tgggcaagat	gattatctca	1500
40	ttcttctctg	ccctgacctc	taccgccctg	ctgtttctgc	tgttctttct	gacctgcgg	1560
	ttcagcgtgg	tcaagagagg	ccggaagaaa	ctgctgtaca	tcttcaagca	gccttcatg	1620
	cggcccgtgc	agaccaccca	ggaagaggac	ggctgcagct	gccggttccc	cgaggaagag	1680
	gaaggcggct	gcgaactcgc	ggtgaagttc	agccggagcg	ccgacgcccc	tgctaccag	1740
	cagggccaga	accagctgta	caacgagctg	aacctgggccc	ggagggagga	gtacgacgtg	1800
45	ctggacaagc	ggagaggccg	ggaccctgag	atgggcggca	agccccggag	aaagaaccct	1860
	caggagggcc	tgtataacga	actgcagaaa	gacaagatgg	ccgaggccta	cagcgagatc	1920
	ggcatgaagg	gcgagcggcg	gaggggcaag	ggccacgacg	gcctgtacca	gggcctgagc	1980
	accgccacca	aggataccta	cgacgccctg	cacatgcagg	ccctgcccc	cagatga	2037

<210> 59  
 <211> 2160  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 5 <220>  
 <223> Синтетический олигонуклеотид  
 <400> 59

```

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg      60
atccccgaca tccagatgac ccaгaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg      120
10 gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag      180
aagcccгacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg      240
cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg      300
gagcaggagg acatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacacctt      360
ggcggcggaа caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc      420
15 ggcgagggca gcaccaaggг cгaggтgaaг ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc      480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc      540
gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggctggagt ggctgggctg gatctggggc      600
agcgagacca cctactaaa cagcgcctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac      660
agcaagagcc aggtgttccг gaagatgaaс agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac      720
20 tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc      780
accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgcctgccc      840
cccgagttcc tgggcggacc cagcgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg      900
atgatcagcc ggacccccga ggtgacctgt gtggtggtgg acgtgtcca ggaggacccc      960
gaggтccagт tcaactggta cgtggacggc gtggaggтgс аcaacgccaа gaccaagccc      1020
25 cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag      1080
gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggтgтcсa аcaaggгcct gcccagcagc      1140
atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaaggгc cagcctcggg agccccaggt gtacaccctg      1200
ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggтgтcсc tgacctgcct ggtgaaggгc      1260
ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac      1320
30 aagaccaccс cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag caggctgacc      1380
gtggacaaga gccggтgгca ggaggгcaac gtctttagct gctccgtgat gcacgaggcc      1440
ctgcacaacc actacacca gaagagcctg tccctgagcc tgggcaagat gttctgggtg      1500
ctggтcгtгг tggгtггcгt gctggcctgc tacagcctgc tggтgacagт ggccttcatc      1560
atcttttggg tgaggagcaa gcggagcaga ggcggccaca gcgactacat gaacatgacc      1620
35 ccccggaggc ctggccccac ccggaagcac taccagccct acgccccctc cagggacttc      1680
gccgcctacc ggagcaagag aggcggaaг aaactgctgt acatcttcaa gcagcccttc      1740
atgcggccccг tgcagaccac ccaggaagag gacggctgca gctgccggtt ccccaggгаа      1800
gaggaaггcг gctgcgaaсг gcggгtгaaг ttcagccgga gcgccgacgc ccctgcctac      1860
cagcaggгcc agaaccagct gtacaacgag ctgaaсctгг gccggaggгa ggagtacgac      1920
40 gtgctggaca agcggagagг ccgggaccct gagatggгcг gcaagccccг gaaaaгaaс      1980
cctcaggagг gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc ctacagcgag      2040
atcggcatga agggcgagcg gcggaggггc aaggгccacг acggcctgta ccaggгcctг      2100
agcaccgcca ccaaggatac ctacgacgcc ctgcacatgc aggcctgcc cccagatga      2160

```

45 (57) Формула изобретения  
 1. CD19-специфический полипептид химерного антигенного рецептора, кодируемый последовательностью ДНК с последовательностью SEQ ID NO:5, нуклеотидами 1-1485 SEQ ID NO:5 или нуклеотидами 67-1485 SEQ ID NO:5.

2. Нуклеиновая кислота, кодирующая CD19-специфический полипептид химерного антигенного рецептора, кодируемый последовательностью SEQ ID NO:5, нуклеотидами 1-1485 SEQ ID NO:5 или нуклеотидами 67-1485 SEQ ID NO:5.

5 3. Транспозонный вектор «спящая красавица», содержащий нуклеиновую кислоту по п. 2, где введение транспозонного вектора «спящая красавица» в клетку приводит к экспрессии CD19-специфического полипептида химерного антигенного рецептора.

4. Т-клетка для применения в лечении CD19+-рака, содержащая CD19-специфический полипептид химерного антигенного рецептора, кодируемый последовательностью SEQ ID NO:5, нуклеотидами 1-1485 SEQ ID NO:5 или нуклеотидами 67-1485 SEQ ID NO:5, где  
10 Т-клетка экспрессирует CD19-специфический полипептид химерного антигенного рецептора на поверхности клетки.

5. Т-клетка для применения в лечении CD19+-рака, содержащая: а) CD19-специфический полипептид химерного антигенного рецептора, кодируемый последовательностью SEQ ID NO:5, нуклеотидами 1-1485 SEQ ID NO:5 или нуклеотидами  
15 67-1485 SEQ ID NO:5, и б) мембраносвязанный цитокин, где Т-клетка экспрессирует CD19-специфический полипептид химерного антигенного рецептора на поверхности клетки.

6. Т-клетка по п. 5, где мембраносвязанный цитокин представляет собой мембраносвязанный IL-5.

20 7. Т-клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 2, где Т-клетка экспрессирует CD19-специфический полипептид химерного антигенного рецептора на клеточной поверхности.

8. Т-клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 2 и мембраносвязанный цитокин, где Т-клетка экспрессирует CD19-специфический полипептид химерного антигенного  
25 рецептора на клеточной поверхности.

9. Т-клетка по п. 8, где мембраносвязанный цитокин представляет собой мембраносвязанный IL-5.

10. Т-клетка, содержащая транспозонный вектор «спящая красавица» по п. 3, где Т-клетка экспрессирует CD19-специфический полипептид химерного антигенного  
30 рецептора на клеточной поверхности.

11. Т-клетка, содержащая транспозонный вектор «спящая красавица» по п. 3 и мембраносвязанный цитокин, где Т-клетка экспрессирует CD19-специфический полипептид химерного антигенного рецептора на клеточной поверхности.

35 12. Т-клетка по п. 11, где мембраносвязанный цитокин представляет собой мембраносвязанный IL-5.

13. Т-клетка по любому из пп. 4-12, представляющая собой иммортализованную клетку.

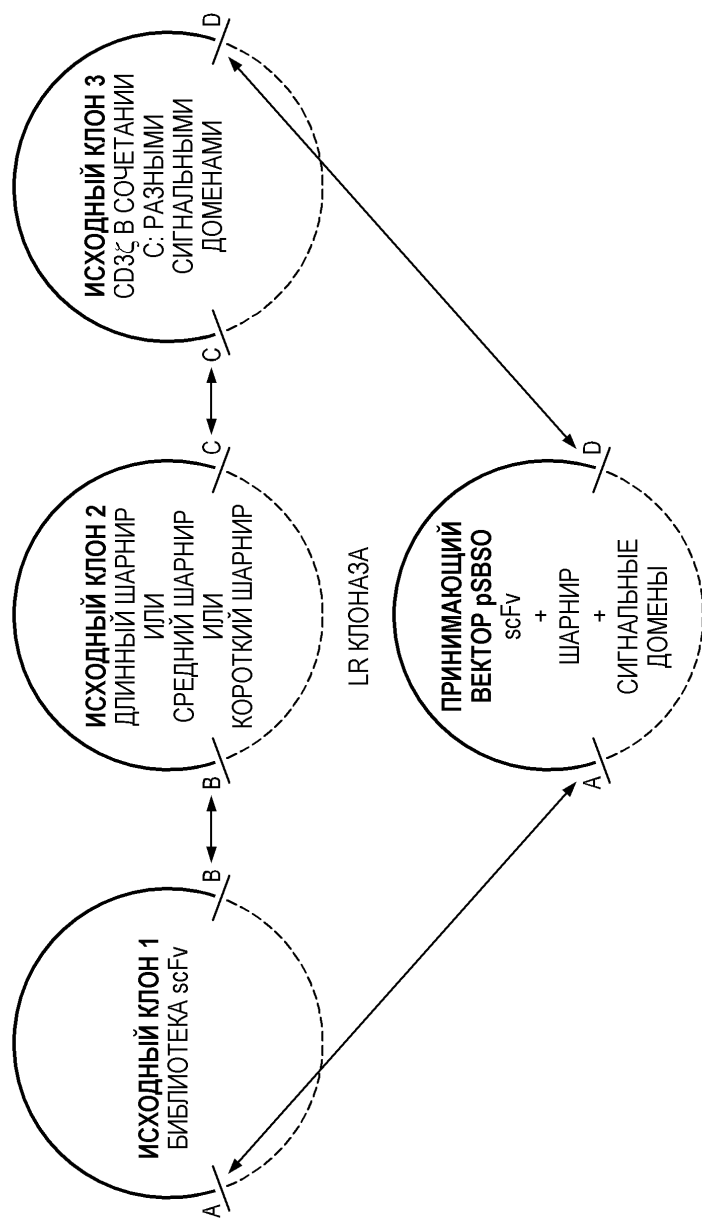
14. Т-клетка по любому из пп. 4-13, представляющая собой альфа-бета Т-клетку, гамма-дельта Т-клетку или NKT-клетку.

40 15. Фармацевтическая композиция для лечения CD19+ злокачественного новообразования, содержащая эффективное количество Т-клетки по любому из пп. 4-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Применение Т-клетки по любому из пп. 4-14 для лечения CD19+ злокачественного новообразования.

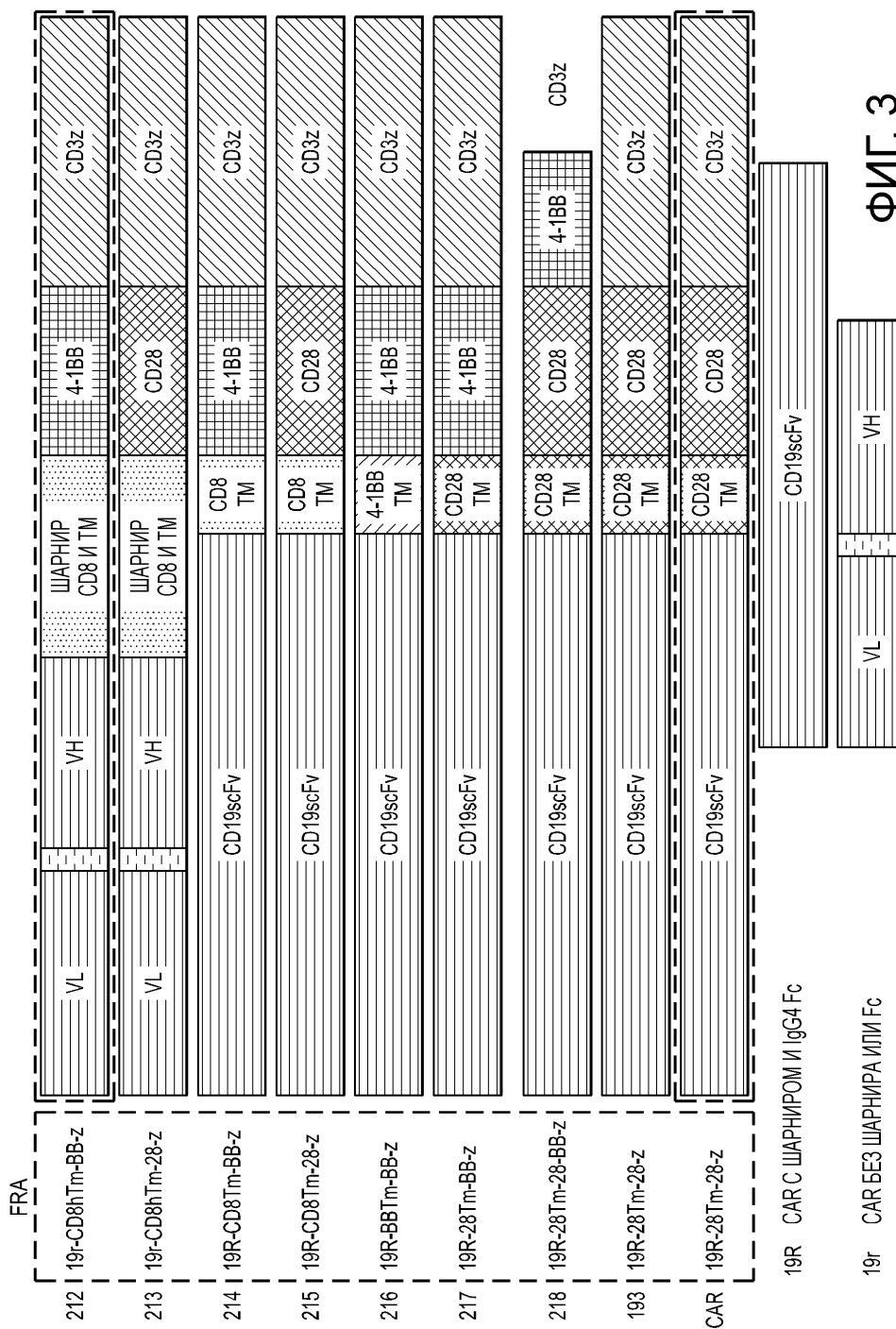
45 17. Применение Т-клетки по п. 16, где рак представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование или лимфому.

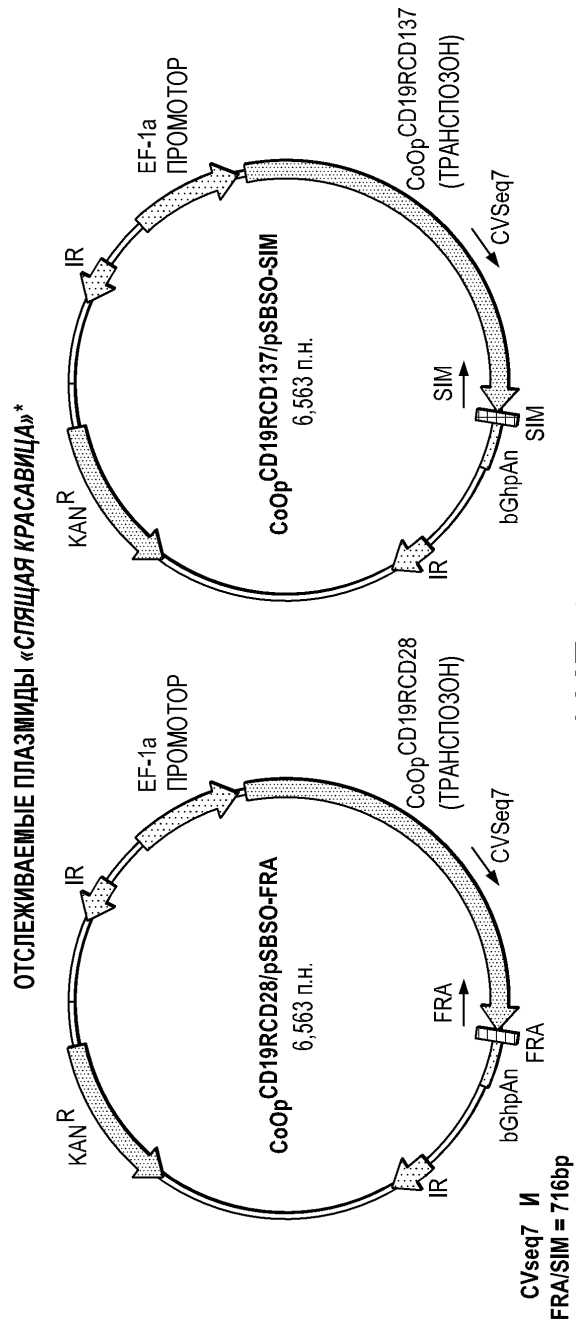




ФИГ. 1

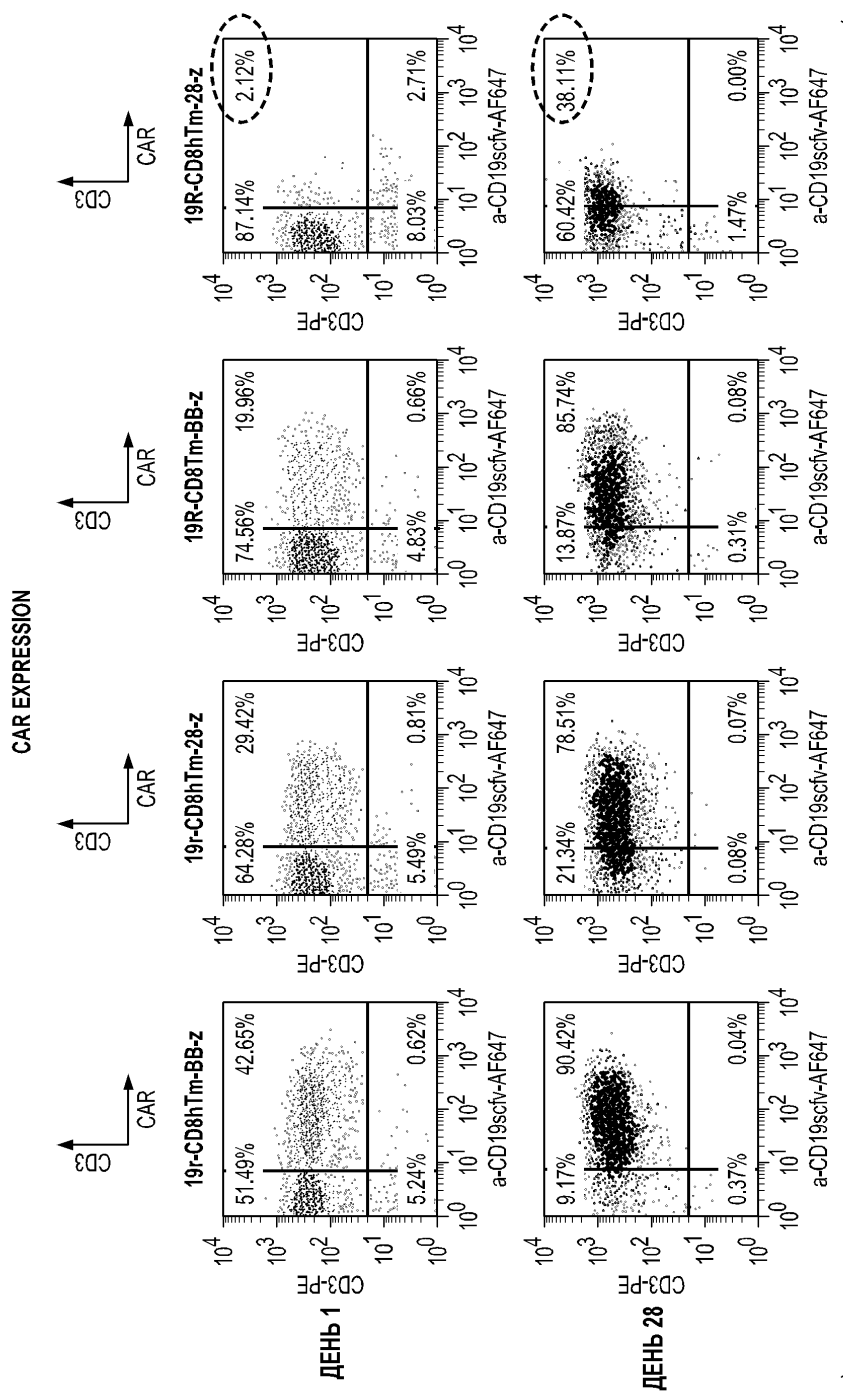






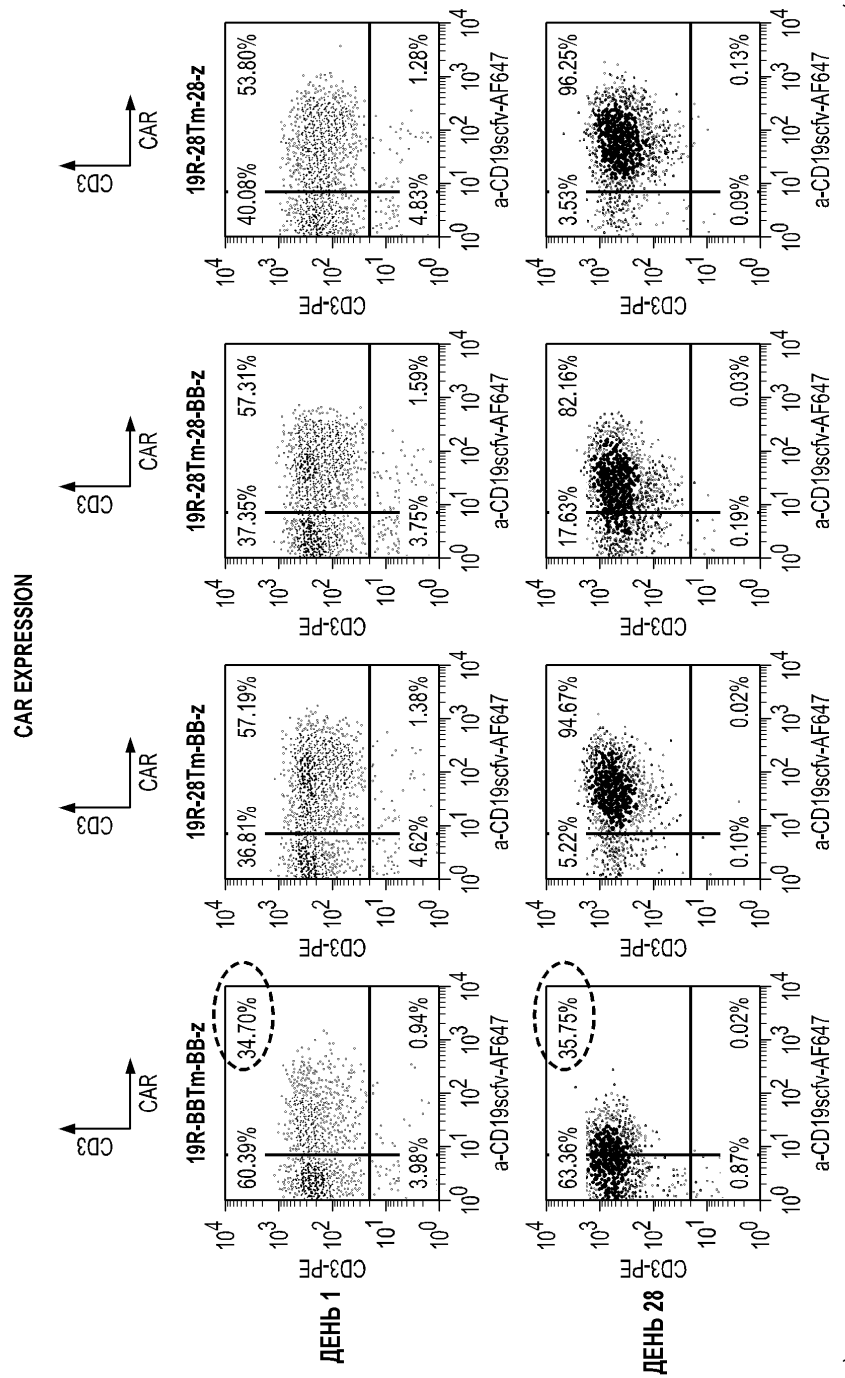
ФИГ. 4

5/43



ФИГ. 5-1

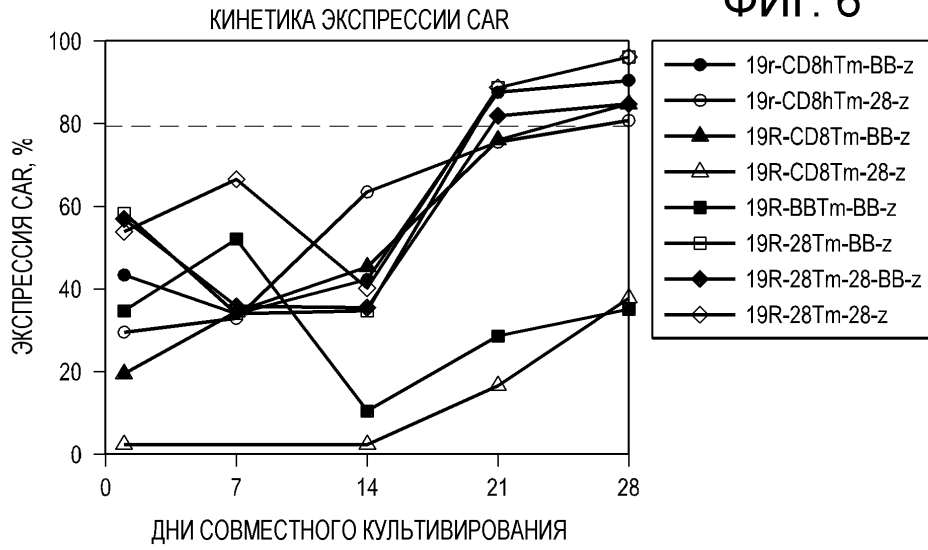
6/43



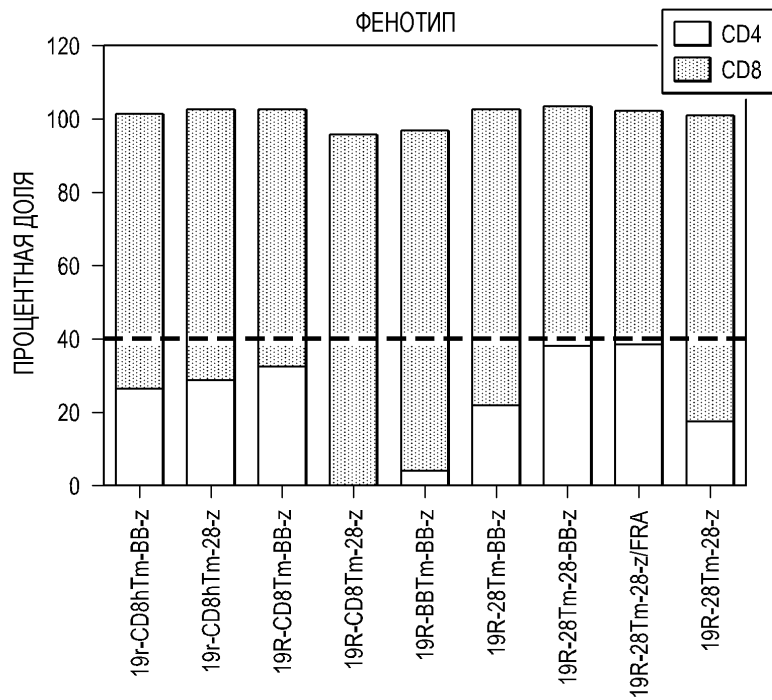
ФИГ. 5-1

7/43

ФИГ. 6

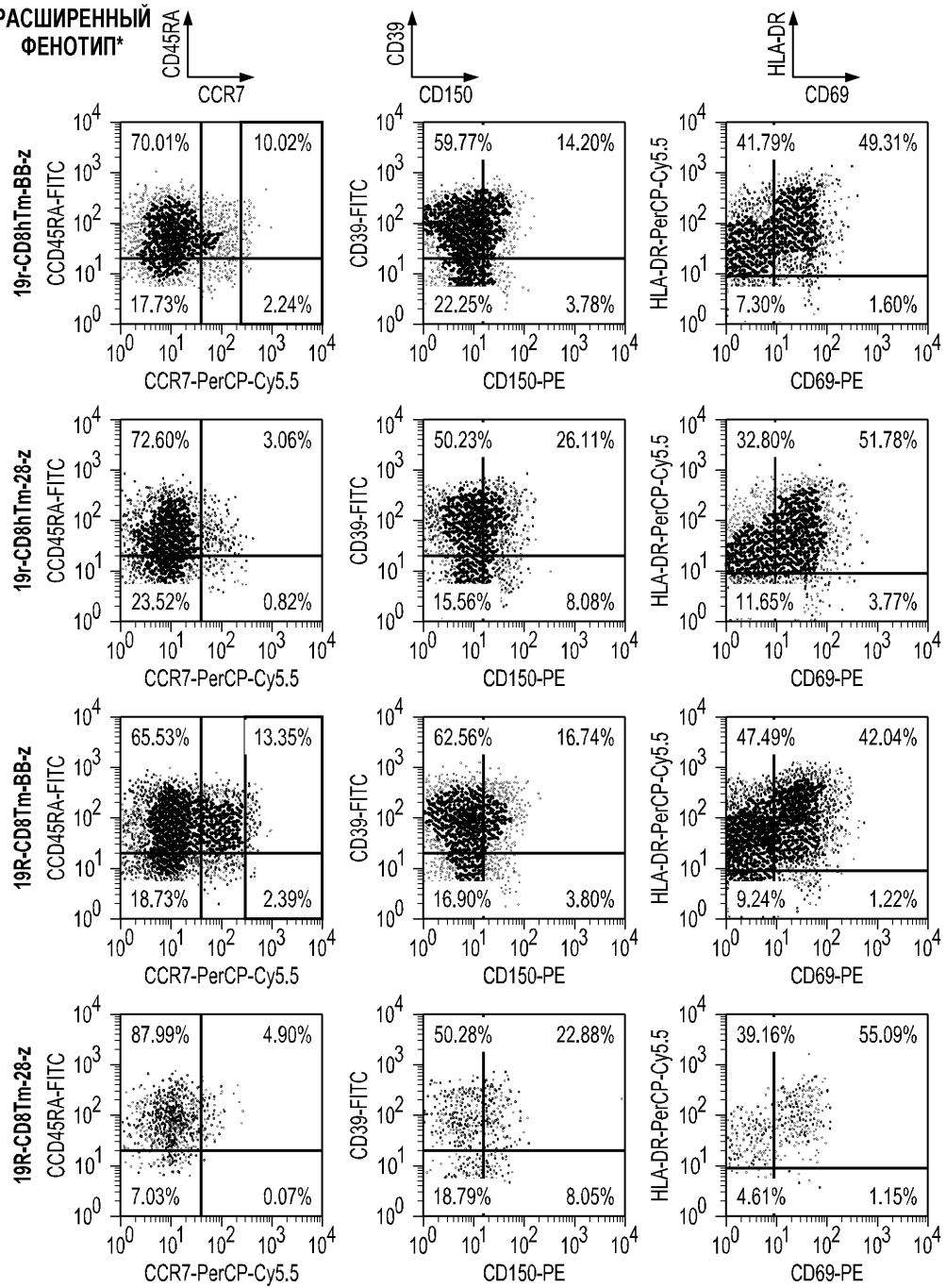


ФИГ. 7



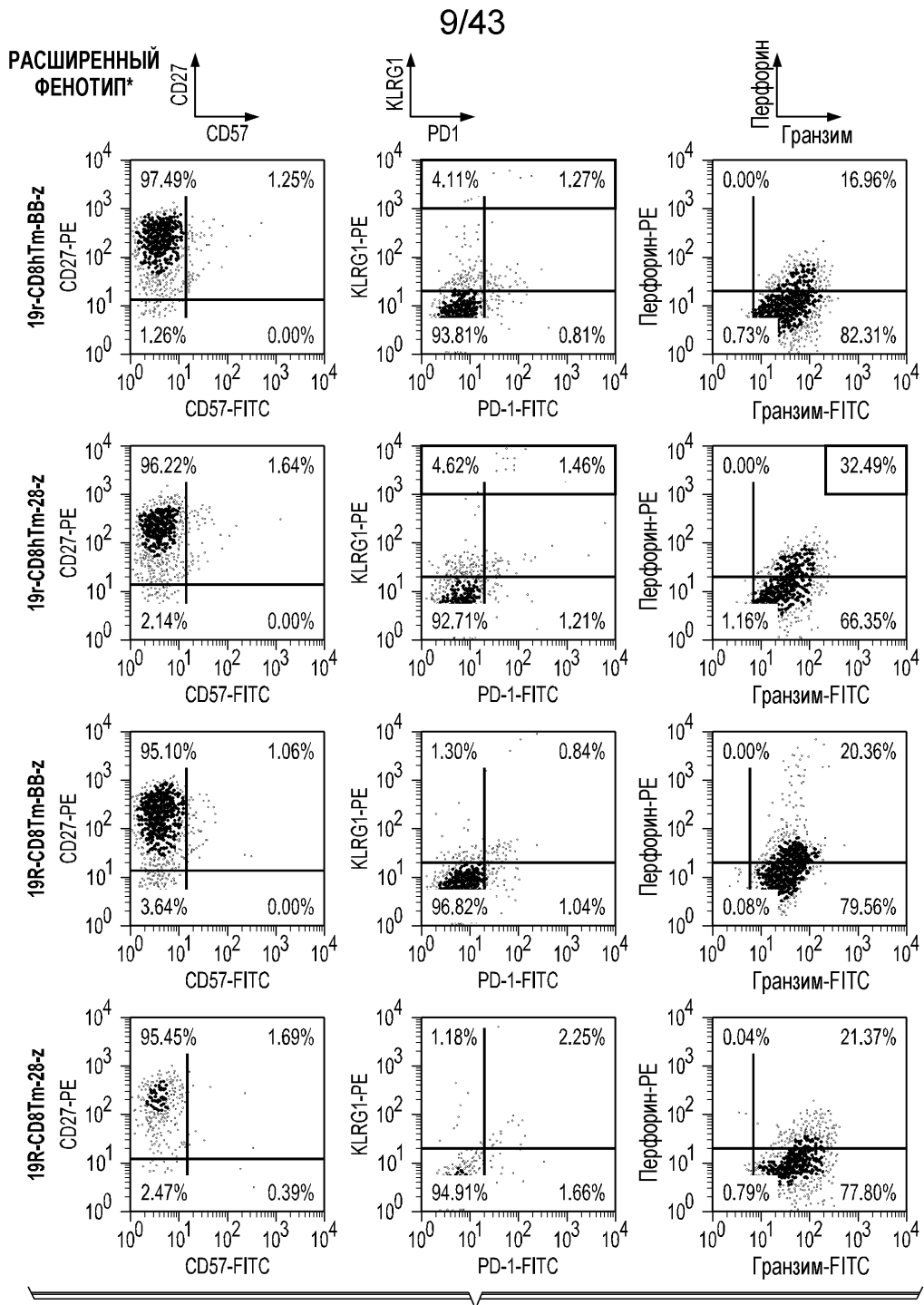
8/43

РАСШИРЕННЫЙ  
ФЕНОТИП\*



ФИГ. 8А-1

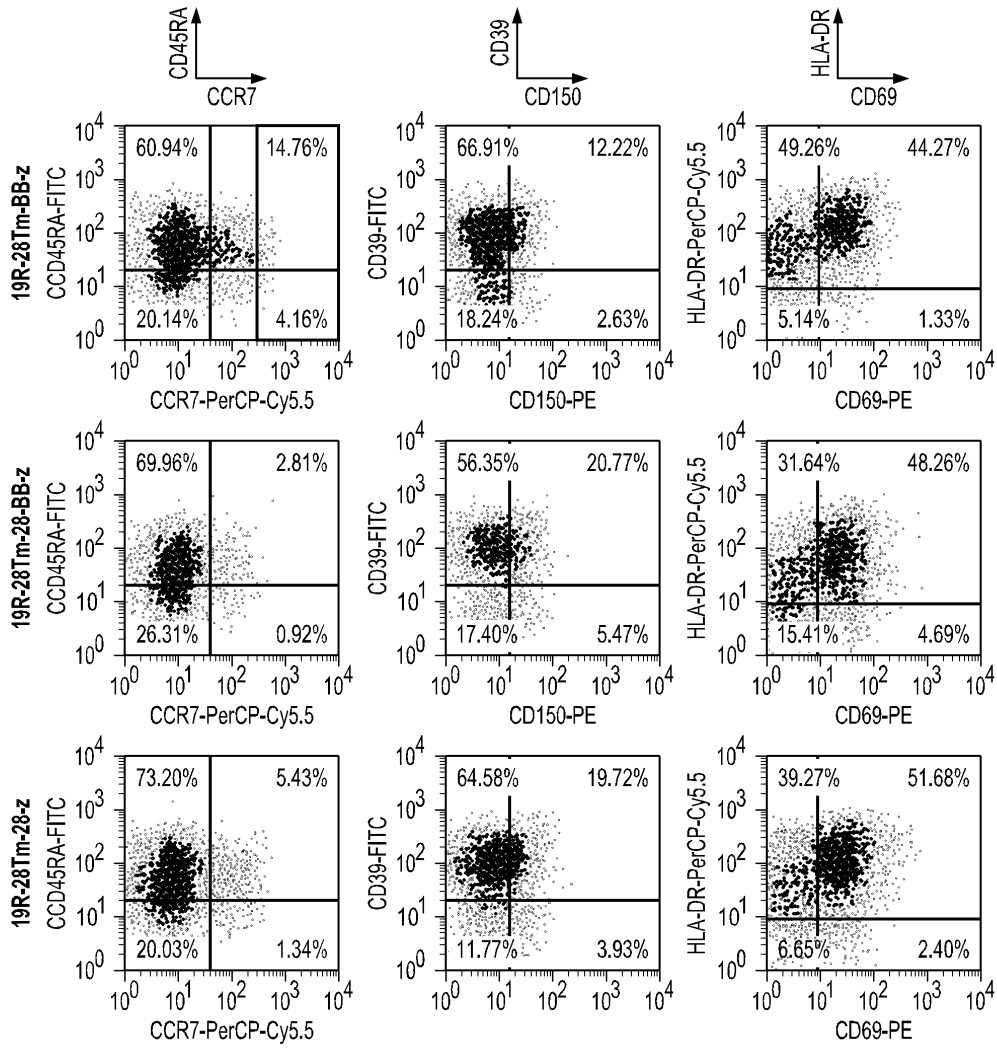




**ФИГ. 8А-2**

10/43

РАСШИРЕННЫЙ ФЕНОТИП\*

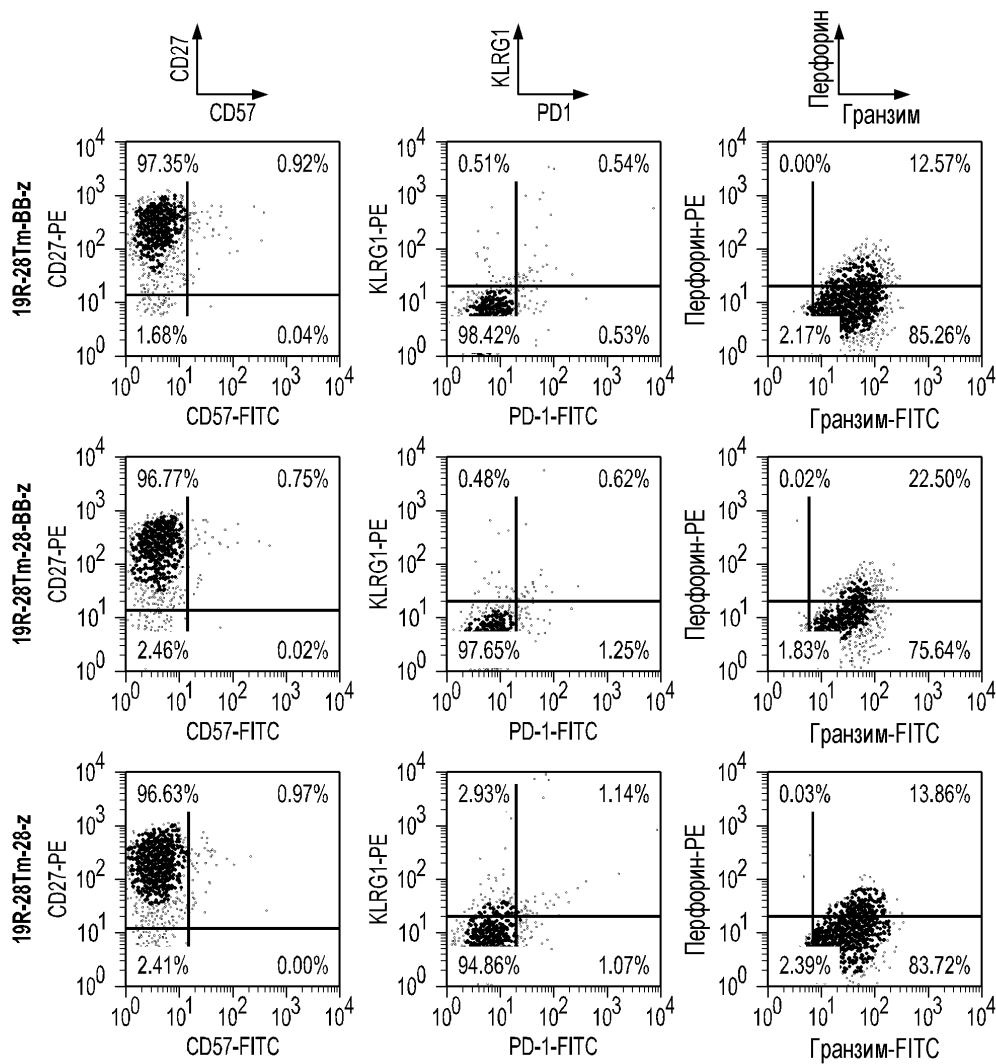


\* ДИСКРИМИНАЦИОННОЕ ОКНО НА SAR+ КЛЕТКИ

ФИГ. 8В-1

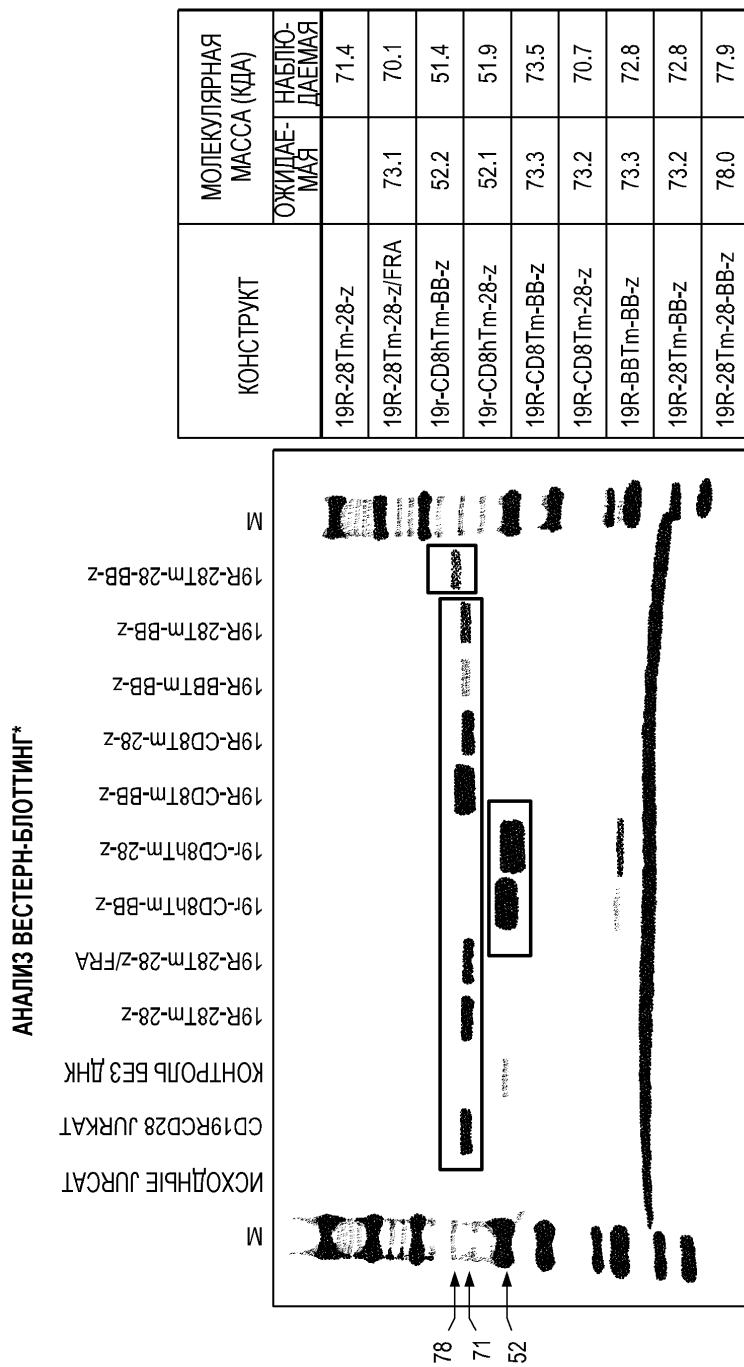
11/43

РАСШИРЕННЫЙ ФЕНОТИП\*



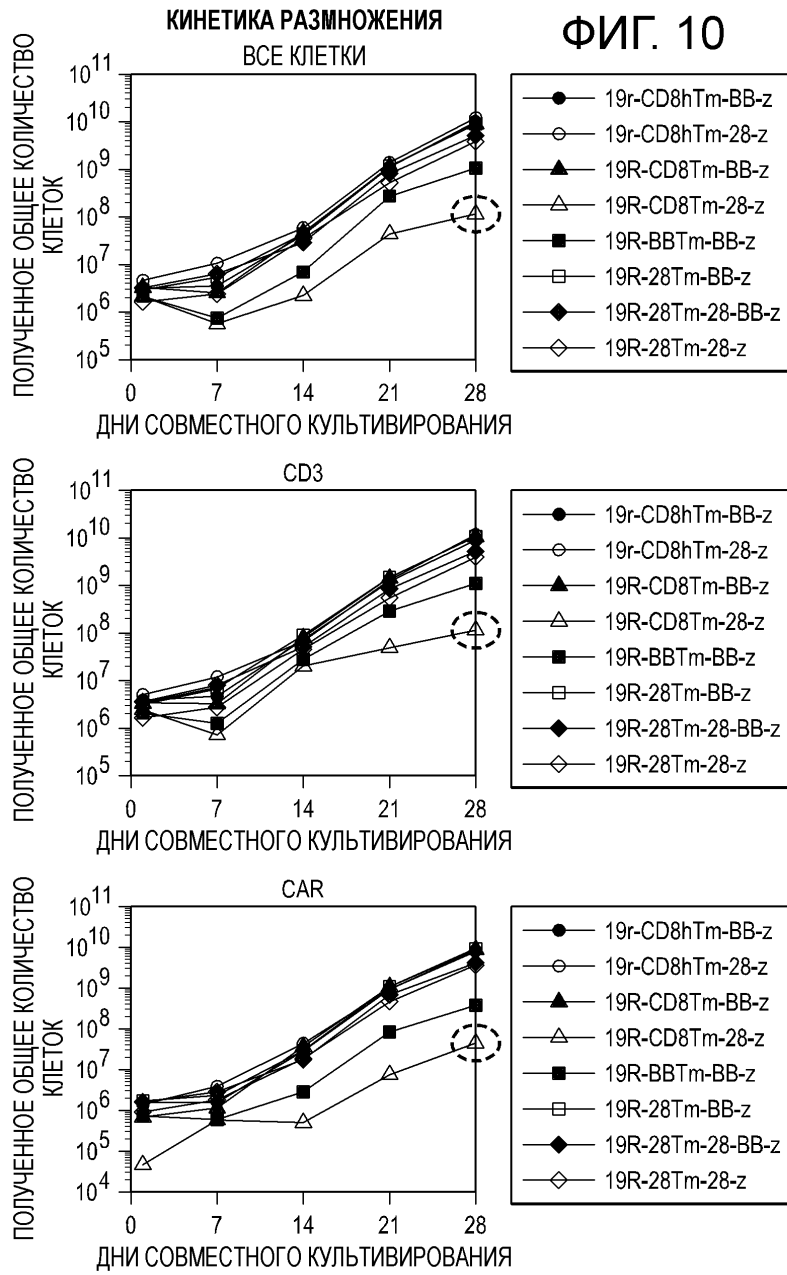
\* ДИСКРИМИНАЦИОННОЕ ОКНО НА CAR+ КЛЕТКИ

ФИГ. 8В-2

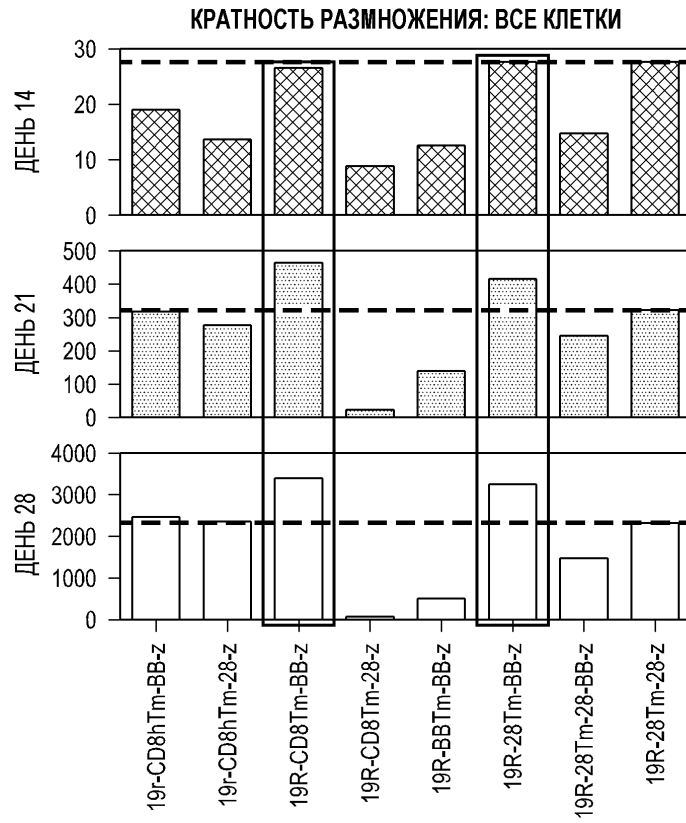


ФИГ. 9

13/43

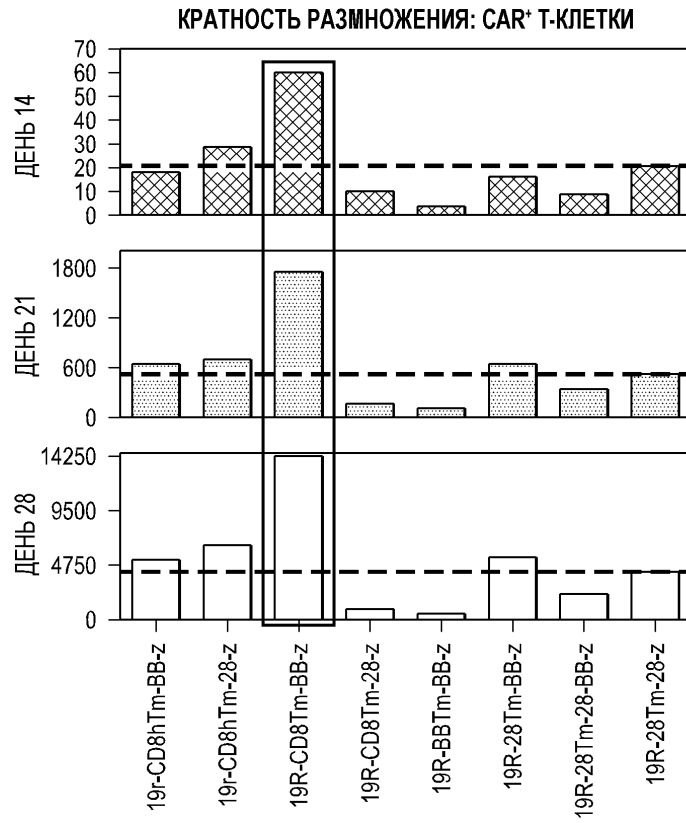


14/43



ФИГ. 11

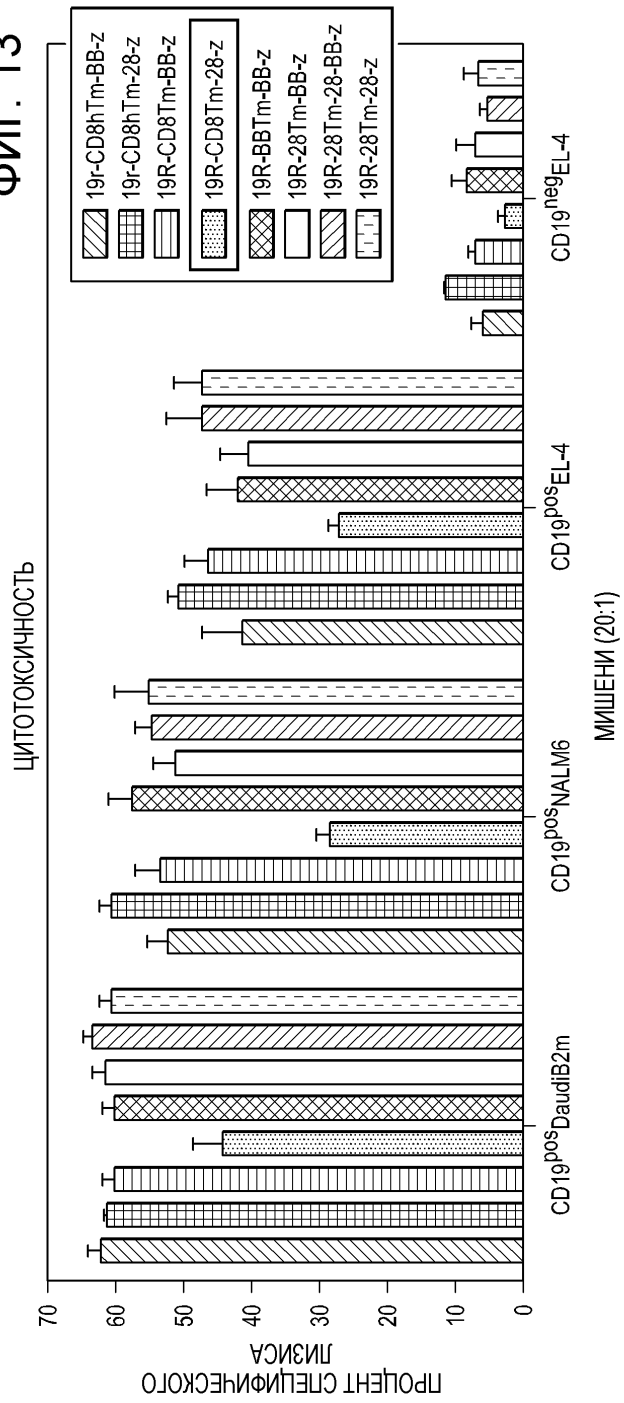
15/43



ФИГ. 12

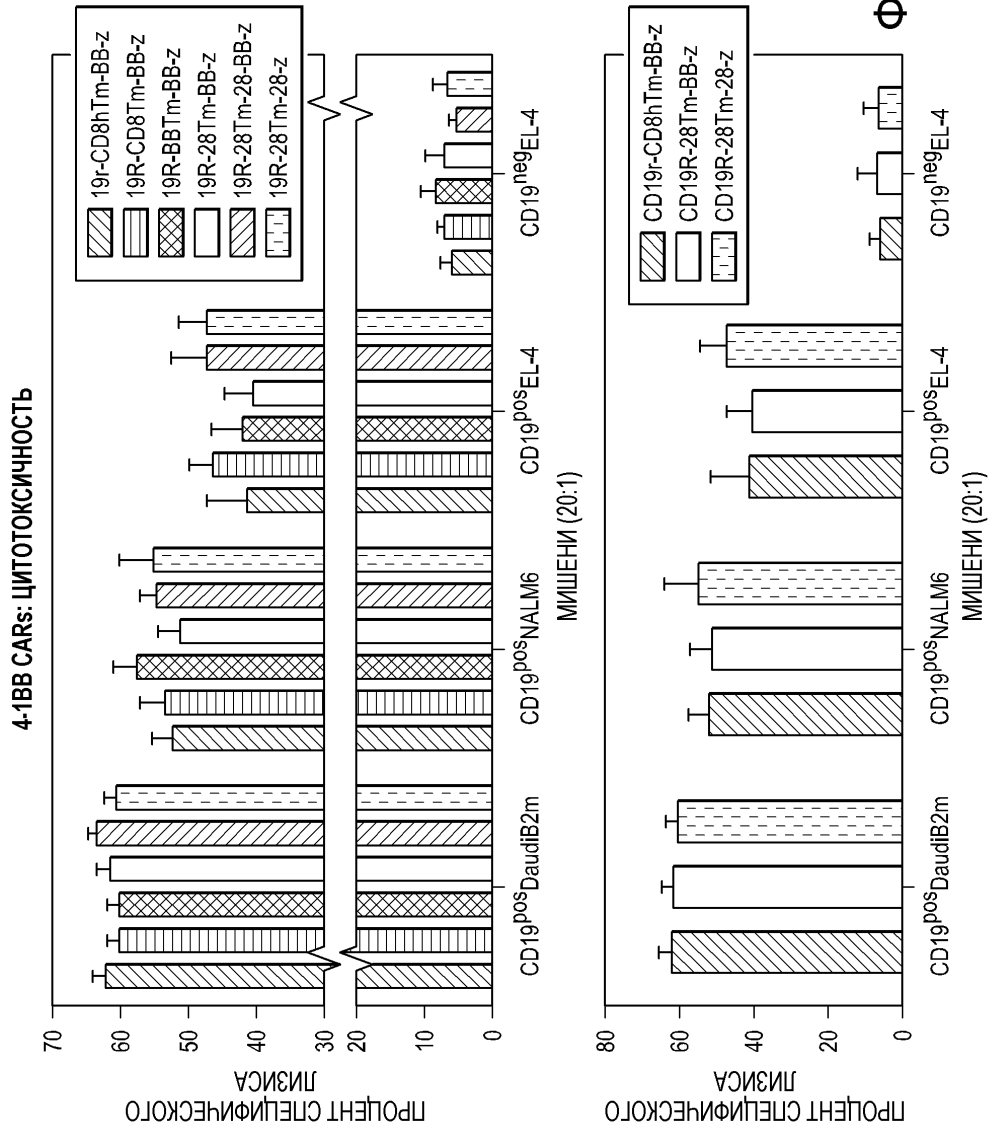
16/43

ФИГ. 13

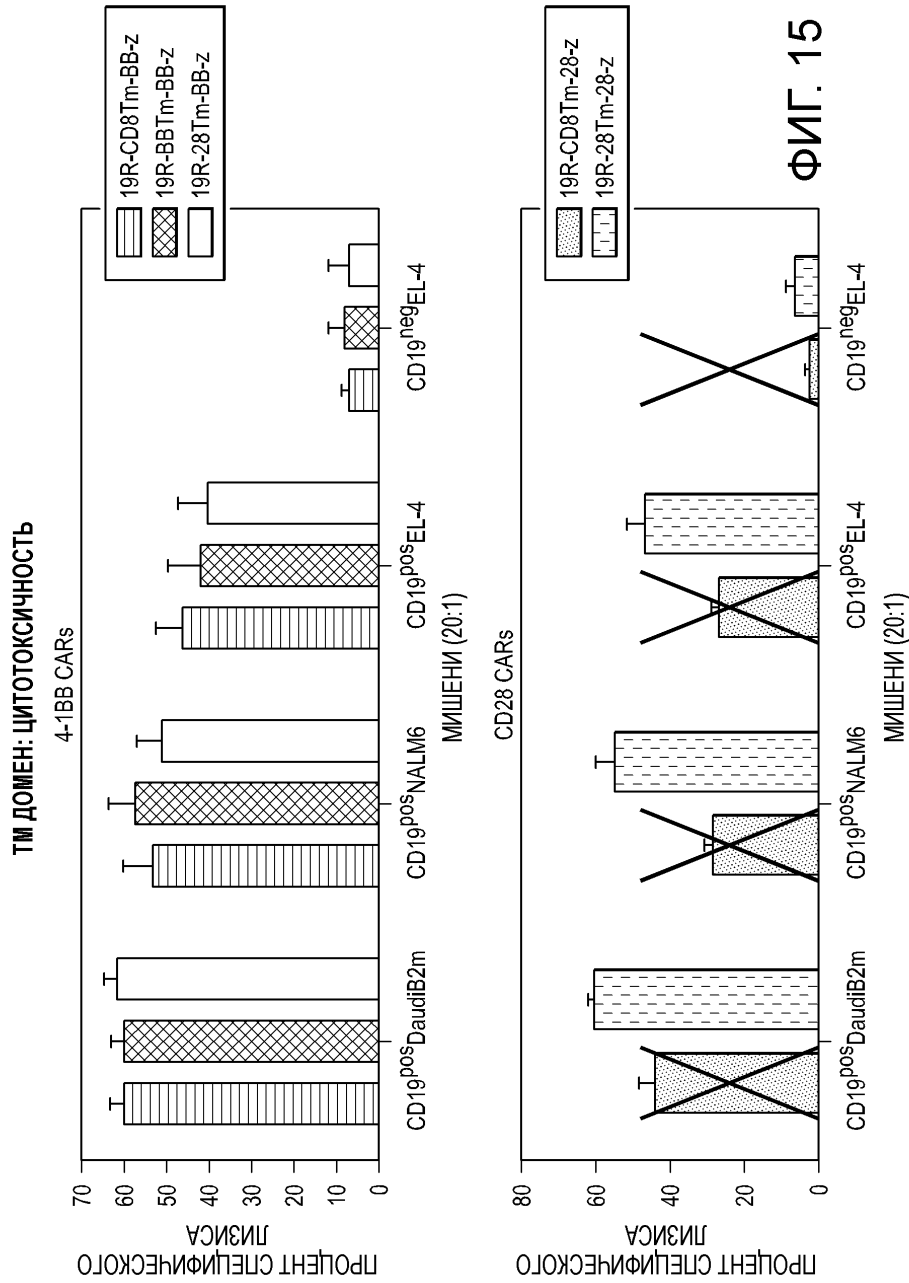




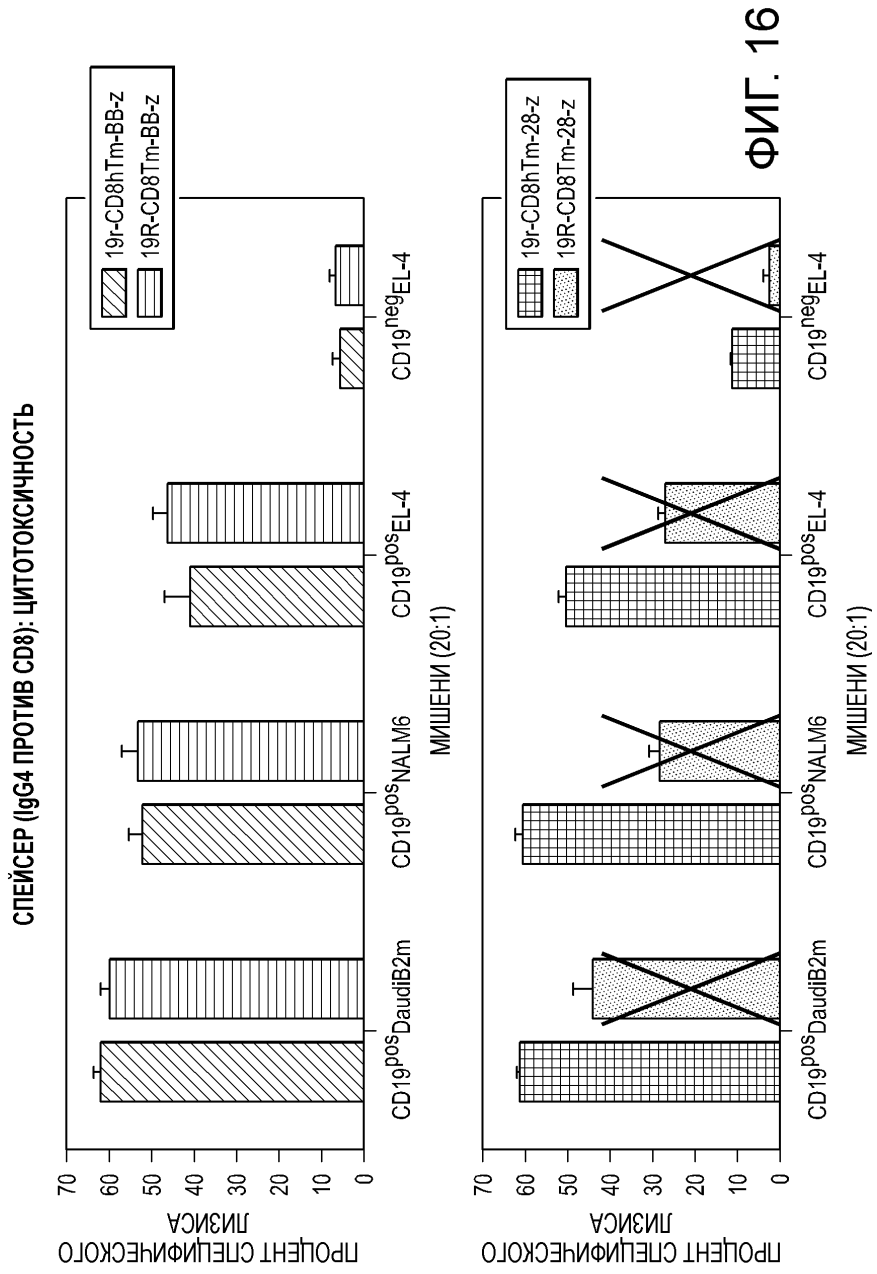
17/43

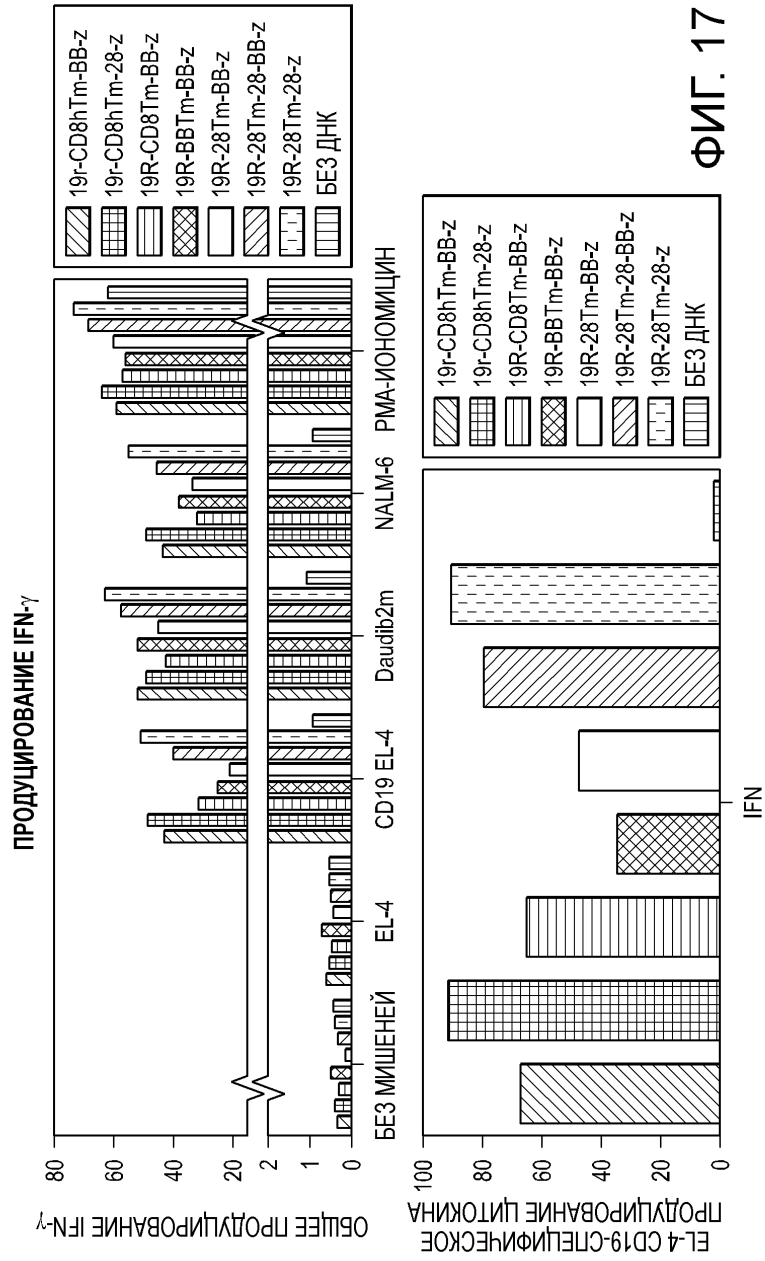


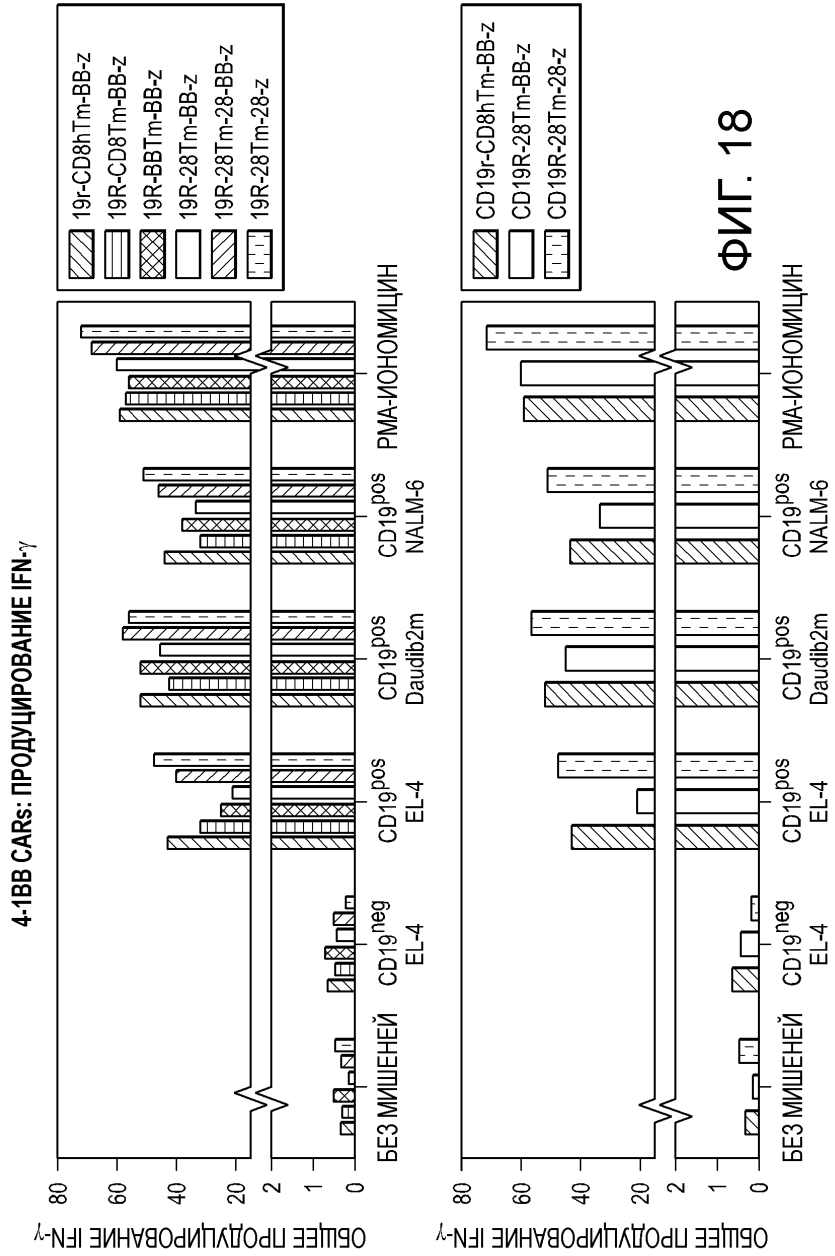
18/43

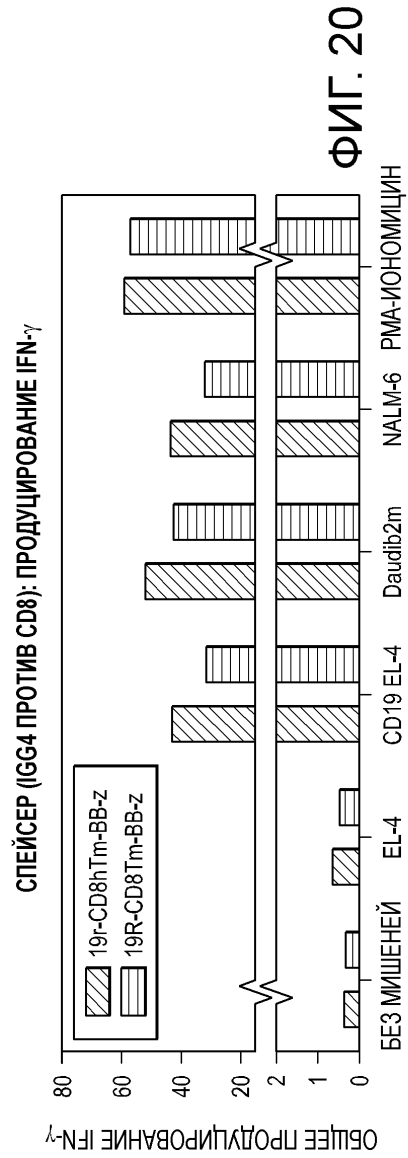
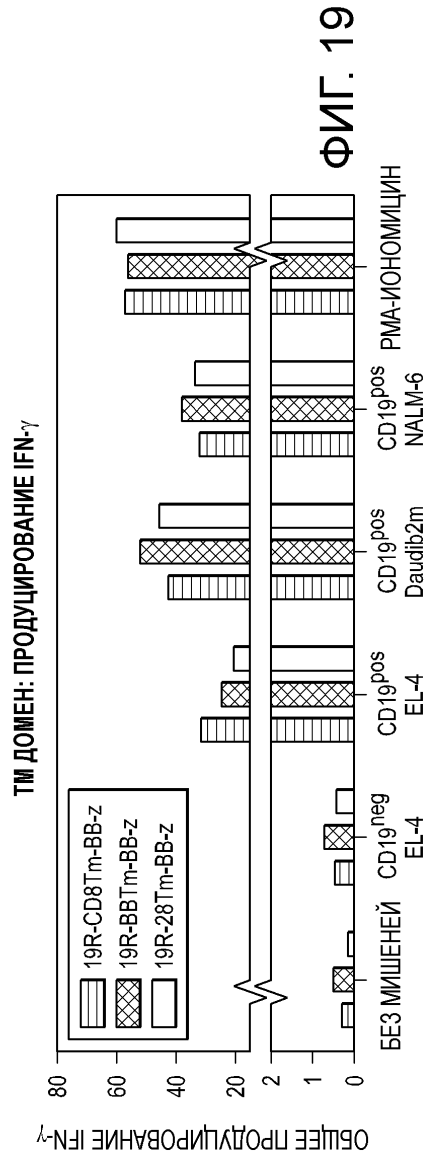


19/43





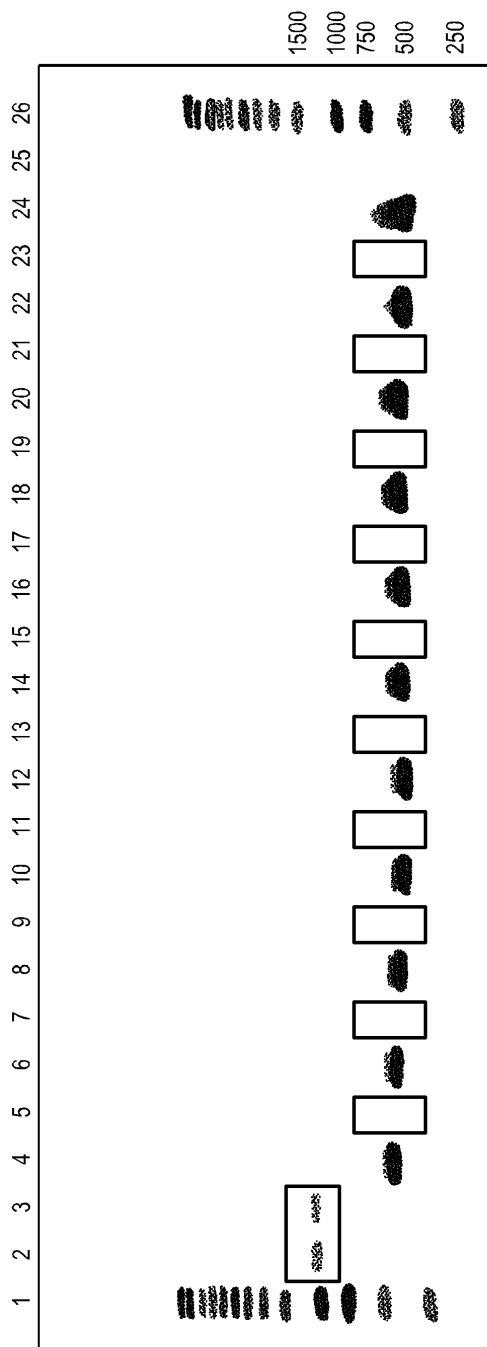




23/43

ФИГ. 21

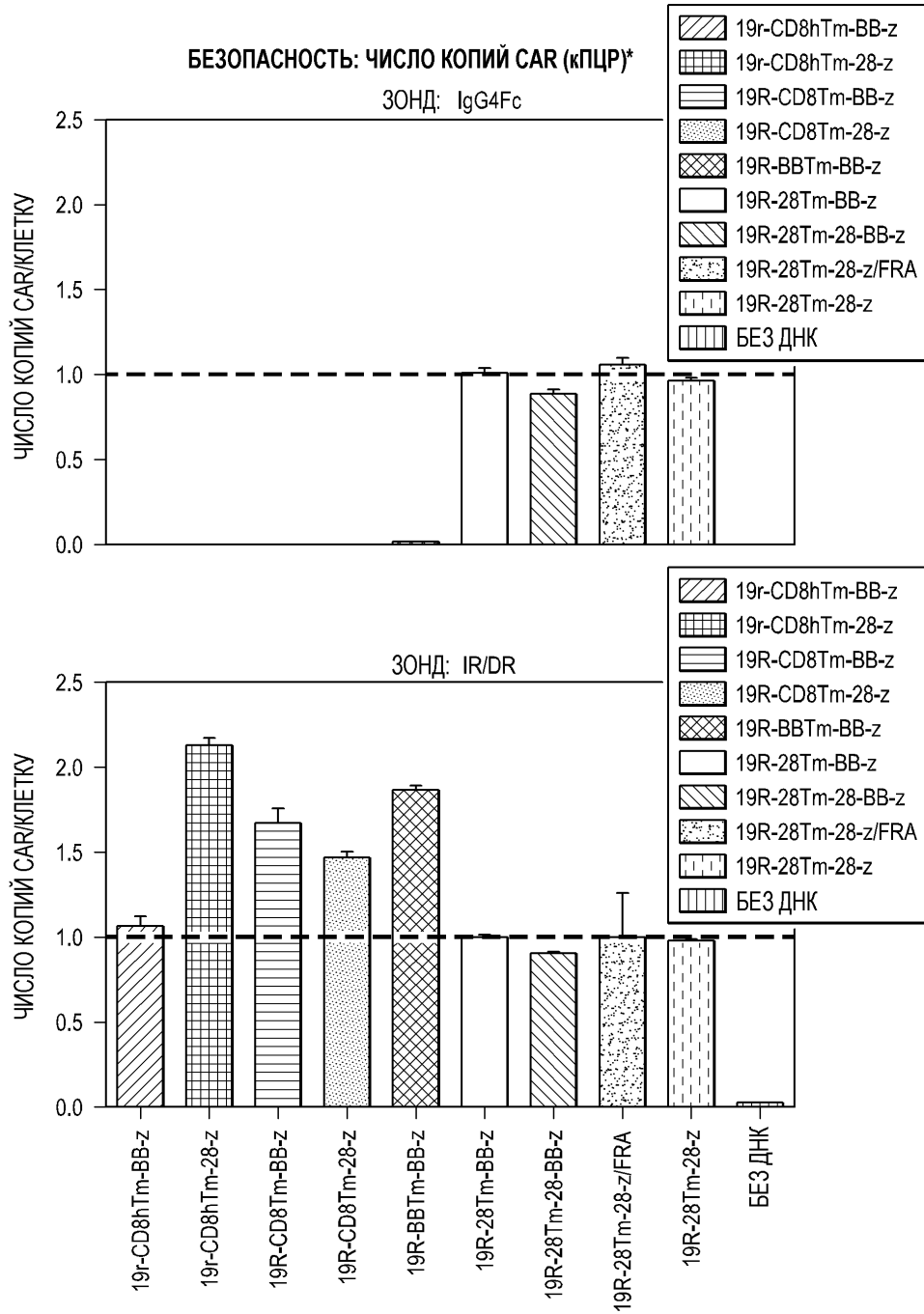
БЕЗОПАСНОСТЬ: ПЦР SB11\*



ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ SB11		ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ GARDH	
1, 26 = 1 т.п.н. НАБОР СТАНДАРТОВ	2 = SB11-IRES2-EGFP ПЛАЗМИДА	4 = JURKAT/SB11-IRES2-EGFP	
25 = ПУСТАЯ ПРОБА	3 = JURKAT/SB11-IRES2-EGFP	6 = NO DNA	
	5 = БЕЗ ДНК	8 = 217	
	7 = 217	10 = 215	
	9 = 215	12 = 213	
	11 = 213	14 = 218	
	13 = 218	16 = 214	
	15 = 214	18 = CAR	
	17 = CAR	20 = 193	
	19 = 193	22 = 216	
	21 = 216	24 = 212	
	23 = 212		

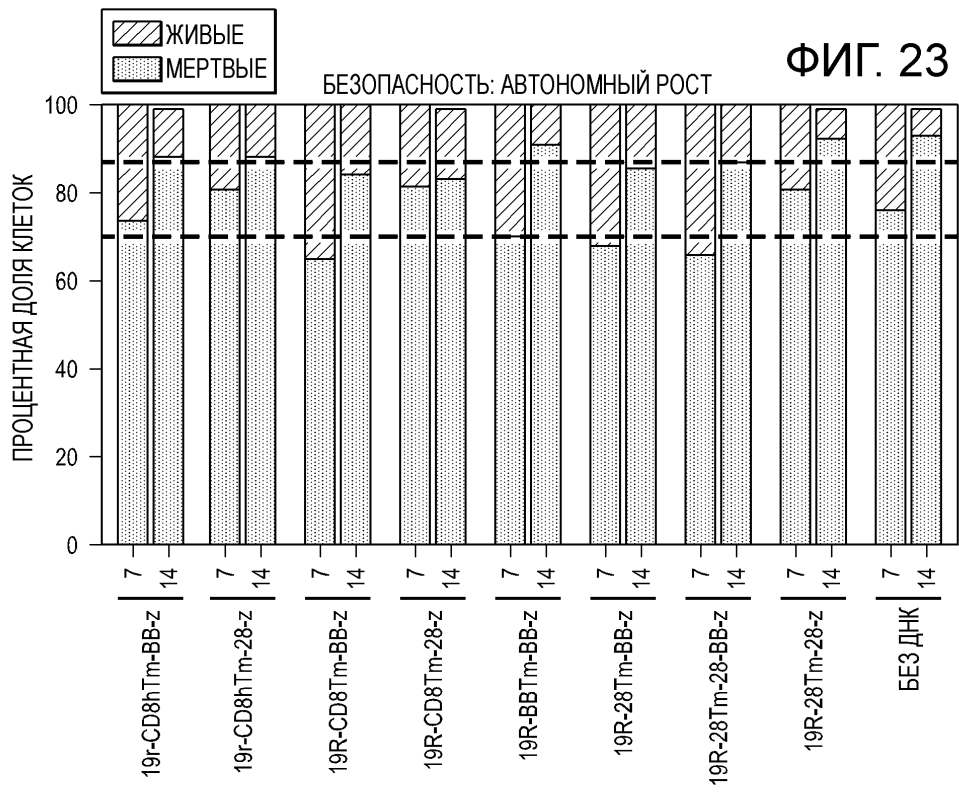
24/43

ФИГ. 22



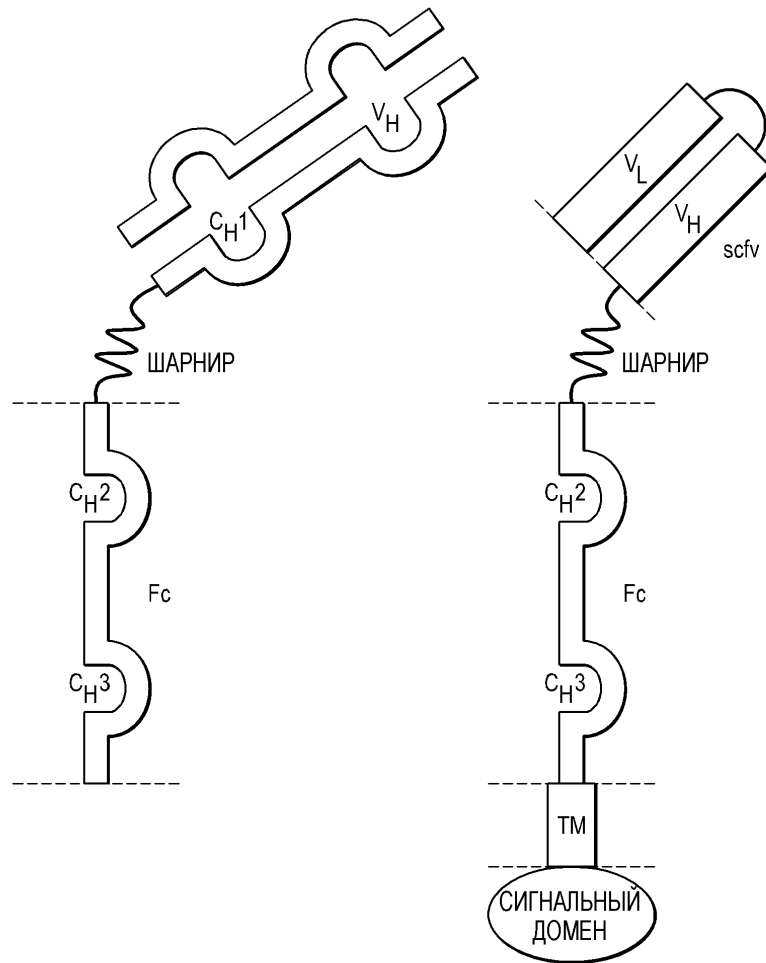


25/43



26/43

КОНСТРУКЦИЯ CAR



ФИГ. 24

CD3 $\zeta$

**МОЛЕКУЛА CD247 НОМО SAPIENS (CD247), ВАРИАНТ 1 ТРАНСКРИПТА, МРНК  
ЭТАЛОННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НСБИ: NR\_198053.2**

Искомая 1 RVKFFRSADAPAYQQGQNQLYNELNGRREYDVLKRRGRDPEMGKP-RRKNPQEGLY 59  
 Исследуемая RVKFFRSADAPAYQQGQNQLYNELNGRREYDVLKRRGRDPEMGKPRRRKNPQEGLY  
 Искомая 60 NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR 112  
 Исследуемая NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA

**ПРЕДШЕСТВЕННИК ИЗОФОРМЫ 1 ДЗЕТА-ЦЕПИ Т-КЛЕТОЧНОГО ПОВЕРХНОСТНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА CD3 [НОМО SAPIENS]  
ЭТАЛОННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НСБИ: NR\_932170.1**

Искомая 1 RVKFFRSADAPAYQQGQNQLYNELNGRREYDVLKRRGRDPEMGKP-RRKNPQEGLY 59  
 Исследуемая 52 RVKFFRSADAPAYQQGQNQLYNELNGRREYDVLKRRGRDPEMGKPRRRKNPQEGLY 111  
 Искомая 60 NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR 112  
 Исследуемая 112 NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR 164

**ПРЕДШЕСТВЕННИК ИЗОФОРМЫ 2 ДЗЕТА-ЦЕПИ Т-КЛЕТОЧНОГО ПОВЕРХНОСТНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА CD3 [НОМО SAPIENS]  
ЭТАЛОННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НСБИ: NR\_000725.1**

Искомая	1	RVKFFRSADAPAYQQGQNQLYNELNGRREYDVLKRRGRDPEMGKPRRRKNPQEGLYN	60
Исследуемая	52	RVKFFRSADAPAYQQGQNQLYNELNGRREYDVLKRRGRDPEMGKPRRRKNPQEGLYN	111

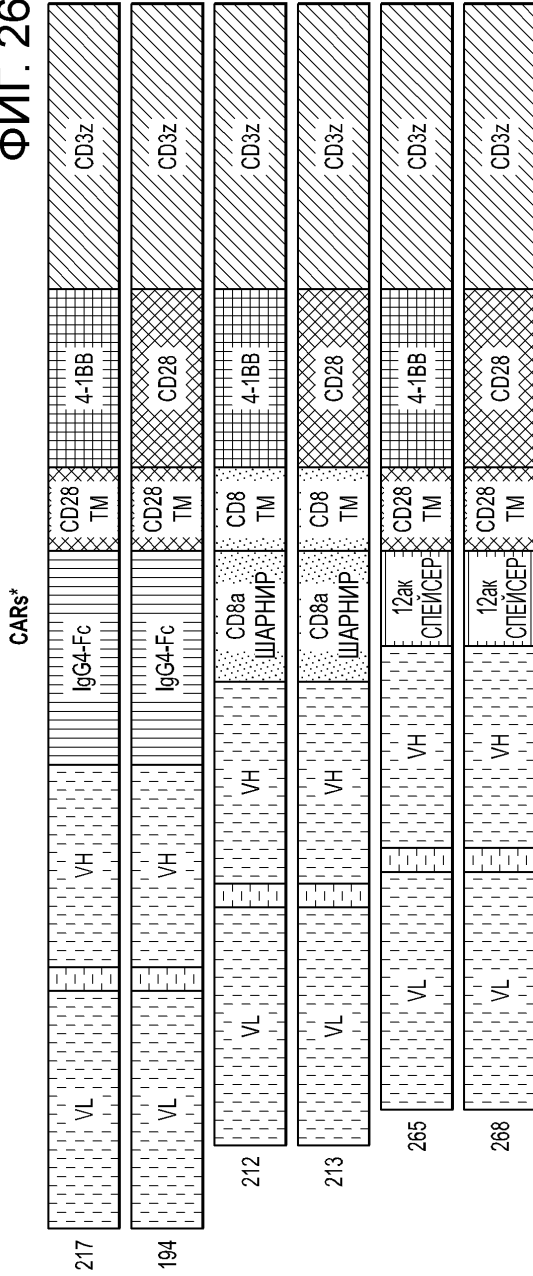
ITAM1

Искомая	61	NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	112
Исследуемая	112	NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	163

ITAM3

ФИГ. 25

ФИГ. 26



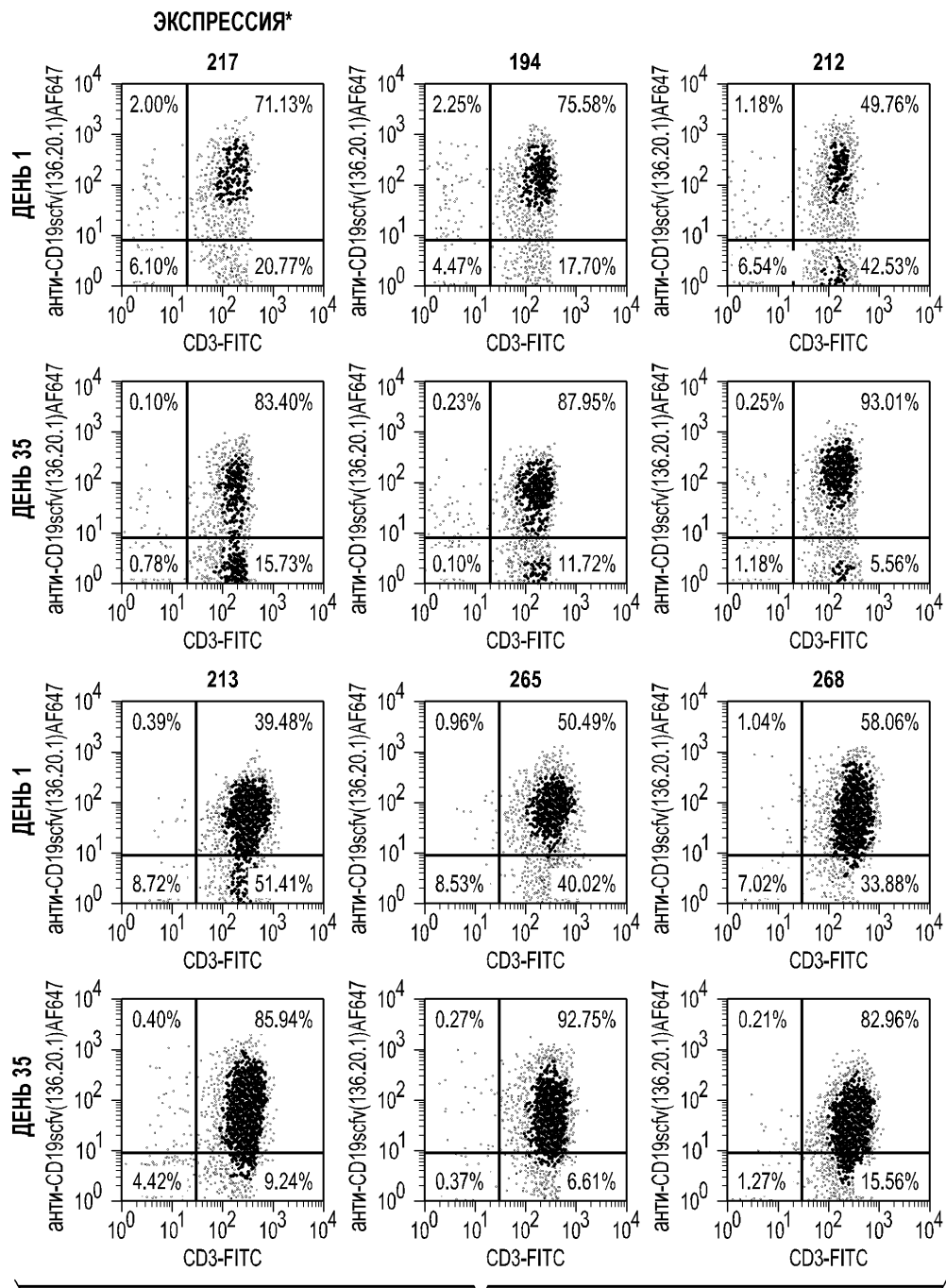
ESKYGRRCRRCR = IgG4 Fc ШАРНИР = 12 ак СПЕЙСЕР

ФИГ. 27

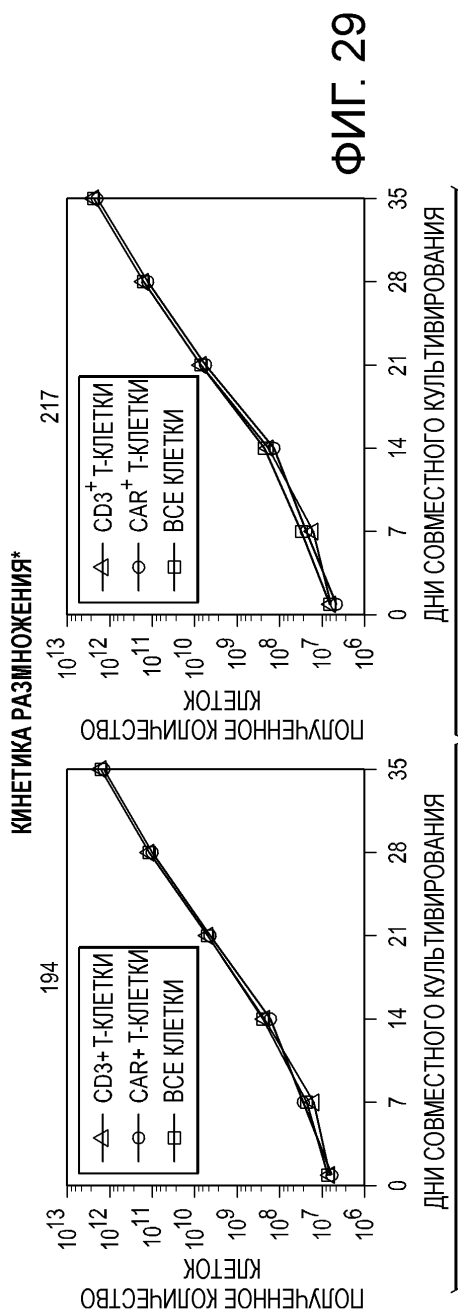
CARs

CAR →	COOPER
СПЕЙСЕР	CD28 CD137
Fc (230ак)	194 217
CD8 (47ак)	213 212
КОРОТКИЙ (12ак)	265 268
CD3z	ДТ ДТ

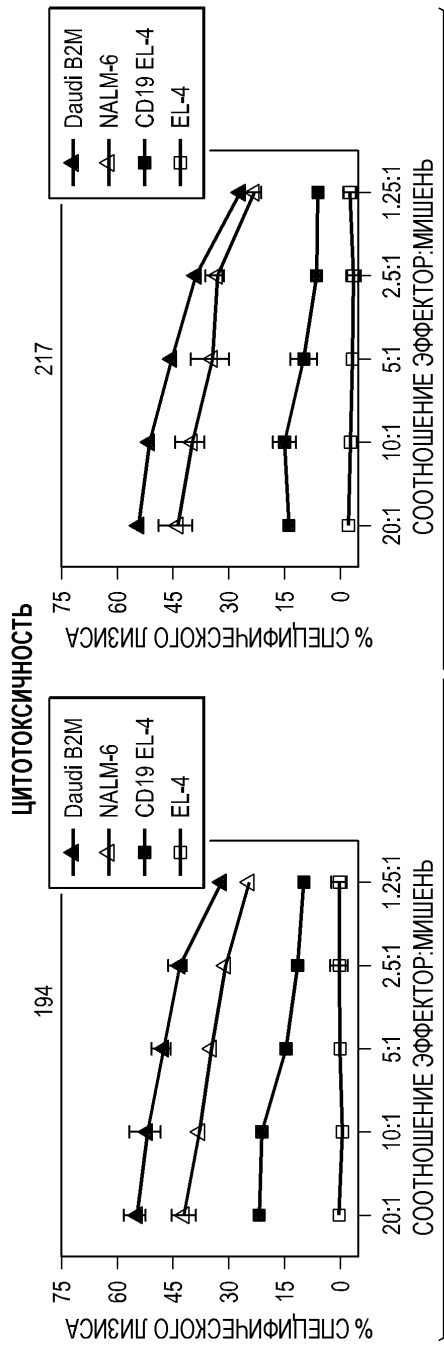
29/43



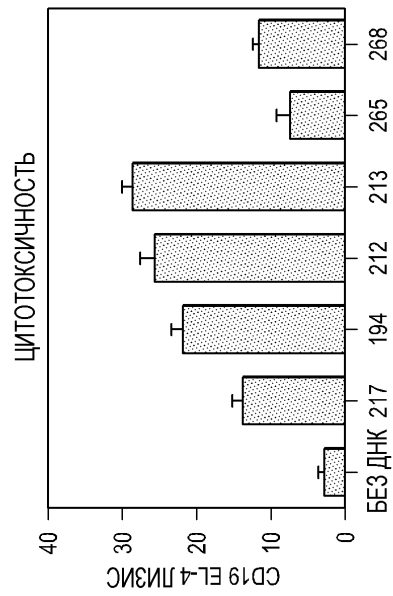
ФИГ. 28



31/43

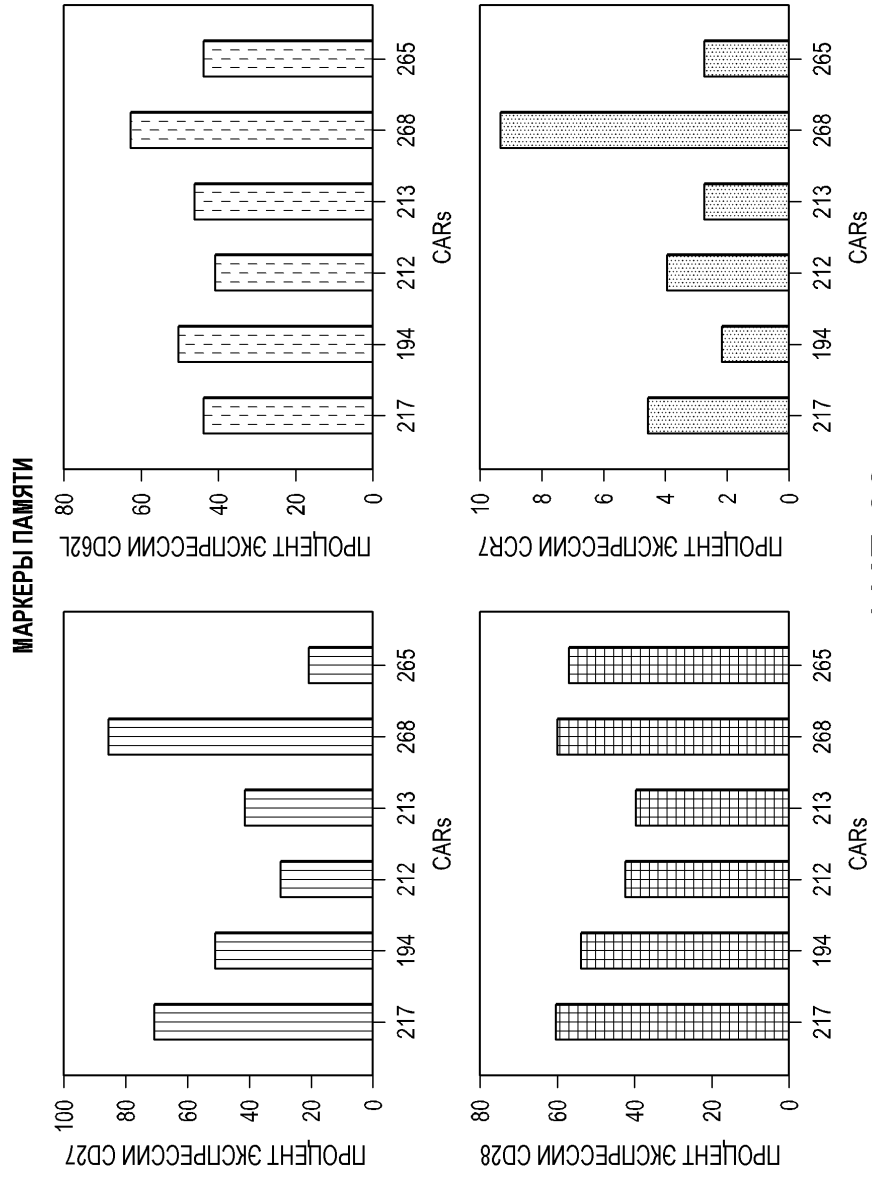


ФИГ. 31



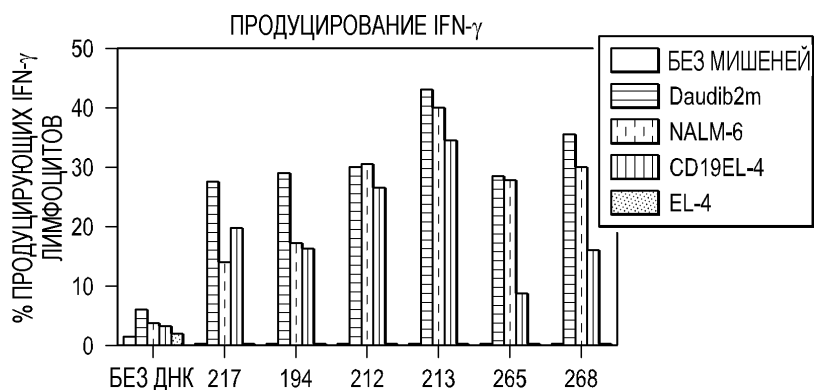
ФИГ. 32

32/43

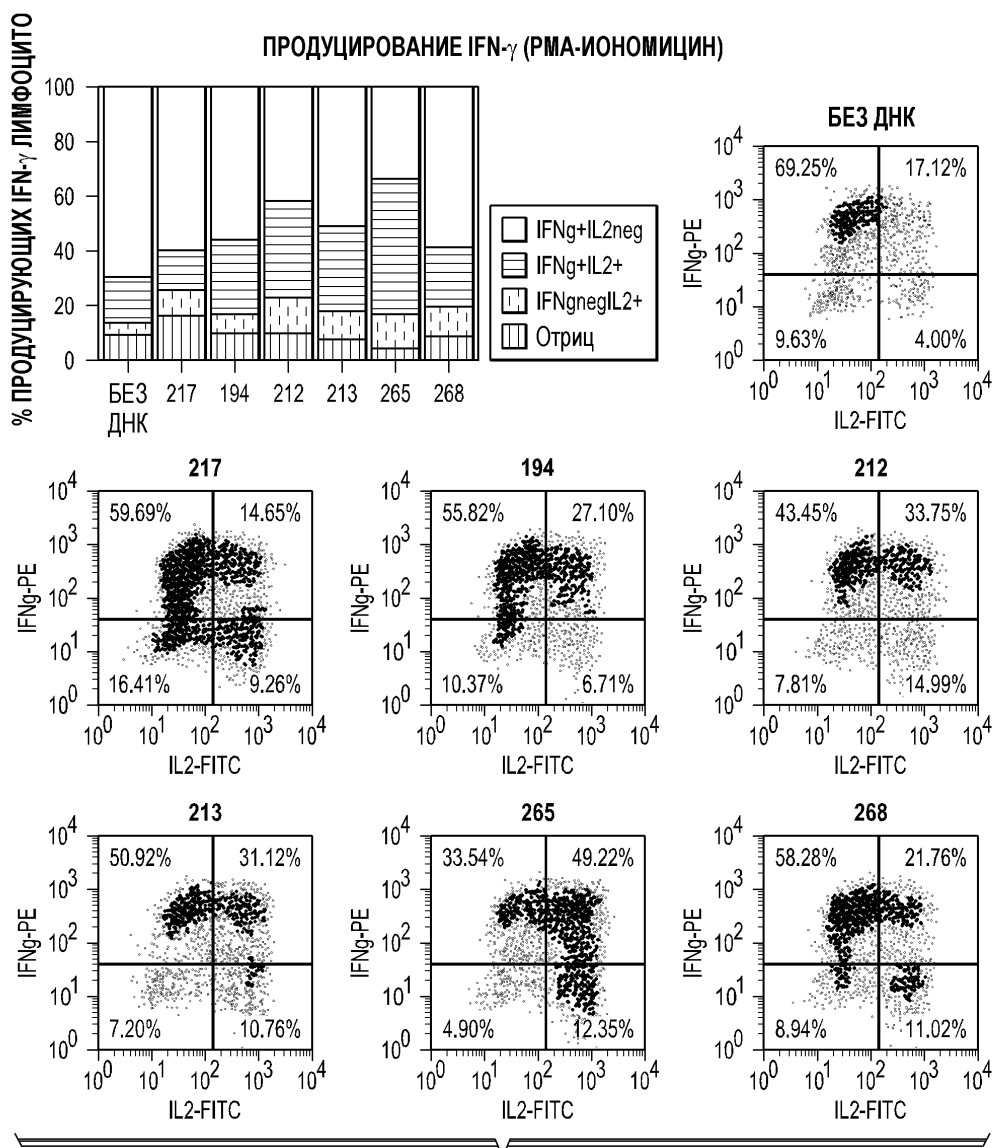


**ФИГ. 33**



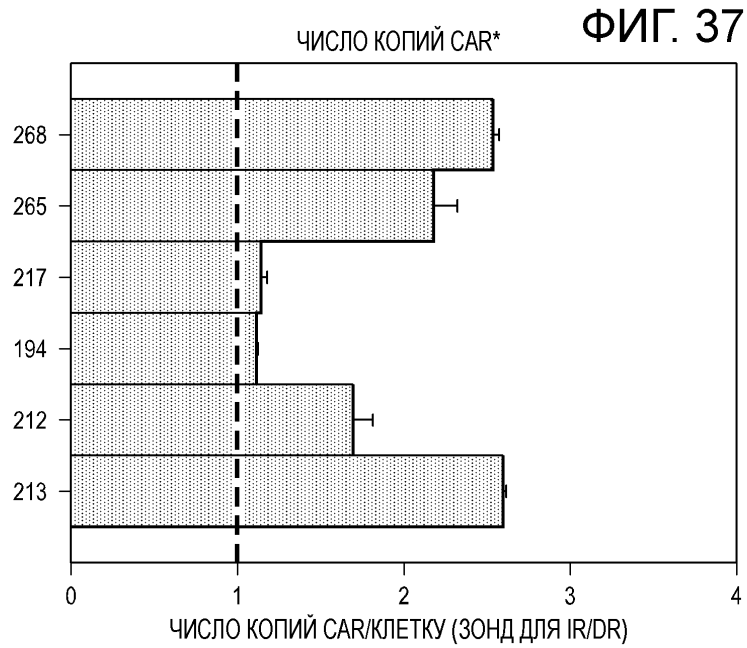
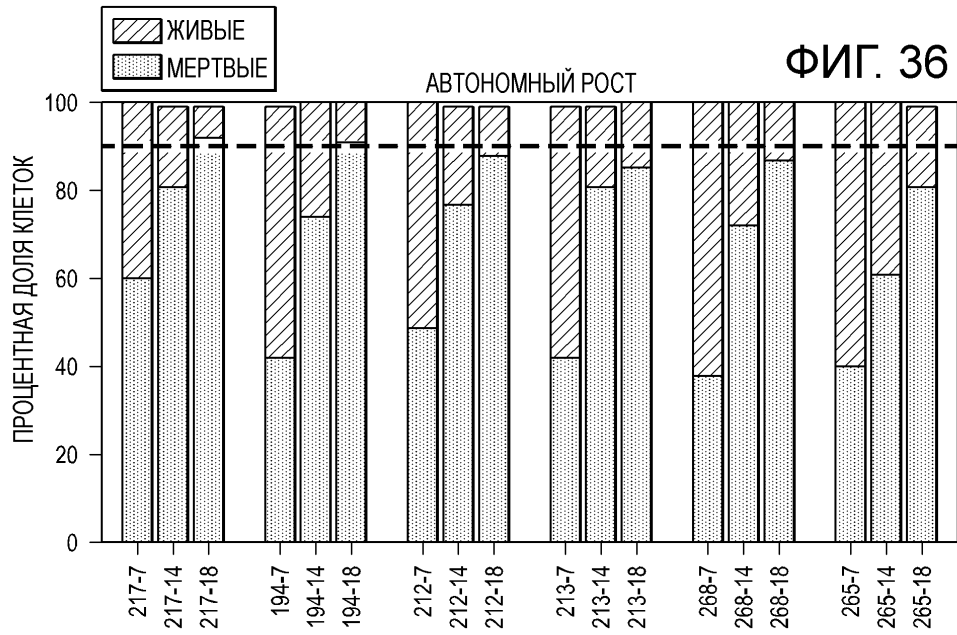


ФИГ. 34





ФИГ. 35

34/43



35/43

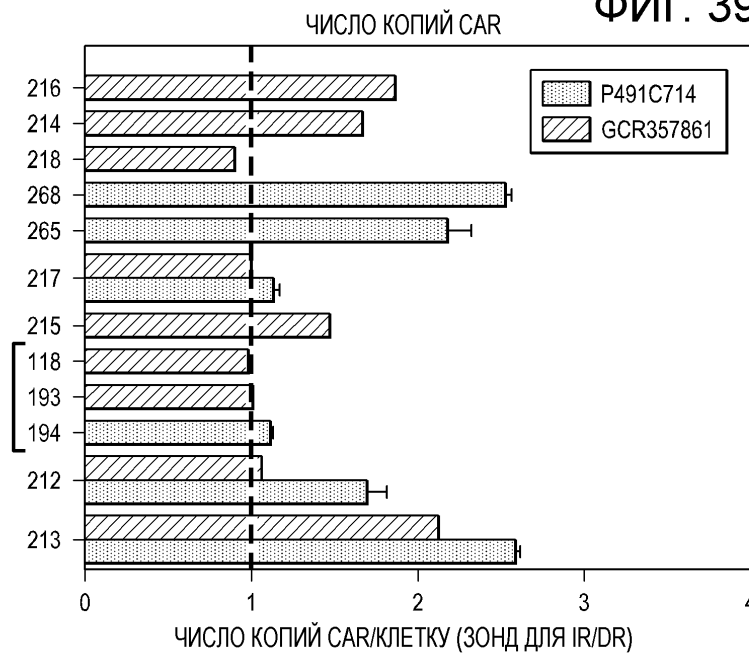
	ДОНОР P491C714
	ДОНОР GCR357861

ЧИСЛО КОПИЙ CAR

ФИГ. 38

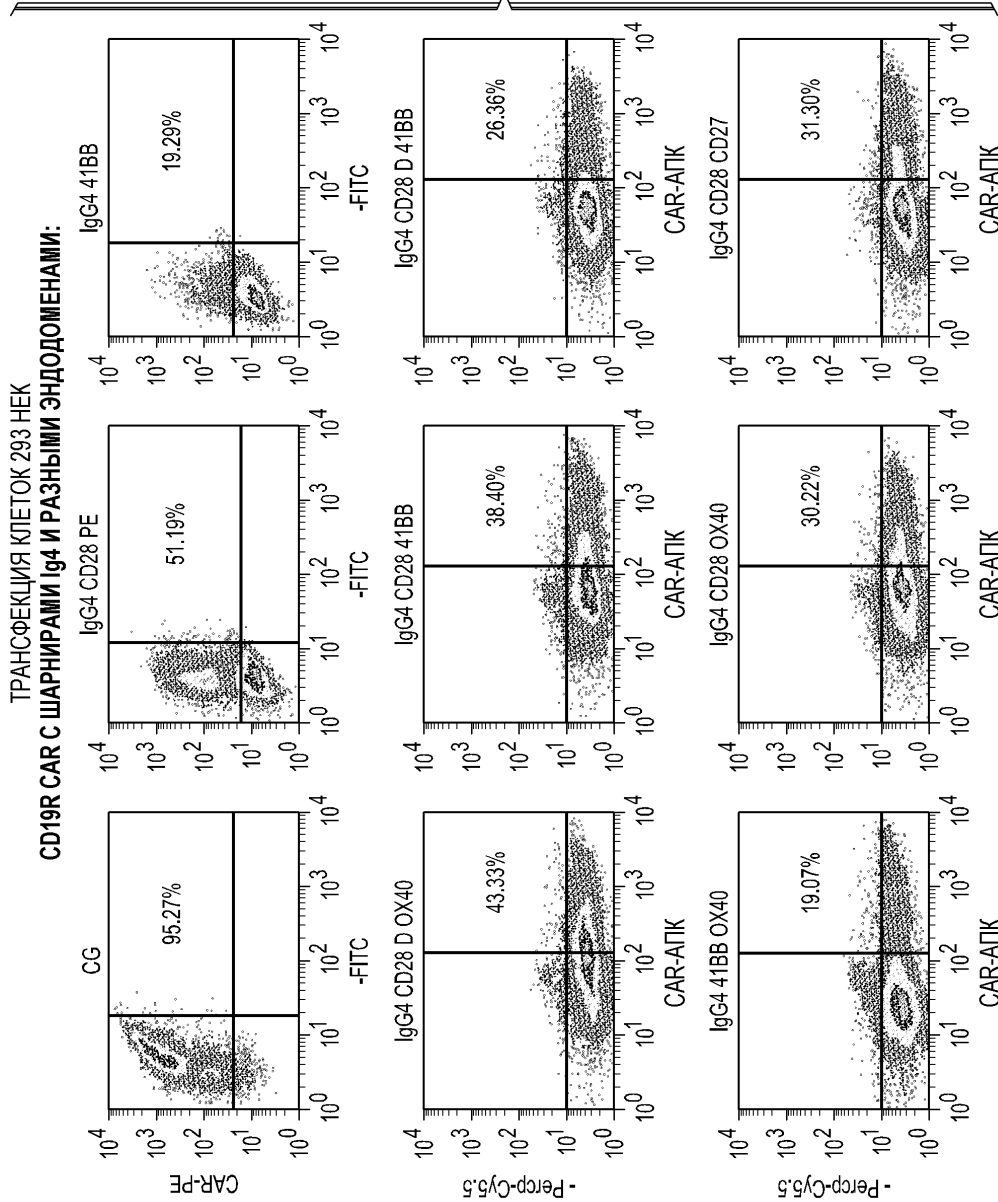
ДОМЕНЫ	COOPER						
	CD28			CD137			CD28+ CD137
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ	CD8	CD28	CD137	CD8	CD28	CD137	CD28
ТМ/СПЕЙСЕР	CD8	CD28	CD137	CD8	CD28	CD137	CD28
Fc (230ак)	215 (1.48)	194 (1.12) 193 (1.01) 118 (0.98)		214 (1.67)	217 (1.01, 1.14)	216 (1.87)	218 (0.90)
CD8 (47ак)	213 (2.13, 2.6)			212 (1.06, 1.7)			
КОРОТКИЙ (12ак)		265 (2.18)			268 (2.53)		
CD3ζ	ДТ	ДТ	ДТ	ДТ	ДТ	ДТ	ДТ

ФИГ. 39



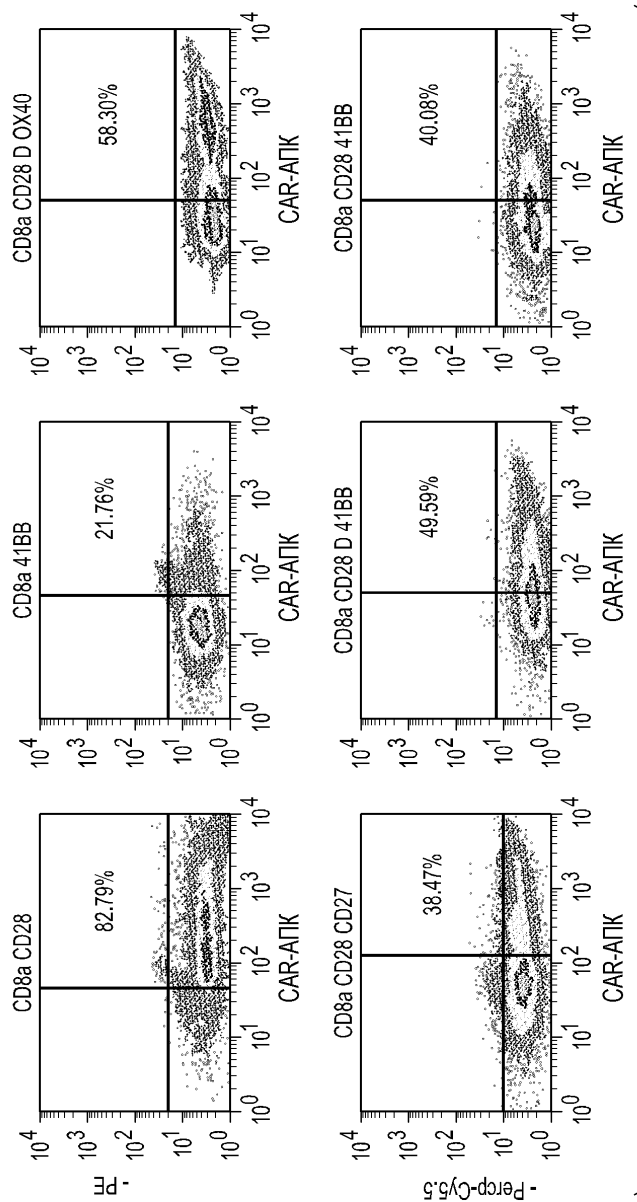
36/43

ФИГ. 40А



37/43

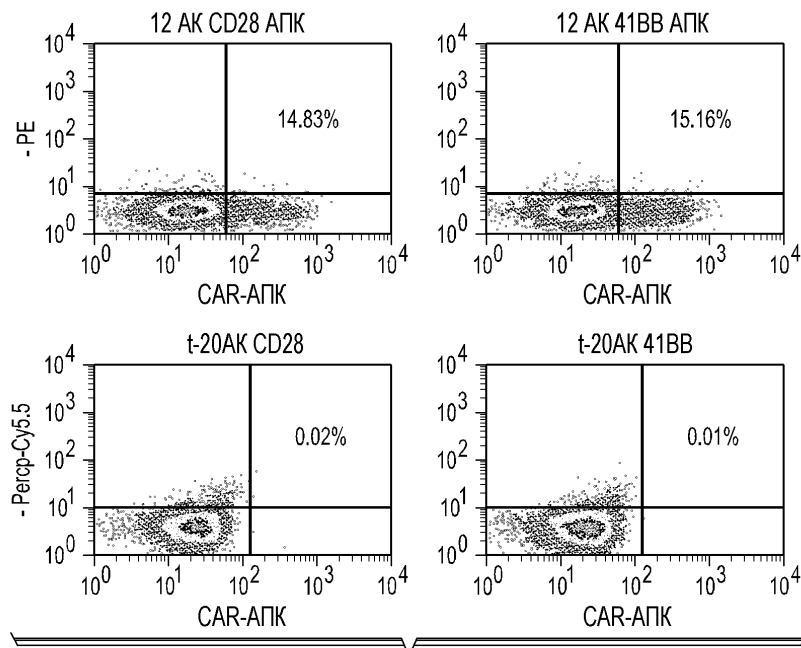
**CD19R CAR С ШАРНИРАМИ CD8α И РАЗНЫМИ ЭНДОДОМЕНАМИ:**



**ФИГ. 40В**

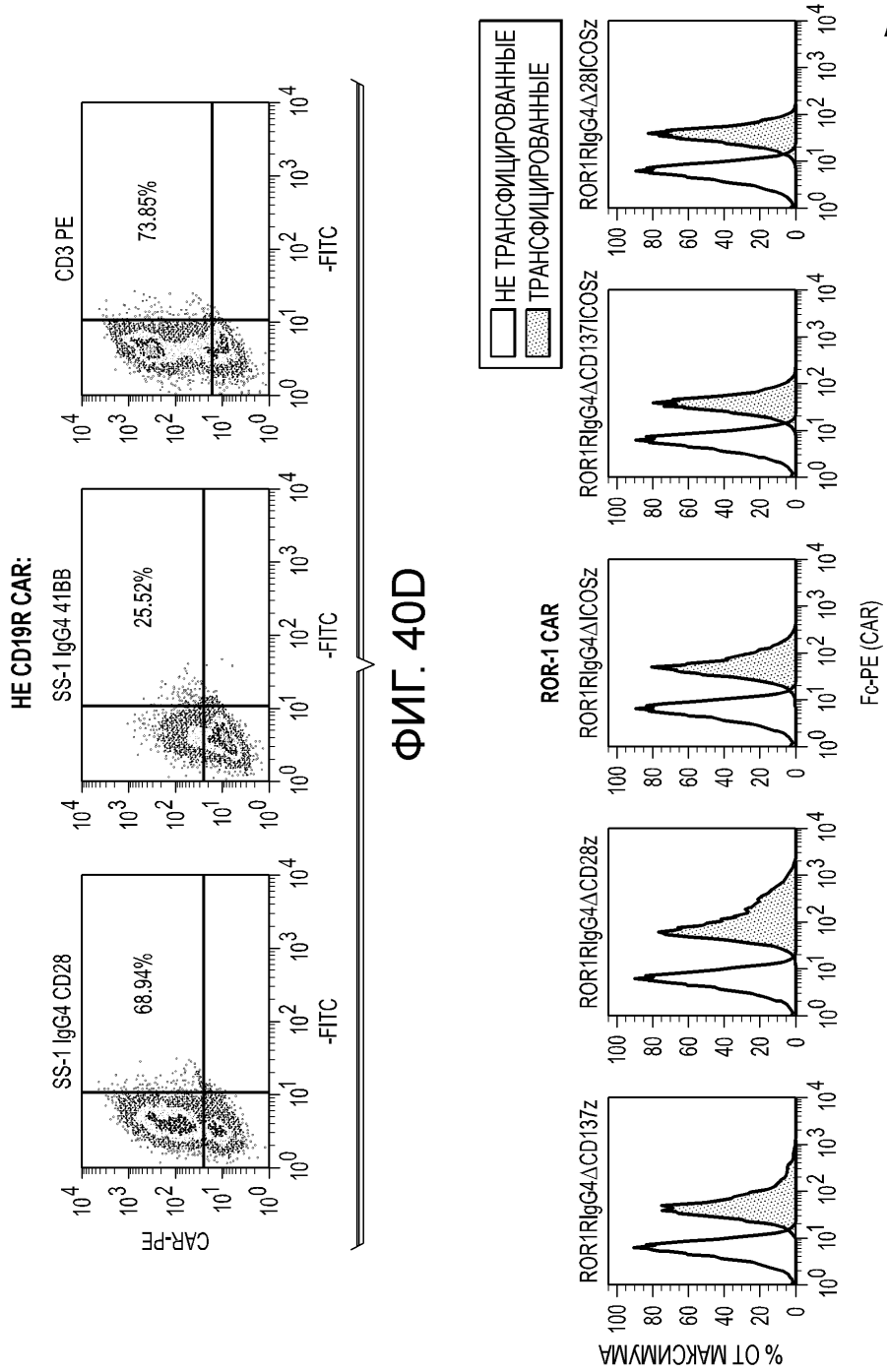
38/43

**CD19R CAR С T-12 АК И T-20 АК (КОРОТКИМИ) ШАРНИРАМИ И РАЗНЫМИ ЭНДОДОМЕНАМИ**



**ФИГ. 40С**

39/43

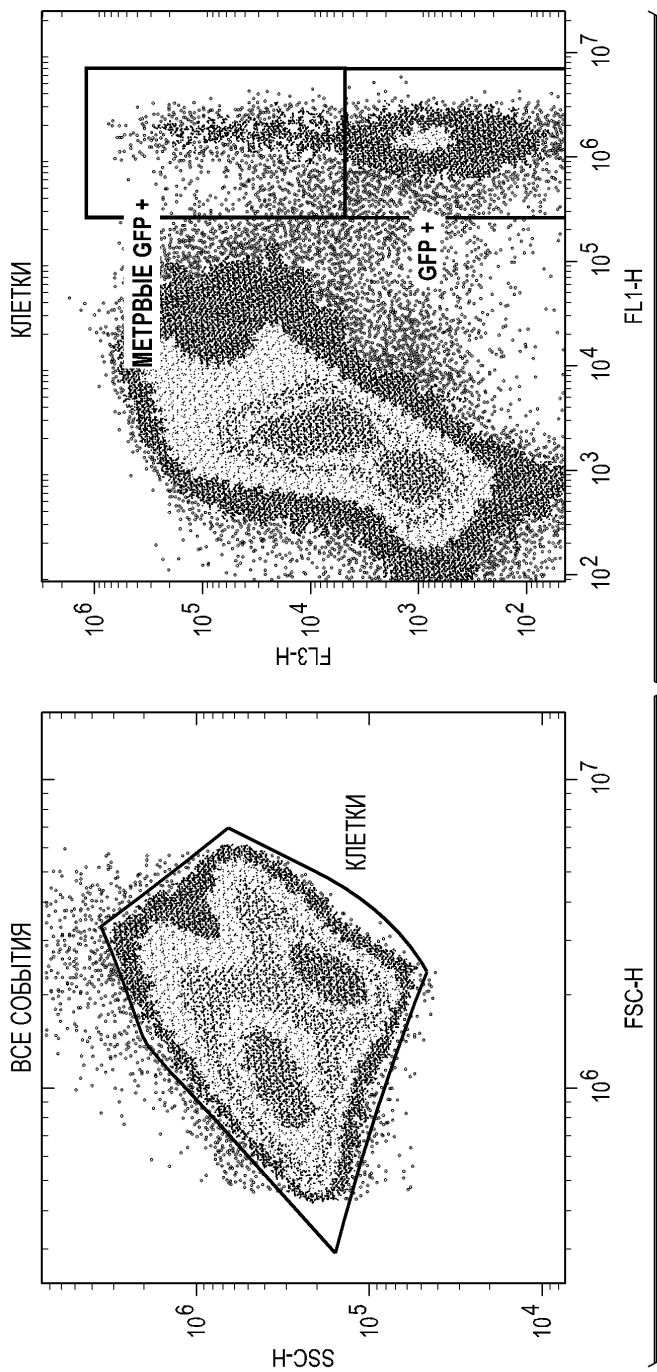


ФИГ. 40D

ФИГ. 40E

40/43

СТРАТЕГИЯ УСТАНОВКИ ДИСКРИМИНАЦИОННОГО ОКНА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ И ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ GFP:

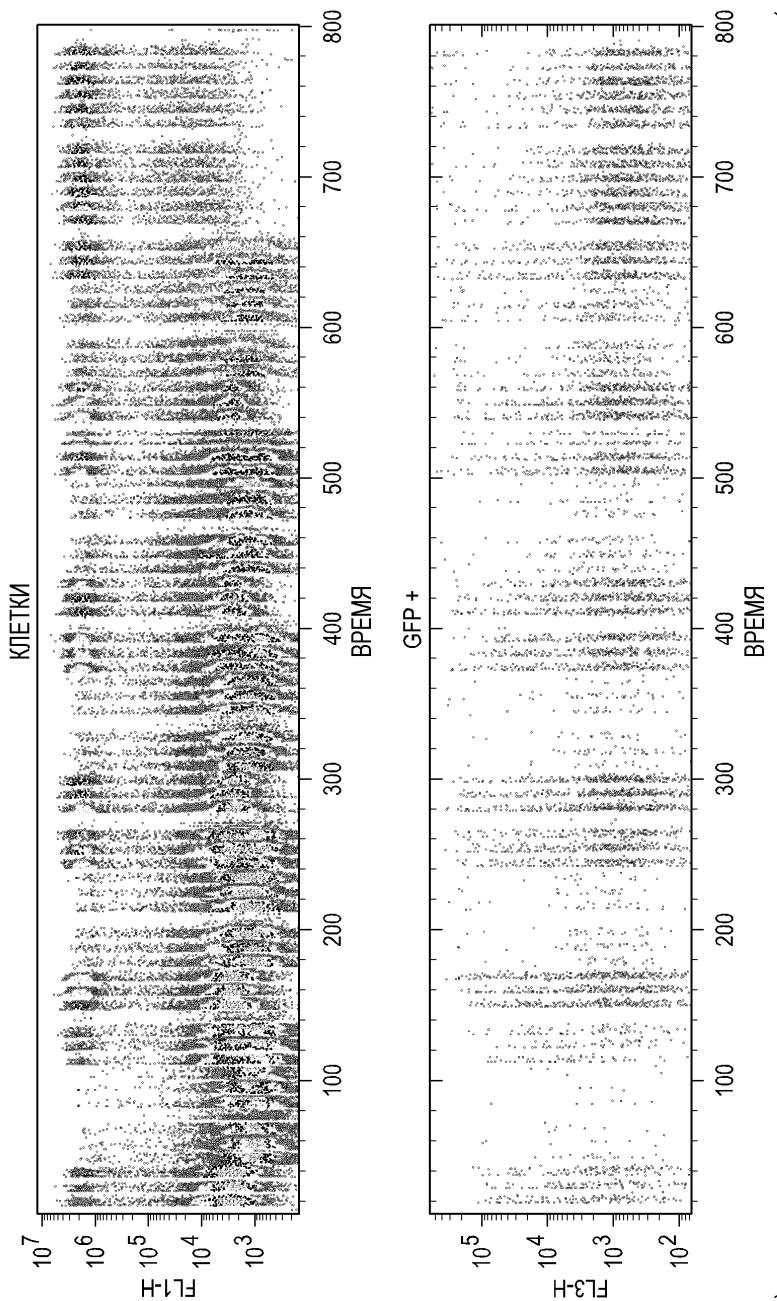


ФИГ. 41А-1



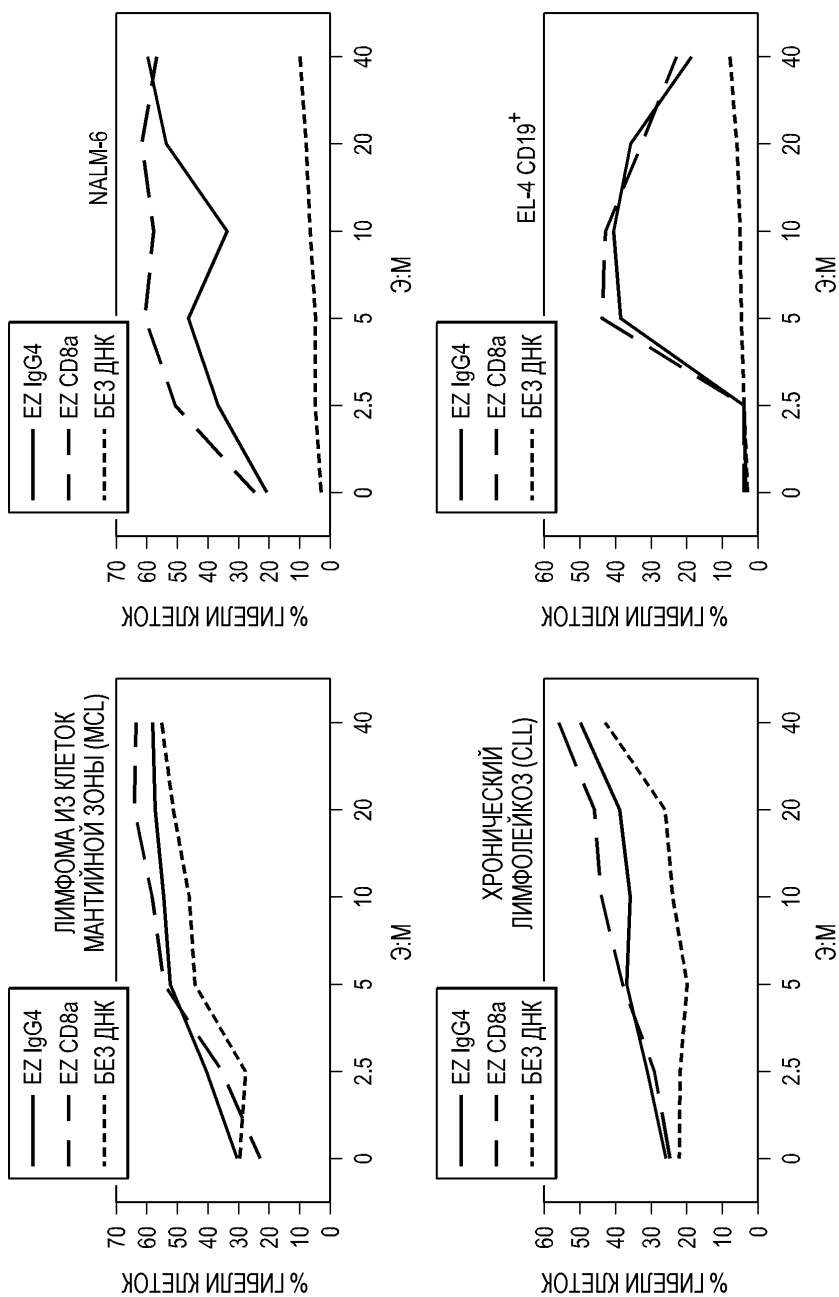
41/43

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СБОРА ДАННЫХ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ



42/43

СРАВНЕНИЕ В АНАЛИЗЕ НА УНИЧТОЖЕНИЕ КЛЕТОК EZ SAR С РАЗНЫМИ ШАРНИРАМИ НА ПРИБОРЕ iQue™ ОТ КОМПАНИИ IntelliCyt

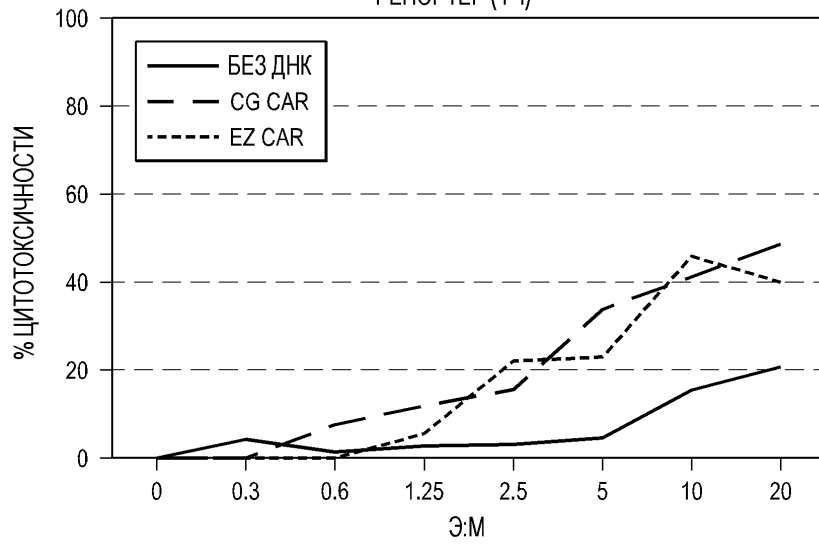


ФИГ. 41В

43/43

EL-4 CD19<sup>+</sup> ГРАНЗИМ В  
РЕПОРТЕР (4 ч)

ФИГ. 42



EL-4 CD19<sup>+</sup> ГРАНЗИМ В  
РЕПОРТЕР (10 ч)

