

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047690**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.27

(21) Номер заявки
202290969

(22) Дата подачи заявки
2020.09.23

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(54) **РЕЦЕПТОРЫ NOTCH С ШАРНИРНЫМ ДОМЕНОМ**

(31) **62/905,251; 62/905,263**

(32) **2019.09.24**

(33) **US**

(43) **2022.07.25**

(86) **PCT/US2020/052327**

(87) **WO 2021/061862 2021.04.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)**

(72) Изобретатель:

**Ройбол Коул Т., Лю Рэймонд, Чжу
Иовис (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-B2-9834608
US-A1-20190111080
WO-A1-9603883**

(57) Настоящее изобретение, в целом, относится к новому классу рецепторов, сконструированных для модулирования регуляции транскрипции зависимым от лиганда образом. В частности, новые рецепторы, хотя и получены из Notch, не нуждаются в негативных регуляторных областях Notch, которые, как считалось ранее, необходимы для функционирования рецепторов. Кроме того, новые рецепторы, описанные в настоящем документе, содержат внеклеточный домен олигомеризации, способствующий образованию олигомеров химерных рецепторов. Изобретение также относится к композициям и способам, полезным для получения таких рецепторов, кодирующим их нуклеиновым кислотам, клеткам-хозяевам, генетически модифицированным такими нуклеиновыми кислотами, а также к способам модулирования активности клетки и/или лечения различных патологических состояний здоровья или заболеваний, таких как разные формы рака.

B1

047690

047690

B1

Заявление относительно спонсируемых Федеральным правительством исследований и разработок

Настоящее изобретение было осуществлено при поддержке правительства в рамках гранта № OD025751, предоставленного Национальным институтом здоровья США. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительных патентных заявок США №№ 62/905251 и 62/905263, обе из которых поданы 24 сентября 2019 г., и содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, включая все чертежи.

Включение списка последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Сопроводительный текстовый файл Списка последовательностей под названием "048536_654001WO_Sequence_Listing_ST25.txt" был создан 23 сентября 2020 г. и имеет размер 144 килобайта.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится, главным образом, к новым синтетическим клеточным рецепторам, которые связывают лиганды на клеточной поверхности и обладают избирательной специфичностью и активностью. Изобретение также относится к композициям и способам, полезным для получения таких рецепторов, кодирующим их нуклеиновым кислотам, клеткам-хозяевам, генетически модифицированным такими нуклеиновыми кислотами, а также к способам модулирования активности клетки и/или лечения различных патологических состояний здоровья или заболеваний, таких как разные формы рака.

Предпосылки создания изобретения

Важной проблемой, ограничивающей развитие инженерной клеточной терапии у человека, является регуляция экспрессии терапевтических генов для уменьшения или устранения взаимодействий, вызывающих значительные побочные эффекты при введении Т-клеток с химерными антигенными рецепторами (CAR-T), такие как, например, нецелевая активность, целевая внеопухолевая активность (то есть, когда мишень CAR-T также присутствует на нормальных клетках вне опухоли), а также невозможность модулировать или отключать активность CAR-T, когда это необходимо. Возможным решением этих проблем является использование синтетического рецептора, способного изменять экспрессию генов и/или поведение клеток.

Рецепторы Notch представляют собой трансмембранные белки, которые опосредуют сигнализацию межклеточных контактов и играют центральную роль в развитии и других аспектах коммуникации между клетками, например, коммуникации между двумя контактирующими клетками, при которой одна контактирующая клетка является "принимающей" клеткой, а другая контактирующая клетка является "отправляющей" клеткой. Рецепторы Notch, экспрессируемые на принимающей клетке, узнают свои лиганды (например, белки семейства дельта/серрат/лаг, или "DSL"), экспрессируемые на отправляющей клетке. Взаимодействие Notch и дельта на этих контактирующих клетках приводит к двухэтапному протеолизу рецептора Notch, что в конечном итоге вызывает высвобождение внутриклеточной части рецептора из мембраны в цитоплазму. Notch имеет сайт расщепления металлопротеазы (называемый "S2"), который обычно защищен от расщепления негативной регуляторной областью Notch (NRR), доменом, состоящим из трех модулей повтора LIN-12-Notch (LNR) и домена гетеродимеризации (HD) внеклеточной субъединицы Notch (NEC). Считается, что этот протеолиз регулируется силой, применяемой отправляющей клеткой: лиганд DSL притягивается к рецептору Notch и изменяет конформацию негативной регуляторной области, обнажая сайт металлопротеазы. Затем этот сайт расщепляется конститутивно активной протеазой, высвобождая внеклеточную связывающую часть и негативную регуляторную область (NRR) рецептора. Высвобождение внеклеточной связывающей части рецептора, в свою очередь, открывает другой внутримембранный сайт(ы) расщепления (под названием "S3"), который(ые) расщепляется(ются) гамма-секретазой внутри клеточной мембраны, с высвобождением внутриклеточного домена ядерной локализации из клеточной мембраны. W.R. Gordon et al., *Dev Cell* (2015) 33: 729-36. Этот высвобожденный домен изменяет поведение принимающих клеток, действуя в качестве регулятора транскрипции. Рецепторы Notch вовлечены и необходимы для различных клеточных функций во время развития и важны для функционирования огромного количества типов клеток у разных биологических видов.

В примерах существующих синтетических производных рецепторов Notch первого поколения, которые часто называют "рецепторами SynNotch", используют это прямолинейное сигнальное поведение, заменяя внеклеточный лиганд-связывающий домен, который в Notch дикого типа содержит множество EGF-подобных повторов, производным антитела, и заменяя цитоплазматический домен активатором транскрипции по выбору, при этом сохраняя функциональность NRR Notch (L. Morsut et al., *Cell* (2016) 164:780-91). Как правило, сигнализация SynNotch коррелирует со связыванием лиганда, но регулировать чувствительность и ответ рецептора сложно. Кроме того, NRR охватывает примерно 160 аминокислот, что делает этот домен размером с некоторые зрелые белки, такие как инсулин или эпидермальный фактор роста (EGF). Это делает экспрессию химерного рецептора менее эффективной и, вследствие ограничений, связанных с вместимостью вектора, получаемые химерные рецепторы могут превышать вместимость некоторых векторов для клонирования и трансфекции.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится, главным образом, к иммунотерапевтическим средствам, таким как химерные полипептиды, предназначенным для использования в модуляции активности клеток или в лечении различных патологических состояний здоровья или заболеваний. В частности, настоящее изобретение относится к способным образовывать олигомеры химерным рецепторам, которые, что удивительно, сохраняют способность к передаче сигналов в ответ на связывание лиганда, несмотря на полное отсутствие внеклеточной субъединицы Notch (NEC), включая негативную регуляторную область (NRR). Более конкретно, данные рецепторы содержат внеклеточный домен олигомеризации, способствующий образованию олигомерной формы, например, димерной или тримерной формы, химерных рецепторов. Без связи с конкретной теорией, такой дизайн облегчает олигомеризацию или образование кластеров внеклеточных доменов (ECD), и впоследствии объединяет внутриклеточные домены (ICD), активируя клеточную сигнализацию, например, T-клеточную сигнализацию. Помимо этого, данные рецепторы обеспечивают диапазон чувствительности. Кроме того, за счет полного отсутствия природной NEC Notch можно получать полинуклеотиды, кодирующие рецепторы по изобретению, меньшего размера, чем кодирующие SynNotch полинуклеотиды, что позволяет использовать векторы с более ограниченной вместимостью, или облегчает включение дополнительных элементов, которые в ином случае были бы исключены вследствие ограничений, связанных с вместимостью вектора.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, включающим в направлении от N-конца к C-концу: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, имеющий аффинность связывания для выбранного лиганда; (b) шарнирный домен, способствующий образованию олигомеров химерного полипептида за счет межмолекулярных дисульфидных связей; (с) трансмембранный домен, содержащий один или более лиганд-индуцируемых сайтов протеолитического расщепления; и (d) внутриклеточный домен, содержащий регулятор транскрипции, где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом вызывает расщепление в лиганд-индуцируемом сайте протеолитического расщепления, расположенном между регулятором транскрипции и шарнирным доменом, и где химерный полипептид не содержит повтор LIN-12-Notch (LNR) и/или домен гетеродимеризации (HD) рецептора Notch.

Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления химерных полипептидов по настоящему изобретению имеют один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен дополнительно содержит последовательность стоп-сигнала переноса. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий фрагмент, способный связывать лиганд на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой патоген. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую клетку. В некоторых вариантах осуществления человеческая клетка представляет собой опухолевую клетку. В некоторых вариантах осуществления человеческая клетка представляет собой терминально дифференцированную клетку. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой белок или углевод. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой маркер кластера дифференцировки (CD). В некоторых вариантах осуществления маркер CD выбран из группы, состоящей из CD1, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD7, CD8a, CD8b, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27, CD28, CD33, CD34, CD40, CD45, CD48, CD52, CD59, CD66, CD70, CD71, CD72, CD73, CD79A, CD79B, CD80 (B7,1), CD86 (B7,2), CD94, CD95, CD134, CD140 (PDGFR4), CD152, CD154, CD158, CD178, CD181 (CXCR1), CD182 (CXCR2), CD183 (CXCR3), CD210, CD246, CD252, CD253, CD261, CD262, CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD276 (B7H3), CD279, CD295, CD339 (JAG1), CD340 (HER2), EGFR, FGFR2, CEA, AFP, CA125, MUC-1, MAGE, щелочной фосфатазы, подобной плацентарному белку 2 (ALPPL2), антигена созревания B-клеток (BCMA), зеленого флуоресцентного белка (GFP), усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) и сигнального регуляторного белка α (SIRP α).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный полипептид, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность включена в экспрессионную кассету или экспрессионный вектор.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам, содержащим: (а) химерный полипептид, описанный в настоящем документе; и/или (b) рекомбинантную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе. В соответствующем аспекте также предложены клеточные культуры, включающие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, описанную в настоящем документе, и культуральную среду.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим фармацевтически приемлемый носитель и одно или более из следующего: (а) рекомбинантную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе; и (b) рекомбинантную клетку, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления описанная фармацевтическая композиция содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота

заклучена в вирусном капсиде или липидной наночастице.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам модулирования активности клетки, включающим: (а) получение рекомбинантной клетки по изобретению и (b) создание контакта с выбранным лигандом, где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом химерного полипептида вызывает расщепление в лиганд-индуцируемом сайте протеолитического расщепления и высвобождает регулятор транскрипции, при этом высвобожденный регулятор транскрипции модулирует активность рекомбинантной клетки. Другой аспект относится к способам модулирования активности клетки-мишени у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества рекомбинантных клеток по изобретению, где рекомбинантные клетки ингибируют активность клетки-мишени у индивидуума.

Другой аспект относится к способам лечения патологического состояния здоровья (например, заболевания) у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества рекомбинантных клеток по изобретению, где рекомбинантные клетки лечат патологическое состояние здоровья у индивидуума.

В другом аспекте некоторые варианты осуществления изобретения относятся к системам модулирования активности клетки, ингибирования раковой клетки-мишени или лечения патологического состояния здоровья (например, заболевания) у индивидуума, который нуждается в этом, где система включает одно или более из: химерного полипептида по изобретению; полинуклеотида по изобретению; рекомбинантной клетки по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению.

Другой аспект изобретения относится к способам получения рекомбинантной клетки по изобретению, включающим (а) получение клетки, способной к экспрессии белка, и (b) создание контакта полученной клетки с рекомбинантной нуклеиновой кислотой по изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетка получена в результате лейкафереза, проведенного на образце, полученном от субъекта, и клетка вступает в контакт *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота заключена в вирусном капсиде или липидной наночастице.

Другой аспект изобретения относится к применению одного или более из: химерного полипептида по изобретению; полинуклеотида по изобретению; рекомбинантной клетки по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для лечения патологического состояния здоровья. В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние здоровья представляет собой заболевание, такое как рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль, опухоль мягких тканей или метастатический опухолевый очаг.

Другой аспект изобретения относится к применению одного или более из: химерного полипептида по изобретению; полинуклеотида по изобретению; рекомбинантной клетки по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для производства лекарственного препарата для лечения патологического состояния здоровья, например, заболевания.

Вышеизложенная сущность изобретения носит исключительно иллюстративный характер и ни в коей мере не является ограничивающей. Помимо иллюстративных вариантов осуществления и признаков, описанных в настоящем документе, дополнительные аспекты, варианты осуществления, объекты и признаки изобретения станут очевидными из чертежей и подробного описания, а также формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1A-1B схематически иллюстрируют различия между рецептором SynNotch и химерным полипептидом по изобретению. На фиг. 1A представлена схематическая структура существующего синтетического рецептора Notch (SynNotch), имеющего узнающий лиганд домен (например, анти-CD19 scFv), околочелювеческий домен (JMD), включающий негативную регуляторную область Notch (NRR), однопроходный трансмембранный домен (TMD), последовательность стоп-сигнала переноса (STS) и регулятор транскрипции (например, Gal4VP64). На фиг. 1B представлена схематическая структура иллюстративного синтетического рецептора Notch второго поколения, описанного в настоящем документе (рецептор Шарнир-Notch), в котором весь фрагмент NEC полипептида Notch дикого типа, включающий NRR, был удален. Последовательность шарнирного полипептида, полученная из шарнирного домена CD8, вставлена на N-конец TMD. Последовательность шарнира CD8 содержит полипептидные фрагменты, которые способствуют образованию димеров химерного полипептида за счет межмолекулярных дисульфидных связей.

На фиг. 2A-2C схематически представлен дизайн рецепторов Шарнир-Notch, их экспрессия и активация в первичных CD4⁺ T-клетках. На фиг. 2A схематически представлен иллюстративный рецептор SynNotch1 (левая панель), который был спроектирован на основе человеческих белков Notch1. На средней панели схематически представлен иллюстративный рецептор Шарнир CD8-Notch1. В сравнении с рецептором SynNotch1 на левой панели в рецепторе Шарнир CD8-Notch1 заменен весь JMD на шарнирный домен CD8A, который содержит остатки цистеина, которые, как известно, образуют дисульфидные связи. На правой панели схематически представлен иллюстративный рецептор укороченный Шарнир CD8-Notch1 (укорШарнир CD8-Notch1). В сравнении с рецепторами Шарнир CD8-Notch1, рецепторы укорШарнир CD8-Notch1 имеют C-концевую делецию последовательности шарнира CD8A, с оставшим-

ся одним остатком цистеина и более короткой внеклеточной областью. На фиг. 2B приведены полученные методом проточной цитометрии данные по экспрессии рецептора. В этих экспериментах первичные человеческие Т-клетки трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, экспрессирующими либо рецептор, либо плазмиду транскрипционного репортера, и активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco). Сигнализацию рецептора измеряли с использованием AlexaFluor647-маркированного анти-мус антитела (Cell Signaling). Экспрессию репортера определяли на основании конститутивного гена mCitrine, присутствующего на плазмиде репортера. Проводили сортировку на дважды положительные клетки в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали их для тестирования активации. На фиг. 2C представлены результаты тестирования активации рецепторов, где активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP определяли с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

На фиг. 3 схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для демонстрации активации рецепторов с одновременной активацией Т-клеток. В этих экспериментах для стимуляции активации Т-клеток использовали анти-МСАМ, анти-CD3 биспецифические Т-клеточные активаторы (МСАМ BiTE®), которые активируют Т-клеточный рецептор в присутствии клеток K562. 1×10^5 дважды положительные Т-клетки, экспрессирующие анти-CD19 рецепторы, культивировали совместно с: МСАМ BiTE® (верхняя кривая), 1×10^5 клеток K562+МСАМ BiTE® (средняя кривая) или 1×10^5 CD19+ клеток K562+МСАМ BiTE® (нижняя кривая) в течение 24 ч. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences), и наблюдали увеличение сигнала репортера в сравнении с сигналом, полученным от не активированных Т-клеток на фиг. 2.

На фиг. 4A-4D представлены результаты экспериментов, проведенных для оптимизации шарнирного домена в контексте химерных рецепторов Notch. На фиг. 4A схематически представлены различные укороченные варианты Шарнир CD8-Notch, включающие один или более шарнирных компонентов, обозначенных "a", "b", "c" и "d". Компонент "a" представляет собой область, N-концевую относительно первого остатка цистеина. Компонент "b" представляет собой первый остаток цистеина. Компонент "c" представляет собой область между первым и вторым остатками цистеина. Компонент "d" представляет собой второй остаток цистеина и область от второго остатка цистеина до трансмембранного домена рецептора. Перечислены шарнирные компоненты четырех протестированных вариантов. На фиг. 4B представлены результаты тестирования активации рецепторов в Т-клетках Jurkat. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). На фиг. 4C представлена количественная оценка % BFP-положительных клеток из данных на фиг. 4B. На фиг. 4D представлен график соотношения сигнал:шум из данных на фиг. 4B.

На фиг. 5 схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для тестирования активации рецепторов укороченный Шарнир CD82 с одновременной сигнализацией РКС (протеинкиназа С). В этих экспериментах для стимуляции сигнализации РКС добавляли форбол-12-миристинат-13-ацетат (РМА). 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или с 1×10^5 CD19+ клеток K562 (нижняя кривая) в течение 24 часов, с добавлением или без добавления РМА. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

На фиг. 6A-6B схематически представлены результаты для рецепторов Шарнир-Notch, содержащих альтернативные шарнирные домены, полученные из других источников. Как показано на фиг. 6A, в дополнение к CD8A, CD28, OX40 и IgG4, как обнаружено, также обладают полезными шарнирными доменами. В этих экспериментах использовали иллюстративные рецепторы Шарнир-Notch: pIZ343 (укороченный Шарнир CD8-Notch), pIZ358 (Шарнир CD28-Notch), pIZ360 (Шарнир OX40-Notch), pIZ359 (Шарнир IgG4-Notch). Краткое описание каждого из рецепторов Шарнир-Notch приведено в табл. 2. На фиг. 6B представлена количественная оценка % BFP-положительных клеток из результатов тестирования на фиг. 6A.

На фиг. 7A-7B схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для тестирования рецепторов Шарнир-Notch, содержащих другие узнающие лиганд домены. Как показано на фиг. 7A, в дополнение к анти-CD19 scFv, анти-ALPPL2 scFv и eGFP также могут быть использованы в качестве узнающих лиганд доменов. Как показано на фиг. 7B, ранее полученные положительные по наличию репортера Т-клетки линии Jurkat трансдуцировали конструкцией рецептора. Экспрессию рецептора определяли с использованием AlexaFluor647-маркированного анти-мус антитела (Cell Signaling). Для тестирования активации рецепторов 1×10^5 Т-клеток Jurkat, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или с 1×10^5 ALPPL2+ клеток K562/ 1×10^5 клеток K562, экспрессирующих анти-GFP нанотело на клеточной поверхности (нижняя кривая), в течение 24 часов. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

На фиг. 8A-8B схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для тестирования рецепторов Шарнир-Notch с другими последовательностями стоп-сигнала переноса (STS). Как пока-

зано на фиг. 8А, в дополнение к Notch1 STS, и другие STS (например, Notch2 STS, Notch4 STS, DAG1 STS, PTPRF STS и KL STS) также могут быть использованы для оказания влияния на поведение рецепторов. В этих экспериментах первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, экспрессирующими либо рецептор, либо конструкцию транскрипционного репортера. Положительные по наличию рецептора/репортера клетки отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Для тестирования 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или с 1×10^5 CD19+ клеток K562 (нижняя кривая) в течение 24 часов. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). На фиг. 8В представлена количественная оценка данных по активации на фиг. 8А.

На фиг. 9А-9С схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для оценки функциональности различных укороченных вариантов Шарнир-Notch, представленных конструкциями Шарнир-Notch1, с целью оптимизации рецепторов Шарнир-Notch. На фиг. 9А представлен дизайн конструкций для вариантов, включающих либо полноразмерную, либо укороченную, форму домена N-JMD конструкции pIZ341. Черными полосами указаны аминокислоты, составляющие каждый вариант. "Полноразмерный" означает полноразмерный вариант, включающий SEQ ID NO: 12. "Укороченный 1" означает укороченный вариант № 1, включающий SEQ ID NO: 39. "Укороченный 2" означает укороченный вариант № 2, включающий SEQ ID NO: 13. "Укороченный 3" означает укороченный вариант № 3, включающий SEQ ID NO: 40. "Укороченный 4" означает укороченный вариант № 4, включающий SEQ ID NO: 41. Сравнение экспрессии этих вариантов шарнира CD8 показано на фиг. 9В. В частности, первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей вариант рецептора с укороченным шарниром, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер BFP плюс CAR против щелочной фосфатазы, подобной плацентарному белку 2 (ALPPL2). Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. На левых пяти панелях фиг. 9В показаны относительные уровни экспрессии каждого рецептора, измеренные путем окрашивания антителами против тус-метки (ось у), против уровней экспрессии конструкции репортера, измеренных при помощи GFP (ось х). На самой правой панели фиг. 9В показана количественная оценка в виде СИФ экспрессии рецепторов с вариантами шарнира CD8 в дважды положительных клетках. На фиг. 9С показаны 5 панелей, представляющих полноразмерный вариант и укороченные варианты 1-4, слева направо. Для каждого варианта Т-клетки, экспрессирующие анти-CD19 рецепторы, культивировали, как указано сверху вниз, без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с ALPPL2+ клетками K562 (вторая сверху кривая), CD19+ клетками K562 (третья сверху кривая) или ALPPL2+ CD19+ клетками (нижняя кривая). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

На фиг. 10 схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для тестирования вариантов Шарнир-Notch с разными связывающими доменами, и их связь с протеолитической активностью. Первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей шарнирный рецептор, вариант рецептора с указанной укороченной связывающей головкой, и другой с транскрипционным репортером. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Для тестирования 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, культивировали совместно с 1×10^5 клеток K562 (верхняя кривая), 1×10^5 лиганд+ клеток K562 (вторая сверху кривая), 1×10^5 лиганд+ клеток K562 с ингибитором ADAM10 (третья сверху кривая), или 1×10^5 лиганд+ клеток K562 с ингибитором гамма-секретазы, DAPT (нижняя кривая). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

На фиг. 11А-11С схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для тестирования вариантов Шарнир-Notch с разными связывающими доменами и доменом Notch2 STS. Первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей шарнирный рецептор, рецептор Шарнир-Notch с указанной связывающей головкой, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Для тестирования 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, культивировали без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или с 1×10^5 ВСМА+ клеток K562 (нижняя кривая) в течение двух дней (фиг. 11А). На фиг. 11А на левой панели представлена конструкция со связывающей головкой анти-ВСМА scFv, на средней панели представлена конструкция со связывающей головкой анти-ВСМА полностью гуманизированным VH, и на правой панели представлена конструкция со связывающей головкой анти-ВСМА полностью гуманизированным VH с шарнирным доменом, оптимизиро-

ванными для связывающего домена (Шарнир 5). Аналогичным образом тестировали связывающую головку SIRP α . 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, культивировали без дополнительных клеток (верхняя кривая) или совместно с 1×10^5 клеток K562 (нижняя кривая) в течение двух дней (фиг. 11B). На фиг. 11C показаны результаты тестирования разных scFv против антигена HER2 и сравнения с использованием аналогичных способов. 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, культивировали без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с прикрепляющимися Т-клетками HEK 293 (вторая сверху кривая), прикрепляющимися клетками MBMDA-468 (третья сверху кривая), прикрепляющимися клетками MCF7 (четвертая сверху кривая) или прикрепляющимися клетками SKBR3 (нижняя кривая) в течение двух дней (фиг. 11C). На левой панели представлена связывающая головка анти-HER2 4D5-7 scFv, а на правой панели представлена связывающая головка анти-HER2 4D5-8 scFv. Для данных на фиг. 11A-11C впоследствии определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

На фиг. 12 схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для сравнения активации вариантов Шарнир-Notch с разными промоторами и доменами STS. Для тестирования 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 ALPPL2+ клеток K562 (вторая сверху кривая), 1×10^5 CD19+ клеток K562 (третья сверху кривая) или 1×10^5 ALPPL2+ CD19+ клеток K562 (нижняя кривая). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). Для сравнения включены результаты активации с использованием конструкций мышинового и оригинального человеческого synNotch.

На фиг. 13A-13B схематически представлены результаты экспериментов мутационного анализа трансмембранного домена Notch1 (TMD) в конструкциях Шарнир-Notch. Были получены варианты с разными мутациями на аланин в домене TMD конструкции Шарнир-Notch. Каждый аминокислотный остаток от положения 301 (F) до положения 322 (S) в TMD в Шарнир-Notch был индивидуально мутирован на аланин. Первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей мутантный вариант TMD, и другой, содержащей транскрипционный репортер BFP. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. На фиг. 13A на левой панели показана относительная экспрессия разных рецепторов, измеренная путем окрашивания антителами против анти-тус-метки (ось у), против экспрессии конструкции маркерного репортера (ось x), а на правой панели представлена количественная оценка в виде СИФ экспрессии рецептора с мутантными вариантами TMD в дважды положительных клетках. На фиг. 13B Т-клетки, экспрессирующие анти-CD19 рецепторы, совместно культивировали в соотношении 1:1 с контрольными CD19(-) или CD19(+) клетками K562. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). На левой панели показаны полученные методом проточной цитометрии профили активации. Правая панель представляет % BFP в виде линейного графика.

На фиг. 14 схематически представлены результаты экспериментов мутационного анализа для трансмембранного домена (TMD) и домена STS в конструкциях Шарнир-Notch. В данном примере использовали иллюстративные шарнирные рецепторы Notch четырех типов, все из которых включали домен анти-CD19 scFv, укороченный домен шарнира CD8 и домен Gal4VP64, плюс разные домены TMD (CLSTN1 TMD или CLSTN2 TMD) и разные домены STS (CLSTN1 STS, CLSTN2 STS или Notch1 STS). Первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей шарнирный рецептор с указанным сочетанием TMD/STS, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер с конститутивно экспрессируемым анти-ALPPL2 CAR. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Для тестирования 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, культивировали совместно с: 1×10^5 клеток K562 (панели "-CAR", синий цвет) или 1×10^5 CD19+ клеток K562 (панели "-CAR", красный цвет). Аналогично, 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, тестировали в присутствии активности CAR путем совместного культивирования с 1×10^5 ALPPL2+ клеток K562 (панели "+CAR", синий цвет) или 1×10^5 ALPPL2+ CD19+ клеток K562 (панели "+CAR", красный цвет). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

На фиг. 15A-15B схематически представлены результаты экспериментов с регулируемым, лиганд-зависимым размножением Т-клеток с использованием Шарнир-Notch-контролируемой экспрессии генетически модифицированного цитокина. На фиг. 15A показана диаграмма Т-клеток, генетически модифицированных Шарнир-Notch с вариантами STS для обеспечения лиганд-инициируемой секреции генетически модифицированного цитокина для аутокринного и паракринного размножения Т-клеток. Профили экспрессии анти-CD19 рецепторов Шарнир-Notch с указанными модификациями STS приведены на фиг. 15B. Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей CAR против антиге-

на MCAM, и одной, экспрессирующей рецептор Шарнир-Notch, с индуцируемым супер-IL2 под контролем Gal4-UAS. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Экспрессию рецептора определяли путем окрашивания антителами против тус-метки (ось y).

На фиг. 16 схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для демонстрации того, что лиганд-иницируемая экспрессия супер-IL2 приводит к улучшению жизнеспособности CAR-Т-клеток. 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы Шарнир-Notch Notch1 STS, культивировали в среде без IL-2, без клеток K562 (вверху слева), с CD19+ клетками K562 для запуска Шарнир-Notch (вверху справа), с MCAM+ клетками K562 для запуска активации CAR (внизу слева) или с MCAM+ и CD19+ клетками K562 для запуска активации обоих рецепторов (внизу справа). Через 9 дней оценивали относительное содержание живых Т-клеток путем измерений прямого и бокового рассеяния с использованием Fortessa X-50.

На фиг. 17 схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для демонстрации регулируемой пролиферации Т-клеток с вариантами STS в Шарнир-Notch. Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей CAR против антигена MCAM, и одной, экспрессирующей рецептор Шарнир-Notch, с индуцируемым супер-IL2 под контролем Gal4-UAS (правые четыре панели). Рецепторы Шарнир-Notch, содержащие 3 разных варианта STS (NRG1, Notch1, Notch2), тестировали в сравнении с контролем без Шарнир-Notch. Аналогично, первичные человеческие Т-клетки получали без экспрессии CAR (левые панели). Т-клетки окрашивали CellTrace Violet в соответствии с протоколами производителя, инкубировали совместно с CD19+ клетками-мишенями K562 в среде без IL-2 и проводили количественное определение с использованием Fortessa X-50 в указанные моменты времени для оценки пролиферации по угасанию сигнала CTV.

На фиг. 18А-18В схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для демонстрации регулируемой секреции супер-IL2, с вариантами STS в Шарнир-Notch. Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали лентивирусной конструкцией рецептора Шарнир-Notch с индуцируемым супер-IL2 под контролем Gal4-UAS (фиг. 18А). Рецепторы Шарнир-Notch, содержащие 3 разных варианта STS (NRG1, Notch1, Notch2), тестировали в сравнении с контролем без Шарнир-Notch. Т-клетки инкубировали совместно с MCAM+ CD19+ клетками K562 в среде без IL-2, и в указанные моменты времени определяли содержание IL-2 в супернатанте с использованием набора Instant ELISA Kit, в соответствии с протоколами производителя, и планшетного ридера. Красной пунктирной линией указана стандартная концентрация IL-2, используемая для культивирования Т-клеток. Постепенная секреция супер-IL2 была достигнута путем активации рецепторов Шарнир-Notch с переменными STS. Для результатов на фиг. 18В первичные человеческие Т-клетки получали при помощи дополнительного лентивирусного вектора, экспрессирующего CAR против MCAM.

На фиг. 19 схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для демонстрации того, что регулируемая секреция супер-IL2 за счет Шарнир-Notch с вариантами STS приводит к усилению пролиферации неспецифических Т-клеток. Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали лентивирусной конструкцией, включающей рецептор Шарнир-Notch, с индуцируемым супер-IL2 под контролем Gal4-UAS (правые панели). Рецепторы Шарнир-Notch, содержащие 3 разных варианта STS (NRG1, Notch1, Notch2), тестировали в сравнении с контролем без Шарнир-Notch. Т-клетки с Шарнир-Notch инкубировали совместно с "неспецифическими" Т-клетками, окрашенными CellTrace Far Red, экспрессирующими CAR против MCAM (левая панель) или не экспрессирующими CAR (правая панель). Т-клетки инкубировали совместно с MCAM+ CD19+ клетками K562 в среде без IL-2, и пролиферацию неспецифических Т-клеток оценивали путем измерения угасания сигнала на Fortessa X-50.

На фиг. 20 схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для тестирования одиночных лентивирусных векторных конструкций, содержащих системы рецепторов Шарнир-Notch с CAR. Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали одной лентивирусной конструкцией, содержащей последовательности для конститутивно экспрессируемых рецепторов Шарнир-Notch с индуцируемой кассетой анти-MCAM CAR под контролем Gal4-UAS. Клетки отбирали на основании экспрессии рецепторов Шарнир-Notch при помощи тус-метки в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Тестировали указанные три варианта STS, с конститутивно экспрессируемым CAR, используемым в качестве контроля. Для тестирования 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 5×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или 5×10^4 CD19+ клеток K562 (нижняя кривая). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого CAR при помощи GFP-метки с использованием Fortessa X-50.

На фиг. 21 схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для демонстрации уничтожения клеток-мишеней со специфическими двойными антигенами Т-клетками, генетически модифицированными одним лентивирусным вектором, содержащим систему Шарнир-Notch с CAR. Пер-

вичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали одной лентивирусной конструкцией, содержащей последовательности конститутивно экспрессируемых рецепторов Шарнир-Notch с индуцируемой кассетой анти-MCAM CAR под контролем Gal4-UAS. Клетки отбирали на основании экспрессии рецепторов Шарнир-Notch при помощи тус-метки в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Тестировали указанные три варианта STS, с конститутивно экспрессируемым CAR, используемым в качестве контроля. Для тестирования 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали совместно с 5×10^5 MCAM+ клетками K562 или 5×10^4 MCAM+ CD19+ клетками K562. Уничтожение клеток-мишеней оценивали путем измерений прямого/бокового рассеяния в популяции клеток K562 с использованием Fortessa X-50.

На фиг. 22 схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для тестирования одиночных лентивирусных векторных конструкций, содержащих последовательности рецепторов Шарнир-Notch, для контроля активации и истощения Т-клеток. Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали одной лентивирусной конструкцией, содержащей последовательности конститутивно экспрессируемых рецепторов Шарнир-Notch с индуцируемой кассетой анти-MCAM CAR под контролем Gal4-UAS. Клетки отбирали на основании экспрессии рецепторов Шарнир-Notch при помощи тус-метки в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Тестировали указанные три варианта STS, с конститутивно экспрессируемым CAR, используемым в качестве контроля. Для тестирования 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали совместно с 5×10^4 CD19+ клеток K562. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого CAR при помощи GFP-метки с использованием Fortessa X-50 (крайняя левая панель). Активацию и истощение Т-клеток определяли на основании экспрессии CD25 (вторая панель слева) и CD39 (третья и четвертая панели слева), соответственно.

На фиг. 23 схематически представлены результаты экспериментов, проведенных для *in vivo* тестирования систем Шарнир-Notch с CAR. Для односторонних опухолей мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) имплантировали 1×10^6 K562-BCMA/CD19 опухолевых клеток подкожно в левый бок. Для контралатеральных опухолей мышам NSG имплантировали 1×10^6 K562-BCMA/CD19 опухолевых клеток в левый бок и 1×10^6 K562-CD19 опухолевых клеток в правый бок. Через четыре дня после имплантации опухоли $2,5 \times 10^6$ генетически модифицированных первичных человеческих CD4+ и CD8+ Т-клеток (всего 5×10^6 Т-клеток) вводили в/в инфузией через хвостовую вену. Размер опухоли измеряли с помощью штангенциркуля 2-3 раза в неделю, и мышей считали достигшими конечной точки, когда размер опухоли достигал ≥ 20 мм. Для иммунофенотипического анализа опухоли и селезенки собирали через 10 дней после имплантации Т-клеток. Опухоли измельчали вручную и расщепляли в среде RPMI-1640, содержащей 4 мг/мл коллагеназы IV и 0,1 мг/мл ДНКазы I при 37°C в течение 30 мин, а селезенки измельчали вручную и проводили лизис эритроцитов. Использовали следующие антитела: анти-CD45, анти-CD3, анти-CD4 и анти-CD8. Мертвые клетки исключали при помощи Draq7. Образцы анализировали с использованием FACSymphony X50 SORP, и данные анализировали с использованием программы FlowJo.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение, в целом, относится к новому классу способных образовывать олигомеры химерных полипептидных рецепторов, генетически модифицированных для модуляции регуляции транскрипции зависимым от лиганда образом. В частности, новые рецепторы (называемые "Шарнир-Notch"), хотя и получены из Notch, не нуждаются в субъединице NEC Notch, в частности, NRR, которая, как считалось ранее, необходима для функционирования рецепторов. Эти рецепторы нового класса являются синтетическими и рекомбинантными, и не существуют в природе. Как описано ниже, химерные полипептиды, описанные в настоящем документе, могут представлять собой синтетические полипептиды, или могут быть генетически модифицированными, спроектированными или модифицированными для обеспечения желаемых и/или улучшенных свойств, например, модулирования транскрипции. Демонстрация того, что новые рецепторы Шарнир-Notch, описанные в настоящем документе, не только являются функциональными, но и проявляют повышенную биологическую активность, является удивительной и полностью противоречит теории, принятой в области. Кроме того, новые химерные рецепторы, описанные в настоящем документе, содержат внеклеточный домен олигомеризации, способствующий образованию олигомерных форм, например, димерных или тримерных форм, химерных рецепторов. Считается, что такая конструкция способствует олигомеризации/образованию кластеров внеклеточных доменов (ECD), и впоследствии сближает внутриклеточные домены (ICD), активируя клеточную сигнализацию, например, Т-клеточную сигнализацию. В некоторых вариантах осуществления рецепторы, описанные в настоящем документе, связывают целевой лиганд на клеточной поверхности, что инициирует протеолитическое расщепление химерного рецептора и высвобождение регулятора транскрипции, который модулирует индивидуальную программу транскрипции в клетке. Изобретение также относится к композициям и способам, полезным для получения таких рецепторов, кодирующим их нуклеиновым кислотам, клеткам-хозяевам, генетически модифицированным такими нуклеиновыми кислотами, а также к способам модулирования активности клетки и/или лечения различных патологических состояний здоровья, таких как

заболевания (например, рак).

В следующем далее подробном описании делается ссылка на прилагаемые чертежи, которые являются частью настоящего документа. В этих чертежах аналогичные символы, как правило, обозначают аналогичные компоненты, если из контекста явно не следует иное. Иллюстративные альтернативные варианты, указанные в подробном описании, чертежи и пункты формулы изобретения не должны быть ограничивающими. Другие альтернативные варианты могут быть использованы, и другие изменения могут быть внесены, без отклонения от сущности и объема изобретения, представленного в настоящем документе. Легко понять, что аспекты, в общих чертах описанные в настоящем документе и проиллюстрированные на фигурах, могут быть сгруппированы, заменены, объединены и спланированы в широком диапазоне различных конфигураций, все из которых прямо предусмотрены и являются частью настоящего изобретения.

Определения.

Форма единственного числа терминов включает и соответствующую форму множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Например, термин "клетка" охватывает одну или более клеток, включая их смеси. Используемое в настоящем документе выражение "А и/или В" включает все из следующих альтернативных вариантов: "А", "В", "А или В" и "А и В".

Используемые в настоящем документе термины "введение" и "вводить" означают доставку композиции или препарата, описанных в настоящем документе, путем введения, включающего, но без ограничения, внутривенный, внутриартериальный, интракраниальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный пути введения, или их сочетания. Термин включает, но без ограничения, введение медицинским работником и самостоятельное введение.

Используемый в настоящем документе термин "рак" означает присутствие клеток, обладающих свойствами, характерными для клеток, вызывающих рак, такими как неконтролируемая пролиферация, бессмертие, метастатический потенциал, быстрый рост и высокая скорость пролиферации, а также определенные характерные морфологические признаки. Раковые клетки некоторых типов могут объединяться в массу, такую как опухоль, но некоторые раковые клетки могут существовать отдельно в организме субъекта. Опухоль может представлять собой солидную опухоль, опухоль мягких тканей или метастатический опухолевый очаг. Используемый в настоящем документе термин "рак" также охватывают другие виды неопухолевых раковых заболеваний. Неограничивающие примеры включают разные виды рака крови или гематологические злокачественные новообразования, такие как лейкоз, лимфома и миелома. Рак может включать предзлокачественные, а также злокачественные формы рака.

В настоящем документе термины "клетка-хозяин" и "рекомбинантная клетка" используются взаимозаменяемо. Понятно, что такие термины, а также термины "клетка", "культура клеток", "линия клеток", относятся не только к конкретной клетке или линии клеток, но также и к потомству, или потенциальному потомству, такой клетки или линии клеток, без учета количества пересевов или пассажей в культуре. Следует понимать, что не все потомки в точности идентичны родительской клетке. Это происходит вследствие того, что некоторые модификации могут происходить в последующих поколениях в результате либо мутации (например, преднамеренных или непреднамеренных мутаций), либо влияния факторов окружающей среды (например, метилирования или других эпигенетических модификаций), так, что потомки могут быть фактически не идентичны родительской клетке, но все равно попадают под определение используемого в настоящем документе термина, при условии, что потомство сохраняет ту же функциональность, что и исходная клетка или линия клеток.

Используемый в настоящем документе термин "функционально связанные" означает физическую или функциональную связь между двумя или более элементами, например, полипептидными последовательностями или полинуклеотидными последовательностями, что позволяет им функционировать по своему прямому назначению.

Используемый в настоящем документе термин "процент идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или белков, относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислот, которые являются одинаковыми (например, примерно 60% идентичность последовательностей, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более высокая идентичность на протяжении определенной области, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или заданной области), при определении с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0 с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или при выравнивании вручную и визуальной инспекции. См. например, веб-сайт NCBI по сетевому адресу ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Такие последовательности называют "по существу идентичными". Данное определение также относится к, или может быть применено к, комплементу последовательности. Данное определение также относится к последовательностям, которые имеют делеции и/или добавления, а также к тем, которые имеют замены. Идентичность последовательностей может быть рассчитана на протяжении области, имеющей длину по меньшей мере примерно 20 аминокислот или нуклеотидов, или на протяжении области, имеющей длину 10-100 аминокислот или нуклеотидов, или на протяжении всей длины конкретной последовательности. Идентичность последовательностей может быть рассчитана с

использованием опубликованных методик и широкодоступных компьютерных программ, таких как пакет программ GCS (Devereux et al., *Nucleic Acids Res.* 12:387, 1984), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul et al., *J Mol Biol* 215:403, 1990). Идентичность последовательностей можно определять с использованием программы анализа последовательностей, например, пакета программ для анализа последовательностей Компьютерной группы по генетике в Биотехнологическом центре Университета Висконсина (1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705), с его параметрами по умолчанию.

Используемый в настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" средства означает количество, достаточное для обеспечения терапевтического эффекта при лечении или контроле патологического состояния здоровья, такого как заболевание (например, рак), либо для отсрочки или минимизации одного или более симптомов, связанных с заболеванием. Терапевтически эффективное количество соединения означает количество терапевтического средства, отдельно или в сочетании с другими терапевтическими средствами, которое обеспечивает терапевтический эффект при лечении или контроле заболевания. Термин "терапевтически эффективное количество" может охватывать количество, которое, в целом, способствует лечению заболевания, позволяет уменьшать или избегать симптомов или причин заболевания, или повышает терапевтическую эффективность другого терапевтического средства. Примером "эффективного количества" является количество, достаточное для содействия лечению, предотвращению или уменьшению симптома, или симптомов, заболевания, которое также может быть названо "терапевтически эффективным количеством". "Уменьшение" симптома означает уменьшение степени тяжести или частоты проявления симптома(ов), либо устранение симптома(ов). Точное количество композиции, содержащей "терапевтически эффективное количество", будет зависеть от цели лечения, и будет определено специалистом в данной области с использованием известных методов (смотри, например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 2010); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (2016); Pickar, *Dosage Calculations* (2012); и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22-е издание, 2012, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Используемый в настоящем документе термин "субъект", или "индивидуум", охватывает животных, таких как человек (например, индивидуумы-люди) и не являющиеся людьми животные. В некоторых вариантах осуществления "субъект" или "индивидуум" является пациентом под наблюдением врача. Таким образом, субъект может являться пациентом-человеком или индивидуумом-человеком, который страдает от, или имеет риск развития, или предположительно страдает от, интересующего заболевания (например, рака) и/или одного или более симптомов заболевания. Субъект также может являться индивидуумом, у которого обнаружены факторы риска для развития интересующего состояния в момент диагностики или позже. Термин "не являющиеся людьми животные" охватывает всех позвоночных, например, млекопитающих, например, грызунов, например, мышей, и не млекопитающих животных, например, приматов, например, овец, собак, коров, кур, амфибий, рептилий и так далее.

При описании диапазона значений понятно, что каждое промежуточное значение, с точностью до десятой доли единицы нижнего предела, если из контекста явно не следует иное, между верхним и нижним пределами данного диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне, входит в объем изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, и также входят в объем изобретения, кроме любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также входят в объем изобретения.

Все диапазоны, раскрытые в настоящем документе, также охватывают любые и все возможные поддиапазоны и комбинации их поддиапазонов. Любой перечисленный диапазон может быть признан достаточно описывающим и позволяющим разбить тот же диапазон по меньшей мере на равные половины, трети, четверти, пятые, десятые доли и так далее. В качестве неограничивающего примера, каждый диапазон, описанный в настоящем документе, может быть с легкостью разделен на нижнюю треть, среднюю треть, верхнюю треть и так далее. Как также понятно специалистам в данной области, выражения "вплоть до", "по меньшей мере", "более чем", "менее чем", и тому подобные, включают указанное число и относятся к диапазонам, которые впоследствии могут быть разделены на поддиапазоны, как описано выше. Наконец, как будет понятно специалисту в данной области, диапазон включает каждый отдельный элемент диапазона. Так, например, "группа, состоящая из 1-3 компонентов", означает группы, состоящие из 1, 2 или 3 компонентов. Аналогично, "группа, состоящая из 1-5 компонентов", означает группы, состоящие из 1, 2, 3, 4 или 5 компонентов, и так далее.

Следует понимать, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предоставлены объединенными в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые, для краткости, описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предоставлены отдельно или в любой подходящей субкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящиеся к изобретению, конкретно охвачены настоящим изобретением и раскрыты в настоящем документе так же, как если бы каждая комбинация была отдельно и явно раскрыта в настоящем документе. Кроме того, все субкомбинации

различных вариантов осуществления и их элементов также конкретно охвачены настоящим изобретением и раскрыты в настоящем документе так же, как если бы любая и каждая такая комбинация была отдельно и явно раскрыта в настоящем документе.

Рецепторы Notch.

Рецепторы Notch представляют собой трансмембранные белки, которые обычно передают сигналы при связывании с поверхностными лигандами, экспрессируемыми на соседних клетках. Сигналы Notch зависят от межклеточных контактов. Эволюционная дивергенция позвоночных и беспозвоночных сопровождалась по меньшей мере двумя раундами дубликации генов с участием рецепторов Notch: мухи имеют единственный ген Notch, черви имеют два (GLP-1 и LIN-12), и млекопитающие имеют четыре (NOTCH 1-4). Трансдукция сигналов Notch зависит от трех ключевых событий: (i) узнавания лиганда, (ii) конформационного экспонирования лиганд-зависимого сайта расщепления и (iii) сборки ядерных комплексов активации транскрипции.

Канонические сигналы Notch передаются с помощью процесса, называемого регулируемым внутримембранным протеолизом. Рецепторы Notch обычно поддерживаются в покоящейся, устойчивой к протеолитическому расщеплению конформации на клеточной поверхности, однако связывание лиганда инициирует протеолитический каскад, который высвобождает внутриклеточный фрагмент рецептора (также называемый внутриклеточным notch (ICN) или внутриклеточным доменом Notch (NICD)) из мембраны. На крайне важный регулируемый этап расщепления влияют ADAM металлопротеазы, и он происходит в участке, называемом S2, непосредственно снаружи от плазматической мембраны. Этот укороченный рецептор, получивший название NEXT (сокращенно от Notch extracellular truncation - внеклеточный укороченный Notch), остается связанным с мембраной до его процессинга в участке S3 за счет гамма-секретазы, ферментного комплекса из нескольких белков.

После опосредованного гамма-секретазой расщепления ICN в конечном итоге попадает в ядро, где он собирает комплекс активации транскрипции, содержащий ДНК-связывающий фактор транскрипции, называемый CSL (С-промотор-связывающий фактор у млекопитающих; также известный как RBP-J)/супрессор "безволосого" гена у *Drosophila melanogaster* или Lag1 у *Caenorhabditis elegans*), и коактиватор транскрипции из семейства Mastermind/Lag-3. Этот комплекс затем связывает дополнительные коактиваторные белки, такие как p300, с привлечением базового транскрипционного механизма и активацией экспрессии последующих генов-мишеней.

Рецепторы Notch имеют модульную доменную организацию. Внеклеточная субъединица Notch (NEC) рецепторов Notch состоит из серии повторов, подобных N-концевой части рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), которые отвечают за связывание лиганда. О-связанное гликозилирование этих EGFR повторов, включая модификацию за счет О-фукозы, Fringe и Rumi гликозилтрансфераз, также модулирует активность рецепторов Notch в ответ на разные подтипы лигандов у мух и млекопитающих.

За EGFR повторами следуют три модуля LIN-12/Notch repeat (LNR), которые являются уникальными для рецепторов Notch, и, согласно многочисленным сообщениям, участвуют в предотвращении преждевременной активации рецепторов. Домен гетеродимеризации (HD) в Notch1 разделяется путем расщепления фурином, так что его N-концевая часть завершает внеклеточную субъединицу Notch (NEC), а его С-концевая половина образует начало трансмембранной субъединицы Notch (NTM). За внеклеточной областью HD-С в NEC следует трансмембранный сегмент и внутриклеточная область (ICN), которая включает активатор транскрипции. Дополнительную информацию о рецепторах Notch и Notch-опосредованной клеточной сигнализации можно найти, например, в публикациях W.R. Gordon et al., *Dev Cell* (2015) 33:729-36 и W.R. Gordon et al., *J. Cell Sci.* (2008) 121:3109-19, обе из которых включены посредством ссылки.

Композиции по изобретению.

Как более подробно описано ниже, настоящее изобретение относится к новому классу способных образовывать олигомеры химерных полипептидных рецепторов, генетически модифицированных для модуляции регуляции транскрипции зависимым от лиганда образом, с многочисленными преимуществами перед существующими синтетическими рецепторами Notch. Например, поскольку природные рецепторы Notch являются крупными с субъединицей NEC, содержащей несколько десятков тандемных EGFR-подобных повторов, то за счет избавления от регуляторных областей Notch, или даже всех субъединиц NEC, могут быть получены полинуклеотиды, кодирующие рецепторы по изобретению меньшего размера, чем природные рецепторы Notch, и существующие SynNotch-кодирующие полинуклеотиды, что позволяет использовать векторы, имеющие более ограниченную вместимость, или включать дополнительные элементы, которые в противном случае были бы исключены вследствие ограничений, связанных с вместимостью вектора.

Специалист в данной области понимает, что химерные полипептидные рецепторы, описанные в настоящем документе, способствуют усилению активации в определенных клеточных условиях и условиях окружающей среды. Этот тип обратной связи с активностью рецептора является новым признаком, который может быть использован для усиления и регулирования продуцирования терапевтической полезной нагрузки генетически модифицированными клетками. Кроме того, как более подробно описано ниже, ряд вариантов рецептора, описанных в настоящем документе, легче экспрессируются, чем существую-

шие рецепторы SynNotch, поскольку они могут быть трансдуцированы с более высокой эффективностью и экспрессируются на более высоких уровнях на клеточной поверхности первичных человеческих Т-клеток.

Кроме того, как более подробно описано ниже, некоторые химерные полипептидные рецепторы, описанные в настоящем документе, имеют более высокую активность, чем существующие рецепторы SynNotch, что определяют, например, по лиганд-индуцируемым уровням сигнала желаемого транскрипционного выхода. Например, Шарнир-Notch и укороченный Шарнир-Notch обеспечивают более высокую степень лиганд-индуцируемого сигнала, чем соответствующий SynNotch, и обеспечивают более низкие степени сигнала без индукции лигандом. Кроме того, некоторые химерные полипептидные рецепторы, описанные в настоящем документе, обеспечивают более модульную платформу для разработки дополнительных рецепторов Notch. Эта модульная платформа позволяет легко заменять домены с различными функциями на соответствующие домены, например, других биологических видов, что позволяет настраивать профиль активации рецепторов. Как более подробно описано в разделе "Примеры", некоторые рецепторы Шарнир-Notch и укороченный Шарнир-Notch, предложенные в настоящем документе, не только имеют меньший размер, чем существующие рецепторы synNotch, но и хорошо экспрессируются, могут быть индивидуально настроены в широких пределах со всеми элементами внеклеточных, трансмембранных и внутриклеточных доменов рецептора, доступными для индивидуальной настройки. Например, тестирование различных рецепторов Шарнир CD8-Notch, описанных в настоящем документе, показало, что могут быть использованы различные внеклеточные домены. Напротив, аналогичный процесс, проведенный на регуляторном домене существующего SynNotch1, приводит либо к потере экспрессии, либо к потере функции переключения.

Без связи с конкретной теорией, считается, что рецепторы Шарнир-Notch, описанные в настоящем документе, способны обеспечивать более высокие уровни лиганд-индуцируемого сигнала в сравнении с мышинными или человеческими вариантами SynNotch1. Также считается, что рецепторы Шарнир-Notch, описанные в настоящем документе, могут обеспечивать более низкие уровни сигнала в отсутствие лиганда, в сравнении с мышинными вариантами SynNotch1 (например, более низкий уровень шума). Например, существующие рецепторы SynNotch могут быть генетически модифицированы такими лиганд-связывающими доменами, как scFv и нанотела, но было затруднительно использовать природные внеклеточные домены из рецепторов/лигандов в рецепторах SynNotch. Напротив, в рецепторах Notch второго поколения, предложенных в настоящем документе, можно использовать лиганд-связывающие домены других типов, например, связывающие домены, отличные от scFv, за счет этого расширяется спектр целевых заболеваний и тканей. Например, эксперименты, описанные ниже в разделе "Примеры", продемонстрировали возможность использования в качестве лиганд-связывающего домена eGFP, который может связывать анти-GFP нанотело LaG17, экспрессируемое на поверхности клетки-мишени. Напротив, существующие синтетические рецепторы Notch, например, мышинные и человеческие SynNotch1, не совместимы с eGFP в качестве лиганд-связывающего домена.

Как описано в разделе "Примеры", некоторые химерные полипептидные рецепторы были протестированы, и их эффективность подтверждена в первичных человеческих Т-клетках. Ожидается, что эти новые рецепторы продемонстрируют аналогичную эффективность в мышинных моделях. Рецепторы, описанные в настоящем документе, могут быть введены генно-инженерными методами в иммунные клетки разных типов для лучшего узнавания и элиминации опухолей, или в генетически модифицированные клетки для контроля аутоиммунитета и регенерации тканей. Соответственно, генетически модифицированные клетки, такие как иммунные клетки, генетически модифицированные для экспрессии одного или более из химерных рецепторов, описанных в настоящем документе, также входят в объем изобретения.

Химерные полипептиды.

Как описано выше, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к новым, не существующим в природе химерным полипептидам, спроектированным для модулирования регуляции транскрипции зависимым от лиганда образом. В частности, новые рецепторы, хотя и получены из Notch, не нуждаются в регуляторных областях Notch (NRR), которые, как считалось ранее, необходимы для функционирования рецепторов. Более того, новые генетически модифицированные рецепторы, описанные в настоящем документе, содержат внеклеточный домен олигомеризации (например, шарнирный домен), способствующий олигомеризации, с образованием более высокого порядка олигомерных, например, димерных или тримерных, форм химерных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит полипептидные фрагменты, способствующие образованию олигомеров химерного полипептида за счет межмолекулярных дисульфидных связей. Внеклеточный домен олигомеризации может заменять часть или весь внеклеточный домен Notch. В некоторых вариантах осуществления рецепторы, описанные в настоящем документе, связывают целевой лиганд на клеточной поверхности, что запускает протеолитическое расщепление рецепторов и высвобождение регулятора транскрипции, который модулирует индивидуальную программу транскрипции в клетке.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен химерный полипептид, содержащий, в направлении от N-конца к C-концу: (а) внеклеточный лиганд-связывающий домен (ECD),

имеющий аффинность связывания для выбранного лиганда; (b) шарнирный домен, способствующий образованию олигомеров химерного полипептида за счет межмолекулярных дисульфидных связей; (c) трансмембранный домен (TMD), содержащий один или более лиганд-индуцируемых сайтов протеолитического расщепления; и (d) внутриклеточный домен (ICD), содержащий регулятор транскрипции, где связывание выбранного лиганда с ECD вызывает расщепление в индуцируемом лигандом сайте(ах) протеолитического расщепления между регулятором транскрипции и шарнирным доменом, и где химерный полипептид не содержит повтора LIN-12-Notch (LNR) и/или домен гетеродимеризации (HD) рецептора Notch.

Внеклеточные домены (ECD).

В некоторых вариантах осуществления ECD химерных полипептидных рецепторов (например, рецепторов Шарнир-Notch), описанных в настоящем документе, имеет аффинность связывания для одного или более целевых лигандов. Целевой лиганд экспрессируется на клеточной поверхности, или иным образом закреплен, иммобилизован или удерживается так, чтобы он мог оказывать механическое воздействие на химерный рецептор. Таким образом, без связи с конкретной теорией, связывание ECD химерного рецептора, описанного в настоящем документе, с лигандом на клеточной поверхности не обязательно приводит к удалению целевого лиганда с поверхности клетки-мишени, но вместо этого оказывает механическую силу притяжения на химерный рецептор. Например, растворимый лиганд может стать мишенью, если он связан с поверхностью или с молекулой во внеклеточном матриксе. В некоторых вариантах осуществления целевой лиганд представляет собой лиганд на клеточной поверхности. Неограничивающие примеры подходящих типов лигандов включают рецепторы на клеточной поверхности; белки адгезии; углеводы, липиды, гликолипиды, липопротеины и липополисахариды, которые связаны с поверхностью; интегрины; муцины и лектины. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой белок. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой углевод.

В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой маркер кластера дифференцировки (CD). В некоторых вариантах осуществления маркер CD выбран из группы, состоящей из CD1, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD7, CD8a, CD8b, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27, CD28, CD33, CD34, CD40, CD45, CD48, CD52, CD59, CD66, CD70, CD71, CD72, CD73, CD79A, CD79B, CD80 (B7,1), CD86 (B7,2), CD94, CD95, CD134, CD140 (PDGFR4), CD152, CD154, CD158, CD178, CD181 (CXCR1), CD182 (CXCR2), CD183 (CXCR3), CD210, CD246, CD252, CD253, CD261, CD262, CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD276 (B7H3), CD279, CD295, CD339 (JAG1), CD340 (HER2), EGFR, FGFR2, CEA, AFP, CA125, MUC-1 и MAGE.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит лиганд-связывающий фрагмент рецептора. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий фрагмент, который связывает один или более целевых антигенов. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или более антигенсвязывающих детерминант антитела или его функциональный антигенсвязывающий фрагмент. Специалист в данной области, ознакомившись с настоящим описанием, легко поймет, что термин "его функциональный фрагмент", или "его функциональный вариант", относится к молекуле, имеющей количественно и/или качественно определяемую биологическую активность, общую с молекулой дикого типа, из которой был получен фрагмент или вариант. Например, функциональный фрагмент, или функциональный вариант, антитела представляет собой фрагмент, который сохраняет практически такую же способность к связыванию того же эпитопа, что и антитело, из которого был получен функциональный фрагмент или функциональный вариант. Например, антитело, способное к связыванию эпитопа рецептора на клеточной поверхности, может быть укорочено с N-конца и/или C-конца, и сохранение его эпитоп-связывающей активности оценивают с использованием анализов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из антитела, нанотела, диатела, триатела или минитела, F(ab')₂-фрагмента, F(ab)-фрагмента, одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) и однодоменного антитела (sdAb), или их функциональных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv.

Антигенсвязывающий фрагмент может содержать природные аминокислотные последовательности или может быть генетически модифицированным, спроектированным или модифицированным для обеспечения желаемых и/или улучшенных свойств, таких как, например, аффинность связывания. Как правило, аффинность связывания антигенсвязывающего фрагмента, например, антитела, для целевого антигена (например, антигена CD19) может быть рассчитана по методу Скэтчарда, описанному в публикации Frankel et al., Mol. Immunol, 16:101-06, 1979. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания определяют по скорости диссоциации комплекса антиген/антитело. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания определяют методом конкурентного радиоиммунного анализа. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания определяют методом ELISA. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела определяют методом проточной цитометрии. Антитело, которое "избирательно связывает" антиген (такой как CD19), представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который существенно не связывает другие антигены, но связывает конкретный антиген с высокой аффинностью, например, с константой равновесия (KD), составляющей 100 нМ или менее, напри-

мер, 60 нМ или менее, например, 30 нМ или менее, например, 15 нМ или менее, или 10 нМ или менее, или 5 нМ или менее, или 1 нМ или менее, или 500 пМ или менее, или 400 пМ или менее, или 300 пМ или менее, или 200 пМ или менее, или 100 пМ или менее.

Квалифицированный специалист может выбирать ECD на основании желательной локализации или функции клетки, которую генетически модифицируют для экспрессии химерного полипептида или рецептора Шарнир-Notch по настоящему изобретению. Например, химерный полипептид или рецептор миниNotch с ECD, включающим антитело, специфическое для антигена HER2, может нацеливать клетки на HER2-экспрессирующие клетки рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления ECD раскрытых полипептидных рецепторов Шарнир-Notch способен связывать опухоль-ассоциированный антиген (ОАА) или опухоль-специфический антиген (ОСА). Квалифицированный специалист понимает, что ОАА включает молекулу, такую как, например, белок, присутствующую на опухолевых клетках и на нормальных клетках, или на многих нормальных клетках, но в гораздо более низкой концентрации, чем на опухолевых клетках. Напротив, ОСА, как правило, включают молекулу, такую как, например, белок, которая присутствует на опухолевых клетках, но отсутствует на нормальных клетках.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент является специфическим для эпитопа, присутствующего в антигене, который экспрессируется опухолевой клеткой, то есть, опухоль-ассоциированного антигена. Опухоль-ассоциированный антиген может представлять собой антиген, ассоциированный, например, с клеткой рака молочной железы, В-клеточной лимфомы, рака поджелудочной железы, клеткой лимфомы Ходжкина, клеткой рака яичника, клеткой рака предстательной железы, мезотелиомы, клеткой рак легких, клеткой неходжкинской В-клеточной лимфомы (В-NHL), клеткой рака яичника, клеткой рака предстательной железы, клеткой мезотелиомы, клеткой меланомы, клеткой хронического лимфоцитарного лейкоза, клеткой острого лимфоцитарного лейкоза, клеткой нейробластомы, глиомы, глиобластомы, клеткой колоректального рака и так далее. Кроме того, следует понимать, что опухоль-ассоциированный антиген может также экспрессироваться не злокачественной клеткой. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен является специфическим для эпитопа, присутствующего в тканеспецифическом антигене. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен является специфическим для эпитопа, присутствующего в ассоциированном с заболеванием антигене.

Неограничивающие примеры подходящих целевых антигенов включают CD19, B7H3 (CD276), BCMA (CD269), щелочную фосфатазу, подобную плацентарному белку 2 (ALPPL2), зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), сигнальный регуляторный белок α (SIRP α), CD123, CD171, CD179 α , CD20, CD213A2, CD22, CD24, CD246, CD272, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD46, CD71, CD97, CEA, CLDN6, CLECL1, CS-1, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, эфрин B2, FAP, FLT3, GD2, GD3, GM3, GPRC5D, HER2 (ERBB2/neu), IGLL1, IL-11R α , KIT (CD 117), MUC1, NCAM, PAP, PDGFR- β , PRSS21, PSCA, PSMA, ROR1, SSEA-4, TAG72, TEM1/CD248, TEM7R, TSHR, VEGFR2, ALPI, цитруллинированный виментин, cMet и Axl.

В некоторых вариантах осуществления целевой антиген выбран из CD19, B7H3 (CD276), BCMA (CD269), ALPPL2, CD123, CD171, CD179 α , CD20, CD213A2, CD22, CD24, CD246, CD272, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD46, CD71, CD97, CEA, CLDN6, CLECL1, CS-1, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, эфрина B2, FAP, FLT3, GD2, GD3, GM3, GPRC5D, HER2 (ERBB2/neu), IGLL1, IL-11Ra, KIT (CD117), MUC1, NCAM, PAP, PDGFR- β , PRSS21, PSCA, PSMA, ROR1, SSEA-4, TAG72, TEM1/CD248, TEM7R, TSHR, VEGFR2, ALPI, цитруллинированного виментина, cMet, Axl, GPC2, рецептора 2 человеческого эпидермального фактора роста (Her2/neu), CD276 (B7H3), IL-13R α 1, IL-13R α 2, α -фетопротейна (AFP), карциноэмбрионального антигена (CEA), ракового антигена-125 (CA-125), CA19-9, кальретинина, MUC-1, эпителиального мембранного белка (EMA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), тирозиназы, меланома-ассоциированного антигена (MAGE), CD34, CD45, CD123, CD93, CD99, CD117, хромогранина, цитокератина, десмина, глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), белковой жидкости при обширных кистозных болезнях (GCDFFP-15), ALK, DLK1, FAP, NY-ESO, WT1, антигена HMB-45, белка мелана-A (антигена меланомы, узнаваемого Т-лимфоцитами; MART-1), тью-D1, мышечно-специфического актина (MSA), нейронспецифической энolahзы нейрофиламентов (NSE), плацентарной щелочной фосфатазы, синаптофизина, тиреоглобулина, тиреоидного фактора транскрипции-1, AOC3 (VAP-1), CAM-3001, CCL11 (эотаксина-1), CD125, CD147 (базиджина), CD154 (CD40L), CD2, CD20, CD23 (рецептора IgE), CD25 (субъединицы гетеродимерного рецептора IL-2), CD3, CD4, CD5, IFN α , IFN γ , IgE, Fc-области IgE, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-22, IL-4, IL-5, IL-5, IL-6, рецептора IL-6, интегрин α 4, интегрин α 4 β 7, LFA-1 (CD11 α), миостатина, OX-40, склеростина, SOST, TGF β 1, TNF α , VEGF-A, изофермента пируваткиназы типа M2 (опухолевого M2-PK), CD20, CD5, CD7, CD3, TRBC1, TRBC2, BCMA, CD38, CD123, CD93, CD34, CD1 α , SLAMF7/CS1, FLT3, CD33, CD123, TALLA-1, CSPG4, DLL3, легкой цепи каппа, легкой цепи лямбда, CD16/ Fc γ RIII, CD64, FITC, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (ганглиозида G2), GD3, EGFRvIII (эпидермального фактора роста варианта III), EGFR и его изовариантов, TEM-8, белка сперматозоидов 17 (Sp17), мезотелина.

Дополнительные неограничивающие примеры подходящих антигенов включают PAP (простатиче-

скую кислую фосфатазу), антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простеин, NKG2D, TARP (белок альтернативной рамки считывания Т-клеточного рецептора гамма), Ttr-p8, STEAP1 (с шестью трансмембранными доменами эпителиальный антиген предстательной железы 1), аномальный белок gas, аномальный белок p53, интегрин $\beta 3$ (CD61), галактин, K-Ras (V-Ki-ras2 онкоген вируса крысиной саркомы Кирстена), Ral-B, GPC2, CD276 (B7H3) или IL-13R α . В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой Her2. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой ALPPL2. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой BCMA. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент ECD является специфическим для белка-репортера, такого как GFP и eGFP. Неограничивающие примеры такого антигенсвязывающего фрагмента включают анти-GFP нанотело LaG17. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент ECD включает анти-BCMA полностью гуманизированный домен VH (FHVH). В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой сигнальный регуляторный белок α (SIRP α).

Дополнительные антигены, подходящие в качестве мишени для химерных полипептидных рецепторов, описанных в настоящем документе, включают, но без ограничения, GPC2, рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста (Her2/neu), CD276 (B7H3), IL-13R $\alpha 1$, IL-13R $\alpha 2$, α -фетопротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), раковый антиген-125 (CA-125), CA19-9, кальретинин, MUC-1, эпителиальный мембранный белок (EMA), эпителиальный опухолевый антиген (ETA). Другие подходящие целевые антигены включают, но без ограничения, тирозиназу, меланома-ассоциированный антиген (MAGE), CD34, CD45, CD123, CD93, CD99, CD117, хромогранин, цитокератин, десмин, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), белковую жидкость при обширных кистозных болезнях (GCDFP-15), ALK, DLK1, FAP, NY-ESO, WT1, антиген HMB-45, белок мелан-А (антиген меланомы, узнаваемый Т-лимфоцитами; MART-1), myo-D1, мышечно-специфический актин (MSA), нейронспецифическую энлазу нейрофиламентов (NSE), плацентарную щелочную фосфатазу, синаптофизин, тиреоглобулин, тиреоидный фактор транскрипции-1.

Дополнительные антигены, подходящие в качестве мишени для химерных полипептидных рецепторов, описанных в настоящем документе, включают, но без ограничения, те, которые ассоциированы с воспалительным заболеванием, например, AOC3 (VAP-1), CAM-3001, CCL11 (эотаксин-1), CD125, CD147 (базиджин), CD154 (CD40L), CD2, CD20, CD23 (рецептор IgE), CD25 (субъединицу гетеродимерного рецептора IL-2), CD3, CD4, CD5, IFN α , IFN γ , IgE, Fc-область IgE, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-22, IL-4, IL-5, IL-5, IL-6, рецептор IL-6, интегрин $\alpha 4$, интегрин $\alpha 4\beta 7$, LFA-1 (CD11 α), миостатин, OX-40, склеростин, SOST, TGF $\beta 1$, TNF α и VEGF-A.

Дополнительные антигены, подходящие в качестве мишени для химерных полипептидов и рецепторов Шарнир-Notch, описанных в настоящем документе, включают, но без ограничения, изофермент пируваткиназы типа M2 (опухолевый M2-ПК), CD20, CD5, CD7, CD3, TRBC1, TRBC2, BCMA, CD38, CD123, CD93, CD34, CD1 α , SLAMF7/CS1, FLT3, CD33, CD123, TALLA-1, CSPG4, DLL3, легкую цепь каппа, легкую цепь лямбда, CD16/Fc γ RIII, CD64, FITC, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (ганглиозид G2), GD3, EGFRvIII (эпидермальный фактор роста варианта III), EGFR и его изоварианты, TEM-8, белок сперматозоидов 17 (Sp17), мезотелин. Дополнительные неограничивающие примеры подходящих антигенов включают PAP (простатическую кислую фосфатазу), антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простеин, NKG2D, TARP (белок альтернативной рамки считывания Т-клеточного рецептора гамма), Ttr-p8, STEAP1 (с шестью трансмембранными доменами эпителиальный антиген предстательной железы 1), аномальный белок gas, аномальный белок p53, интегрин $\beta 3$ (CD61), галактин, K-Ras (V-Ki-ras2 онкоген вируса крысиной саркомы Кирстена) и Ral-B. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой GPC2, CD19, Her2/neu, CD276 (B7H3), IL-13R $\alpha 1$ или IL-13R $\alpha 2$. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой Her2. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой ALPPL2. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой BCMA. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент ECD является специфическим для белка-репортера, такого как GFP и eGFP. Неограничивающие примеры такого антигенсвязывающего фрагмента включают анти-GFP нанотело LaG17. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент ECD включает анти-BCMA полностью гуманизированный домен VH (FHVH).

В некоторых вариантах осуществления антигены, подходящие в качестве мишени для химерных полипептидов и рецепторов Шарнир-Notch, описанных в настоящем документе, включают лиганды, полученные из патогена. Например, антиген может представлять собой HER2, продуцируемый HER2-положительными клетками рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления антиген может представлять собой CD19, который экспрессируется на клетках В-клеточного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления антиген может представлять собой EGFR, который экспрессируется на клетках полиморфной глиобластомы (GBM), но в гораздо меньшей степени экспрессируется на здоровых тканях ЦНС. В некоторых вариантах осуществления антиген может представлять собой CEA, который ассоциирован с раком у взрослых, например, раком толстого кишечника.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент ECD является специфиче-

ским для мишени на клеточной поверхности, где неограничивающие примеры мишеней на клеточной поверхности включают CD19, CD30, Her2, CD22, ENPP3, EGFR, CD20, CD52, CD11 α и α -интегрин. В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды и рецепторы Шарнир-Notch, описанные в настоящем документе, содержат внеклеточный домен, имеющий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD19, CEA, HER2, MUC1, CD20, ALPPL2, BCMA или EGFR. В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды по настоящему изобретению (например, рецепторы Шарнир-Notch) содержат внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD19. В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды по настоящему изобретению (например, рецепторы Шарнир-Notch) содержат внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает ALPPL2. В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды по настоящему изобретению (например, рецепторы Шарнир-Notch) содержат внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает BCMA. В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды по настоящему изобретению (например, рецепторы Шарнир-Notch) содержат внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает Her2.

В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды и рецепторы Шарнир-Notch, описанные в настоящем документе, содержат внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD19, ALPPL2, BCMA или Her2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичность последовательности с одной или более из SEQ ID NO: 9-11, 36-38, и 72 в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-11, 36-38 и 72. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-11, 36-38 и 72. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательности с одной или более из SEQ ID NO: 9-11, 36-38 и 72. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-11, 36-38 и 72, где один, два, три, четыре или пять из аминокислотных остатков в любой из SEQ ID NO: 9-11, 36-38 и 72 заменены/заменены на другой аминокислотный остаток.

Шарнирный домен.

Как указано выше, внеклеточные домены Notch, расположенные на N-конце TMD химерного полипептида по изобретению, включают домен олигомеризации (например, шарнирный домен), содержащий один или более полипептидных фрагментов, которые способствуют образованию олигомеров химерных полипептидов за счет межмолекулярных дисульфидных связей. В этих случаях в составе химерных рецепторов Notch, описанных в настоящем документе, шарнирный домен, как правило, содержит гибкую олиго- или полипептидную соединительную область, расположенную между ECD и TMD. Таким образом, шарнирный домен обеспечивает гибкое соединение между ECD и TMD и также обеспечивает участки для образования межмолекулярных дисульфидных связей между двумя или более мономерами химерного полипептида, с образованием олигомерного комплекса. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит фрагменты, которые способствуют образованию димеров химерных полипептидов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит фрагменты, которые способствуют образованию тримеров химерных полипептидов, описанных в настоящем документе (например, шарнирный домен, полученный из OX40).

Последовательности шарнирного полипептида, подходящие для композиций и способов по изобретению, могут представлять собой природные полипептидные последовательности (например, последовательности из природных иммуноглобулинов). Альтернативно, последовательность шарнирного полипептида может представлять собой синтетическую последовательность, которая соответствует природной последовательности шарнирного полипептида, или может представлять собой полностью синтетическую последовательность шарнира, либо может быть генетически модифицирована, спроектирована или модифицирована для обеспечения желаемых и/или улучшенных свойств, например, модуляции транскрипции. Подходящие последовательности шарнирного полипептида включают, но без ограничения, последовательности, полученные из иммуноглобулинов подклассов IgA, IgD и IgG, например, шарнирный домен IgG1, шарнирный домен IgG2, шарнирный домен IgG3 и шарнирный домен IgG4, или их функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления последовательность шарнирного полипептида содержит один или более фрагментов CXXC. В некоторых вариантах осуществления последовательность шарнирного полипептида содержит один или более фрагментов CPPC. Дополнительную соответствующую информацию можно найти, например, в недавнем обзоре Vidarsson G. et al., *Frontiers Immunol.*, 20 октября 2014 г., который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит последовательность шарнирного полипептида, полученного из шарнирного домена IgG1 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит последовательность шарнирного полипептида, полученного из шарнирного домена IgG2 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит последовательность шарнирного полипептида, полученного из шарнирного домена IgG3 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит последовательность шарнирного полипептида, полученного из шарнирного домена IgG4 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит последовательность шарнирного полипептида, полученного из шарнирного домена IgA или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит последовательность шарнирного полипептида, полученного из шарнирного домена IgD или его функционального варианта.

Дополнительные последовательности шарнирного полипептида, подходящие для композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, но без ограничения, последовательности шарнирного полипептида, полученные из шарнирного домена CD8 α , шарнирного домена CD28, шарнирного домена CD152, шарнирного домена PD-1, шарнирного домена CTLA4, шарнирного домена OX40, шарнирного домена Fc γ RIII α и их функциональных вариантов. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит последовательность шарнирного полипептида, полученного из шарнирного домена CD8 α или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит последовательность шарнирного полипептида, полученного из шарнирного домена CD28 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит последовательность шарнирного полипептида, полученного из шарнирного домена OX40 или его функционального варианта. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит последовательность шарнирного полипептида, полученного из шарнирного домена IgG4 или его функционального варианта.

В принципе, отсутствуют конкретные ограничения в отношении длины и/или аминокислотного состава шарнирного домена при условии, что он придает гибкость и способность к образованию олигомеров. Однако квалифицированный специалист в данной области понимает, что длину и аминокислотный состав последовательности шарнирного полипептида можно оптимизировать для изменения ориентации и/или расстояния между ECD и TMD, а также между мономерами химерного полипептида, для достижения желаемой активности химерного полипептида по изобретению. В некоторых вариантах осуществления любой произвольный одноцепочечный пептид, содержащий примерно от одного до 100 аминокислотных остатков (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, и так далее, аминокислотных остатков), может быть использован в качестве шарнирного домена. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит примерно 5-50, примерно 10-60, примерно 20-70, примерно 30-80, примерно 40-90, примерно 50-100, примерно 60-80, примерно 70-100, примерно 30-60, примерно 20-80, примерно 30-90 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит примерно 1-10, примерно 5-15, примерно 10-20, примерно 15-25, примерно 20-40, примерно 30-50, примерно 40-60, примерно 50-70 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит примерно 40-70, примерно 50-80, примерно 60-80, примерно 70-90 или примерно 80-100 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит примерно 1-10, примерно 5-15, примерно 10-20, примерно 15-25 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или 99% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-16 и 39-42 в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-16 и 39-42. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-16 и 39-42. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-16 и 39-42. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-16 и 39-42, где один, два, три, четыре или пять из аминокислотных остатков в любой из SEQ ID NO: 12-16 и 39-42 заменен/заменены на другой аминокислотный остаток.

Трансмембранный домен (TMD).

Как описано выше, химерные полипептиды по изобретению содержат трансмембранный домен, содержащий один или более индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления.

Примеры сайтов протеолитического расщепления в рецепторе Notch (например, S2 или S3) являются такими, как описано выше. Дополнительные сайты протеолитического расщепления, подходящие для композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, но без ограничения, сайт расщепления металлопротеиназы для MMP, выбранной из коллагеназы-1, -2 и -3 (MMP-1, -8 и -13), желатиназы А и В (MMP-2 и -9), стромелизина 1, 2 и 3 (MMP-3, -10 и -11), матрилизина (MMP-7) и мембранных металлопротеиназ (MT1-MMP и MT2-MMP). Например, последовательность расщепления MMP-9 представляет собой Pro-X-X-Hy (где X представляет собой произвольный остаток; Hy, гидрофобный остаток, такой как Leu, Ile, Val, Phe, Trp, Tyr, Val, Met и Pro) (SEQ ID NO: 64), например, Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr) (SEQ ID NO: 65), например, Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser (SEQ ID NO: 66) или Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr (SEQ ID NO: 67). Другим примером подходящего сайта расщепления протеазы является сайт расщепления активатора плазминогена, например, активатора плазминогена типа урокиназы (uPA) или сайт расщепления тканевого активатора плазминогена (tPA). Другим примером подходящего сайта расщепления протеазы является сайт расщепления пролактина. Конкретные примеры последовательностей расщепления uPA и tPA включают последовательности, содержащие Val-Gly-Arg (SEQ ID NO: 68). Другим иллюстративным сайтом расщепления протеазы, который может быть включен в протеолитически расщепляемый линкер, является сайт расщепления протеазы вируса гравировки табака (TEV), например, Glu-Asn-Leu-Tyr-Thr-Gln-Ser (SEQ ID NO: 69), где протеаза расщепляет между остатками глутамина и серина. Другим примером сайта расщепления протеазы, который может быть включен в протеолитически расщепляемый линкер, является сайт расщепления энтерокиназы, например, Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID NO: 70), где расщепление происходит после остатка лизина. Другим примером сайта расщепления протеазы, который может быть включен в протеолитически расщепляемый линкер, является сайт расщепления тромбина, например, Leu-Val-Pro-Arg (SEQ ID NO: 71). Дополнительные подходящие линкеры, содержащие сайты расщепления протеазы, содержат последовательности, расщепляемые следующими протеазами: протеазой PreScission™ (слитый белок, включающий протеазу человеческого риновируса 3С и глутатион-S-трансферазу), тромбином, катепсином В, протеазой вируса Эпштейна-Барр, MMP-3 (стромелизин), MMP-7 (матрилизин), MMP-9; термолитин-подобной MMP, матриксной металлопротеиназой 2 (MMP-2), катепсином L; катепсином D, матриксной металлопротеиназой 1 (MMP-1), активатором плазминогена урокиназного типа (uPA), мембранной матриксной металлопротеиназой 1 типа (MT-MMP), стромелизином 3 (или MMP-11), термолитином, коллагеназой фибробластов и стромелизином-1, матриксной металлопротеиназой 13 (коллагеназа-3), тканевым активатором плазминогена (tPA), человеческим простатическим специфическим антигеном, калликреином (hK3), нейтрофильной эластазой и кальпаином (кальций-активируемая нейтральная протеаза). Протеазы, которые не являются естественными для клетки-хозяина, в которой экспрессируется рецептор (например, TEV), могут быть использованы в качестве дополнительного регуляторного механизма, в котором активация Шарнир-Notch невозможна до того, как протеаза будет экспрессирована или иным образом предоставлена. Кроме того, протеаза может быть ассоциирована с опухолью или ассоциирована с заболеванием (экспрессируется в гораздо большей степени, чем в нормальной ткани) и служить в качестве независимого регуляторного механизма. Например, некоторые матриксные металлопротеазы в высокой степени экспрессируются при некоторых видах рака.

Как правило, TMD, подходящий для химерных полипептидов и рецепторов Шарнир-Notch, описанных в настоящем документе, может представлять собой любой трансмембранный домен трансмембранного рецептора 1 типа, содержащий по меньшей мере один сайт расщепления γ -секретазы. Подробное описание структуры и функции комплекса γ -секретазы, а также ее субстратные белки, включая белок-предшественник амилоида (APP) и Notch, можно, например, найти в недавнем обзоре Zhang et al., *Frontiers Cell Neurosci* (2014). Неограничивающие примеры подходящих TMD из трансмембранных рецепторов 1 типа включают таковые из CLSTN1, CLSTN2, APLP1, APLP2, LRP8, APP, BTC, TGBR3, SPN, CD44, CSF1R, CXCL16, CX3CL1, DCC, DLL1, DSG2, DAG1, CDH1, EPCAM, ERHA4, EPHB2, EFNB1, EFNB2, ErbB4, GHR, HLA-A и IFNAR2, где TMD содержит по меньшей мере один сайт расщепления γ -секретазы. Дополнительные TMD, подходящие для композиций и способов, описанных в настоящем документе, включают, но без ограничения, трансмембранные домены из трансмембранных рецепторов 1 типа IL1R1, IL1R2, IL6R, INSR, ERN1, ERN2, JAG2, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNE4, KL, CHL1, PTPRF, SCN1B, SCN3B, NPR3, NGFR, PLXDC2, PAM, AGER, ROBO1, SORCS3, SORCS1, SORL1, SDC1, SDC2, SPN, TYR, TYRP1, DCT, VASN, FLT1, CDH5, PKHD1, NECTIN1, PCDHGC3, NRG1, LRP1B, CDH2, NRG2, PTPRK, SCN2B, Nradd и PTPRM. В некоторых вариантах осуществления TMD химерных полипептидов или рецепторов Notch по изобретению представляет собой TMD, полученный из TMD представителя семейства калсинтенинов, такого как алкадеин альфа и алкадеин гамма. В некоторых вариантах осуществления TMD химерных полипептидов или рецепторов Notch по изобретению представляет собой TMD, известный для рецепторов Notch. В некоторых вариантах осуществления TMD химерных полипептидов или рецепторов Notch по изобретению представляет собой TMD, полученный из другого рецептора Notch. Например, в рецепторе Шарнир-Notch на основе человеческого Notch1, Notch1 TMD может быть заменен на Notch2 TMD, Notch3 TMD, Notch4 TMD или Notch TMD от не являющегося

человеком животного, такого как *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* или *Gallus gallus*.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичность последовательности с одной или более из SEQ ID NO: 17, 77 и 78 в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 77 и 78. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 77 и 78. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую примерно 100% идентичность последовательности с одной или более из SEQ ID NO: 17, 77 и 78. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 77 и 78, где один, два, три, четыре или пять из аминокислотных остатков в любой из SEQ ID NO: 17, 77 и 78 заменен/заменены на другой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена(ы) в TMD включает одну или более замен в "GV" фрагменте TMD. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из таких замен представляет собой замену на аланин. Например, один, два, три, четыре, пять или более из аминокислотных остатков последовательности FMYVAAAFAVLLFFVCGVLLS (SEQ ID NO: 17), а также последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 77 или 78, могут быть заменены на другой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток в положении 18 и/или 19 "GV" фрагмента в SEQ ID NO: 17 заменен на другой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления остаток глицина в положении 18 в SEQ ID NO: 17 заменен на другой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления остаток валина в положении 19 в SEQ ID NO: 17 заменен на другой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 17 с мутацией в положении, соответствующем положению 18 в SEQ ID NO: 17, например, мутацией G18A. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 17 с мутацией в положении, соответствующем положению 19 в SEQ ID NO: 17, например, мутацией V19A.

Последовательность стоп-сигнала переноса.

В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды и рецепторы Шарнир-Notch по изобретению содержат последовательность стоп-сигнала переноса (STS), который представляет собой сильно заряженный домен, расположенный на С-конце TMD. Без связи с конкретной теорией, такой сильно заряженный домен, расположенный между TMD и ICD, предотвращает проникновение ICD в мембрану. STS связан с TMD и ICD в следующем порядке, в направлении от N-конца к С-концу, TMD-STS-ICD. В принципе, отсутствуют конкретные ограничения в отношении длины и/или аминокислотного состава STS. В некоторых вариантах осуществления любой производный одноцепочечный пептид, содержащий от примерно 4 до примерно 40 аминокислотных остатков (например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, и так далее, аминокислотных остатков), может быть использован в качестве STS. В некоторых вариантах осуществления STS содержит примерно 4-15, примерно 6-20, примерно 8-25, примерно 10-30, примерно 12-35, примерно 14-40, примерно 5-40, примерно 10-35, примерно 15-30, примерно 20-25, примерно 20-40, примерно 10-30, примерно 4-20 или примерно 5-25 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления STS содержит примерно 4-10, примерно 5-12, примерно 6-14, примерно 7-18, примерно 8-20, примерно 9-22, примерно 10-24 или примерно 11-26 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления STS содержит примерно 4-10 остатков, например, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков.

В некоторых вариантах осуществления STS содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности, например, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или 99% идентичность последовательности с последовательностью STS из Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, CLSTN1, CLSTN2, CSF1R, CXCL16, DAG1, GHR, PTPRF, AGER, KL, NRG1, LRP1B, Jag2, EPCAM, KCNE3, CDH2, NRG2, PTPRK, BTC, EPHA3, IL1R2 или PTPRM. В некоторых вариантах осуществления STS содержит последовательность, содержащую только Lys (K) или Arg (R) в первых 4 остатках. В некоторых вариантах осуществления STS содержит один, два, три, четыре, пять или более основных остатков. В некоторых вариантах осуществления STS содержит пять, четыре, три, два, один или ноль ароматических остатков, либо остатков с гидрофобными и/или большими по объему боковыми цепями.

В некоторых вариантах осуществления STS содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере

мере 98% или 99% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-19, 43-63, 79 и 80 в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления STS содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-19, 43-63, 79 и 80. В некоторых вариантах осуществления STS содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-19, 43-63, 79 и 80. В некоторых вариантах осуществления STS содержит аминокислотную последовательность, имеющую примерно 100% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-19, 43-63, 79 и 80. В некоторых вариантах осуществления STS содержит аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-19, 43-63, 79 и 80, где один, два, три, четыре или пять из аминокислотных остатков в любой из SEQ ID NO: 18-19, 43-63, 79 и 80 заменен/заменены на другой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления STS содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичность последовательности, например, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или 99% идентичность последовательности с последовательностью STS из Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, CLSTN1, CLSTN2, JAG2, PTPRF, LRP1B, NRG2, KCNE2, KCNE3, KCNE4, AGER, PKHD1, GHR, PTPRM, DAG1, NRG1, EPCAM, KL, PTPRK, CXCL16, или любой из перечисленных в табл. 3 и 4. В некоторых вариантах осуществления STS содержит последовательность, содержащую только Lys (K) или Arg (R) в первых 4 остатках. В некоторых вариантах осуществления STS содержит один, два, три, четыре, пять или более основных остатков. В некоторых вариантах осуществления STS содержит пять, четыре, три, два, один или ноль ароматических остатков, либо остатков с гидрофобными и/или большими по объему боковыми цепями.

Внутриклеточный домен.

Химерные полипептиды и рецепторы Шарнир-Notch по изобретению содержат регулятор транскрипции. Регулятор транскрипции по изобретению представляет собой полипептидный элемент, который действует, активируя или ингибируя транскрипцию управляемой промотором последовательности ДНК. Регуляторы транскрипции, подходящие для композиций и способов по изобретению, могут представлять собой природные регуляторы транскрипции, либо могут быть генетически модифицированными, спроектированными или модифицированными для обеспечения желаемых и/или улучшенных свойств, например, модуляции транскрипции. Как описано выше, генетически модифицированные рецепторы по настоящему изобретению обладают преимуществами в том, что они могут обеспечивать способность к запуску индивидуальной программы транскрипции в генетически модифицированных клетках. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции по изобретению представляет собой специально спроектированный регулятор транскрипции, который управляет транскрипцией конкретной последовательности, которая появляется лишь один раз в генетически модифицированной клетке.

В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции непосредственно регулирует дифференциацию клетки. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции опосредованно модулирует (например, регулирует) дифференциацию клетки путем модуляции экспрессии второго фактора транскрипции. Специалист в данной области понимает, что регулятор транскрипции может представлять собой активатор транскрипции или репрессор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции представляет собой репрессор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции представляет собой активатор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции может дополнительно содержать сигнал ядерной локализации. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции выбран из Gal4-VP16, Gal4-VP64, tetR-VP64, ZFHD1-VP64, Gal4-KRAB и NAPI-VP16. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции представляет собой Gal4-VP64.

Химерные полипептиды и рецепторы Шарнир-Notch по настоящему изобретению могут представлять собой химерные полипептиды любой длины, включая химерные полипептиды, которые, как правило, имеют длину от примерно 100 аминокислот (ак) до примерно 1000 ак, например, от примерно 100 ак до примерно 200 ак, от примерно 150 ак до примерно 250 ак, от примерно 200 ак до примерно 300 ак, от примерно 250 ак до примерно 350 ак, от примерно 300 ак до примерно 400 ак, от примерно 350 ак до примерно 450 ак, от примерно 400 ак до примерно 500 ак. В некоторых вариантах осуществления описанные химерные полипептиды, как правило, имеют длину от примерно 400 ак до примерно 450 ак, от примерно 450 ак до примерно 500 ак, от примерно 500 ак до примерно 550 ак, от примерно 550 ак до примерно 600 ак, от примерно 600 ак до примерно 650 ак, от примерно 650 ак до примерно 700 ак, от примерно 700 ак до примерно 750 ак, от примерно 750 ак до примерно 800 ак, от примерно 800 ак до примерно 850 ак, от примерно 850 ак до примерно 900 ак, от примерно 900 ак до примерно 950 ак, или от примерно 950 ак до примерно 1000 ак. В некоторых случаях химерные полипептиды по настоящему изобретению имеют длину от примерно 300 ак до примерно 400 ак. В некоторых случаях химерные полипептиды по настоящему изобретению имеют длину от примерно 300 ак до примерно 350 ак. В некоторых

случаях химерные полипептиды по настоящему изобретению имеют длину от примерно 300 ак до примерно 325 ак. В некоторых случаях химерные полипептиды по настоящему изобретению имеют длину от примерно 350 ак до примерно 400 ак. В некоторых случаях химерные полипептиды по настоящему изобретению имеют длину от 750 ак до 850 ак. В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды по настоящему изобретению имеют длину примерно 525 ак, примерно 538 ак, примерно 539 ак, примерно 542 ак, примерно 550 ак, примерно 556 ак или примерно 697 ак.

Дополнительные домены.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточные домены Notch, расположенные на N-конце TMD, могут, кроме того, содержать дополнительный домен, например, мембранный сигнал локализации, такой как сигнал CD8A, детектируемый маркер, такой как мус-метка или his-метка, и тому подобное. Без связи с конкретной теорией, может быть полезно включать дополнительные домены на N-конце шарнирного домена. Причиной этого является то, что включение больших по объему элементов (таких как NRR) вблизи TMD будет влиять на активность рецептора, если только он не находится на достаточном расстоянии. Также предусмотрено, что химерные полипептиды и рецепторы Шарнир-Notch, описанные в настоящем документе, могут быть спроектированы для включения одного или более дополнительных элементов, таких как сигнальная последовательность, детектируемая метка, опухоль-специфический сайт расщепления, специфический для заболевания сайт расщепления, или их сочетания. Например, некоторые протеазы (такие как матриксные металлопротеазы) имеют повышенную регуляцию при раке, что допускает опухоль-специфическую специфичность расщепления не за счет конкретного сайта расщепления, но за счет более высоких уровней специфических протеаз. Дополнительную соответствующую информацию можно найти, например, в публикации J.S. Dudani et al., *Annu. Rev. Cancer Biol.* (2018), 2:353-76, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид или рецептор Шарнир-Notch по изобретению содержит: (а) шарнирный домен, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 12-16 и 39-42; (b) трансмембранный домен, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 17, 77 и 78; и (с) домен последовательности стоп-сигнала переноса, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 18-19, 43-63, 79 и 80. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид или рецептор Шарнир-Notch по изобретению содержит: (а) шарнирный домен, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 12-16 и 39-42; (b) трансмембранный домен, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 17, 77 и 78; и (с) домен последовательности стоп-сигнала переноса, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 18-19, 43-63, 79 и 80. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид или рецептор Шарнир-Notch по изобретению содержит: (а) шарнирный домен, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 12-16 и 39-42; (b) трансмембранный домен, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 17, 77 и 78; и (с) домен последовательности стоп-сигнала переноса, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 18-19, 43-63, 79 и 80.

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид по изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с химерным рецептором, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, содержащим аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-8, 24-35 и 73-76, приведенных в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления химер-

связывающий домен, имеющий аффинность связывания для выбранного лиганда; (b) шарнирный домен, способствующий образованию олигомеров химерного полипептида за счет межмолекулярных дисульфидных связей; (c) трансмембранный домен, содержащий один или более индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления; и (d) внутриклеточный домен, содержащий регулятор транскрипции, где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом вызывает расщепление в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления, расположенном между регулятором транскрипции и шарнирным доменом, и где химерный полипептид не содержит повтора LIN-12-Notch (LNR) и/или домен гетеродимеризации (HD) рецептора Notch.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность встроена в экспрессионную кассету или экспрессионный вектор. Следует понимать, что экспрессионная кассета, как правило, содержит конструкцию генетического материала, которая содержит кодирующие последовательности и достаточно регуляторной информации для управления правильной транскрипцией и/или трансляцией кодирующих последовательностей в клетке-реципиенте *in vivo* и/или *ex vivo*. Как правило, экспрессионная кассета может быть встроена в вектор для нацеливания на нужную клетку-хозяина и/или нацеливания в организме индивидуума. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета по изобретению содержит кодирующую последовательность для химерного полипептида, описанного в настоящем документе, которая функционально связана для экспрессии с контрольными элементами, такими как промотор и, необязательно, любая другая последовательность нуклеиновой кислоты, или их сочетание, которые влияют на транскрипцию или трансляцию кодирующей последовательности.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность встроена в экспрессионный вектор. Специалисты в данной области понимают, что термин "вектор", в целом, относится к конструкции рекомбинантного полинуклеотида, спроектированной для переноса между клетками-хозяевами, которая может быть использована для целей трансформации, например, введения гетерологичной ДНК в клетку-хозяина. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой репликон, такой как плаزمид, фаг или космид, в который может быть встроены другой сегмент ДНК для обеспечения репликации встроенного сегмента. В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор может представлять собой интегрирующий вектор.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор может представлять собой вирусный вектор. Как понятно специалистам в данной области, термин "вирусный вектор" широко используют для обозначения либо молекулы нуклеиновой кислоты (например, переносимой плазмиды), которая включает вирусные нуклеотидные элементы, которые, в целом, способствуют переносу молекулы нуклеиновой кислоты или встраиванию ее в геном клетки, либо вирусной частицы, которая опосредует перенос нуклеиновой кислоты. Вирусные частицы, как правило, содержат помимо нуклеиновой кислоты (кислот) различные вирусные компоненты и иногда также компоненты клетки-хозяина. Термин "вирусный вектор" может относиться либо к вирусу или вирусной частице, способным к переносу нуклеиновой кислоты в клетку, либо к самой перенесенной нуклеиновой кислоте. Вирусные векторы и плазмиды для переноса содержат структурные и/или функциональные генетические элементы, которые в основном происходят из вируса. Термин "ретровирусный вектор" относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащим структурные и функциональные генетические элементы, или их фрагменты, которые в основном происходят из ретровируса. Термин "лентивирусный вектор" относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащим структурные и функциональные генетические элементы, или их фрагменты, включая LTR, которые в основном происходят из лентивируса, который представляет собой род ретровируса.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с химерным рецептором, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-8, 24-35 и 73-76, приведенных в списке последовательностей. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99%, или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере примерно 80%, 90%, 95%, 96%, 97, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полипептид с аминокислотной последова-

экспрессионным кассетам, содержащим рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую химерные рецепторы, описанные в настоящем документе. Экспрессионная кассета, как правило, содержит кодирующие последовательности и достаточно регуляторной информации для управления правильной транскрипцией и/или трансляцией кодирующих последовательностей в клетке-реципиенте *in vivo* и/или *ex vivo*. Экспрессионная кассета может быть встроена в вектор для нацеливания на нужную клетку-хозяина и/или нацеливания в организме индивидуума. Экспрессионная кассета может быть встроена в плазмиду, космиду, вирус, автономно реплицируемую полинуклеотидную молекулу, фаг, линейный или кольцевой, одноцепочечный или двухцепочечный, полинуклеотидную молекулу ДНК или РНК, полученную из любого источника, способную к интеграции в геном или к автономной репликации, включая молекулу нуклеиновой кислоты, в которой одна или более нуклеотидных последовательностей связаны для функционального взаимодействия, то есть, функционально связаны.

Настоящее изобретение также относится к векторам, плазмидам или вирусам, содержащим одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любой химерный рецептор или рецептор Шарнир-Notch, описанный в настоящем документе. Молекулы нуклеиновой кислоты могут содержаться в векторе, который способен управлять их экспрессией, например, в клетке, которая была трансформирована/трандуцирована вектором. Подходящие векторы для использования в эукариотических и прокариотических клетках известны в данной области и коммерчески доступны, или легко могут быть получены квалифицированным специалистом. Смотри, например, Sambrook, J., & Russell, D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4-е издание), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, и Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3-е издание), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (в настоящем документе имеющие общее название "Sambrook"); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley (включая дополнения до 2014 г.); Bollag, D. M. et al. (1996). *Protein Methods*. New York, NY: Wiley-Liss; Huang, L. et al. (2005). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press; Kaplitt, M. G. et al. (1995). *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*. San Diego, CA: Academic Press; Lefkovits, I. (1997). *The Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*. San Diego, CA: Academic Press; Doyle, A. et al. (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York, NY: Wiley; Mullis, K. B., Ferré, F. & Gibbs, R. (1994). *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. Boston: Birkhauser Publisher; Greenfield, E. A. (2014). *Antibodies: A Laboratory Manual* (2-е издание), New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage, S. L. et al. (2000). *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. New York, NY: Wiley, (включая дополнения до 2014 г.); и Makrides, S. C. (2003). *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V., содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки).

ДНК-содержащие векторы могут быть введены в эукариотические клетки общепринятыми методами трансформации или трансфекции. Подходящие методы трансформации или трансфекции клеток-хозяев описаны в Sambrook et al. (2012, выше) и других стандартных лабораторных руководствах по молекулярной биологии, например, трансфекция при помощи фосфата кальция, опосредуемая DEAE-декстраном трансфекция, трансфекция при помощи микроинъекции, опосредуемая катионными липидами трансфекция, электропорация, трансдукция, введение при соскабливании, баллистическое введение, нуклеопорация, гидродинамический шок и инфекция.

Вирусные векторы, которые могут быть использованы по изобретению, включают, например, ретровирусные векторы, аденовирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы, лентивирусные векторы, векторы на основе вируса герпеса, обезьяньего вируса 40 (SV40) и вируса бычьей папилломы (смотри, например, Gluzman (Ed.), *Eukaryotic Viral Vectors*, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Например, химерный рецептор, описанный в настоящем документе, может быть продуцирован в эукариотическом хозяине, например, в клетках млекопитающего (например, клетках COS, клетках NIH 3T3 или клетках HeLa). Эти клетки доступны из многих источников, включая Американскую коллекцию типовых культур (Manassas, VA). При выборе системы экспрессии следует обращать внимание на совместимость компонентов друг с другом. Квалифицированные и обычные специалисты способны ее определять. Кроме того, если требуется руководство при выборе системы экспрессии, квалифицированные специалисты могут обратиться к публикации P. Jones, "Vectors: Cloning Applications", John Wiley and Sons, New York, N.Y., 2009).

Предложенные молекулы нуклеиновой кислоты могут содержать природные последовательности или последовательности, которые отличаются от существующих в природе последовательностей, однако вследствие вырожденности генетического кода кодируют тот же полипептид, например, антитело. Эти молекулы нуклеиновой кислоты могут состоять из РНК или ДНК (например, геномной ДНК, кДНК или синтетической ДНК, такой, которая получена синтезом на основе фосфорамидита), или их сочетаний, или иметь модификации нуклеотидов в нуклеиновых кислотах этих типов. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть двухцепочечными или одноцепочечными (например, смысловая или анти-смысловая цепь).

Молекулы нуклеиновой кислоты не ограничены последовательностями, которые кодируют полипептиды (например, антитела); некоторые, или все, из не кодирующих последовательностей, располо-

женных выше или ниже кодирующей последовательности (например, кодирующей последовательности химерного рецептора), также могут быть включены. Специалистам в области молекулярной биологии знакомы обычные методы выделения молекул нуклеиновой кислоты. Они могут, например, быть получены путем обработки геномной ДНК эндонуклеазами рестрикции или путем проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). В случае, если молекула нуклеиновой кислоты представляет собой рибонуклеиновую кислоту (РНК), молекулы могут быть получены, например, путем *in vitro* транскрипции.

Рекомбинантные клетки и клеточные культуры.

Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может быть введена в клетку-хозяина, такую как, например, человеческий Т-лимфоцит, с получением рекомбинантной клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты. Соответственно, некоторые варианты осуществления изобретения относятся к способам получения рекомбинантной клетки, включающим (а) получение клетки, способной к экспрессии белка, и (б) создание контакта полученной клетки с рекомбинантной нуклеиновой кислотой по изобретению.

Введение молекул нуклеиновой кислоты по изобретению в клетки можно осуществлять методами, известными специалистам в данной области, такими как, например, вирусная инфекция, трансфекция, конъюгация, слияние протопластов, липофекция, электропорация, нуклеофекция, осаждение фосфатом кальция, опосредуемая полиэтиленгликолем (PEG) трансфекция, опосредуемая DEAE-декстраном трансфекция, опосредуемая липосомами трансфекция, технология "генной пушки", осаждение фосфатом кальция, прямая микроинъекция, опосредуемая наночастицами доставка нуклеиновой кислоты и тому подобное.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты можно доставлять при помощи вирусных или невирусных способов доставки, известных в данной области. Например, молекула нуклеиновой кислоты может быть стабильно интегрирована в геном хозяина или может эпизомально реплицироваться, или может присутствовать в рекомбинантной клетке-хозяине в виде мини-кольцевого экспрессионного вектора для временной экспрессии. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты сохраняется и реплицируется в рекомбинантной клетке-хозяине как эпизомальная единица. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты стабильно интегрируется в геном рекомбинантной клетки. Стабильная интеграция может быть достигнута с использованием классических методов случайной геномной рекомбинации или более точных методов, таких как направляемое гидРНК редактирование генома при помощи CRISPR/Cas9 или направляемое ДНК редактирование генома при помощи эндонуклеазы с использованием NgAgo (моллюска *Natronobacterium gregoryi*), или редактирование генома при помощи TALEN (эффektorных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты присутствует в рекомбинантной клетке-хозяине в виде мини-кольцевого экспрессионного вектора для временной экспрессии.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть инкапсулированы в вирусный капсид или липидную наночастицу, или могут быть доставлены вирусными или не вирусными способами доставки и способами, известными в данной области, такими как электропорация. Например, введение нуклеиновых кислот в клетки можно осуществлять путем вирусной трансдукции. В неограничивающем примере аденоассоциированный вирус (AAV) спроектирован для доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени методом вирусной трансдукции. Описаны несколько серотипов AAV, и все из известных серотипов могут инфицировать клетки из множества разных типов тканей. AAV способен трансдуцировать широкий спектр видов и тканей *in vivo* без признаков токсичности, и он вызывает относительно слабые врожденные и адаптивные иммунные ответы.

Векторные системы на основе лентивирусов также полезны для доставки нуклеиновой кислоты и генной терапии путем вирусной трансдукции. Лентивирусные векторы обладают рядом привлекательных свойств в качестве средств для доставки генов, включая: (i) непрерывную доставку генов за счет стабильной интеграции вектора в геном хозяина; (ii) способность инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки; (iii) широкий тканевый тропизм, включая важные типы клеток-мишеней для генной и клеточной терапии; (iv) отсутствие экспрессии вирусных белков после векторной трансдукции; (v) способность доставлять комплексные генетические элементы, например, полицистронные или интрон-содержащие последовательности; (vi) потенциально более безопасный профиль участка интеграции; и (vii) относительно простую систему обращения с вектором и его производства.

В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева могут быть генетически модифицированы (например, трансдуцированы или трансформированы, или трансфицированы), например, векторной конструкцией по настоящей заявке, которая может представлять собой, например, вирусный вектор или вектор для гомологичной рекомбинации, содержащий нуклеотидные последовательности, гомологичные части генома клетки-хозяина, или может представлять собой экспрессионный вектор для экспрессии интересующих полипептидов. Клетки-хозяева могут представлять собой либо нетрансформированные клетки, либо клетки, которые уже были трансфицированы по меньшей мере одной молекулой нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой прокариотиче-

скую клетку или эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой животную клетку. В некоторых вариантах осуществления животная клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления животная клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку примата. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего представляет собой иммунную клетку, нейрон, эпителиальную клетку и эндотелиальную клетку или стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку иммунной системы, например, лимфоцит (например, Т-клетку или NK-клетку) или дендритную клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой В-клетку, моноцит, клетку - естественный киллер (NK), базофил, эозинофил, нейтрофил, дендритную клетку, макрофаг, регуляторную Т-клетку, хелперную Т-клетку (T_H), цитотоксическую Т-клетку (T_{CTL}) или другую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка иммунной системы представляет собой Т-лимфоцит.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой предшественник Т-клетки или регуляторную Т-клетку (Treg). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой CD34+, CD8+ или CD4+ клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой цитотоксический CD8+ Т-лимфоцит, выбранный из группы, состоящей из необученной CD8+ Т-клетки, центральной CD8+ Т-клетки памяти, эффекторной CD8+ Т-клетки памяти и CD8+ Т-клетки из общей популяции. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой хелперный CD4+ Т-лимфоцит, выбранный из группы, состоящей из необученной CD4+ Т-клетки, центральной CD4+ Т-клетки памяти, эффекторной CD4+ Т-клетки памяти и CD4+ Т-клетки из общей популяции. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть получена путем лейкафереза, проведенного на образце, полученном от субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект является пациентом-человеком.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка также содержит первую и вторую молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, где первая молекула нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты имеют не одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка также содержит первый и второй химерные полипептиды или рецепторы Шарнир-Notch, описанные в настоящем документе, где первый химерный полипептид или рецептор Шарнир-Notch и второй химерный полипептид или рецептор Шарнир-Notch имеют не одинаковые последовательности. В некоторых вариантах осуществления первый химерный полипептид или рецептор Шарнир-Notch модулирует экспрессию и/или активность второго химерного полипептида или рецептора Шарнир-Notch.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка также содержит экспрессионную кассету, кодирующую интересующий белок, функционально связанный с промотором, где экспрессию интересующего белка модулирует химерный рецепторный регулятор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления интересующий белок является гетерологичным для рекомбинантной клетки. Гетерологичный белок представляет собой белок, который обычно не встречается в клетке, например, обычно не продуцируется клеткой. В принципе, отсутствуют конкретные ограничения в отношении подходящих белков, экспрессию которых может модулировать химерный рецепторный регулятор транскрипции. Иллюстративные типы белков, подходящих для использования с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают цитокины, цитотоксины, хемокины, иммуномодуляторы, проапоптотические факторы, антиапоптотические факторы, гормоны, факторы дифференциации, факторы дедифференциации, рецепторы иммунных клеток или репортеры. В некоторых вариантах осуществления рецептор иммунной клетки представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления рецептор иммунной клетки представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, кодирующая интересующий белок, включена в ту же молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный рецептор по изобретению. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, кодирующая интересующий белок, включена во второй экспрессионный вектор отдельно от молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор по изобретению. В другом аспекте настоящее изобретение относится к клеточным культурам, включающим по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, описанную в настоящем документе, и культуральную среду. В целом, культуральная среда может быть любой подходящей культуральной средой для культивирования клеток, описанных в настоящем документе. Методы трансформации широкого спектра вышеуказанных клеток-хозяев и биологических видов известны в данной области и описаны в технической и научной литературе. Соответственно, клеточные культуры, включающие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, описанную в настоящем документе, также входят в объем настоящего изобретения. Способы и системы, подходящие для получения и поддержания клеточных

культур, известны в данной области.

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты и рекомбинантные клетки по изобретению могут быть включены в композиции, в том числе фармацевтические композиции. Такие композиции, как правило, содержат нуклеиновые кислоты, и/или рекомбинантные клетки и фармацевтически приемлемый эксципиент, например, носитель.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в качестве инъекций, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимых компонентов) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед использованием. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, кремофор EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой степени, чтобы ее можно было легко набирать в шприц. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения, и должна быть сохранена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и тому подобное), а также их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования сурфактантов, например, додецилсульфата натрия. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто при помощи различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Во многих случаях композиция, как правило, будет содержать изотонические средства, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, и хлорид натрия. Пролонгированного действия инъекционных композиций можно добиваться путем включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним, или сочетанием, из ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. В целом, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из тех, что перечислены выше.

В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды и рецепторы Notch по изобретению также можно вводить путем трансфекции или инфекции с использованием способов, известных в данной области, включая, но без ограничения, способы, описанные в McCaffrey et al. (Nature 418:6893, 2002), Xia et al. (Nature Biotechnol. 20: 1006-10, 2002) или Putnam (Am. J. Health Syst. Pharm. 53: 151-60, 1996, исправление в Am. J. Health Syst. Pharm. 53: 325, 1996).

Способы по изобретению.

Введение любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, например, нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и фармацевтических композиций, может быть использовано для лечения пациентов от соответствующих патологических состояний здоровья или заболеваний, таких как рак и хронические инфекции. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, рекомбинантные клетки и фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть включены в терапевтические средства для применения в способах лечения индивидуума, который страдает от, который предположительно страдает от, или который может иметь риск развития, одного или более аутоиммунных нарушений или заболеваний, связанных с ингибированием контрольных точек. Иллюстративные аутоиммунные нарушения и заболевания могут включать, без ограничения, глютенчувствительную целиакию, диабет 1 типа, болезнь Грэйвса, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, псориаз, ревматоидный артрит и системную красную волчанку.

Соответственно, в одном аспекте некоторые варианты осуществления изобретения относятся к способам ингибирования активности клетки-мишени у индивидуума, включающим введение индивидууму первого терапевтического средства, включающего одно или более из нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, где первое терапевтическое средство ингибирует клетку-мишень. Например, клетка-мишень может быть ингибирована, если ее пролиферация снижается, если ее патологическое или патогенное действие уменьшается, если она разрушается или уничтожается, и так далее. Ингибирование включает уменьшение измеряемого патологического или патогенного действия на по меньшей мере примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение индивидууму эффективного количества рекомбинантных клеток, описанных в настоящем документе, где рекомбинантные клетки ингибируют активность клеток-мишеней у индивидуума. Как правило, клетки-мишени в описанных способах могут представлять собой клетки любого типа у индивидуума, и могут представлять собой, например, клетку острого миеломного лейкоза, клетку анапластической лимфомы,

клетку астроцитомы, клетку В-клеточного рака, клетку рака молочной железы, клетку рака толстой кишки, клетку эпендимомы, клетку рака пищевода, клетку глиобластомы, клетку глиомы, клетку лейомиосаркомы, клетку липосаркомы, клетку рака печени, клетку рака легких, клетку лимфомы из клеток мантийной зоны, клетку меланомы, клетку нейробластомы, клетку немелкоклеточного рака легких, клетку олигодендроглиомы, клетку рака яичника, клетку рака поджелудочной железы, клетку периферической Т-клеточной лимфомы, клетку рака почки, клетку саркомы, клетку рака желудка, клетку карциномы, клетку мезотелиомы или клетку саркомы. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является патогенной клеткой.

В другом аспекте некоторые варианты осуществления изобретения относятся к способам лечения патологического состояния здоровья (например, заболевания) у индивидуума, который нуждается в этом, включающим введение индивидууму первого терапевтического средства, включающего одно или более из рекомбинантных клеток, содержащих химерный полипептид или рецептор Шарнир-Notch, описанный в настоящем документе, и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, где первое терапевтическое средство лечит патологическое состояние здоровья у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение индивидууму первого терапевтического средства, включающего эффективное количество рекомбинантных клеток, описанных в настоящем документе, где рекомбинантные клетки лечат патологическое состояние здоровья.

В другом аспекте некоторые варианты осуществления изобретения относятся к способам содействия лечению патологического состояния здоровья (например, заболевания) у индивидуума, который нуждается в этом, включающим введение индивидууму первого терапевтического средства, включающего один или более химерных полипептидов, рецепторов Шарнир-Notch, нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, и второго терапевтического средства, где первое и второе терапевтические средства совместно лечат заболевание у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение индивидууму первого терапевтического средства, включающего эффективное количество рекомбинантных клеток, описанных в настоящем документе, где рекомбинантные клетки лечат патологическое состояние здоровья.

Введение рекомбинантных клеток индивидууму.

В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению включают введение эффективного количества рекомбинантных клеток по изобретению индивидууму, который нуждается в таком лечении. Этот этап введения может быть выполнен с использованием любого способа доставки путем имплантации, известного в данной области. Например, рекомбинантные клетки по изобретению можно вводить инфузией непосредственно в кровотоки индивидуума или иным образом вводить индивидууму.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают введение, данный термин используется взаимозаменяемо с терминами "помещение", "имплантация" и "трансплантация", рекомбинантных клеток индивидууму способом или путем введения, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в нужном участке, так что производится желаемый(ые) эффект(ы). Рекомбинантные клетки или их дифференцированное потомство можно вводить любым подходящим путем введения, который приводит к доставке в желаемый участок в организме индивидуума, где по меньшей мере часть введенных клеток или компонентов клеток остаются жизнеспособными. Продолжительность жизнеспособности клеток после введения индивидууму может составлять от всего нескольких часов, например, двадцати четырех часов, или нескольких дней, до нескольких лет или даже всей продолжительности жизни индивидуума, то есть, долгосрочное приживание.

В случае профилактического применения рекомбинантные клетки, описанные в настоящем документе, можно вводить индивидууму до появления какого-либо симптома заболевания или состояния, подлежащего лечению. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления профилактическое введение популяции рекомбинантных клеток предотвращает возникновение симптомов заболевания или состояния.

В случае терапевтического применения в некоторых вариантах осуществления рекомбинантные клетки вводят в момент (или после) начала возникновения симптома или признака заболевания или состояния, например, после начала заболевания или состояния.

Для применения в различных вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, эффективное количество рекомбинантных клеток, описанных в настоящем документе, может составлять по меньшей мере 10^2 клеток, по меньшей мере 5×10^2 клеток, по меньшей мере 10^3 клеток, по меньшей мере 5×10^3 клеток, по меньшей мере 10^4 клеток, по меньшей мере 5×10^4 клеток, по меньшей мере 10^5 клеток, по меньшей мере 2×10^5 клеток, по меньшей мере 3×10^5 клеток, по меньшей мере 4×10^5 клеток, по меньшей мере 5×10^5 клеток, по меньшей мере 6×10^5 клеток, по меньшей мере 7×10^5 клеток, по меньшей мере 8×10^5 клеток, по меньшей мере 9×10^5 клеток, по меньшей мере 1×10^6 клеток, по меньшей мере 2×10^6 клеток, по меньшей мере 3×10^6 клеток, по меньшей мере 4×10^6 клеток, по меньшей мере 5×10^6 клеток, по меньшей мере 6×10^6 клеток, по меньшей мере 7×10^6 клеток, по меньшей мере 8×10^6 клеток, по меньшей мере 9×10^6 клеток или кратные им количества. Рекомбинантные клетки могут быть получены от одного или более доноров, или могут быть получены из аутологичного источника. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные клетки размножают в культуре перед введением индивидууму, который

нуждается в этом.

В некоторых вариантах осуществления доставка композиции рекомбинантных клеток (например, композиции, содержащей множество рекомбинантных клеток, описанных в настоящем документе) индивидууму определенным способом или путем введения приводит к по меньшей мере частичной локализации клеточной композиции в нужном участке. Композицию, содержащую рекомбинантные клетки, можно вводить любым подходящим путем введения, который приводит к эффективному лечению индивидуума, например, введение приводит к доставке в нужный участок в организме индивидуума, где по меньшей мере часть доставляемой композиции, например, по меньшей мере 1×10^4 клеток, доставляется в нужный участок на определенный период времени. Способы введения включают инъекцию, инфузию, инстилляцию. "Инъекция" включает, без ограничений, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, внутрикапсульную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, интрацереброспинальную и интратеренальную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления путь введения является внутривенным. При доставке клеток доставка путем инъекции или инфузии является предпочтительным способом введения.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные клетки вводят системно, например, путем инфузии или инъекции. Например, популяцию рекомбинантных клеток вводят иначе, нежели непосредственно в целевой участок, ткань или орган, так что она поступает в кровеносную систему индивидуума и, таким образом, подвергается метаболизму и другим аналогичным биологическим процессам.

Эффективность лечения с использованием любой из композиций, предложенных в настоящем документе для лечения заболевания или состояния, может быть определена квалифицированным клиницистом. Однако специалисты в данной области понимают, что лечение считается эффективным, если любой один, либо все признаки или симптомы, или маркеры заболевания уменьшаются или ослабляются. Эффективность также может быть измерена по отсутствию ухудшения состояния индивидуума, что оценивают по снижению продолжительности госпитализации или потребности в медицинском вмешательстве (например, прогрессирование заболевания останавливается или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалистам в данной области и/или описаны в настоящем документе. Лечение охватывает любое лечение заболевания у человека или животного (некоторые неограничивающие примеры включают человека или млекопитающего) и включает: (1) ингибирование заболевания, например, остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) облегчение заболевания, например, вызывание регрессии симптомов; и (3) предотвращение или снижение вероятности развития симптомов.

Как описано выше, терапевтически эффективное количество включает количество терапевтической композиции, которое является достаточным для оказания содействия достижению определенного положительного эффекта при введении индивидууму, например, который страдает от, предположительно страдает от, или имеет риск развития, заболевания. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество включает количество, достаточное для предотвращения или задержки развития симптома заболевания, изменения развития симптома заболевания (например, но без ограничения, замедления прогрессирования симптома заболевания) или обращения вспять симптома заболевания. Понятно, что в любом конкретном случае соответствующее эффективное количество может быть определено квалифицированным специалистом в данной области с использованием обычного экспериментирования.

В некоторых вариантах осуществления описанных способов индивидуум является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является человеком. В некоторых вариантах осуществления индивидуум страдает от, или предположительно страдает от, заболевания, связанного с ингибированием клеточной сигнализации, опосредуемой лигандом или антигеном на клеточной поверхности. Заболевания, подходящие для лечения композициями и способами по изобретению, включают, но без ограничения, рак, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания и инфекционные заболевания. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак или хроническую инфекцию.

Дополнительные виды терапии.

Как описано выше, рекомбинантные клетки и фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть введены в сочетании с одним или более дополнительными видами терапии, такими как, например, химиотерапевтические средства или противораковые средства, или противораковые методы лечения. Введение "в сочетании с" одним или более дополнительными терапевтическими средствами включает одновременное (параллельное) и последовательное введение в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных терапевтических средств, химиотерапевтических средств, противораковых средств или противораковых методов лечения выбраны из группы, состоящей из химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии, терапии токсинами и хирургической операции. В настоящем документе термины "химиотерапия" и "противораковое средство" используются взаимозаменяемо. Можно использовать противораковые средства разных классов. Неограничивающие примеры включают: алкилирующие средства, антиметаболиты, антрацик-

лины, растительные алкалоиды, ингибиторы топоизомеразы, подофиллотоксин, антитела (например, моноклональные или поликлональные), ингибиторы тирозинкиназы (например, иматиниб мезилат (гливек® или глайвек®)), терапевтические гормоны, растворимые рецепторы и другие противораковые средства.

Способы модулирования активности клетки.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к различным способам модулирования активности клетки. Способы включают следующие этапы: (а) получение эффективного количества любых из рекомбинантных клеток, описанных в настоящем документе, и (b) создание контакта с выбранным лигандом, где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом вызывает расщепление в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления и высвобождает регулятор транскрипции, при этом высвобожденный регулятор транскрипции модулирует активность рекомбинантной клетки. Специалист в данной области, ознакомившись с настоящим изобретением, поймет, что раскрытые способы можно использовать *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*.

Неограничивающие иллюстративные виды активности клеток, которые можно модулировать с использованием способов, предложенных в настоящем документе, включают, но без ограничения, экспрессию генов, пролиферацию, апоптоз, не вызванную апоптозом гибель, дифференциацию, дедифференциацию, миграцию, секрецию генного продукта, клеточную адгезию и цитолитическую активность.

В некоторых вариантах осуществления высвобождаемый регулятор транскрипции модулирует экспрессию генного продукта клетки. В некоторых вариантах осуществления высвобождаемый регулятор транскрипции модулирует экспрессию гетерологичного генного продукта в клетке. Гетерологичный генный продукт представляет собой продукт, который обычно не встречается в природной клетке, например, обычно не продуцируется клеткой. Например, клетка может быть генетически модифицирована нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный генный продукт.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный генный продукт представляет собой секретуемый генный продукт. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный генный продукт представляет собой генный продукт на клеточной поверхности. В некоторых случаях гетерологичный генный продукт представляет собой внутриклеточный генный продукт. В некоторых вариантах осуществления высвобождаемый регулятор транскрипции одновременно модулирует экспрессию двух или более гетерологичных генных продуктов в клетке.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный генный продукт в клетке выбран из группы, состоящей из хемокина, рецептора хемокина, химерного антигенного рецептора, цитокина, рецептора цитокина, фактора дифференциации, фактора роста, рецептора фактора роста, гормона, метаболического фермента, полученного из патогена белка, индуктора пролиферации, рецептора, направляемой РНК нуклеазы, сайт-специфической нуклеазы, Т-клеточного рецептора (TCR), химерного антигенного рецептора (CAR), токсина, полученного из токсина белка, регулятора транскрипции, активатора транскрипции, репрессора транскрипции, регулятора трансляции, активатора трансляции, репрессора трансляции, активирующего иммунорецептора, антитела, ингибитора апоптоза, индуктора апоптоза, рекомбинантного Т-клеточного рецептора, иммуноактиватора, иммуноингибитора и ингибирующего иммунорецептора.

В некоторых вариантах осуществления высвобождаемый регулятор транскрипции модулирует дифференциацию клетки, где клетка представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, клетку-предшественник или исходную клетку.

Химерные рецепторы по изобретению демонстрируют более высокую степень экспрессии, чем стандартный рецептор SynNotch, при использовании идентичных связывающих доменов и ICD. В зависимости от пары лиганд/связывающий домен и их аффинности, химерные полипептиды или рецепторы Шарнир-Notch по изобретению могут демонстрировать повышение экспрессии на примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45% или примерно 50% в сравнении с соответствующим рецептором SynNotch.

Кроме того, химерные рецепторы по изобретению могут обеспечивать регуляцию транскрипции, которая реагирует на степень активации Т-клеток, независимую от связывания лиганда. Например, при экспрессии в Т-клетке некоторые рецепторы по изобретению обеспечивают более сильный индуцируемый лигандом сигнал, когда Т-клетка является активированной, в сравнении с индуцируемым лигандом сигналом, когда Т-клетка не является активированной. Это обеспечивает дополнительную гибкость в использовании, например, в случаях, когда необходимо усиливать или подавлять Т-клеточный ответ в активированном состоянии, несмотря на отсутствие лиганда химерного рецептора.

Системы и наборы.

Настоящее изобретение также относится к системам и наборам, включающим химерные полипептиды, рецепторы Шарнир-Notch, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные клетки или фармацевтические композиции, предложенные и описанные в настоящем документе, а также письменные инструкции для их получения и применения. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены системы и/или наборы, которые включают одно или более из: химерного полипептида, описанного в настоящем документе, рецептора Шарнир-Notch, описанного в настоя-

шем документе, рекомбинантных нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, рекомбинантных клеток, описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления системы и/или наборы по изобретению дополнительно включают один или более шприцев (в том числе предварительно заполненных шприцев) и/или катетеров (в том числе предварительно заполненных шприцев), используемых для введения индивидууму любых из предложенных химерных полипептидов, рецепторов Шарнир-Notch, рекомбинантных нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток или фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления набор может включать одно или более дополнительных терапевтических средств, которые могут быть введены одновременно или последовательно с другими компонентами набора для достижения желаемой цели, например, модулирования активности клетки, ингибирования раковой клетки-мишени или лечения патологического состояния здоровья (например, заболевания) у индивидуума, который нуждается в этом.

Любые из описанных выше систем и наборов могут дополнительно включать один или более дополнительных реагентов, где такие дополнительные реагенты могут быть выбраны из: буферов для разведения; растворов для восстановления, промывающих буферов, контрольных реагентов, контрольных экспрессионных векторов, полипептидов отрицательного контроля, полипептидов положительного контроля, реагентов для *in vitro* продуцирования полипептидов химерного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления компоненты системы или набора могут находиться в отдельных контейнерах. В некоторых других вариантах осуществления компоненты системы или набора могут быть объединены в одном контейнере.

В некоторых вариантах осуществления система или набор может дополнительно включать инструкции по применению компонентов набора для осуществления на практике способов. Инструкции для осуществления на практике способов, как правило, записаны на подходящий носитель. Например, инструкции могут быть напечатаны на субстрате, таком как бумага или пластик, и так далее. Инструкции могут присутствовать в наборах в виде вкладыша в упаковку, на этикетке контейнера из набора или его компонентов (то есть, связаны с упаковкой или внутренней упаковкой) и так далее. Инструкции могут быть представлены в виде электронного файла данных, находящегося на подходящем машиночитаемом носителе, например, CD-ROM, дискете, флэш-накопителе и так далее. В некоторых случаях фактически инструкции не присутствуют в наборе, но могут быть предусмотрены средства для получения инструкций из удаленного источника (например, через Интернет). Примером такого варианта осуществления является набор, включающий сетевой адрес, по которому можно просмотреть и/или скачать инструкции. Как и в случае с инструкциями, это средство для получения инструкций может быть записано на соответствующем субстрате.

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация или патентная заявка специально и индивидуально включена в настоящий документ посредством ссылки.

Не допускается, что какая-либо ссылка, приведенная в настоящем документе, является известным уровнем техники. В обсуждении ссылок указано то, что утверждают их авторы, и авторы изобретения оставляют за собой право оспаривать точность и уместность цитируемых документов. Следует четко понимать, что, хотя в настоящем документе даны ссылки на ряд источников информации, включая статьи из научных журналов, патентные документы и учебники, данная ссылка не является признанием того, что какой-либо из этих документов является частью общепринятых знаний в данной области техники.

Описание общих способов, приведенных в настоящем документе, предназначено исключительно для иллюстративных целей. Другие альтернативные способы и альтернативные варианты будут очевидны специалистам в данной области после изучения настоящего описания, и должны входить в объем и сферу действия настоящего изобретения.

В тексте настоящей спецификации упомянуты различные патенты, патентные заявки и другие виды публикаций (например, журнальные статьи, записи в электронных базах данных и так далее). Содержание всех патентов, патентных заявок и других публикаций, цитируемых в настоящем документе, включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

Не допускается, что какая-либо ссылка, приведенная в настоящем документе, является известным уровнем техники. В обсуждении ссылок указано то, что утверждают их авторы, и авторы изобретения оставляют за собой право оспаривать точность и уместность цитируемых документов. Следует четко понимать, что, хотя в настоящем документе даны ссылки на ряд источников информации, включая статьи из научных журналов, патентные документы и учебники; данная ссылка не является признанием того, что какой-либо из этих документов является частью общепринятых знаний в данной области техники.

Примеры

При осуществлении на практике настоящего изобретения будут использованы, если нет иных указаний, общепринятые методы молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, биохимии, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, которые хорошо известны специалистам в данной области. Такие методы подробно описаны в литературе, приведенной выше.

Дополнительные варианты осуществления описаны более подробно в следующих далее примерах,

которые приведены для иллюстрации и никоим образом не предназначены для ограничения объема или формулы настоящего изобретения.

Пример 1.

Дизайн и создание конструкций химерного рецептора и элементов ответа.

В данном примере описаны дизайн и конструирование семейства химерных рецепторов Notch. Подробную информацию о различных иллюстративных рецепторах по изобретению можно найти в табл. 1 и 2, ниже.

В табл. 1 приведено краткое описание каждого из химерных рецепторов Notch, их соответствующие компоненты, а также соответствующие идентификаторы последовательностей, приведенных в списке последовательностей. ECD: внеклеточный домен; N-JMD: N-концевой околочелювочный домен (то есть, шарнирный домен); TMD: трансмембранный домен; STS: последовательность стоп-сигнала переноса; TF: фактор транскрипции.

Таблица 1

Конструкция	Описание рецептора	ECD	N-JMD	TMD	STS	TF	Полная последовательность
pIZ341	анти-CD19scFv-CD8Шарнир-Notch1TMD-Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 1
pIZ343	анти-CD19scFv-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 2
pIZ358	анти-CD19scFv-CD28Шарнир-Notch1TMD-Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 3
pIZ359	анти-CD19scFv-IgG4Шарнир-Notch1TMD-Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 4
pIZ360	анти-CD19scFv-OX40-Notch1TMD-Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 5
pIZ361	анти-CD19scFv-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 6
pIZ343FYIA	анти-ALPPL2scFv-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Gal4VP64	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 7
pIZ343eGFP	eGFP-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Gal4VP64	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 8
pIZ342	анти-CD19scFv-CD8Шарнир1-Notch1TMD-Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 24
pIZ362	анти-CD19scFv-CD8Шарнир3-Notch1TMD-Notch1STS-Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 25

pIZ363	анти-CD19scFV- CD8Шарнир4- Notch1TMD- Notch1STS- Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 26
pIZ361FYIA	анти-ALPPL2scFv- CD8Шарнир2- Notch1TMD- Notch2STS- Gal4VP64	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 27
pIZ343BCMA	анти-BCMAscFV- CD8Шарнир2- Notch1TMD- Gal4VP64	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 28
pIZ361BCMA	анти-BCMAscFV- CD8Шарнир2- Notch1TMD- Notch2STS- Gal4VP64	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 29
pIZ343(4D5-8)	анти- Her2scFV_4D5-8- CD8Шарнир2- Notch1TMD- Gal4VP64	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 30
pIZ361(4D5-8)	анти- Her2scFV_4D5-8- CD8Шарнир2- Notch1TMD- Notch2STS- Gal4VP64	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 31
pIZ343(4D5-7)	анти- Her2scFV_4D5-7- CD8Шарнир2- Notch1TMD- Gal4VP64	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 32
pIZ361(4D5-7)	анти- Her2scFV_4D5-7- CD8Шарнир2- Notch1TMD- Notch2STS- Gal4VP64	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 33
pRay068A	анти- BCMA_FHVN33- CD8Шарнир2- Notch1TMD- Notch2STS- Gal4VP64	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 34
pRay068B	анти- BCMA_FHVN33- CD8Шарнир5- Notch1TMD- Notch2STS- Gal4VP64	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 35
pIZ370	анти-CD19scFv- CD8Шарнир2- CLSTN1TMD- CLSTN1STS- Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 73

pIZ371	анти-CD19scFv- CD8Шарнир2- CLSTN2TMD- CLSTN2STS- Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 74
pTMD201	анти-CD19scFv- CD8Шарнир2- CLSTN1TMD- Notch1STS- Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 75
pTMD202	анти-CD19scFv- CD8Шарнир2- CLSTN2TMD- Notch1STS- Gal4VP64	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 76

В табл. 2 приведено краткое описание каждого из химерных рецепторов Notch и их соответствующие компоненты (компоненты разделены запятыми). Если нет иных указаний, информация относится к белку человеческого происхождения. Например, "Notch1, Notch1" указывает на то, что две последовательности из Notch1 были слиты для получения этого белкового модуля.

Таблица 2

Конструкция	Описание рецептора	ECD	N-JMD	TMD	STS	TF
pIZ341	анти-CD19 scFv, связанный с hsNotch1TMD_Gal4VP64 с полным шарниром CD8	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	Шарнир CD8	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ343	анти-CD19 scFv, связанный с hsNotch1TMD_Gal4VP64 с укороченным шарниром CD8, один цистеин	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ358	анти-CD19 scFv, связанный с hsNotch1TMD_Gal4VP64 с шарниром CD28	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	Шарнир CD28	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ359	анти-CD19 scFv, связанный с hsNotch1TMD_Gal4VP64 с шарниром IgG4	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	(GGGGS) 3 Шарнир IgG4	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ360	анти-CD19 scFv, связанный с hsNotch1TMD_Gal4VP64 с тримером шарнира OX40	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	Шарнир OX40	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ361	pIZ343 с заменой Notch1 STS человека на Notch2 STS	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch2	Gal4, VP64
pIZ343FYIA	анти-ALPPL2 scFv(FYIA), связанный с hsNotch1TMD_Gal4VP64 с укороченным шарниром CD8, один цистеин	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-ALPPL2 scFv	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch1	Gal4, VP64

pIZ343eGFP	pIZ343 с внеклеточным доменом GFP	Сигнальный пептид IgKVIII мыши, eGFP	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ342	анти-CD19 scFv, связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с укороченным шарниром CD8, без цистеина	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ362	анти-CD19 scFv, связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с N-укороч. шарниром CD8, один цистеин	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	N-укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ363	анти-CD19scFv, связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с N-укороч. шарниром CD8, два цистеина	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	N-укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ361FYIA	анти-ALPPL2 scFv(FYIA), связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с укороченным шарниром CD8, один цистеин, Notch2 STS	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-ALPPL2 scFv	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch2	Gal4, VP64
pIZ343BCMA	анти-BCMA scFv, связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с укороченным шарниром CD8, один цистеин	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-BCMA scFv	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ361BCMA	анти-BCMA scFv, связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с укороченным шарниром CD8, один цистеин, Notch2 STS	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-BCMA scFv	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch2	Gal4, VP64
pIZ343(4D5-8)	анти-Her2 scFv (4D5-8), связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с укороченным шарниром CD8, один цистеин	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-HER2 scFv	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ361(4D5-8)	анти-Her2 scFv (4D5-8), связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с укороченным шарниром CD8, один цистеин, Notch2 STS	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-HER2 scFv	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch2	Gal4, VP64

pIZ343(4D5-7)	анти-Her2 scFV (4D5-7), связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с укороченным шарниром CD8, один цистеин	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-HER2 scFv	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch1	Gal4, VP64
pIZ361(4D5-7)	анти-Her2 scFV (4D5-7), связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с укороченным шарниром CD8, один цистеин, Notch2 STS	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-HER2 scFv	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch2	Gal4, VP64
pRay068A	анти-BCMA полностью гуманизованный домен VH, связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с укороченным шарниром CD8, один цистеин, Notch2 STS	Сигнальный пептид CD8a, анти-BCMA домен VH	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch2	Gal4, VP64
pRay068B	анти-BCMA полностью гуманизованный домен VH, связанный с hsNotch1TMD_Gal4 VP64 с укороченным шарниром CD8, один цистеин, Notch2 STS	Сигнальный пептид CD8a, анти-BCMA домен VH	укороч. шарнир CD8	Notch1	Notch2	Gal4, VP64
pIZ370	анти-CD19scFv-CD8Шарнир2-CLSTN1TMD-CLSTN1STS-Gal4VP64	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	укороч. шарнир CD8	CLST N1	CLSTN 1	Gal4, VP64
pIZ371	анти-CD19scFv-CD8Шарнир2-CLSTN2TMD-CLSTN2STS-Gal4VP64	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	укороч. шарнир CD8	CLST N2	CLSTN 2	Gal4, VP64
pTMD201	анти-CD19scFv-CD8Шарнир2-CLSTN1TMD-Notch1STS-Gal4VP64	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	укороч. шарнир CD8	CLST N1	Notch1	Gal4, VP64
pTMD202	анти-CD19scFv-CD8Шарнир2-CLSTN2TMD-Notch1STS-Gal4VP64	Сигнальный пептид CD8a, мусметка, анти-CD19 scFv	укороч. шарнир CD8	CLST N2	Notch1	Gal4, VP64

Химерные рецепторы, описанные в табл. 1-2, выше, были созданы путем слияния одноцепочечного антигенсвязывающего фрагмента (scFv), узнающего CD19 (Porter DL et al., 2011), ALPPL2 (FYIA), BCMA, Her2, или анти-BCMA полностью гуманизованного домена VH, с соответствующим каркасом рецептора и синтетическим регулятором транскрипции GAL4-VP64. Для конструирования этих рецепторов фрагменты ДНК, кодирующие аминокислотные последовательности, приведенные в табл. 1 и списке последовательностей, были ПЦР-амплифицированы из синтезированных генных фрагментов или плазмид, содержащих последовательность ДНК для указанного белка, и сгруппированы с использованием стандартных методов клонирования (например, ПЦР с липкими концами, ПЦР с перекрывающимися

праймерами и клонирования со слиянием) с фланкирующими последовательностями начала и остановки трансляции, в сайт клонирования BamHI лентивирусного экспрессионного вектора pHR-SIN-pGK (L. Morsut et al., Cell (2016) 164:780-91; плаزمида № 76120 Addgene).

Регулятор транскрипции GAL4-VP64, используемый в этих экспериментах, содержал ДНК-домен из дрожжевого фактора транскрипции GAL4, слитый с доменом активации VP64, который состоит из тетрамерного повтора минимального домена активации (аминокислоты 437-447) белка VP16 вируса простого герпеса. Как показано в табл. 2, большинство иллюстративных рецепторов содержали N-концевой сигнальный пептид CD8 α (MALPVTALLLPLALLLHAARP) (SEQ ID NO: 21) для нацеливания на мембрану, при этом один иллюстративный рецептор (pIZ343eGFP) содержал сигнальный пептид IgKVIII мыши. Кроме того, большинство иллюстративных рецепторов содержали мус-метку (EQKLISEEDL) (SEQ ID NO: 22) для соответствующего определения поверхностной экспрессии при помощи антитела, конъюгированного с флуоресцентным красителем (α -мус A647®, Cell Signaling Technology, каталожный № 2233). Каждый из рецепторов был клонирован в модифицированный лентивирусный вектор pHR'SIN:CSW (KT Roybal et al., Cell 2016 Oct 6; 167(2):419-32), содержащий промотор фосфолипидкиназы (PGK), для всех экспериментов с первичными Т-клетками, описанными в примерах 3-4, ниже.

Вектор pHR'SIN:CSW также был модифицирован для продуцирования плазмид элементов ответа. Для этой цели пять копий последовательности-мишени для связывания домена DBD GAL4 (GGAGCACTGTCTCCGAACG) (SEQ ID NO: 23) были клонированы в 5'-направлении от минимального промотора рубTATA. В плазмиды элементов ответа также включен промотор PGK, который конститутивно управляет экспрессией желтого флуоресцентного белка-репортера (mCitrine), для удобной идентификации успешно трансдуцированных Т-клеток.

Для конструирования всех индуцируемых векторов BFP, кодирующую последовательность синего флуоресцентного белка-репортера (BFP) клонировали через сайт BamHI в сайт множественного клонирования, расположенный в 3'-направлении от элементов ответа GAL4. Для конструирования всех индуцируемых векторов CAR, CAR были маркированы на С-конце зеленым флуоресцентным белком-репортером (GFP) и были клонированы через сайт BamHI в сайт множественного клонирования, расположенный в 3'-направлении от элементов ответа GAL4. Все конструкции были клонированы с использованием набора для клонирования (In-Fusion® cloning, Clontech № ST0345) в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 2.

Выделение и культивирование первичных человеческих Т-клеток.

В данном примере описано выделение и культивирование первичных человеческих Т-клеток, которые были впоследствии использованы в различных экспериментах с трансдукцией клеток, описанных ниже в примере 3.

В этих экспериментах первичные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки были выделены из крови после афереза и обогащены путем отрицательной селекции с использованием наборов для выделения человеческих Т-клеток (коктейль для обогащения по человеческим CD4⁺ или CD8⁺ клеткам; STEMCELL Technologies, каталожные №№ 15062 и 15063). Кровь была получена из Центров переливания крови Тихоокеанского региона (San Francisco, CA) в соответствии с протоколом, утвержденным Советом по институциональному контролю университета. Т-клетки были криоконсервированы в ростовой среде (RPMI-1640, UCSF cell culture core) с 20% человеческой АВ сывороткой (Valley Biomedical Inc., № HP1022) и 10% DMSO. После размораживания Т-клетки культивировали в среде для человеческих Т-клеток, содержащей X-VIVO™ 15 (Lonza № 04-418Q), 5% человеческую АВ сыворотку и 10 мМ нейтрализованный N-ацетил-L-цистеин (Sigma-Aldrich № A9165), с добавлением 30 единиц/мл IL-2 (NCI BRB Preclinical Repository), для всех экспериментов.

Пример 3.

Человеческие Т-клетки были стабильно трансдуцированы лентивирусными векторами.

В примере описан общий протокол, используемый для лентивирусной трансдукции человеческих Т-клеток, если иное не указано в настоящей спецификации.

Как правило, лентивирусные векторы, псевдотипированные белком G оболочки вируса везикулярного стоматита (VSV-G) (пантропические векторы), получали путем трансфекции Lenti-X™ клеток 293T (Clontech № 11131D) трансгенным экспрессионным вектором pHR'SIN:CSW и вирусными упаковывающими плазмидами pCMVdR8.91 и pMD2.G с использованием Mirus TransIT®-Lenti (Mirus, № MIR 6606). Как правило, первичные Т-клетки размораживали в тот же день и, через 24 часа культивирования, стимулировали гранулами со связанными на поверхности анти-CD3 и анти-CD28 антителами (Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads®, Life Technologies № 11131D) при соотношении клетки:гранулы, составляющем 1:3. Через 48 часов вирусный супернатант собирали, и первичные Т-клетки подвергали воздействию вируса в течение 24 часов. В день 5 после стимуляции Т-клеток гранулы извлекали, и Т-клетки размножали до дня 14, когда они переходили в состояние покоя и могли быть использованы в анализах. Т-клетки сортировали для анализов при помощи проточного цитометра Beckton Dickinson (BD Biosciences) FACS Aria™ II. AND-гейт Т-клетки, демонстрирующие базовую экспрессию CAR, отбирали

во время сортировки.

Пример 4.

Стимуляция первичных Т-клеток *in vitro*.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации стимуляции первичных Т-клеток *in vitro* при помощи химерных полипептидов Шарнир-Notch, описанных в настоящем документе, если иное не указано в настоящей спецификации.

Для всех *in vitro* стимуляций Т-клеток 1×10^5 Т-клеток культивировали совместно с клетками-отправителями сигнала в соотношении 1:1 в плоскостных 96-луночных планшетах для культивирования тканей. Культуры анализировали через 24 часа на активацию репортера, используя BD Fortessa™ X-50. Все результаты проточной цитометрии анализировали с использованием программы FlowJo™ (TreeStar, Inc.).

Пример 5.

Дизайн, экспрессия и активация рецептора Шарнир CD8-Notch в первичных CD4⁺ Т-клетках.

В данном примере описан дизайн рецепторов Шарнир CD8-Notch и результаты экспериментов, проведенных для оценки их экспрессии и активации в первичных CD4⁺ Т-клетках. Были сконструированы два варианта рецепторов Шарнир CD8-Notch. Как показано на фиг. 2А, на левой панели представлен иллюстративный рецептор SynNotch1, который был разработан на основе человеческого белка Notch1. На средней панели схематически представлен иллюстративный рецептор Шарнир CD8-Notch1. В сравнении с рецептором SynNotch1 на левой панели в рецепторах Шарнир CD8-Notch1 NRR заменена шарнирным доменом CD8, содержащим остатки цистеина, которые, как известно, образуют дисульфидные связи. На правой панели схематически представлены иллюстративные рецепторы укороченный Шарнир CD8-Notch1 (укорШарнир CD8-Notch1). В сравнении с рецепторами Шарнир CD8-Notch1, рецепторы укорШарнир CD8-Notch1 имеют С-концевую делецию последовательности шарнира CD8, с оставшимся одним остатком цистеина и более короткой внеклеточной областью. На фиг. 2В представлены полученные методом проточной цитометрии данные по экспрессии рецепторов. В этих экспериментах первичные человеческие Т-клетки активировали анти-CD3/анти-CD28 гранулами Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, экспрессирующими либо рецептор, либо конструкцию транскрипционного репортера. Экспрессию рецептора определяли с использованием AlexaFluor647-маркированного анти-мус антитела (Cell Signaling). Экспрессию репортера определяли на основании конститутивного гена mCitrine, присутствующего в плазмиде репортера. Дважды положительные клетки отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. На фиг. 2С представлены результаты тестирования активации рецепторов. В этих экспериментах 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или 1×10^5 CD19+ клеток K562 (нижняя кривая) в течение 24 часов. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). Результаты, описанные в данном примере, показывают, что как рецептор Шарнир CD8-Notch, так и рецептор укорШарнир CD8-Notch1 экспрессировались в первичных CD4⁺ Т-клетках.

Пример 6.

Активация рецепторов с шарниром CD8 со стимуляцией Т-клеток.

В данном примере описаны результаты экспериментов, проведенных для демонстрации активации гена, опосредованной рецепторами Шарнир CD8-Notch, описанными в настоящем документе, с одновременной активацией Т-клеток. Эти эксперименты были проведены с использованием тех же вариантов рецептора Шарнир CD8-Notch, которые описаны выше в примере 5. Результаты тестирования активации рецепторов с одновременной активацией Т-клеток представлены на фиг. 3В. В этих экспериментах для стимуляции активации Т-клеток использовали анти-МСАМ, анти-CD3 биспецифические Т-клеточные активаторы (МСАМ ViTE®), которые активируют Т-клеточный рецептор в присутствии клеток K562. 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали совместно с: МСАМ ViTE® (верхняя кривая), 1×10^5 клеток K562+МСАМ ViTE® (средняя кривая) или 1×10^5 CD19+ клеток K562+МСАМ ViTE® (нижняя кривая) в течение 24 часов. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). Результаты, описанные в данном примере, показывают, что как рецептор Шарнир CD8-Notch, так и рецептор укорШарнир CD8-Notch1, могут активировать транскрипцию с одновременной активацией Т-клеток, или без нее.

Пример 7.

Оптимизация шарнира CD8.

В данном примере описаны результаты экспериментов, проведенных для оптимизации шарнирного домена CD8 в контексте химерных рецепторов Notch. Были протестированы четыре варианта шарнирного домена CD8: укорШарнир CD8 1, укорШарнир CD8 2, укорШарнир CD8 3 и укорШарнир CD8 4. Структурные различия между этими вариантами шарнирного домена CD8 показаны на фиг. 4А, где шарнирные компоненты обозначены "a", "b", "c" и "d". Компонент "a" представляет собой область, N-

концевую относительно первого остатка цистеина. Компонент "b" представляет собой первый остаток цистеина. Компонент "c" представляет собой область между первым и вторым остатками цистеина. Компонент "d" представляет собой второй остаток цистеина и область от второго остатка цистеина до трансмембранного домена рецептора. На фиг. 4B представлены результаты тестирования активации рецепторов на Т-клетках Jurkat. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). На фиг. 4C представлена количественная оценка % BFP-положительных клеток из данных На фиг. 4B. Результаты, описанные в данном примере, показывают, что все четыре варианта шарнирного домена CD8 могут активировать транскрипцию, на основании измерений уровней экспрессии BFP. Однако рецепторы укорШарнир CD8 1 и 2-Notch1 оптимальны в том смысле, что они активируют транскрипцию до высоких уровней с лигандом и демонстрируют минимальную независимую от лиганда регуляцию транскрипции (фиг. 4B).

Пример 8.

Тестирование активации рецепторов укорШарнир CD8 2 с одновременной сигнализацией PKC.

В данном примере описаны результаты экспериментов, проведенных для тестирования активации гена, опосредованной рецептором укорШарнир CD8 2, описанным выше в примере 7, с одновременной сигнализацией PKC. В этих экспериментах для стимуляции сигнализации PKC добавляли форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA), аналог DAG. Как показано На фиг. 5, 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или с 1×10^5 CD19+ клеток K562 (нижняя кривая) в течение 24 часов, с добавлением или без добавления PMA. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). Результаты, описанные в данном примере, показывают, что укорШарнир CD8 2-Notch1 может активировать транскрипцию с одновременной сигнализацией PKC или без нее.

Пример 9.

Тестирование шарнирных доменов из альтернативных источников.

В данном примере описаны результаты экспериментов, проведенных с рецепторами Шарнир-Notch, содержащими альтернативные шарнирные домены, полученные из других источников. В этих экспериментах рецепторы Шарнир-Notch были сконструированы с шарнирным доменом, полученным из CD28, OX40 и IgG4 (смотри, например, фиг. 6A). Были протестированы четыре иллюстративных рецептора Шарнир-Notch: pIZ343 (укороченный Шарнир CD8-Notch), pIZ358 (Шарнир CD28-Notch), pIZ360 (Шарнир OX40-Notch), pIZ359 (Шарнир IgG4-Notch). Краткое описание каждого из рецепторов Шарнир-Notch приведено в табл 2. Как показано На фиг. 6B, каждая из конструкций Шарнир-Notch: pIZ343 (укороченный Шарнир CD8-Notch), pIZ358 (Шарнир CD28-Notch), pIZ360 (Шарнир OX40-Notch), pIZ359 (Шарнир IgG4-Notch) была способна стимулировать первичные Т-клетки, что было определено по экспрессии гена-репортера BFP. Полученные ранее положительные по содержанию репортера Т-клетки линии Jurkat трансдуцировали конструкцией рецептора. Экспрессию рецептора определяли с использованием AlexaFluor647-маркированного анти-мус антитела (Cell Signaling). Для тестирования активации рецепторов 1×10^5 Т-клеток Jurkat, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или с 1×10^5 CD19+ клеток K562 (нижняя кривая) в течение 24 часов. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). На фиг. 6B представлена количественная оценка % BFP-положительных клеток из результатов тестирования на фиг. 6A. Эксперименты, описанные в данном примере, показывают, что помимо CD8A, и другие полезные шарнирные домены могут быть получены из альтернативных источников, таких как, CD28, OX40 и IgG4.

Пример 10.

Тестирование рецепторов Шарнир-Notch, содержащих альтернативные узнающие лиганд домены.

В данном примере описаны результаты экспериментов, проведенных для тестирования рецепторов Шарнир-Notch, содержащих альтернативные узнающие лиганд домены.

Как показано на фиг. 7A, помимо анти-CD19 scFV, анти-ALPPL2 scFV и eGFP также были использованы в качестве узнающих лиганд доменов. Как показано на фиг. 7B, полученные ранее положительные по содержанию репортера Т-клетки линии Jurkat трансдуцировали конструкцией рецептора. Экспрессию рецептора определяли с использованием AlexaFluor647-маркированного анти-мус антитела (Cell Signaling). Для тестирования активации рецепторов 1×10^5 Т-клеток Jurkat, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или с 1×10^5 ALPPL2+ клеток K562/ 1×10^5 клеток K562, экспрессирующих анти-GFP нанотело на клеточной поверхности (нижняя кривая), в течение 24 часов. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). Эксперименты, описанные в данном примере, показывают, что помимо CD19, и другие полезные узнающие лиганд домены могут быть получены из альтернативных источников.

Пример 11.

Тестирование рецепторов Шарнир-Notch, содержащих альтернативные последовательности стоп-сигнала переноса (STS).

В данном примере описаны результаты экспериментов, проведенных для тестирования рецепторов Шарнир-Notch, содержащих альтернативные STS.

Как показано на фиг. 8А, помимо Notch1 STS, и другие STS (например, Notch2 STS, Notch4 STS, DAG STS, PTPRF STS и KL STS) могут быть использованы для оказания влияния на поведение рецепторов. В этих экспериментах первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, экспрессирующими либо рецептор, либо конструкцию транскрипционного репортера. Положительные по наличию рецептора/репортера клетки отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Для тестирования 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или с 1×10^5 CD19+ клеток K562 (нижняя кривая) в течение 24 часов. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). На фиг. 8В представлена количественная оценка данных по активации на фиг. 8А. Эксперименты, описанные в данном примере, показывают, что помимо Notch1 STS, и другие полезные последовательности стоп-сигнала переноса могут быть получены из альтернативных источников.

Пример 12.

Получение Т-клеток Jurkat с репортером.

В данном примере описано получение Т-клеток Jurkat с репортером, которые были впоследствии использованы для тестирования различных рецепторов Шарнир-Notch, описанных в настоящем документе.

В этих экспериментах Т-клетки Jurkat E6-1 (ATCC № TIB-152) были трансдуцированы лентивирусом с плазмидой репортера, несущей индуцируемый ген-репортер BFP и конститутивный ген-репортер mCitrine, как описано ранее (К.Т. Roibal et al., Cell, 164:1-10, 2016). Положительные по наличию репортера клетки Jurkat отбирали на наличие экспрессии mCitrine при помощи проточного цитометра Beckton Dickinson (BD Biosciences) FACSAria™ II и размножали.

Лентивирусные частицы получали с экспрессионным вектором трансгена рецептора, как описано ранее (L. Morsut et al., Cell (2016) 164: 780-91). Положительные по наличию репортера клетки Jurkat трансдуцировали отдельными рецепторами и размножали для проведения экспериментов в 96-луночных планшетах.

Пример 13.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации стимуляции Т-клеток Jurkat in vitro за счет полипептидов Шарнир-Notch, описанных в настоящем документе.

Были протестированы четыре варианта Шарнир CD8-Notch. На фиг. 4А схематически представлены четыре укороченных варианта Шарнир CD8-Notch, содержащие один или более шарнирных компонентов. На фиг. 4В представлены результаты экспериментов, проведенных для тестирования активации рецепторов в Т-клетках Jurkat. В этих экспериментах полученные ранее положительные по содержанию репортера Т-клетки линии Jurkat трансдуцировали каждым из вариантов Шарнир CD8-Notch. Экспрессию рецептора определяли с использованием AlexaFluor647-маркированного анти-мус антитела (Cell Signaling). Для тестирования активации рецепторов 1×10^5 Т-клеток Jurkat, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или с 1×10^5 CD19+ клеток K562 (нижняя кривая) в течение 24 часов. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). На основании данного тестирования было определено, что укороченный Шарнир CD8 2 имеет оптимальную конфигурацию, и он был использован в последующих исследованиях. На фиг. 4С представлена количественная оценка % BFP-положительных клеток из данных на фиг. 4В (без дополнительных клеток, с клетками K562, с клетками CD19+ K562). На фиг. 4D представлен график соотношения сигнал:шум из данных на фиг. 4В. Значения для Т-клеток Jurkat, стимулированных CD19+ K562, делили на значения для Т-клеток Jurkat, стимулированных клетками K562.

Пример 14.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для оптимизации химерных полипептидов Шарнир CD8-Notch, описанных в настоящем документе.

Были получены несколько иллюстративных укороченных вариантов шарнира CD8. Как показано на фиг. 9А, иллюстративные варианты содержат либо полноразмерную, либо укороченную форму последовательности GTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 12), соответствующей домену N-JMD конструкции pIZ341. Черными полосами указаны аминокислоты, составляющие каждый вариант. В результате, вариантами для сравнения на фиг. 9А-9С являются: "Полноразмерный" вариант, содержащий SEQ ID NO: 12; "Укороченный 1" вариант, содержащий SEQ ID NO: 39; "Укороченный 2" вариант, содержащий SEQ ID NO: 13; "Укороченный 3" вариант, содержащий SEQ ID NO: 40; и "Укороченный 4" вариант, содержащий SEQ ID NO: 41. Сравнение экспрессии этих вариантов шарнира CD8 показано на фиг. 9В. В частности, первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей вариант рецептора с укороченным шарниром, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер BFP плюс анти-ALPPL2 CAR. Клетки, содержащие обе конструк-

ции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. На левых пяти панелях фиг. 9В показаны относительные уровни экспрессии каждого рецептора, измеренные путем окрашивания антителами против тус-метки (ось у), против уровней экспрессии конструкции репортера, измеренных при помощи GFP (ось х). На самой правой панели Фиг. 9В показана количественная оценка в виде СИФ экспрессии рецепторов с вариантами шарнира CD8 в дважды положительных клетках. Как показано сверху вниз на каждой панели фиг. 9С, Т-клетки, экспрессирующие анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), с ALPPL2+ клетками K562 (вторая сверху кривая), с CD19+ клетками K562 (третья сверху кривая) или ALPPL2+ CD19+ клетками (нижняя кривая). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

Пример 15.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации активации конструкций Шарнир-Notch с разными лиганд-связывающими доменами и их зависимость от протеолитической активности протеаз ADAM и гамма-секретазы.

Были получены три иллюстративные конструкции Шарнир-Notch, включая одну конструкцию, имеющую анти-CD19 scFv в качестве узнающего лиганд домена и домен Notch2 STS, другую конструкцию, имеющую анти-LaG17 нанотело в качестве узнающего лиганд домена и домен Notch2 STS, и третью конструкцию, имеющую внеклеточный домен eGFP и домен Notch1 STS. Первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей шарнирный рецептор с указанным вариантом укороченной связывающей головки, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер (фиг. 10). Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Для тестирования 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, культивировали совместно с 1×10^5 клеток K562 (верхняя кривая), 1×10^5 лиганд+ клеток K562 (вторая сверху кривая), 1×10^5 лиганд+ клеток K562 с ингибитором ADAM10 (третья сверху кривая) или 1×10^5 лиганд+ клеток K562 с ингибитором гамма-секретазы, DAPT (нижняя кривая). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

Пример 16.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации характеристик активации иллюстративных конструкций Notch2 STS Шарнир-Notch с расширенным набором лиганд-связывающих доменов.

Тестирование проводили для разных связывающих головок против антигена BCMA. Первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей шарнирный рецептор, рецептор Шарнир-Notch с указанной связывающей головкой, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Для тестирования 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, культивировали без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 1×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или с 1×10^5 BCMA+ клеток K562 (нижняя кривая) в течение двух дней (фиг. 11А). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). На фиг. 11А на левой панели представлена конструкция со связывающей головкой анти-BCMA scFv, на средней панели представлена конструкция со связывающей головкой анти-BCMA полностью гуманизированным VH, и на правой панели представлена конструкция со связывающей головкой анти-BCMA полностью гуманизированным VH с шарнирным доменом, оптимизированным для связывающего домена (Шарнир 5).

Аналогичным образом тестировали связывающую головку SIRP α . Первичные человеческие CD8+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей шарнирный рецептор, рецептор Шарнир-Notch с указанной связывающей головкой, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Для тестирования 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, культивировали без дополнительных клеток (синий цвет) или с 1×10^5 клеток K562, как указано (красный цвет) в течение двух дней (фиг. 11В). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

Тестировали и сравнивали разные scFv против антигена HER2. Первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей шарнирный рецептор, рецептор Шарнир-Notch с указанной связывающей головкой, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Для тестирования 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, культивировали без дополнительных клеток (верхняя кривая), с

прикрепляющимися Т-клетками НЕК 293 (вторая сверху кривая), прикрепляющимися клетками MBMDA-468 (третья сверху кривая), прикрепляющимися клетками MCF7 (четвертая сверху кривая) или прикрепляющимися клетками SKBR3 (нижняя кривая) в течение двух дней (фиг. 11С). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). На фиг. 11С, на левой панели представлена связывающая головка анти-HER2 4D5-7 scFv, а на правой панели представлена связывающая головка анти-HER2 4D5-8 scFv.

Пример 17.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для сравнения активации вариантов Шарнир-Notch с разными промоторами и доменами STS. Для тестирования 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали без дополнительных клеток (верхняя кривая), с 1×10^5 ALPPL2+ клеток K562 (вторая сверху кривая), с 1×10^5 CD19+ клеток K562 (третья сверху кривая) или с 1×10^5 ALPPL2+ CD19+ клеток K562 (нижняя кривая) (фиг. 12). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). Для сравнения включали активацию с использованием мышиных и человеческих оригинальных конструкций *synNotch*.

Пример 18.

В данном примере описан мутационный анализ трансмембранного домена (TMD) Notch1 в конструкциях Шарнир-Notch.

Были получены варианты с разными мутациями на аланин в домене TMD конструкции Шарнир-Notch. Каждый аминокислотный остаток от положения 301 (F) до положения 322 (S) в TMD в Шарнир-Notch был индивидуально мутирован на аланин. Первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей мутантный вариант TMD, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер BFP. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. На фиг. 13А на левой панели показана относительная экспрессия разных рецепторов, измеренная путем окрашивания антителами против анти-тус-метки (ось у), против экспрессии конструкции маркерного репортера (ось х), а на правой панели представлена количественная оценка в виде СИФ экспрессии рецептора с мутантными вариантами TMD в дважды положительных клетках.

Как показано на фиг. 13В, Т-клетки, экспрессирующие анти-CD19 рецепторы, совместно культивировали в соотношении 1:1 с контрольными CD19(-) или CD19(+) клетками K562. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). На левой панели показаны полученные методом проточной цитометрии профили активации. Правая панель представляет % BFP в виде линейного графика. Результаты демонстрируют важность остатков глицина (G) и валина (V) в С-концевом участке TMD.

Пример 19.

В данном примере описан мутационный анализ трансмембранного домена (TMD) и домена STS в конструкциях Шарнир-Notch.

В данном примере использовали иллюстративные рецепторы Шарнир-Notch четырех типов (SEQ ID NO: 73-76), все из которых содержат анти-CD19 scFv домен, укороченный домен шарнира CD8 и домен Gal4VP64. Для выбора доменов STS и TMD четыре конструкции содержали: CLSTN1 TMD и CLSTN1 STS (SEQ ID NO: 73), CLSTN2 TMD и CLSTN2 STS (SEQ ID NO: 74), CLSTN1 TMD и Notch1 STS (SEQ ID NO: 75), CLSTN2 TMD и Notch1 STS (SEQ ID NO: 76). Первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей шарнирный рецептор с указанным сочетанием TMD/STS, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер с конститутивно экспрессируемым анти-ALPPL2 CAR. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Как показано на фиг. 14, 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, культивировали совместно с: 1×10^5 клеток K562 (панели "-CAR", синий цвет) или 1×10^5 CD19+ клеток K562 (панели "-CAR", красный цвет). Аналогично, 1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы, тестировали в присутствии активности CAR путем совместного культивирования с 1×10^5 ALPPL2+ клеток K562 (панели "+CAR", синий цвет) или 1×10^5 ALPPL2+ CD19+ клеток K562 (панели "+CAR", красный цвет). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

Пример 20.

В данном примере описана табл. 3 с характеристиками активации Шарнир-Notch с вариантами STS без дополнительной стимуляции Т-клеток.

Первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей шарнирный рецептор, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер с конститутивной экспрессией eGFP-маркированного анти-ALPPL2 CAR. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в

день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Для тестирования Т-клетки, экспрессирующие рецепторы, культивировали совместно с клетками K562 или с CD19+ клетками K562. Затем определяли экспрессию гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). Построен график величин соотношения сигнала и шума на основании данных СИФ для BFP+ клеток в условиях CD19+ K562 против K562 относительно дельты изменения СИФ при двух условиях, в соответствии с табл. 3, ниже.

В табл. 3 приведены данные без стимуляции совместно экспрессируемого анти-ALPPL2 CAR ALPPL2+ клетками K562. "Только репортер" означает плазмиду репортера, которая экспрессируется во всех образцах.

Таблица 3

Рецептор, из которого получен STS	Последовательность STS	Среднее отношение сигнал:шум	Средняя разница СИФ (СИФ для "+" - СИФ для "-")
Notch 1	RKRRR (SEQ ID NO: 18)	20,55472264	889,5
Notch 2	KRK RKH (SEQ ID NO: 19)	5,236923077	1259
Notch 4	RRRREH (SEQ ID NO: 43)	10,30799476	1020
CSF1R	KYKQKPK (SEQ ID NO: 44)	3,093253968	801
CXCL16	KRRR (SEQ ID NO: 45)	14,3580786	1286,5
DAG1	RKKRKGK (SEQ ID NO: 46)	2,823255814	2519
GHR	KQQRIK (SEQ ID NO: 47)	2,216494845	141
PTPRF	KRK RTH (SEQ ID NO: 48)	10,48407643	1178
AGER	RRQRR (SEQ ID NO: 49)	11,92390524	1132,5
KL	KKGRRSYK (SEQ ID NO: 50)	3,723350254	880
NRG1	KTKKQRKKLHDRLR (SEQ ID NO: 51)	9,416666667	806,5
LRP1B	KRKRRTKTIRR (SEQ ID NO: 52)	2,315500686	1014
Jag2	RKRRKERERSRLPR (SEQ ID NO: 53)	5,090909091	1323
EPCAM	RKKRMAKYEK (SEQ ID NO: 54)	1,640226629	864
KCNE3	RSRKVDKR (SEQ ID NO: 55)	9,779546846	976
CDH2	KRRDKERQAK (SEQ ID NO: 56)	2,262402089	1134
NRG2	KTKKQRKQMHNHLR (SEQ ID NO: 57)	8,322951605	1259
PTPRK	KKSKLAKKRK (SEQ ID NO: 58)	2,375	1248
BTC	HPLRKRRKRKKK (SEQ ID NO: 59)	1,232854864	480
EPHA3	RRRSKYSKAK (SEQ ID NO: 60)	2,969369369	1289,5
IL1R2	HRRCKHRTGK (SEQ ID NO: 61)	2,413043478	980
PTPRM	KKRKLAKKRK (SEQ ID NO: 62)	2,305630027	1317
Notch3	RRKREH (SEQ ID NO: 63)	12,84705882	1191
Только ре-портер	Н/П	0,408	114

Пример 21.

В данном примере описана табл. 4 с характеристиками активации Шарнир-Notch с вариантами STS при стимуляции Т-клеток.

Первичные человеческие CD4+ Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей шарнирный рецептор, и другой, экспрессирующей транскрипционный репортер с конститутивной экспрессией eGFP+ анти-ALPPL2 CAR. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Для тестирования Т-клетки, экспрессирующие рецепторы, культивировали совместно с клетками K562 или CD19+ клетками K562. Затем определяли экспрессию гена-репортера BFP с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). Построен график величин соотношения сигнала и шума на основании данных СИФ для BFP+ клеток в условиях CD19+ K562 против K562 относительно дельты изменения СИФ при двух условиях. Активацию анализировали, как описано в примере 19, но с дополнительной совместной инкубацией с ALPPL2+ клетками K562 для активации CAR.

В табл. 4 приведены данные со стимуляцией совместно экспрессируемого анти-ALPPL2 CAR ALPPL2+ клетками K562. "Только репортер" означает плазмиду репортера, которая экспрессируется во всех образцах.

Таблица 4

Рецептор, из которого получен STS	Последовательность STS	Среднее отношение сигнал:шум	Средняя разница СИФ (СИФ для "+" - СИФ для "-")
Notch 1	RKRRR (SEQ ID NO: 18)	115,1879699	1639,5
Notch 2	KRKRKH (SEQ ID NO: 19)	15,51369863	4189
Notch 4	RRRREH (SEQ ID NO: 43)	24,14523449	1483
CSF1R	KYKQKPK (SEQ ID NO: 44)	5,44982699	1512
CXCL16	KRRR (SEQ ID NO: 45)	27,93162393	1687,5
DAG1	RKKRKGK (SEQ ID NO: 46)	7,403225806	4639
GHR	KQQRK (SEQ ID NO: 47)	2,673553719	-51,5
PTPRF	KRKRTH (SEQ ID NO: 48)	50,78034682	2574,5
AGER	RRQRR (SEQ ID NO: 49)	105,6603774	1792
KL	KKGRRSYK (SEQ ID NO: 50)	6,534357661	1567,5
NRG1	KTKKQRKKLHDRLR (SEQ ID NO: 51)	24,99036609	637
LRP1B	KRKRRTKTIRR (SEQ ID NO: 52)	10,30285381	2558
Jag2	RKRRKERERSRLPR (SEQ ID NO: 53)	21,38095238	3320,5
EPCAM	RKKRMAKYEK (SEQ ID NO: 54)	2,48189415	2372,5
KCNE3	RSRKVDKR (SEQ ID NO: 55)	62,54752852	1900,5
CDH2	KRRDKERQAK (SEQ ID NO: 56)	4,24047619	2834
NRG2	KTKKQRKQMHNHLR (SEQ ID NO: 57)	15,82959641	2201
PTPRK	KKSKLAKKRK (SEQ ID NO: 58)	6,761506276	2514,5
BTC	HPLRKRKRK (SEQ ID NO: 59)	1,713168188	423
EPHA3	RRRSKYSKAK (SEQ ID NO: 60)	6,307971014	2274
IL1R2	HRRCKHRTGK (SEQ ID NO: 61)	4,775	2027
PTPRM	KKRKLAKKRK (SEQ ID NO: 62)	9,289501591	2517,5
Notch3	RRKREH (SEQ ID NO: 63)	29,22939068	1987,5
Только репортер	Н/П	1,719298246	422,5

Пример 22.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации контролируемого продуцирования IL-2 Т-клетками, генетически модифицированными Шарнир-Notch с вариантами STS.

На фиг. 15А показана диаграмма Т-клеток, генетически модифицированных Шарнир-Notch с вариантами STS для обеспечения лиганд-иницируемой секреции генетически модифицированного цитокина для аутокринного и паракринного размножения Т-клеток. Профили экспрессии анти-CD19 рецепторов Шарнир-Notch с указанными модификациями STS приведены на фиг. 15В. Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей CAR против антигена MCAM, и одной, экспрессирующей рецептор Шарнир-Notch с индуцируемым супер-IL2 под контролем Gal4-UAS. Клетки, содержащие обе конструкции, отбирали в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Экспрессию рецептора определяли путем окрашивания антителами против мус-метки (ось у).

Пример 23.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации того, что инициируемая лигандом экспрессия супер-IL2 приводит к улучшению жизнеспособности CAR-Т-клеток.

1×10^5 дважды положительных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы Шарнир-Notch Notch1 STS, культивировали в среде без IL-2, без клеток K562 (вверху слева), с CD19+ клетками K562 для запуска Шарнир-Notch (вверху справа), с MCAM+ клетками K562 для запуска активации CAR (внизу слева) или с MCAM+ и CD19+ клетками K562 для запуска активации обоих рецепторов (внизу справа) (фиг. 16). Через 9 дней оценивали относительное содержание живых Т-клеток путем измерений прямого и бокового рассеяния с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). Совместная активация обоих рецепторов приводила к наиболее жизнеспособным клеткам, затем по результатам следовала активация Шарнир-Notch (с последующей индукцией супер-IL2), только активация CAR и отсутствие активации обоих рецепторов.

Пример 24.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации регулируемой пролифе-

рации Т-клеток при помощи Шарнир-Notch с вариантами STS.

Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали двумя лентивирусными конструкциями, одной, экспрессирующей CAR против антигена MCAM, и одной, экспрессирующей рецептор Шарнир-Notch с индуцируемым супер-IL2 под контролем Gal4-UAS (правые четыре панели на фиг. 17). Рецепторы Шарнир-Notch, содержащие 3 разных варианта STS (NRG1, Notch1, Notch2), тестировали против контроля без Шарнир-Notch. Аналогично, первичные человеческие Т-клетки получали без экспрессии CAR (левые панели на фиг. 17). Т-клетки окрашивали CellTrace Violet (Invitrogen) в соответствии с протоколами производителя, инкубировали совместно с CD19+ клетками-мишенями K562 в среде без IL-2 и проводили количественное определение с использованием Fortessa X-50 в указанные моменты времени для оценки пролиферации по угасанию сигнала CTV.

Пример 25.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации регулируемой секреции супер-IL2 при помощи Шарнир-Notch с вариантами STS.

Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали лентивирусной конструкцией рецептора Шарнир-Notch с индуцируемым супер-IL2 под контролем Gal4-UAS (фиг. 18A). Рецепторы Шарнир-Notch, содержащие 3 разных варианта STS (NRG1, Notch1, Notch2), тестировали против контроля без Шарнир-Notch. Т-клетки инкубировали совместно с MCAM+ CD19+ клетками K562 в среде без IL-2, и в указанные моменты времени определяли содержание IL-2 в супернатанте с использованием набора Instant ELISA Kit (Invitrogen), в соответствии с протоколами производителя, и планшетного ридера (Tecan). Красной пунктирной линией указана стандартная концентрация IL-2, используемая для культивирования Т-клеток. Постепенная секреция супер-IL2 была достигнута путем активации рецепторов Шарнир-Notch с варьируемыми STS.

Для результатов на фиг. 18B первичные человеческие Т-клетки получали при помощи дополнительного лентивирусного вектора, экспрессирующего CAR против MCAM. Усиленное поглощение IL-2 CAR-экспрессирующими клетками приводило к потере IL2 в супернатанте в случае Т-клеток, содержащих только CAR и NRG1-STS Шарнир-Notch. Напротив, повышенная индукция супер-IL2 за счет рецепторов на основе Notch1 и Notch2 STS первоначально опережает это поглощение, до того, как пролиферация и элиминация K562 приводит к уменьшению уровней в супернатанте.

Пример 26.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации того, что регулируемая секреция супер-IL2 за счет Шарнир-Notch с вариантами STS приводит к усилению пролиферации неспецифических Т-клеток.

Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали лентивирусной конструкцией, экспрессирующей рецептор Шарнир-Notch с индуцируемым супер-IL2 под контролем Gal4-UAS (правые панели на фиг. 19). Рецепторы Шарнир-Notch, содержащие 3 разных варианта STS (NRG1, Notch1, Notch2), тестировали в сравнении с контролем без Шарнир-Notch. Т-клетки с Шарнир-Notch инкубировали совместно с "неспецифическими" Т-клетками, окрашенными CellTrace Far Red (Invitrogen), экспрессирующими CAR против MCAM (левая панель на фиг. 19) или не экспрессирующими CAR (правая панель на фиг. 19). Т-клетки инкубировали совместно с MCAM+ CD19+ клетками K562 в среде без IL-2, и пролиферацию неспецифических Т-клеток оценивали путем измерения угасания сигнала на Fortessa X-50 (BD Biosciences). В случае неспецифических Т-клеток с экспрессией или без экспрессии CAR пролиферация была дифференцированно усилена за счет активированных Т-клеток, содержащих Шарнир-Notch с вариантами STS.

Пример 27.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для тестирования одиночных лентивирусных векторных конструкций, содержащих системы рецепторов Шарнир-Notch с CAR.

Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали одной лентивирусной конструкцией, содержащей последовательности для конститутивно экспрессируемых рецепторов Шарнир-Notch с индуцируемой кассетой анти-MCAM CAR под контролем Gal4-UAS. Клетки отбирали на основании экспрессии рецепторов Шарнир-Notch при помощи тус-метки в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Тестировали указанные три варианта STS, с конститутивно экспрессируемым CAR, используемым в качестве контроля (фиг. 20). Для тестирования 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали: без дополнительных клеток (верхняя кривая), совместно с 5×10^5 клеток K562 (средняя кривая) или 5×10^4 CD19+ клеток K562 (нижняя кривая). Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого CAR при помощи GFP-метки с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences).

Пример 28.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для демонстрации уничтожения клеток-мишеней со специфическими двойными антигенами Т-клетками, генетически модифицированными одним лентивирусным вектором, содержащим систему Шарнир-Notch с CAR.

Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали одной лентивирусной конструкцией, содержащей последовательности конститутивно экспрессируемых рецепторов Шарнир-Notch с индуцируемой кассетой анти-МСАМ CAR под контролем Gal4-UAS. Клетки отбирали на основании экспрессии рецепторов Шарнир-Notch при помощи тус-метки в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Тестировали указанные три варианта STS, с конститутивно экспрессируемым CAR, используемым в качестве контроля. Для тестирования 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали совместно с 5×10^5 МСАМ+ клетками K562 или 5×10^4 МСАМ+ CD19+ клетками K562. Уничтожение клеток-мишеней оценивали путем измерений прямого/бокового рассеяния в популяции клеток K562 с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences). Как показано на фиг. 21, системы Шарнир-Notch эффективно и специфически приводят к уничтожению клеток-мишеней, содержащих антигены МСАМ+ и CD19+.

Пример 29.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для тестирования одиночных лентивирусных векторных конструкций, содержащих последовательности рецепторов Шарнир-Notch, для контроля активации и истощения Т-клеток.

Первичные человеческие Т-клетки активировали при помощи анти-CD3/анти-CD28 Dynabeads (Gibco) и трансдуцировали одной лентивирусной конструкцией, содержащей последовательности конститутивно экспрессируемых рецепторов Шарнир-Notch с индуцируемой кассетой анти-МСАМ CAR под контролем Gal4-UAS. Клетки отбирали на основании экспрессии рецепторов Шарнир-Notch при помощи тус-метки в день 5 после начальной стимуляции Т-клеток и дополнительно размножали для тестирования активации. Тестировали указанные три варианта STS, с конститутивно экспрессируемым CAR, используемым в качестве контроля. Для тестирования 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 рецепторы, культивировали совместно с 5×10^4 CD19+ клеток K562. Затем определяли активацию транскрипции индуцируемого CAR при помощи GFP-метки с использованием Fortessa X-50 (BD Biosciences) (крайняя левая панель на фиг. 22). Активацию и истощение Т-клеток определяли на основании экспрессии CD25 и CD39, соответственно (фиг. 22).

Пример 30.

В данном примере описаны эксперименты, проведенные для *in vivo* тестирования систем Шарнир-Notch с CAR.

Как показано на фиг. 23, для односторонних опухолей мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) имплантировали 1×10^6 опухолевых клеток K562-BCMA/CD19 подкожно в левый бок. Для контралатеральных опухолей мышам NSG имплантировали 1×10^6 опухолевых клеток K562-BCMA/CD19 в левый бок и 1×10^6 опухолевых клеток K562-CD19 в правый бок. Через четыре дня после имплантации опухоли $2,5 \times 10^6$ генетически модифицированных первичных человеческих CD4+ и CD8+ Т-клеток (всего 5×10^6 Т-клеток) вводили в/в инфузией через хвостовую вену. Размер опухоли отслеживали с помощью штангенциркуля 2-3 раза в неделю, и мышей считали достигшими конечной точки, когда размер опухоли достигал ≥ 20 мм. Для иммунофенотипического анализа опухоли и селезенки собирали через 10 дней после имплантации Т-клеток. Опухоли измельчали вручную и расщепляли в среде RPMI-1640, содержащей 4 мг/мл коллагеназы IV (Worthington Biochemical Corporation) и 0,1 мг/мл ДНКазы I (Millipore Sigma), при 37°C в течение 30 мин, а селезенки измельчали вручную и проводили лизис эритроцитов (ACK; KD medical). Использовали следующие антитела: анти-CD45 (2D1, 368516, Biolegend), анти-CD3 (UCHT1, 300464, Biolegend), анти-CD4 (SK3, 563552, BD biosciences) и анти-CD8 (RPA-T8, 563823, BD Biosciences). Мертвые клетки исключали при помощи Draq7 (Abcam). Образцы анализировали с использованием FACSsymphony X50 SORP (BD Biosciences), и данные анализировали с использованием программы FlowJo (BD Biosciences).

Пример 31.

В данном примере представлены результаты экспериментов, проведенных и описанных в настоящем документе для рецепторов Notch, приведенных в табл 1.

Таблица 5

Конструкция	Описание рецептора	Экспериментальные результаты по активности
pIZ341	анти-CD19scFv-CD8Шарнир-Notch1TMD-Gal4VP64	Показано, что полноразмерный шарнир CD8 достаточен в качестве лиганд-чувствительного домена.
pIZ343	анти-CD19scFv-CD8Шарнир 2-Notch1TMD-Gal4VP64	Показано, что укороченный шарнир CD8 достаточен в качестве лиганд-чувствительного домена, лучше контролируется, чем pIZ341 или pIZ342.
pIZ358	анти-CD19scFv-CD28Шарнир-Notch1TMD-Gal4VP64	Показано, что и другие шарнирные домены помимо шарнира CD8 могут быть использованы в качестве лиганд-чувствительных доменов,

		активация примерно такая, как в случае укороченного шарнира CD8.
pIZ359	анти-CD19scFv-IgG4Шарнир-Notch1TMD-Gal4VP64	Показано, что и другие шарнирные домены помимо шарнира CD8 могут быть использованы в качестве лиганд-чувствительных доменов.
pIZ360	анти-CD19scFv-OX40-Notch1TMD-Gal4VP64	Показано, что и другие шарнирные домены помимо шарнира CD8 могут быть использованы в качестве лиганд-чувствительных доменов.
pIZ361	анти-CD19scFv-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64	Показано, что Notch2 STS улучшает сигнал рецепторов, которые не содержат ECD из Notch.
pIZ343FYIA	анти-ALPPL2scFv-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Gal4VP64	Активируется против M28, ALPPL2+ K562.
pIZ343eGFP	eGFP-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Gal4VP64	Активируется против LaG17+ K562.
pIZ342	анти-CD19scFv-CD8Шарнир1-Notch1TMD-Gal4VP64	Показано, что укороченный шарнир CD8 достаточен в качестве лиганд-чувствительного домена, лучше контролируется, чем pIZ341.
pIZ362	анти-CD19scFV-CD8Шарнир3-Notch1TMD-Notch1STS-Gal4VP64	Показано, что укороченный шарнир CD8 достаточен в качестве лиганд-чувствительного домена, слабее чем pIZ343.
pIZ363	анти-CD19scFV-CD8Шарнир4-Notch1TMD-Notch1STS-Gal4VP64	Показано, что укороченный шарнир CD8 достаточен в качестве лиганд-чувствительного домена, слабее чем pIZ343.
pIZ361FYIA	анти-ALPPL2scFv-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64	Активируется против M28, ALPPL2+ K562.
pIZ343BCMA	анти-BCMAscFV-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Gal4VP64	Активируется против BCMA+ K562.
pIZ361BCMA	анти-BCMAscFV-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64	Активируется против BCMA+ K562.
pIZ343(4D5-8)	анти-Her2scFV_4D5-8-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Gal4VP64	Активируется против Her2+ SKBR3.
pIZ361(4D5-8)	анти-Her2scFV_4D5-8-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64	Активируется против Her2+ SKBR3.
pIZ343(4D5-7)	анти-Her2scFV_4D5-7-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Gal4VP64	Активируется против Her2+ SKBR3.
pIZ361(4D5-7)	анти-Her2scFV_4D5-7-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64	Активируется против Her2+ SKBR3.
pRay068A	анти-BCMA_FHVN33-CD8Шарнир2-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64	Активируется против BCMA+ K562.
pRay068B	анти-BCMA_FHVN33-CD8Шарнир5-Notch1TMD-Notch2STS-Gal4VP64	Активируется против BCMA+ K562.
pIZ370	анти-CD19scFv-CD8Шарнир2-CLSTN1TMD-CLSTN1STS-Gal4VP64	Активируется слабо против CD19+ K562.
pIZ371	анти-CD19scFv-CD8Шарнир2-CLSTN2TMD-CLSTN2STS-Gal4VP64	Активируется слабо против CD19+ K562.
pTMD201	анти-CD19scFv-CD8Шарнир2-CLSTN1TMD-Notch1STS-Gal4VP64	Активируется хорошо против CD19+ K562.
pTMD202	анти-CD19scFv-CD8Шарнир2-CLSTN2TMD-Notch1STS-Gal4VP64	Активируется хорошо против CD19+ K562.

При том, что были раскрыты конкретные альтернативные варианты осуществления настоящего

изобретения, следует понимать, что различные модификации и комбинации возможны и предусмотрены в пределах истинной сущности и объема прилагаемой формулы изобретения. Вследствие этого, изобретение не должно быть ограничено конкретным рефератом и описанием, приведенным в настоящем документе.

Список литературы

- Dudani J. S., Warren A. D., and Bhatia S. N., Harnessing Protease Activity to Improve Cancer Care. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 2018. 2:353-76.
- David L. Porter, M.D., Bruce L. Levine, Ph.D., Michael Kalos, Ph.D., Adam Bagg, M.D., and Carl H. June, M.D. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N. Engl J Med.* 2011 Aug 25; 365(8):725-33.
- Gordon WR et al., The molecular logic of Notch signaling - a structural and biochemical perspective. *J. Cell Sci.* (2008) 121:3109-19.
- Gordon WR et al., Mechanical Allostery: Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. *Dev Cell* (2015) 33:729-36.
- Morsut L, Roybal KT, Xiong X, Gordley RM, Coyle SM, Thomson M, and Lim WA. Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell.* 2016 February 11; 164(4):780-91.
- Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs.* 2017; 31(4):317-34.
- Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian Farsani M. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes. *Cytotechnology.* 2014; 66(6):1031-38.
- Roybal KT, Jasper Z. Williams, Leonardo Morsut, Levi J. Rupp, Isabel Kolinko, Joseph H. Choe, Whitney J. Walker, Krista A. McNally, and Wendell A. Lim. Engineering T cells with Customized Therapeutic Response Programs Using Synthetic Notch Receptors. *Cell.* 2016 Oct 6; 167(2):419-32.
- Samulski and Muzyczka (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu. Rev. Virol.* 1:427.
- Sakuma, et al. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* 443:603.
- Watson D.J., Wolfe J.H. *Viral vectors for gene therapy: methods and protocols.* Totowa, NJ, USA: Humana Press; 2003. pp. 383-404.
- Vidarsson G. et al., IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers Immunol.* (2014) Oct 20; 5:520.

Список последовательностей

- <110> The Regents of the University of California
- <120> Рецепторы Notch с шарнирным доменом
- <130> 048536-654001WO
- <140> Herewith
- <141> Herewith
- <150> US 62/905,251
- <151> 2019-09-24
- <150> US 62/905,263
- <151> 2019-09-24
- <160> 80
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 556
- <212> БЕЛОК
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Синтетическая конструкция
- <400> 1

047690

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
65 70 75 80

His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
100 105 110

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
165 170 175

Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
180 185 190

Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
195 200 205

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
210 215 220

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
225 230 235 240

047690

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
 245 250 255
 Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 260 265 270
 Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile
 275 280 285
 Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala
 290 295 300
 Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Met
 305 310 315 320
 Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly
 325 330 335
 Val Leu Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile
 340 345 350
 Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys
 355 360 365
 Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg
 370 375 380
 Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu Thr
 385 390 395 400
 Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile
 405 410 415
 Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln
 420 425 430
 Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val Asn
 435 440 445
 Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro
 450 455 460
 Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu
 465 470 475 480

047690

Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala Ala Ala Gly
 485 490 495

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu
 500 505 510

Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
 515 520 525

Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp
 530 535 540

Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 545 550 555

<210> 2

<211> 538

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 2

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
 50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
 100 105 110

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

047690

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30
 Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 35 40 45
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
 50 55 60
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80
 His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
 100 105 110
 Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
 115 120 125
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
 165 170 175
 Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
 180 185 190
 Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
 195 200 205
 Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
 210 215 220
 Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
 225 230 235 240
 Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
 245 250 255

047690

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
260 265 270

Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
275 280 285

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
290 295 300

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala
305 310 315 320

Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly Val Leu Leu Ser Arg Lys
325 330 335

Arg Arg Arg Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile
340 345 350

Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala
355 360 365

Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys
370 375 380

Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu
385 390 395 400

Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu
405 410 415

Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu
420 425 430

Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp
435 440 445

Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His
450 455 460

Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln
465 470 475 480

Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
485 490 495

047690

Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp
 500 505 510

Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp
 515 520 525

Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp
 530 535 540

Leu Asp Met Leu Gly Ser
 545 550

<210> 4
 <211> 538
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 4

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
 50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
 100 105 110

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
 115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly

047690

130						135										140
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	
145					150					155					160	
Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	
				165					170					175		
Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	
			180					185					190			
Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	
		195					200					205				
Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	
	210					215					220					
Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	
225					230					235					240	
Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	
				245					250					255		
Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	
			260					265					270			
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
		275					280						285			
Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Phe	Met	Tyr	Val	
	290					295					300					
Ala	Ala	Ala	Ala	Phe	Val	Leu	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Cys	Gly	Val	Leu	
305					310					315					320	
Leu	Ser	Arg	Lys	Arg	Arg	Arg	Met	Lys	Leu	Leu	Ser	Ser	Ile	Glu	Gln	
				325					330					335		
Ala	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Leu	Lys	Lys	Leu	Lys	Cys	Ser	Lys	Glu	Lys	
			340					345					350			
Pro	Lys	Cys	Ala	Lys	Cys	Leu	Lys	Asn	Asn	Trp	Glu	Cys	Arg	Tyr	Ser	
		355					360					365				
Pro	Lys	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro	Leu	Thr	Arg	Ala	His	Leu	Thr	Glu	Val	

047690

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
65 70 75 80

His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
100 105 110

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
165 170 175

Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
180 185 190

Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
195 200 205

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
210 215 220

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
225 230 235 240

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
245 250 255

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
260 265 270

Ser Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys
 275 280 285

His Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser
 290 295 300

Gln Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val
 305 310 315 320

Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser
 325 330 335

Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys
 340 345 350

Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val
 355 360 365

Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln
 370 375 380

Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu
 385 390 395 400

Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro
 405 410 415

Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile
 420 425 430

Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser
 435 440 445

Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Phe Met Tyr Val Ala
 450 455 460

Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly Val Leu Leu
 465 470 475 480

Ser Arg Lys Arg Arg Arg Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala
 485 490 495

Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro
 500 505 510

047690

Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro
515 520 525

Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu
530 535 540

Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg
545 550 555 560

Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys
565 570 575

Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala
580 585 590

Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu
595 600 605

Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn
610 615 620

Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly
625 630 635 640

Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
645 650 655

Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp
660 665 670

Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp
675 680 685

Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
690 695

<210> 6

<211> 539

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 6

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

047690

				245					250						255
Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser
			260					265					270		
Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile
		275					280					285			
Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Phe	Met	Tyr	Val
	290					295					300				
Ala	Ala	Ala	Ala	Phe	Val	Leu	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Cys	Gly	Val	Leu
305					310					315					320
Leu	Ser	Lys	Arg	Lys	Arg	Lys	His	Met	Lys	Leu	Leu	Ser	Ser	Ile	Glu
				325					330					335	
Gln	Ala	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Leu	Lys	Lys	Leu	Lys	Cys	Ser	Lys	Glu
			340					345					350		
Lys	Pro	Lys	Cys	Ala	Lys	Cys	Leu	Lys	Asn	Asn	Trp	Glu	Cys	Arg	Tyr
		355					360					365			
Ser	Pro	Lys	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro	Leu	Thr	Arg	Ala	His	Leu	Thr	Glu
	370					375					380				
Val	Glu	Ser	Arg	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Gln	Leu	Phe	Leu	Leu	Ile	Phe
385					390					395					400
Pro	Arg	Glu	Asp	Leu	Asp	Met	Ile	Leu	Lys	Met	Asp	Ser	Leu	Gln	Asp
				405					410					415	
Ile	Lys	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Leu	Phe	Val	Gln	Asp	Asn	Val	Asn	Lys
			420					425					430		
Asp	Ala	Val	Thr	Asp	Arg	Leu	Ala	Ser	Val	Glu	Thr	Asp	Met	Pro	Leu
		435					440					445			
Thr	Leu	Arg	Gln	His	Arg	Ile	Ser	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Ser
	450					455						460			
Ser	Asn	Lys	Gly	Gln	Arg	Gln	Leu	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly
465					470					475					480
Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Asp	Ala	Leu	Asp	Asp	Phe	Asp	Leu	Asp

047690

485

490

495

Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly
 500 505 510

Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala
 515 520 525

Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 530 535

<210> 7

<211> 542

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 7

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gln
 20 25 30

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
 35 40 45

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 50 55 60

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 65 70 75 80

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 85 90 95

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 100 105 110

Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 115 120 125

Lys Glu Gly Asp Ser Ser Arg Trp Ser Tyr Asp Leu Trp Gly Arg Gly
 130 135 140

047690

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val
 165 170 175
 Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser
 180 185 190
 Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro
 195 200 205
 Gly Lys Ala Pro Lys Val Met Ile Tyr Asp Val Thr Asn Arg Pro Ser
 210 215 220
 Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
 225 230 235 240
 Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 245 250 255
 Ser Ser Tyr Thr Ile Ala Ser Thr Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
 260 265 270
 Lys Leu Thr Val Leu Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 290 295 300
 Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly
 305 310 315 320
 Cys Gly Val Leu Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Met Lys Leu Leu Ser
 325 330 335
 Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys
 340 345 350
 Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu
 355 360 365
 Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His
 370 375 380

047690

Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu
385 390 395 400

Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser
405 410 415

Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn
420 425 430

Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp
435 440 445

Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser
450 455 460

Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala Ala
465 470 475 480

Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe
485 490 495

Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp
500 505 510

Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly
515 520 525

Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
530 535 540

<210> 8

<211> 525

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 8

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly
20 25 30

Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys

047690

	275		280		285														
Met	Tyr	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Phe	Val	Leu	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Cys				
	290					295					300								
Gly	Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Lys	Arg	Arg	Arg	Met	Lys	Leu	Leu	Ser	Ser				
305					310					315					320				
Ile	Glu	Gln	Ala	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Leu	Lys	Lys	Leu	Lys	Cys	Ser				
				325					330					335					
Lys	Glu	Lys	Pro	Lys	Cys	Ala	Lys	Cys	Leu	Lys	Asn	Asn	Trp	Glu	Cys				
			340					345					350						
Arg	Tyr	Ser	Pro	Lys	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro	Leu	Thr	Arg	Ala	His	Leu				
		355						360					365						
Thr	Glu	Val	Glu	Ser	Arg	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Gln	Leu	Phe	Leu	Leu				
	370					375						380							
Ile	Phe	Pro	Arg	Glu	Asp	Leu	Asp	Met	Ile	Leu	Lys	Met	Asp	Ser	Leu				
385					390					395					400				
Gln	Asp	Ile	Lys	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Leu	Phe	Val	Gln	Asp	Asn	Val				
				405					410					415					
Asn	Lys	Asp	Ala	Val	Thr	Asp	Arg	Leu	Ala	Ser	Val	Glu	Thr	Asp	Met				
			420					425					430						
Pro	Leu	Thr	Leu	Arg	Gln	His	Arg	Ile	Ser	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Glu				
		435					440						445						
Glu	Ser	Ser	Asn	Lys	Gly	Gln	Arg	Gln	Leu	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ala				
	450					455					460								
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Asp	Ala	Leu	Asp	Asp	Phe	Asp				
465					470					475					480				
Leu	Asp	Met	Leu	Gly	Ser	Asp	Ala	Leu	Asp	Asp	Phe	Asp	Leu	Asp	Met				
				485					490						495				
Leu	Gly	Ser	Asp	Ala	Leu	Asp	Asp	Phe	Asp	Leu	Asp	Met	Leu	Gly	Ser				
			500					505					510						
Asp	Ala	Leu	Asp	Asp	Phe	Asp	Leu	Asp	Met	Leu	Gly	Ser							

047690

515

520

525

<210> 9
 <211> 273
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 9

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
 50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
 100 105 110

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
 115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
 165 170 175

Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
 180 185 190

047690

Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
195 200 205

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
210 215 220

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
225 230 235 240

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
245 250 255

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
260 265 270

Ser

<210> 10
<211> 277
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 10

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gln
20 25 30

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
35 40 45

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
50 55 60

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
65 70 75 80

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
85 90 95

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

047690

100 105 110
 Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 115 120 125
 Lys Glu Gly Asp Ser Ser Arg Trp Ser Tyr Asp Leu Trp Gly Arg Gly
 130 135 140
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val
 165 170 175
 Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser
 180 185 190
 Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro
 195 200 205
 Gly Lys Ala Pro Lys Val Met Ile Tyr Asp Val Thr Asn Arg Pro Ser
 210 215 220
 Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
 225 230 235 240
 Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 245 250 255
 Ser Ser Tyr Thr Ile Ala Ser Thr Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
 260 265 270
 Lys Leu Thr Val Leu
 275
 <210> 11
 <211> 260
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая конструкция
 <400> 11
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

047690

Gly Ser Thr Gly Asp Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly
20 25 30

Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys
35 40 45

Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu
50 55 60

Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr
85 90 95

Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu
100 105 110

Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr
115 120 125

Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg
130 135 140

Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly
145 150 155 160

His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala
165 170 175

Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn
180 185 190

Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr
195 200 205

Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser
210 215 220

Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met
225 230 235 240

Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp
245 250 255

Glu Leu Tyr Lys
260

<210> 12
<211> 45
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 12

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

<210> 13
<211> 27
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 13

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
20 25

<210> 14
<211> 39
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 14

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

047690

20

25

30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
35

<210> 15

<211> 27

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5 10 15

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
20 25

<210> 16

<211> 186

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 16

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His
1 5 10 15

Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln
20 25 30

Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
35 40 45

Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
65 70 75 80

Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp
85 90 95

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala

047690

100

105

110

Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln
 115 120 125

Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro
 130 135 140

Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr
 145 150 155 160

Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr
 165 170 175

Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala
 180 185

<210> 17
 <211> 22
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 17

Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly
 1 5 10 15

Cys Gly Val Leu Leu Ser
 20

<210> 18
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 18

Arg Lys Arg Arg Arg
 1 5

<210> 19
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 19

Lys Arg Lys Arg Lys His
 1 5

<210> 20

<211> 211

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 20

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
 1 5 10 15

Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
 20 25 30

Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
 35 40 45

Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
 50 55 60

Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile
 65 70 75 80

Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu
 85 90 95

Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala
 100 105 110

Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser
 115 120 125

Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu
 130 135 140

Thr Val Ser Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp
 145 150 155 160

Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp

047690

165

170

175

Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp
180 185 190

Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met
195 200 205

Leu Gly Ser
210

<210> 21
<211> 21
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 21

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro
20

<210> 22
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 22

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 23
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 23
ggagcactgt cctccgaacg
20

047690

<210> 24
 <211> 537
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 24

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
 50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
 100 105 110

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
 115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
 165 170 175

Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
 180 185 190

Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
 195 200 205

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
 210 215 220

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
 225 230 235 240

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
 245 250 255

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 260 265 270

Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile
 275 280 285

Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Phe Met Tyr Val Ala
 290 295 300

Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly Val Leu Leu
 305 310 315 320

Ser Arg Lys Arg Arg Arg Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala
 325 330 335

Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro
 340 345 350

Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro
 355 360 365

Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu
 370 375 380

Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg
 385 390 395 400

Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys
 405 410 415

Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala
 420 425 430

Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu
 435 440 445

047690

Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn
 450 455 460

Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly
 465 470 475 480

Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
 485 490 495

Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp
 500 505 510

Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp
 515 520 525

Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 530 535

<210> 25

<211> 529

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 25

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
 50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

047690

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
100 105 110

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
165 170 175

Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
180 185 190

Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
195 200 205

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
210 215 220

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
225 230 235 240

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
245 250 255

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
260 265 270

Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
275 280 285

Ala Cys Asp Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe
290 295 300

Phe Val Gly Cys Gly Val Leu Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Met Lys
305 310 315 320

Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys
325 330 335

047690

Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn
 340 345 350

Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr
 355 360 365

Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln
 370 375 380

Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys
 385 390 395 400

Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val
 405 410 415

Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val
 420 425 430

Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr
 435 440 445

Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val
 450 455 460

Ser Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu
 465 470 475 480

Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe
 485 490 495

Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp
 500 505 510

Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly
 515 520 525

Ser

<210> 26

<211> 530

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

047690

<400> 26

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
 50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
 100 105 110

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
 115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
 165 170 175

Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
 180 185 190

Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
 195 200 205

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
 210 215 220

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
 225 230 235 240

047690

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
 245 250 255

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 260 265 270

Ser Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 275 280 285

Phe Ala Cys Asp Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu
 290 295 300

Phe Phe Val Gly Cys Gly Val Leu Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Met
 305 310 315 320

Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys
 325 330 335

Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys
 340 345 350

Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu
 355 360 365

Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu
 370 375 380

Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu
 385 390 395 400

Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe
 405 410 415

Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser
 420 425 430

Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala
 435 440 445

Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr
 450 455 460

Val Ser Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala
 465 470 475 480

Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp
 485 490 495

Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu
 500 505 510

Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
 515 520 525

Gly Ser
 530

<210> 27
 <211> 543
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 27

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gln
 20 25 30

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
 35 40 45

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 50 55 60

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 65 70 75 80

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 85 90 95

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 100 105 110

Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 115 120 125

047690

Lys Glu Gly Asp Ser Ser Arg Trp Ser Tyr Asp Leu Trp Gly Arg Gly
 130 135 140

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val
 165 170 175

Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser
 180 185 190

Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro
 195 200 205

Gly Lys Ala Pro Lys Val Met Ile Tyr Asp Val Thr Asn Arg Pro Ser
 210 215 220

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
 225 230 235 240

Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 245 250 255

Ser Ser Tyr Thr Ile Ala Ser Thr Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
 260 265 270

Lys Leu Thr Val Leu Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 290 295 300

Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly
 305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Ser Lys Arg Lys Arg Lys His Met Lys Leu Leu
 325 330 335

Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys
 340 345 350

Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp
 355 360 365

047690

Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala
 370 375 380

His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe
 385 390 395 400

Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp
 405 410 415

Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp
 420 425 430

Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr
 435 440 445

Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser
 450 455 460

Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala
 465 470 475 480

Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp
 485 490 495

Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu
 500 505 510

Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
 515 520 525

Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 530 535 540

<210> 28

<211> 542

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 28

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gln
 20 25 30

047690

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
35 40 45

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Tyr Tyr
50 55 60

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
65 70 75 80

Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Thr
85 90 95

Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Met
100 105 110

Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
115 120 125

Ser Leu Tyr Asp Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
130 135 140

Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
165 170 175

Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
180 185 190

Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
195 200 205

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
210 215 220

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
225 230 235 240

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr
245 250 255

Tyr Cys Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
260 265 270

Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 290 295 300

Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly
 305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Met Lys Leu Leu Ser
 325 330 335

Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys
 340 345 350

Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu
 355 360 365

Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His
 370 375 380

Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu
 385 390 395 400

Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser
 405 410 415

Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn
 420 425 430

Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp
 435 440 445

Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser
 450 455 460

Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala Ala
 465 470 475 480

Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe
 485 490 495

Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp
 500 505 510

Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly
 515 520 525

Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 530 535 540

<210> 29

<211> 543

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 29

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gln
 20 25 30

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
 35 40 45

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Tyr Tyr
 50 55 60

Ile Asn Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 65 70 75 80

Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Thr
 85 90 95

Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Met
 100 105 110

Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 115 120 125

Ser Leu Tyr Asp Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 130 135 140

Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160

047690

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
 165 170 175

Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
 180 185 190

Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
 195 200 205

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 210 215 220

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 225 230 235 240

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr
 245 250 255

Tyr Cys Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 260 265 270

Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Thr Pro
 275 280 285

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 290 295 300

Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly
 305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Ser Lys Arg Lys Arg Lys His Met Lys Leu Leu
 325 330 335

Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys
 340 345 350

Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp
 355 360 365

Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala
 370 375 380

His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe
 385 390 395 400

047690

Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp
 405 410 415

Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp
 420 425 430

Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr
 435 440 445

Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser
 450 455 460

Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala
 465 470 475 480

Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp
 485 490 495

Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu
 500 505 510

Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
 515 520 525

Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 530 535 540

<210> 30

<211> 542

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 30

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val
 50 55 60

047690

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
85 90 95

Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
115 120 125

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr Ser
130 135 140

Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
165 170 175

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val
180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro
195 200 205

Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
210 215 220

Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser
225 230 235 240

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly
245 250 255

Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
260 265 270

Val Ser Ser Gly Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
275 280 285

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
290 295 300

Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly
 305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Met Lys Leu Leu Ser
 325 330 335

Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys
 340 345 350

Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu
 355 360 365

Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His
 370 375 380

Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu
 385 390 395 400

Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser
 405 410 415

Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn
 420 425 430

Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp
 435 440 445

Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser
 450 455 460

Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala Ala
 465 470 475 480

Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe
 485 490 495

Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp
 500 505 510

Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly
 515 520 525

Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 530 535 540

<210> 31
 <211> 543
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 31

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val
 50 55 60

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 100 105 110

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 115 120 125

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr Ser
 130 135 140

Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 165 170 175

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val
 180 185 190

047690

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro
 195 200 205

Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 210 215 220

Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 225 230 235 240

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly
 245 250 255

Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 260 265 270

Val Ser Ser Gly Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 290 295 300

Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly
 305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Ser Lys Arg Lys Arg Lys His Met Lys Leu Leu
 325 330 335

Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys
 340 345 350

Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp
 355 360 365

Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala
 370 375 380

His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe
 385 390 395 400

Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp
 405 410 415

Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp
 420 425 430

047690

Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr
435 440 445

Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser
450 455 460

Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala
465 470 475 480

Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp
485 490 495

Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu
500 505 510

Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
515 520 525

Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
530 535 540

<210> 32

<211> 542

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 32

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
35 40 45

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val
50 55 60

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Ser Ala Ser Phe Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
85 90 95

Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 100 105 110

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 115 120 125

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr Ser
 130 135 140

Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 165 170 175

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val
 180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro
 195 200 205

Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 210 215 220

Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 225 230 235 240

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly
 245 250 255

Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 260 265 270

Val Ser Ser Gly Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 290 295 300

Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly
 305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Met Lys Leu Leu Ser
 325 330 335

047690

Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys
 340 345 350

Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu
 355 360 365

Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His
 370 375 380

Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu
 385 390 395 400

Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser
 405 410 415

Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn
 420 425 430

Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp
 435 440 445

Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser
 450 455 460

Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala Ala
 465 470 475 480

Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe
 485 490 495

Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp
 500 505 510

Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly
 515 520 525

Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 530 535 540

<210> 33

<211> 543

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 33

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val
 50 55 60

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

Ser Ala Ser Phe Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 100 105 110

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 115 120 125

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr Ser
 130 135 140

Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 165 170 175

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val
 180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro
 195 200 205

Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 210 215 220

047690

Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 225 230 235 240

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly
 245 250 255

Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 260 265 270

Val Ser Ser Gly Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
 290 295 300

Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly
 305 310 315 320

Cys Gly Val Leu Leu Ser Lys Arg Lys Arg Lys His Met Lys Leu Leu
 325 330 335

Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys
 340 345 350

Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp
 355 360 365

Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala
 370 375 380

His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe
 385 390 395 400

Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp
 405 410 415

Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp
 420 425 430

Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr
 435 440 445

Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser
 450 455 460

047690

Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala
465 470 475 480

Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp
485 490 495

Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu
500 505 510

Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
515 520 525

Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
530 535 540

<210> 34

<211> 416

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 34

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Glu Val Gln
20 25 30

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
35 40 45

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
50 55 60

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
85 90 95

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
100 105 110

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu
115 120 125

Gly Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Ala Asp Tyr Arg Gly Gln Gly Thr
 130 135 140

Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
 145 150 155 160

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
 165 170 175

Cys Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val
 180 185 190

Gly Cys Gly Val Leu Leu Ser Lys Arg Lys Arg Lys His Met Lys Leu
 195 200 205

Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu
 210 215 220

Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn
 225 230 235 240

Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg
 245 250 255

Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu
 260 265 270

Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met
 275 280 285

Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln
 290 295 300

Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu
 305 310 315 320

Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser
 325 330 335

Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser
 340 345 350

Ala Ala Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp
 355 360 365

047690

Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp
 370 375 380

Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met
 385 390 395 400

Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 405 410 415

<210> 35

<211> 426

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 35

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Glu Val Gln
 20 25 30

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 35 40 45

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
 50 55 60

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 85 90 95

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 100 105 110

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu
 115 120 125

Gly Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Ala Asp Tyr Arg Gly Gln Gly Thr
 130 135 140

047690

Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro
 145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 165 170 175

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Phe Met Tyr Val Ala
 180 185 190

Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly Val Leu Leu
 195 200 205

Ser Lys Arg Lys Arg Lys His Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln
 210 215 220

Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys
 225 230 235 240

Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser
 245 250 255

Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val
 260 265 270

Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro
 275 280 285

Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile
 290 295 300

Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp
 305 310 315 320

Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr
 325 330 335

Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser
 340 345 350

Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala Ala Ala Gly Gly Ser
 355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met
 370 375 380

047690

Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
385 390 395 400

Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu
405 410 415

Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
420 425

<210> 36

<211> 277

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 36

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gln
20 25 30

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
35 40 45

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Tyr Tyr
50 55 60

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
65 70 75 80

Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Thr
85 90 95

Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Met
100 105 110

Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
115 120 125

Ser Leu Tyr Asp Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
130 135 140

Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

047690

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
 165 170 175

Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
 180 185 190

Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln
 195 200 205

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 210 215 220

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 225 230 235 240

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr
 245 250 255

Tyr Cys Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 260 265 270

Lys Leu Glu Ile Lys
 275

<210> 37
 <211> 277
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 37

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val
 50 55 60

047690

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
85 90 95

Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
115 120 125

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr Ser
130 135 140

Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
165 170 175

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val
180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro
195 200 205

Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
210 215 220

Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser
225 230 235 240

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly
245 250 255

Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
260 265 270

Val Ser Ser Gly Ser
275

<210> 38

<211> 150

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 38

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Glu Val Gln
 20 25 30

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 35 40 45

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
 50 55 60

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 85 90 95

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 100 105 110

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu
 115 120 125

Gly Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Ala Asp Tyr Arg Gly Gln Gly Thr
 130 135 140

Leu Val Thr Val Ser Ser
 145 150

<210> 39

<211> 26

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 39

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15

047690

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
20 25

<210> 40
<211> 18
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 40

Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala
1 5 10 15

Cys Asp

<210> 41
<211> 19
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 41

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
1 5 10 15

Ala Cys Asp

<210> 42
<211> 37
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 42

Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro
1 5 10 15

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Arg Pro Glu Ala Cys
35

<210> 43
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 43

Arg Arg Arg Arg Glu His
1 5

<210> 44
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 44

Lys Tyr Lys Gln Lys Pro Lys
1 5

<210> 45
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 45

Lys Arg Arg Arg
1

<210> 46
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 46

Arg Lys Lys Arg Lys Gly Lys
1 5

<210> 47
<211> 6

<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 47

Lys Gln Gln Arg Ile Lys
1 5

<210> 48
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 48

Lys Arg Lys Arg Thr His
1 5

<210> 49
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 49

Arg Arg Gln Arg Arg
1 5

<210> 50
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 50

Lys Lys Gly Arg Arg Ser Tyr Lys
1 5

<210> 51
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 51

Lys Thr Lys Lys Gln Arg Lys Lys Leu His Asp Arg Leu Arg
1 5 10

<210> 52

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 52

Lys Arg Lys Arg Arg Thr Lys Thr Ile Arg Arg
1 5 10

<210> 53

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 53

Arg Lys Arg Arg Lys Glu Arg Glu Arg Ser Arg Leu Pro Arg
1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 54

Arg Lys Lys Arg Met Ala Lys Tyr Glu Lys
1 5 10

<210> 55

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 55

Arg Ser Arg Lys Val Asp Lys Arg
1 5

<210> 56
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 56

Lys Arg Arg Asp Lys Glu Arg Gln Ala Lys
1 5 10

<210> 57
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 57

Lys Thr Lys Lys Gln Arg Lys Gln Met His Asn His Leu Arg
1 5 10

<210> 58
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 58

Lys Lys Ser Lys Leu Ala Lys Lys Arg Lys
1 5 10

<210> 59
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 59

His Pro Leu Arg Lys Arg Arg Lys Arg Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 60
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 60

Arg Arg Arg Ser Lys Tyr Ser Lys Ala Lys
 1 5 10

<210> 61
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 61

His Arg Arg Cys Lys His Arg Thr Gly Lys
 1 5 10

<210> 62
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 62

Lys Lys Arg Lys Leu Ala Lys Lys Arg Lys
 1 5 10

<210> 63
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 63

Arg Arg Lys Arg Glu His
 1 5

<210> 64
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (2)..(3)
 <223> X может быть любым аминокислотным остатком

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (4)..(4)
 <223> X представляет собой гидрофобный остаток, такой как Leu, Ile, Val, Phe, Trp, Tyr, Val, Met и Pro

<400> 64

Pro Xaa Xaa Xaa
 1

<210> 65
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (2)..(3)
 <223> X может быть любым аминокислотным остатком

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (4)..(4)
 <223> X представляет собой гидрофобный остаток, такой как Leu, Ile, Val, Phe, Trp, Tyr, Val, Met и Pro

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (5)..(5)
 <223> X представляет собой Ser или Thr

<400> 65

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 66
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<220>
<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
<222> (2)..(2)
<223> X представляет собой Leu или Gln

<400> 66

Pro Xaa Gly Met Thr Ser
1 5

<210> 67
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<220>
<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
<222> (2)..(2)
<223> X представляет собой Leu или Gln

<400> 67

Pro Xaa Gly Met Thr
1 5

<210> 68
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 68

Val Gly Arg
1

<210> 69
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 69

Glu Asn Leu Tyr Thr Gln Ser

1

5

<210> 70
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 70

Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 71
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 71

Leu Val Pro Arg
 1

<210> 72
 <211> 277
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 72

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val
 50 55 60

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

047690

Ser Ala Ser Phe Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
85 90 95

Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
115 120 125

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr Ser
130 135 140

Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
165 170 175

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val
180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro
195 200 205

Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
210 215 220

Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser
225 230 235 240

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly
245 250 255

Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
260 265 270

Val Ser Ser Gly Ser
275

<210> 73

<211> 543

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 73

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
 50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
 100 105 110

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
 115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
 165 170 175

Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
 180 185 190

Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
 195 200 205

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
 210 215 220

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr

047690

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
 165 170 175

Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
 180 185 190

Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
 195 200 205

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
 210 215 220

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
 225 230 235 240

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
 245 250 255

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 260 265 270

Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile
 275 280 285

Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Ile Ala Thr Val
 290 295 300

Val Ile Ile Ile Ser Val Cys Met Leu Val Phe Val Val Ala Met Gly
 305 310 315 320

Val Tyr Arg Val Arg Ile Ala His Gln His Met Lys Leu Leu Ser Ser
 325 330 335

Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys Ser
 340 345 350

Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys
 355 360 365

047690

Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu
 370 375 380

Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu
 385 390 395 400

Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser Leu
 405 410 415

Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val
 420 425 430

Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met
 435 440 445

Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu
 450 455 460

Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala Ala Ala
 465 470 475 480

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp
 485 490 495

Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met
 500 505 510

Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 515 520 525

Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 530 535 540

<210> 75

<211> 537

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 75

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp

047690

				20						25						30
Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	
		35					40					45				
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	
	50					55					60					
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	
65					70					75					80	
His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
				85					90					95		
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	
			100					105					110			
Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	
		115					120					125				
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
	130					135					140					
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	
145					150					155					160	
Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	
				165					170					175		
Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	
			180					185					190			
Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	
		195					200					205				
Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	
	210					215					220					
Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	
225					230					235					240	
Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	
				245					250					255		
Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	

047690

500

505

510

Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp
 515 520 525

Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 530 535

<210> 76

<211> 538

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 76

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asp
 20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 35 40 45

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu
 50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
 100 105 110

Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
 115 120 125

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

047690

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
 165 170 175

Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
 180 185 190

Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
 195 200 205

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
 210 215 220

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
 225 230 235 240

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
 245 250 255

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 260 265 270

Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile
 275 280 285

Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Ile Ala Thr Val
 290 295 300

Val Ile Ile Ile Ser Val Cys Met Leu Val Phe Val Val Ala Met Gly
 305 310 315 320

Val Tyr Arg Lys Arg Arg Arg Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln
 325 330 335

Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys
 340 345 350

Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser
 355 360 365

Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val
 370 375 380

Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro
 385 390 395 400

047690

Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile
 405 410 415

Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp
 420 425 430

Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr
 435 440 445

Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser
 450 455 460

Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Ala Ala Ala Gly Gly Ser
 465 470 475 480

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met
 485 490 495

Leu Gly Ser Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 500 505 510

Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser Asp Ala Leu
 515 520 525

Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Ser
 530 535

<210> 77
 <211> 21
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 77

Ala Thr Val Val Ile Val Val Cys Val Ser Phe Leu Val Phe Met Ile
 1 5 10 15

Ile Leu Gly Val Phe
 20

<210> 78
 <211> 22
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 78

Ile Ala Thr Val Val Ile Ile Ile Ser Val Cys Met Leu Val Phe Val
 1 5 10 15

Val Ala Met Gly Val Tyr
 20

<210> 79

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 79

Arg Ile Arg Ala Ala His Arg Arg Thr Met Arg
 1 5 10

<210> 80

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 80

Arg Val Arg Ile Ala His Gln His
 1 5

20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный полипептид, содержащий в направлении от N-конца к C-концу:

а) внеклеточный лиганд-связывающий домен, имеющий аффинность связывания для выбранного лиганда;

б) шарнирный домен, способствующий образованию олигомеров химерного полипептида за счет межмолекулярных дисульфидных связей;

с) трансмембранный домен из рецептора Notch, содержащий один или более индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления; и

d) внутриклеточный домен, содержащий регулятор транскрипции, где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом вызывает расщепление в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления, расположенном между регулятором транскрипции и шарнирным доменом,

и где химерный полипептид не содержит повтора LIN-12-Notch (LNR) и домен гетеродимеризации (HD) рецептора Notch.

2. Химерный полипептид по п.1, где трансмембранный домен дополнительно содержит последовательность стоп-сигнала переноса.

3. Химерный полипептид по любому из пп.1-2, где внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий фрагмент, способный связывать лиганд на клеточной поверхности.

4. Химерный полипептид по п.3, где клетка представляет собой патоген.

5. Химерный полипептид по п.3, где клетка представляет собой человеческую клетку.

6. Химерный полипептид по п.5, где человеческая клетка представляет собой опухолевую клетку.

7. Химерный полипептид по п.5, где человеческая клетка представляет собой терминально дифференцированную клетку.

8. Химерный полипептид по любому из пп.1-7, где лиганд представляет собой белок или углевод.

9. Химерный полипептид по любому из пп.1-8, где лиганд выбран из группы, состоящей из CD1, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD7, CD8a, CD8b, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27, CD28, CD33, CD34, CD40, CD45, CD48, CD52, CD59, CD66, CD70, CD71, CD72, CD73, CD79A, CD79B, CD80 (B7,1), CD86 (B7,2), CD94, CD95, CD134, CD140 (PDGFR4), CD152, CD154, CD158, CD178, CD181 (CXCR1), CD182 (CXCR2), CD183 (CXCR3), CD210, CD246, CD252, CD253, CD261, CD262, CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD276 (B7H3), CD279, CD295, CD339 (JAG1), CD340 (HER2), EGFR, FGFR2, CEA, AFP, CA125, MUC-1, MAGE, щелочной фосфатазы, подобной плацентарному белку 2 (ALPPL2), антигена созревания В-клеток (BCMA), зеленого флуоресцентного белка (GFP), усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) и сигнального регуляторного белка α (SIRP α).

10. Химерный полипептид по любому из пп.1-9, где лиганд выбран из рецепторов на клеточной поверхности, белков адгезии, интегринов, муцинов, лектинов, опухоль-ассоциированных антигенов и опухоль-специфических антигенов.

11. Химерный полипептид по любому из пп.1-10, где лиганд представляет собой опухоль-ассоциированный антиген или опухоль-специфический антиген.

12. Химерный полипептид по любому из пп.1-11, где внеклеточный лиганд-связывающий домен содержит лиганд-связывающий фрагмент рецептора.

13. Химерный полипептид по любому из пп.3-12, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из антитела, нанотела, диатела, триатела, минитела, F(ab')₂-фрагмента, F(ab)v-фрагмента, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), однодоменного антитела (sdAb) и их функциональных фрагментов.

14. Химерный полипептид по п.13, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv.

15. Химерный полипептид по любому из пп.3-14, где антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает опухоль-ассоциированный антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, B7H3 (CD276), BCMA (CD269), ALPPL2, CD123, CD171, CD179a, CD20, CD213A2, CD22, CD24, CD246, CD272, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD46, CD71, CD97, CEA, CLDN6, CLECL1, CS-1, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EphCAM, EphA2, эфрина B2, FAP, FLT3, GD2, GD3, GM3, GPRC5D, HER2 (ERBB2/neu), IGLL1, IL-11R α , KIT (CD117), MUC1, NCAM, PAP, PDGFR- β , PRSS21, PSCA, PSMA, ROR1, SIRP α , SSEA-4, TAG72, TEM1/CD248, TEM7R, TSHR, VEGFR2, ALPI, цитруллинированного виментина, cMet и Axl.

16. Химерный полипептид по п.15, где опухоль-ассоциированный антиген представляет собой CD19, BCMA, CEA, HER2, MUC1, CD20, ALPPL2, SIRP α или EGFR.

17. Химерный полипептид по п.16, где опухоль-ассоциированный антиген представляет собой CD19, BCMA, HER2 или ALPPL2.

18. Химерный полипептид по любому из пп.1-17, где один или более индуцируемых лигандом сайтов протеолитического расщепления представляет собой сайт расщепления гамма-секретазы.

19. Химерный полипептид по любому из пп.1-18, где регулятор транскрипции представляет собой активатор транскрипции или репрессор транскрипции.

20. Химерный полипептид по любому из пп.1-19, где внутриклеточный домен содержит последовательность ядерной локализации и последовательность регулятора транскрипции, выбранного из группы, состоящей из Gal4-VP16, Gal4-VP64, tetR-VP64, ZFHD1-VP64, Gal4-KRAB и NAP1-VP16.

21. Химерный полипептид по любому из пп.1-20, дополнительно содержащий дополнительный сайт протеолитического расщепления, сигнальную последовательность, детектируемую метку, опухоль-специфический сайт расщепления, специфический для заболевания сайт расщепления и их сочетания.

22. Химерный полипептид по любому из пп.1-21, где шарнирный домен получен из шарнирного домена CD8 α , шарнирного домена CD28, шарнирного домена CD152, шарнирного домена PD-1, шарнирного домена CTLA4, шарнирного домена OX40, шарнирного домена IgG1, шарнирного домена IgG2, шарнирного домена IgG3 и шарнирного домена IgG4, или функционального варианта любого из них.

23. Химерный полипептид по любому из пп.1-22, где шарнирный домен получен из шарнирного домена CD8 α или его функционального варианта.

24. Химерный полипептид по любому из пп.1-22, где шарнирный домен получен из шарнирного домена CD28 или его функционального варианта.

25. Химерный полипептид по любому из пп.1-22, где шарнирный домен получен из шарнирного домена OX40 или его функционального варианта.

26. Химерный полипептид по любому из пп.1-22, где шарнирный домен получен из шарнирного домена IgG4 или его функционального варианта.

27. Химерный полипептид по любому из пп.1-26, где шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 12-16 и 39-42.

28. Химерный полипептид по любому из пп.2-27, где последовательность стоп-сигнала переноса содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 18-19, 43-63, 79 и 80.

29. Химерный полипептид по любому из пп.1-28, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из рецептора Notch 1 человека.

30. Химерный полипептид по любому из пп.1-29, где трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17.

31. Химерный полипептид по любому из пп.1-28, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из рецептора Notch 2 человека.

32. Химерный полипептид по любому из пп.1-28, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из рецептора Notch 3 человека.

33. Химерный полипептид по любому из пп.1-28, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из рецептора Notch 4 человека.

34. Химерный полипептид по любому из пп.2-30, где:

а) шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 12-16 и 39-42;

б) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17; и

в) домен последовательности стоп-сигнала переноса содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 18-19, 43-63, 79 и 80.

35. Химерный полипептид по любому из пп.1-30 и 34, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-8 и 24-35.

36. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный полипептид по пп.1-35.

37. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п.36, где нуклеотидная последовательность включена в экспрессионную кассету или экспрессионный вектор.

38. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п.37, где экспрессионный вектор представляет собой вирусный вектор.

39. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п.38, где вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор или ретровирусный вектор.

40. Рекомбинантная клетка, содержащая:

а) химерный полипептид по любому из пп.1-35; и/или

б) рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп.36-39.

41. Рекомбинантная клетка по п.40, которая представляет собой эукариотическую клетку.

42. Рекомбинантная клетка по п.41, где эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего.

43. Рекомбинантная клетка по п.42, где клетка млекопитающего представляет собой иммунную клетку, нейрон, эпителиальную клетку и эндотелиальную клетку или стволовую клетку.

44. Рекомбинантная клетка по п.43, где иммунная клетка представляет собой В-клетку, моноцит, клетку - естественный киллер, базофил, эозинофил, нейтрофил, дендритную клетку, макрофаг, регуляторную Т-клетку, хелперную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку или другую Т-клетку.

45. Рекомбинантная клетка по любому из пп.40-44, содержащая:

а) первый химерный полипептид и второй химерный полипептид по любому из пп.1-35; и/или
 б) первую нуклеиновую кислоту и вторую нуклеиновую кислоту по любому из пп.36-39;
 где первый химерный полипептид и второй химерный полипептид имеют неодинаковые последовательности, и/или первая нуклеиновая кислота или вторая нуклеиновая кислота имеют неодинаковые последовательности.

46. Рекомбинантная клетка по п.45, где первый химерный полипептид модулирует экспрессию и/или активность второго химерного полипептида.

47. Рекомбинантная клетка по любому из пп.40-46, дополнительно содержащая экспрессионную кассету, кодирующую белок, функционально связанную с промотором, где экспрессия белка модулируется регулятором транскрипции.

48. Рекомбинантная клетка по п.47, где белок является гетерологичным для клетки.

49. Рекомбинантная клетка по п.48, где промотор представляет собой дрожжевой промотор GAL4.

50. Рекомбинантная клетка по любому из пп.47-49, где белок представляет собой цитокин, цитотоксин, хемокин, иммуномодулятор, проапоптотический фактор, антиапоптотический фактор, гормон, фактор дифференциации, фактор дедифференциации, рецептор иммунной клетки (например, TCR или CAR) или репортер.

51. Клеточная культура, включающая по меньшей мере одну рекомбинантную клетку по любому из пп.40-50 и культуральную среду.

52. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и одно или более из следующего:

- а) рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп.36-39; и
- б) рекомбинантную клетку по любому из пп.40-50.

53. Фармацевтическая композиция по п.52, которая содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп.36-39 и фармацевтически приемлемый носитель.

54. Фармацевтическая композиция по п.53, где рекомбинантная нуклеиновая кислота заключена в вирусном капсиде или липидной наночастице.

55. Способ модулирования активности клетки, включающий:

- а) получение рекомбинантной клетки по любому из пп.40-50; и
- б) создание контакта рекомбинантной клетки с выбранным лигандом, где связывание выбранного лиганда с внеклеточным лиганд-связывающим доменом вызывает расщепление в индуцируемом лигандом сайте протеолитического расщепления и высвобождает регулятор транскрипции, при этом высвобожденный регулятор транскрипции модулирует активность рекомбинантной клетки.

56. Способ по п.55, где контакт происходит *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*.

57. Способ по любому из пп.55-56, где модулируемая активность клетки выбрана из группы, состоящей из: экспрессии выбранного гена, пролиферации, апоптоза, не вызванной апоптозом гибели, дифференциации, дедифференциации, миграции, секреции молекулы, клеточной адгезии и цитолитической активности.

58. Способ по любому из пп.55-57, где высвобождаемый регулятор транскрипции модулирует экспрессию генного продукта клетки.

59. Способ по пп.55-57, где высвобождаемый регулятор транскрипции модулирует экспрессию гетерологичного генного продукта.

60. Способ по любому из пп.58-59, где генный продукт клетки выбран из группы, состоящей из хемокина, рецептора хемокина, химерного антигенного рецептора, цитокина, рецептора цитокина, фактора дифференциации, фактора роста, рецептора фактора роста, гормона, метаболического фермента, полученного из патогена белка, индуктора пролиферации, рецептора, направляемой РНК нуклеазы, сайт-специфической нуклеазы, Т-клеточного рецептора, токсина, полученного из токсина белка, регулятора транскрипции, активатора транскрипции, репрессора транскрипции, регулятора трансляции, активатора трансляции, репрессора трансляции, активирующего иммунорецептора, антитела, ингибитора апоптоза, индуктора апоптоза, рекомбинантного Т-клеточного рецептора, иммуноактиватора, иммуноингибитора и ингибирующего иммунорецептора.

61. Способ по любому из пп.55-60, где высвобождаемый регулятор транскрипции модулирует дифференциацию клетки, и где клетка представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, клетку-предшественник или исходную клетку.

62. Способ ингибирования активности клетки-мишени у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества рекомбинантных клеток по любому из пп.40-50, где рекомбинантные клетки ингибируют активность клетки-мишени у индивидуума.

63. Способ по п.62, где клетка-мишень представляет собой патогенную клетку.

64. Способ по п.63, где патогенная клетка представляет собой раковую клетку.

65. Способ по п.64, где раковая клетка-мишень представляет собой клетку острого миеломного лейкоза, клетку анапластической лимфомы, клетку астроцитомы, клетку В-клеточного рака, клетку рака молочной железы, клетку рака толстой кишки, клетку эпендимомы, клетку рака пищевода, клетку глиобластомы, клетку глиомы, клетку лейомиосаркомы, клетку липосаркомы, клетку рака печени, клетку рака

легких, клетку лимфомы из клеток мантийной зоны, клетку меланомы, клетку нейробластомы, клетку немелкоклеточного рака легких, клетку олигодендроглиомы, клетку рака яичника, клетку рака поджелудочной железы, клетку периферической Т-клеточной лимфомы, клетку рака почки, клетку саркомы, клетку рака желудка, клетку карциномы, клетку мезотелиомы или клетку саркомы.

66. Способ лечения рака у индивидуума, который нуждается в этом, включающий введение индивидууму первого терапевтического средства, включающего эффективное количество рекомбинантных клеток по любому из пп.40-50, где рекомбинантная клетка лечит рак у индивидуума.

67. Способ по п.66, дополнительно включающий введение индивидууму второго терапевтического средства.

68. Способ по п.67, где второе терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии и терапии токсином.

69. Способ по любому из пп.67-68, где первое терапевтическое средство и второе терапевтическое средство вводят одновременно в одной и той же композиции или в отдельных композициях.

70. Способ по п.69, где первое терапевтическое средство и второе терапевтическое средство применяют одновременно.

71. Способ по любому из пп.67-68, где первое терапевтическое средство и второе терапевтическое средство применяют последовательно.

72. Способ по п.71, где первое терапевтическое средство применяют до второго терапевтического средства.

73. Способ по п.71, где первое терапевтическое средство применяют после второго терапевтического средства.

74. Способ по п.71, где первое терапевтическое средство и второе терапевтическое средство применяют поочередно.

75. Набор для модулирования активности клетки, ингибирования раковой клетки-мишени или лечения рака у индивидуума, который нуждается в этом, включающая одно или более из следующего:

- a) химерный полипептид по любому из пп.1-35;
- b) рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп.36-39;
- c) рекомбинантную клетку по любому из пп.40-50; и
- d) фармацевтическую композицию по любому из пп.52-54.

76. Способ получения рекомбинантной клетки по любому из пп.40-50, включающий:

- a) получение клетки, способной к экспрессии белка;
- b) создание контакта полученной клетки с рекомбинантной нуклеиновой кислотой по любому из пп.36-39, введенной в полученную клетку.

77. Способ по п.76, где клетка получена в результате лейкафереза, проведенного на образце, полученном от субъекта, и клетка вступает в контакт *ex vivo*.

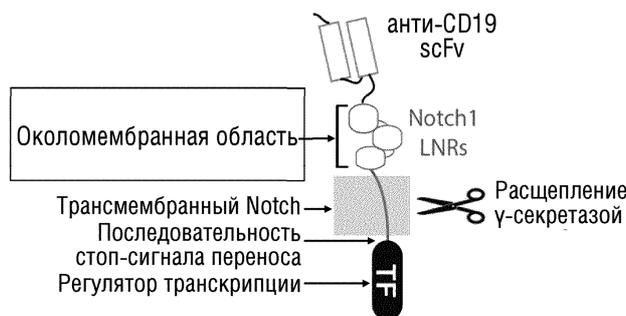
78. Способ по п.76, где рекомбинантная нуклеиновая кислота заключена в вирусном капсиде или липидной наночастице.

79. Применение одного или более из следующего для лечения рака:

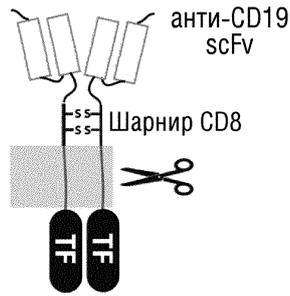
- a) химерного полипептида по любому из пп.1-35;
- b) рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп.36-39;
- c) рекомбинантной клетки по любому из пп.40-50; и
- d) композиции по любому из пп.52-54.

80. Применение по п.79, где рак представляет собой солидную опухоль, опухоль мягких тканей или метастатический опухолевый очаг.

81. Применение изобретения по любому из пп.1-54 для производства лекарственного препарата для лечения рака.

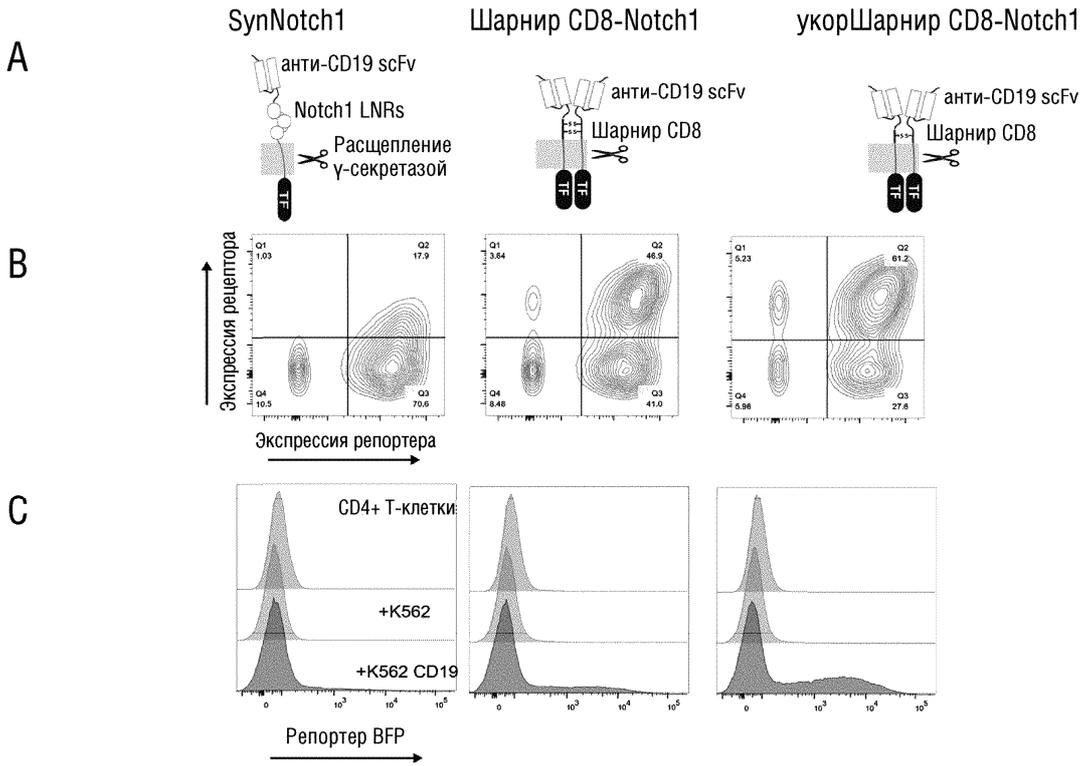


Фиг. 1А



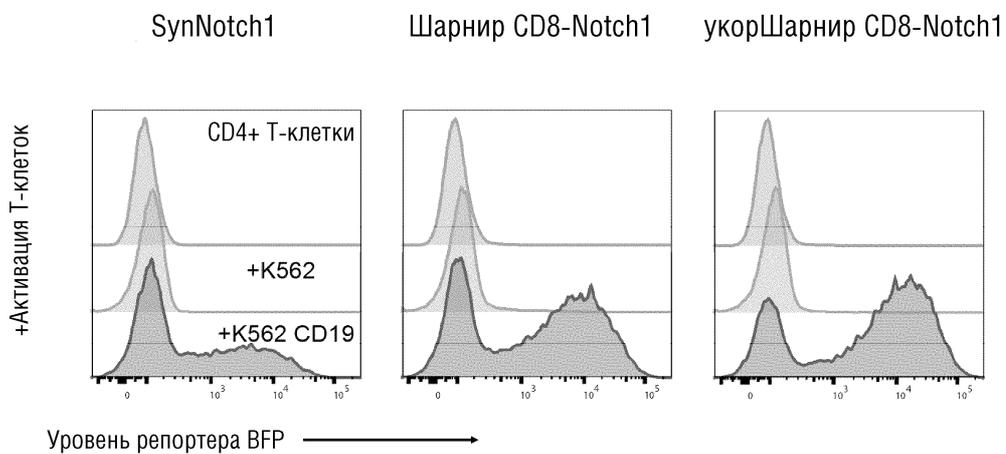
Фиг. 1В

Первичные человеческие CD4+ Т-клетки: активация анти-CD19 Шарнир CD8-SynNotch

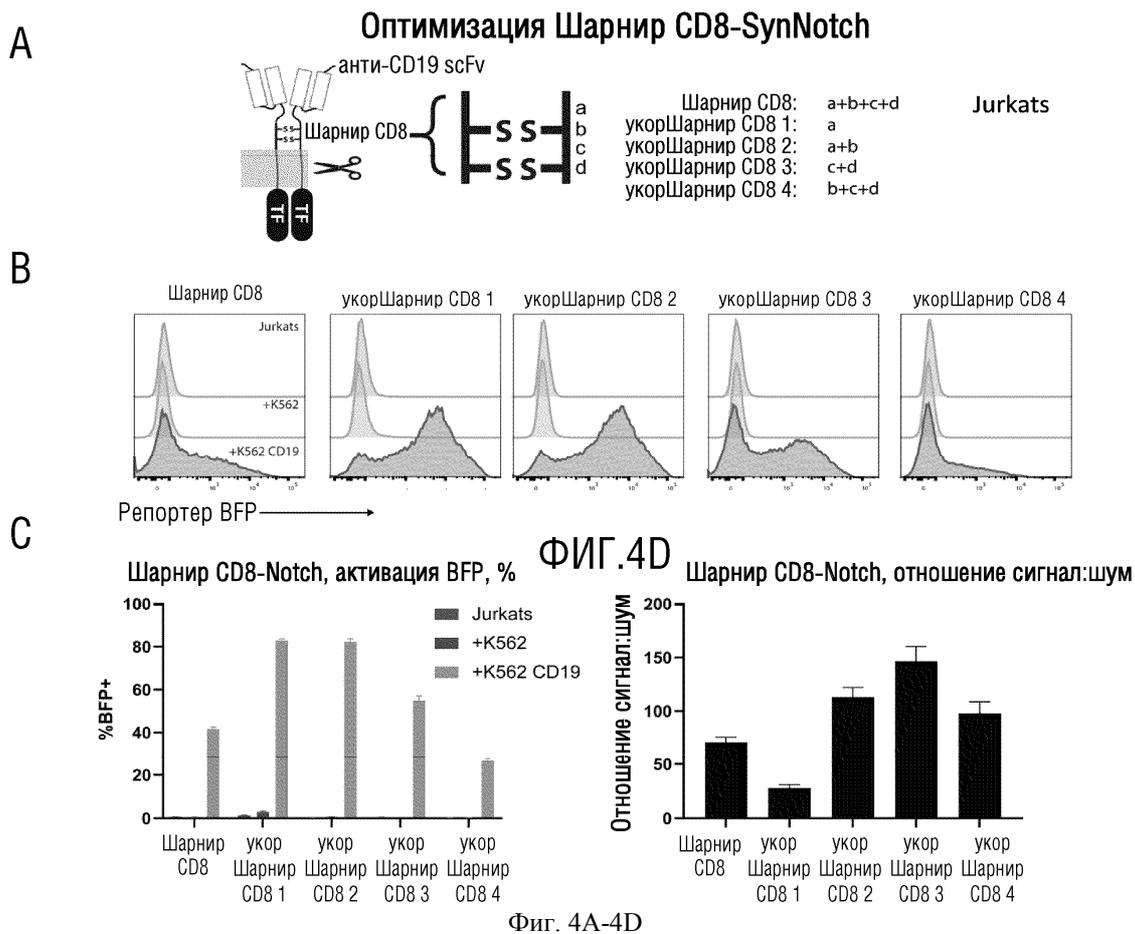


Фиг. 2А-2С

Первичные человеческие CD4+ Т-клетки: активация анти-CD19 Шарнир CD8-SynNotch

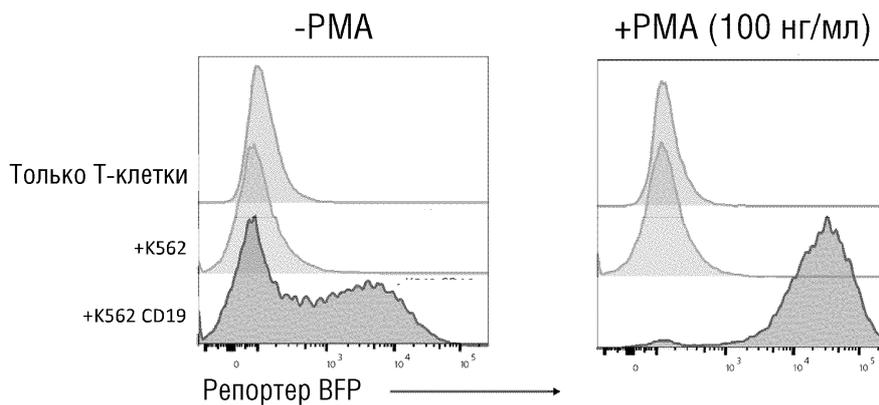


Фиг. 3

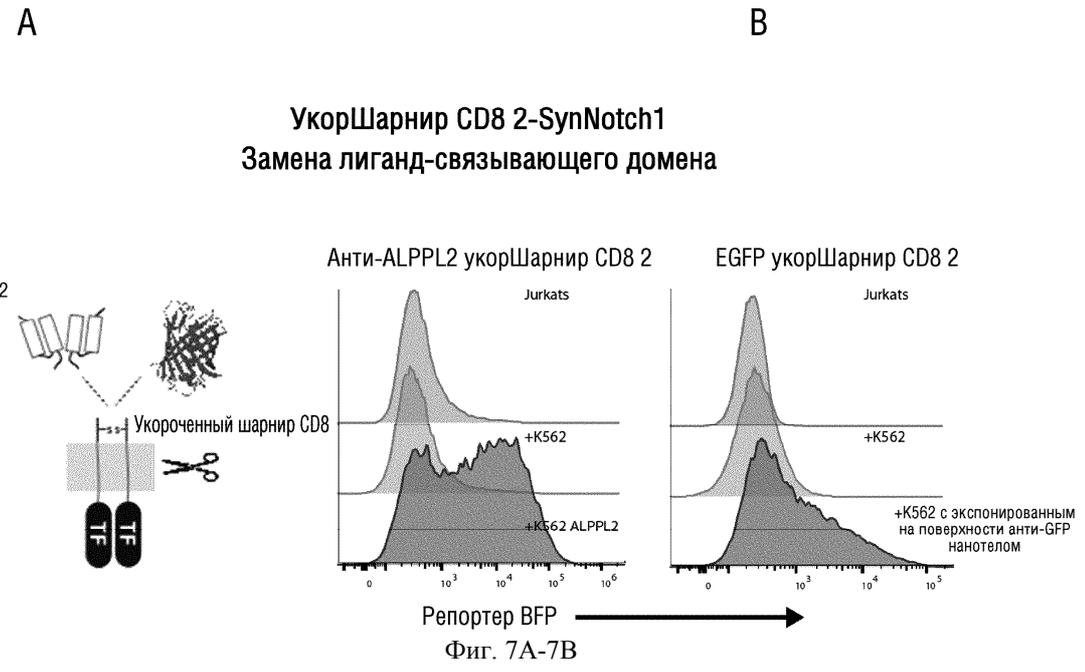
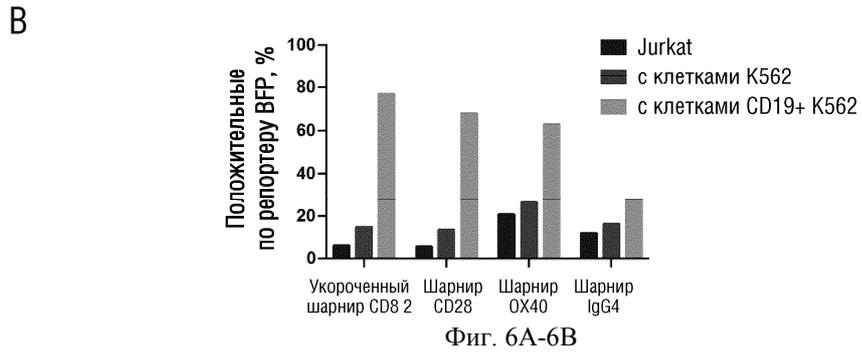
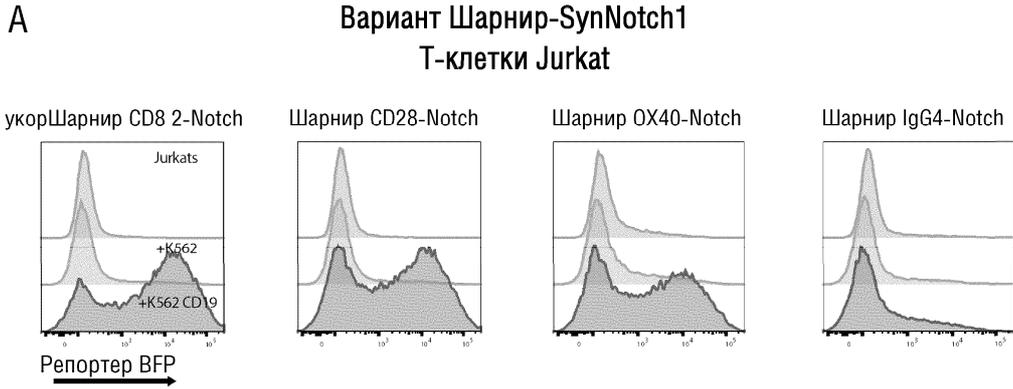


Фиг. 4A-4D

Оптимизация укорШарнир CD8 2-SynNotch1 Регуляция сигнализацией PKC

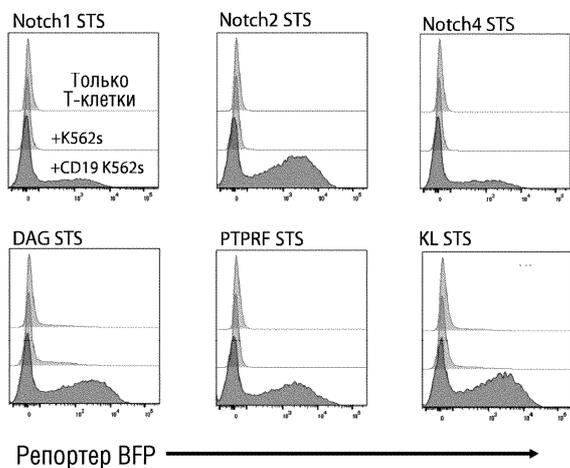


Фиг. 5

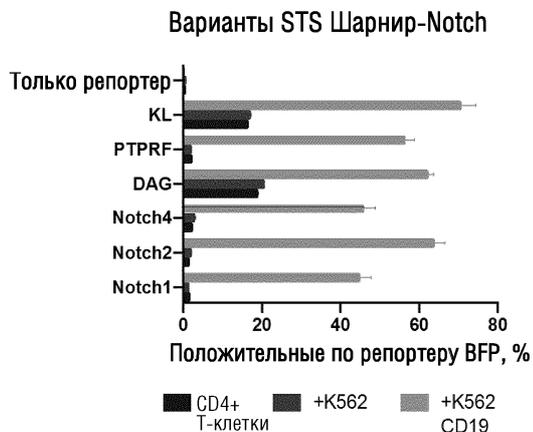


A

укорШарнир CD8 2-SynNotch1
с вариантами стоп-сигнала переноса



B

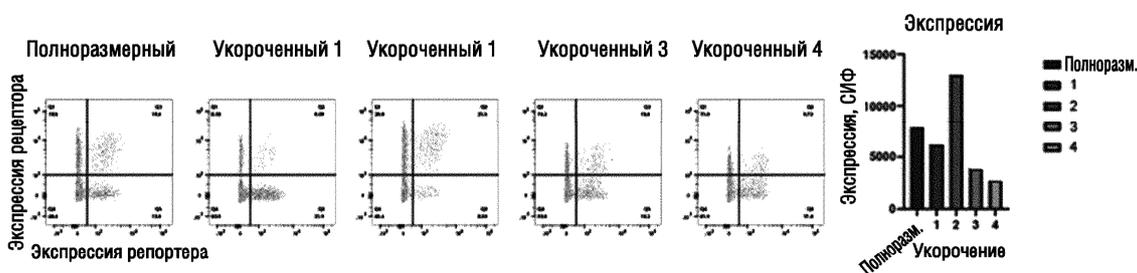


Фиг. 8А-8В

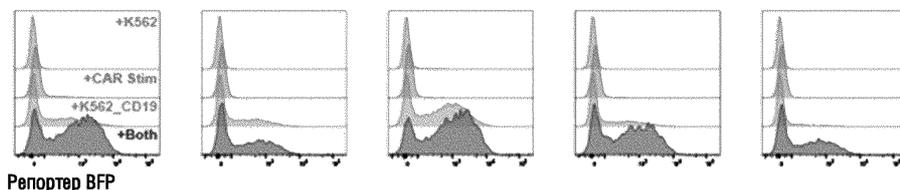
А Оптимизация Шарнир CD8-SynNotch1 с совместно экспрессируемым CAR
Подтверждение в CD45+ Т-клетках



В



С

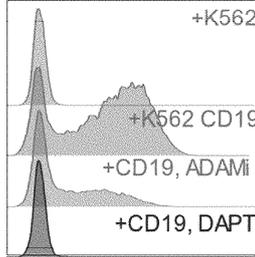


Фиг. 9А-9С

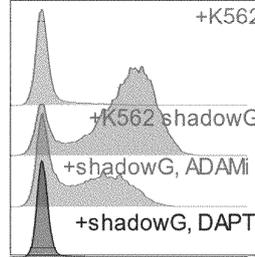
Активация с другими связывающими доменами и зависимость от протеолитической активности

Варианты Шарнир-Notch

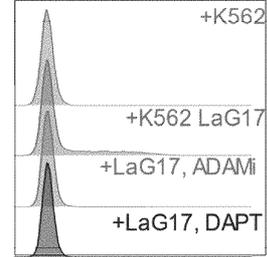
Анти-CD19 scFv, Notch2 STS



Анти-LaG17 нанотело, Notch2 STS



eGFP, Notch1 STS

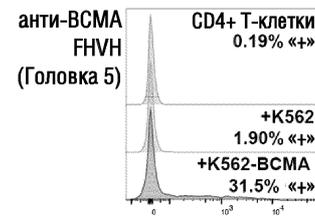
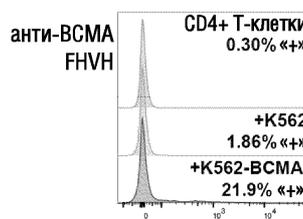
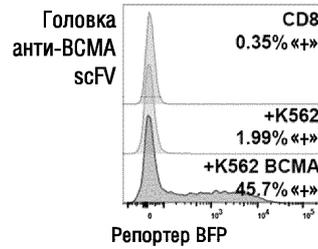


Репортер BFP →

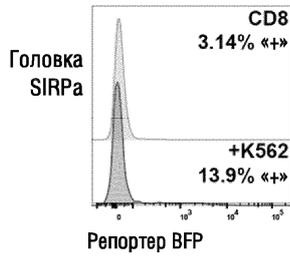
Фиг. 10

Активация рецептора Шарнир-Notch с Notch2 STS с другими связывающими доменами

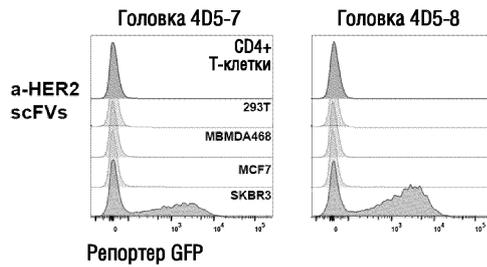
A



B

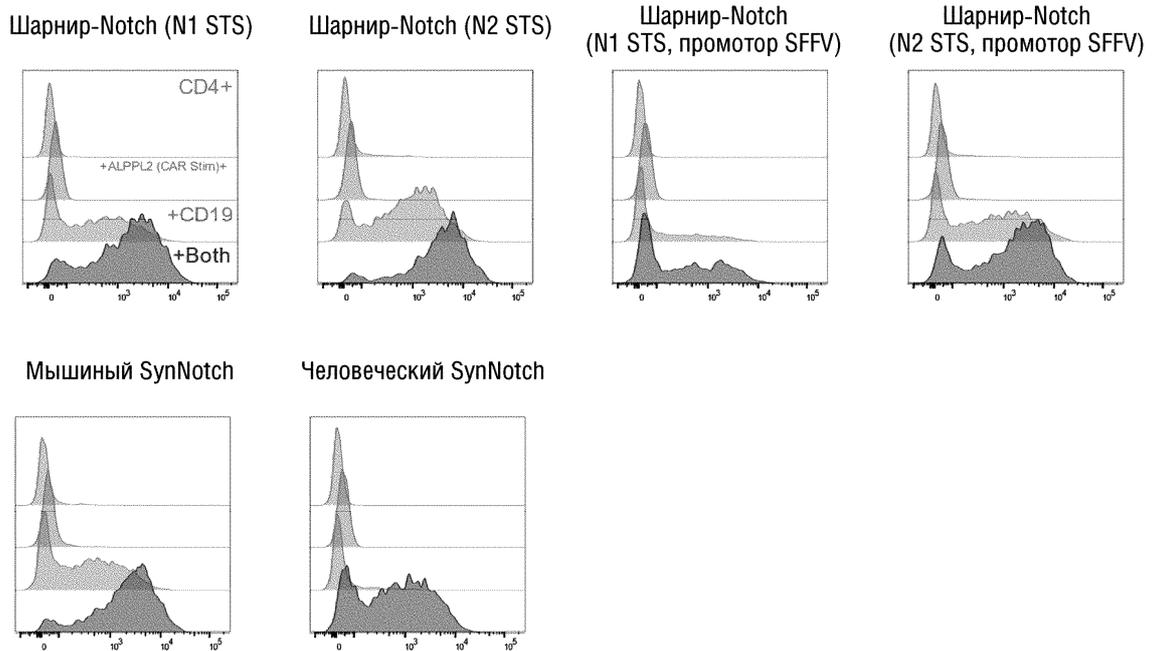


C



Фиг. 11A-11C

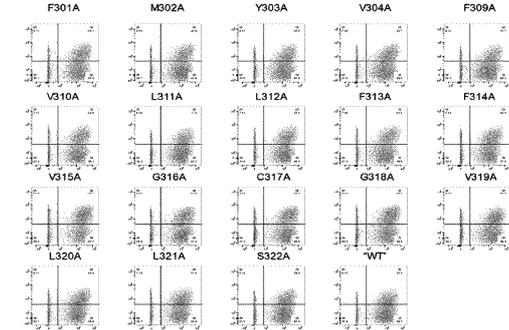
Активация Шарнир-Notch с разными STS и промоторами



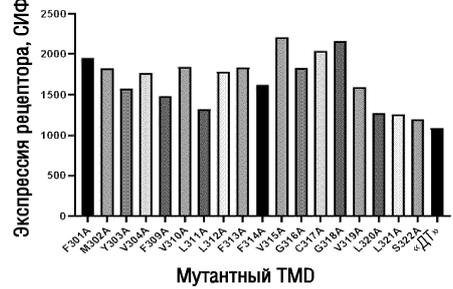
Фиг. 12

А Активация Шарнир-Notch с разными STS и промоторами

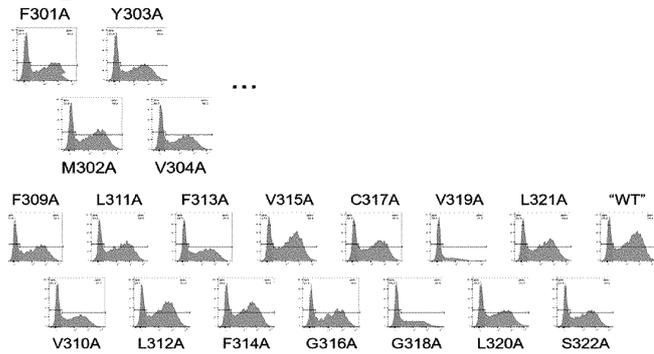
Экспрессия при сканировании аланином - Notch TMD



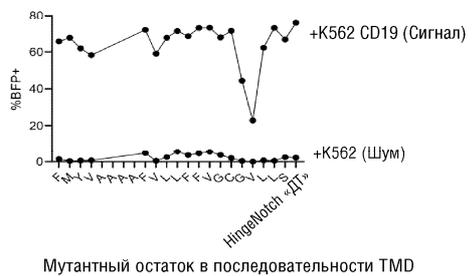
Экспрессия при сканировании аланином Шарнир-Notch



В

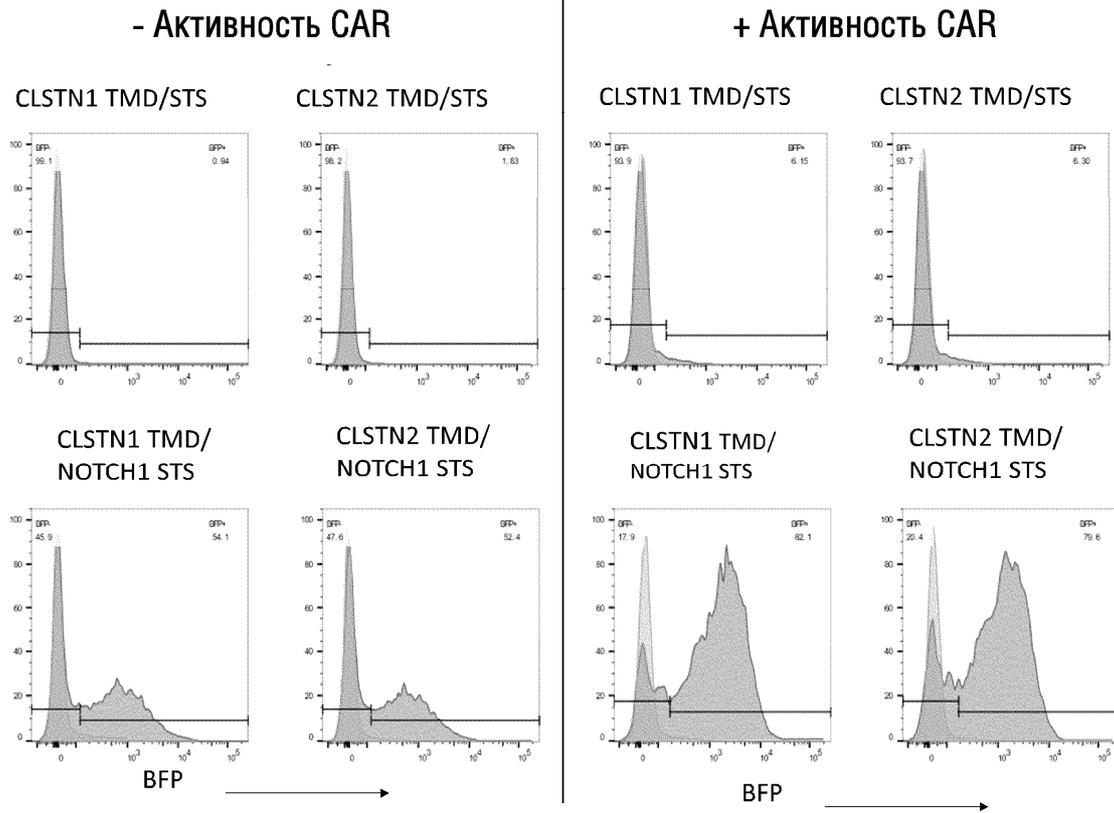


Сканирование аланином Шарнир-Notch - 55 часов



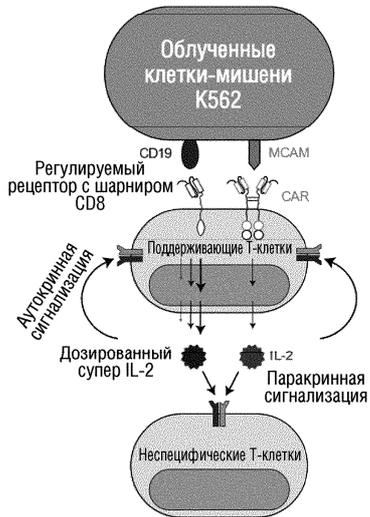
Фиг. 13А-13В

Рецепторы SynCLSTN1/2



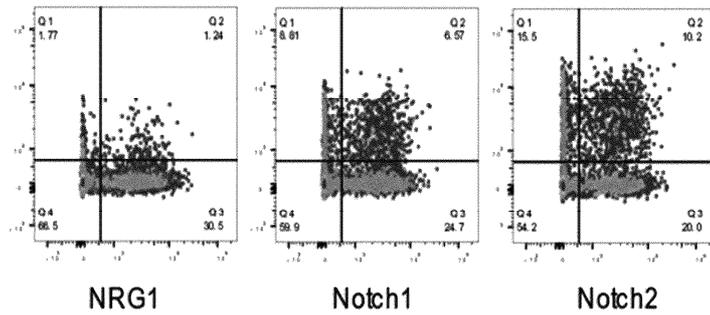
Фиг. 14

Регулируемое, зависимое от лиганда размножение Т-клеток с использованием контролируемой Шарнир-Notch экспрессии генетически модифицированного цитокина



A

Экспрессия рецептора Шарнир-Notch с вариантами STS

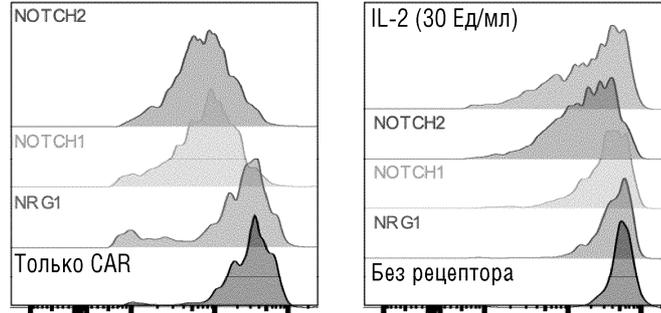


B

Фиг. 15A-15B

Регулируемое, зависимое от лиганда размножение Т-клеток с использованием контролируемой Шарнир-Notch экспрессии генетически модифицированного цитокина

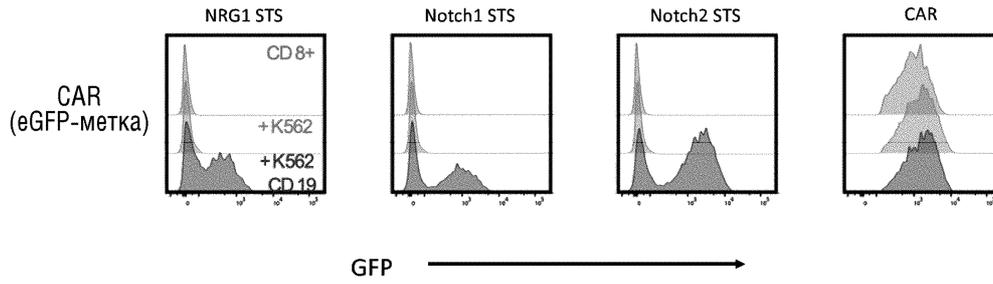
Поддерживающие клетки имеют совместно экспрессируемый CAR Поддерживающие клетки не имеют совместно экспрессируемого CAR



Пролиферация неспецифических клеток (CellTrace™ FarRed), 7 дней

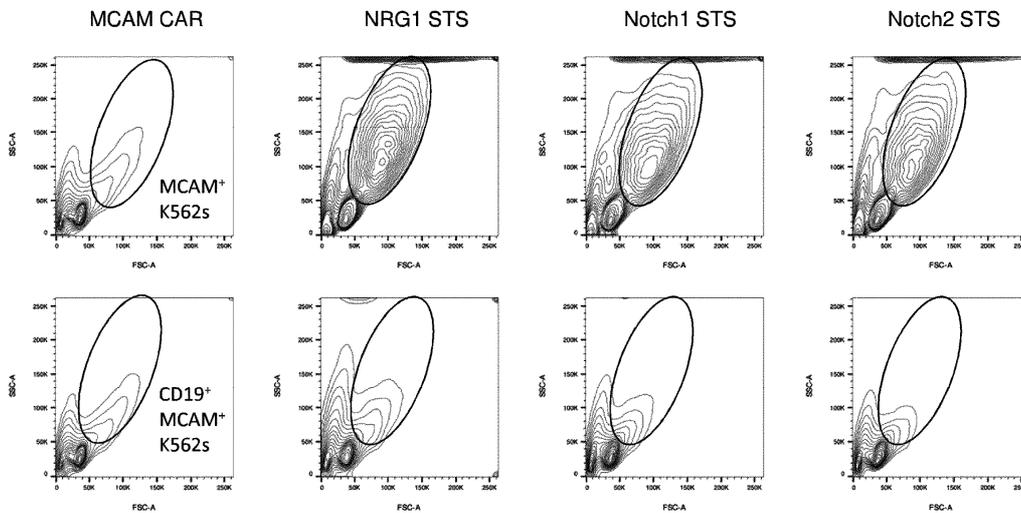
Фиг. 19

Системы рецептора Шарнир-Notch могут функционировать на одном лентивирусном векторе



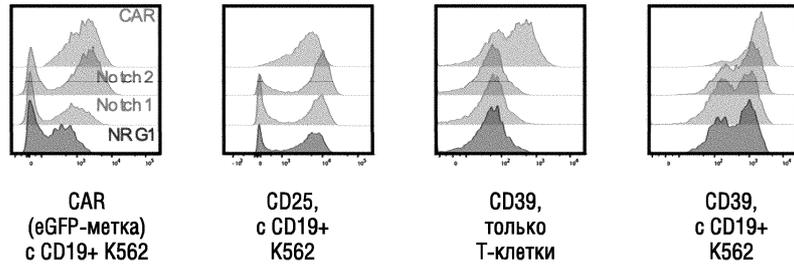
Фиг. 20

Индукция CAR с одиночных векторных конструкций Шарнир-Notch может приводить к специфической элиминации клеток-мишеней с двойными антигенами



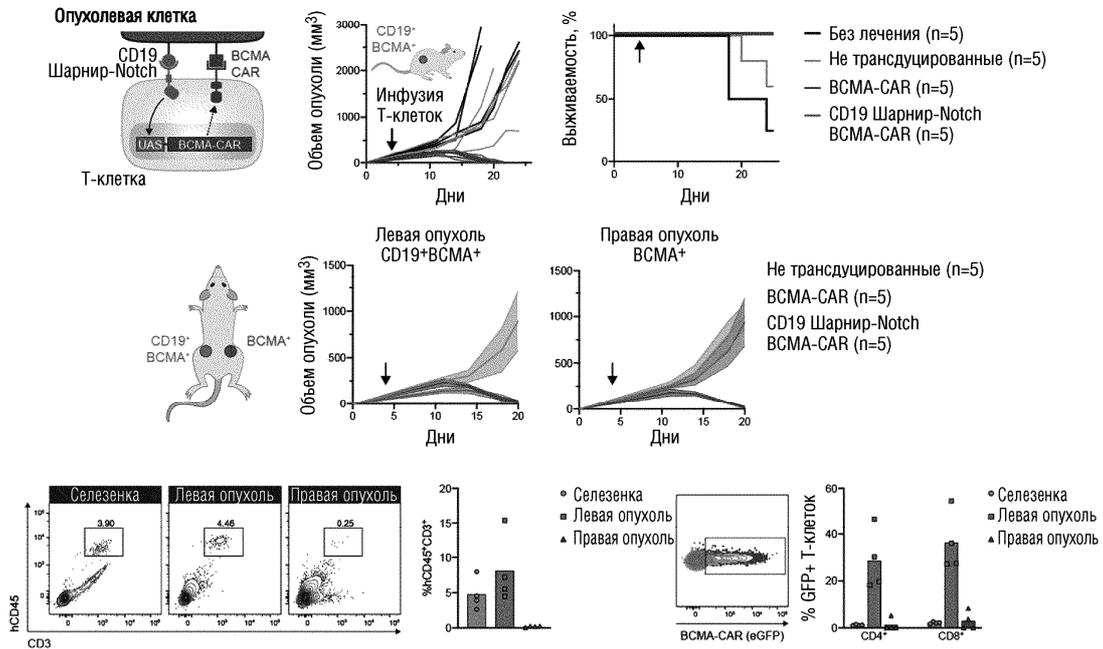
Фиг. 21

Индукция CAR с одиночных векторных конструкций Шарнир-Notch может приводить к специфической элиминации клеток-мишеней с двойными антигенами



Фиг. 22

Избирательное уничтожение опухолевых клеток с двойными антигенами при помощи системы Шарнир-Notch и CAR



Фиг. 23

