

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090931 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.31

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.05.18

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ TCR С ПОМОЩЬЮ
ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ

(31) 62/163,342

(32) 2015.05.18

(33) US

(62) 201792420; 2016.05.18

(71) Заявитель:
ТСР2 ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Баеуерле Патрик, Сичкевич Грегори,
Хофмайстер Роберт (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина
Е.М., Лебедев В.В., Джермакян Р.В.,
Парамонова К.В., Христофоров А.А.,
Костюшенкова М.Ю., Глухарёва А.О.,
Лыу Т.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены гибридные белки (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), Т-клетки, модифицированные для экспрессии одного или более TFP, и способы их применения для лечения заболеваний, включая рак.

A2

202090931

202090931

A2

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ TCR С ПОМОЩЬЮ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США №62/163342, поданной 18 мая 2015, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Большинство пациентов с гематологическими злокачественными опухолями или солидными опухолями на поздней стадии не излечиваются с использованием стандартной терапии. Кроме того, традиционные способы лечения часто имеют серьезные побочные эффекты. Были предприняты многочисленные попытки задействовать иммунную систему пациента для отторжения раковых клеток, этот подход обобщенно называется иммунотерапией рака. Однако ряд обстоятельств затрудняет достижение клинической эффективности. Несмотря на то, что были выявлены сотни так называемых опухолевых антигенов, они часто происходят из аутоантигенов и, соответственно, могут направлять иммунотерапию рака против здоровой ткани или обладают низкой иммуногенностью. Кроме того, раковые клетки используют множество механизмов, чтобы сделать себя невидимыми или враждебными по отношению к инициации и распространению иммунной атаки в результате действия иммунотерапевтических способов лечения рака.

[0003] Последние разработки с использованием терапии на основе аутологичных Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR), которая опирается на перенаправление генетически модифицированных Т-клеток на подходящую молекулу на поверхности раковых клеток, демонстрируют обнадеживающие результаты в использовании возможностей иммунной системы для лечения В-клеточных злокачественных опухолей (см., например, Sadelain et al., Cancer Discovery 3:388-398 (2013)). Клинические результаты, полученные при использовании CD19-специфичных CAR Т-клеток (называемых CTL019), продемонстрировали полную ремиссию у пациентов, страдающих хроническим лимфобластным лейкозом (CLL), а также при детском остром лимфобластном лейкозе (ALL) (см., например, Kalos et al., Sci Transl Med 3:95ra73 (2011), Porter et al., NEJM 365:725-733 (2011), Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)). Альтернативный подход заключается в применении альфа-цепи и бета-цепи Т-клеточного рецептора (TCR), выбранных на основании специфичности в отношении ассоциированного с опухолью пептидного антигена, для генетической модификации

аутологичных Т-клеток. Указанные цепи TCR будут образовывать полные комплексы TCR и обеспечат получение Т-клеток, несущих TCR со вторым видом определенной специфичности. Обнадёживающие результаты были получены при использовании модифицированных аутологичных Т-клеток, экспрессирующих NY-ESO-1-специфичные альфа-цепи и бета-цепи TCR, у пациентов с синовиальной карциномой.

[0004] Помимо способности генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих CAR или второй TCR, распознавать и вызывать гибель соответствующих клеток-мишеней в условиях *in vitro/ex vivo*, успешное лечение пациентов с использованием модифицированных Т-клеток требует наличия Т-клеток, которые способны к сильной активации, пролиферации и устойчивости в течение продолжительного периода времени и, в случае рецидивирующего заболевания, генерации ответа «памяти». Высокая и контролируемая клиническая эффективность Т-клеток, несущих CAR, в настоящее время ограничена CD19-положительными В-клеточными злокачественными опухолями и возможностью применения у пациентов с синовиальной саркомой, экспрессирующей пептид NY-ESO-1 и HLA-A2. Существует очевидная потребность в улучшении генетически модифицированных Т-клеток для более широкого применения против различных злокачественных опухолей человека. В настоящем изобретении предложены новые гибридные белки субъединиц TCR, включая CD3-эпсилон, CD3-гамма и CD3-дельта, а также альфа-цепи и бета-цепи TCR со связывающими доменами, специфичными в отношении клеточных поверхностных антигенов, которые могут преодолеть ограничения существующих подходов. В настоящем изобретении предложены новые гибридные белки, которые более эффективно вызывают гибель клеток-мишеней, чем CAR, однако высвобождают сопоставимые или более низкие уровни провоспалительных цитокинов. Указанные гибридные белки и способы их применения обеспечивают преимущества для TFP по сравнению с CAR, поскольку повышенные уровни указанных цитокинов связаны с ограничивающей дозу токсичностью для ряда видов адоптивной CAR-T терапии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящем изобретении предложены гибридные белки (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), Т-клетки, модифицированные для экспрессии одного или более TFP, и способы их применения для лечения заболеваний.

[0006] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей

мере часть внеклеточного домена TCR, и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3-эпсилон; и домен антитела человека или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, причем указанная субъединица TCR и домен антитела функционально связаны, и при этом указанный TFP встраивается в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0007] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3-гамма; и домен антитела человека или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, причем указанная субъединица TCR и домен антитела функционально связаны, и при этом указанный TFP встраивается в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0008] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3-дельта; и домен антитела человека или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, причем указанная субъединица TCR и домен антитела функционально связаны, и при этом указанный TFP встраивается в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[0009] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR-альфа; и домен антитела человека или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, причем указанная субъединица TCR и домен антитела функционально связаны, и при этом TFP встраивается в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[00010] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR, содержащую по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR, и внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена TCR-бета; и домен антитела человека или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий

домен, причем указанная субъединица TCR и домен антитела функционально связаны, и при этом TFP встраивается в TCR при экспрессии в Т-клетке.

[00011] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR и домен антитела человека или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который представляет собой CD19-связывающий домен.

[00012] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий субъединицу TCR и домен антитела человека или гуманизированного антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, который представляет собой домен, связывающий В-клеточный антиген созревания (BCMA).

[00013] В некоторых случаях субъединица TCR и домен антитела функционально связаны. В некоторых случаях TFP встраивается в TCR при экспрессии в Т-клетке. В некоторых случаях кодируемый антигенсвязывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n=1-4$. В некоторых случаях субъединица TCR содержит внеклеточный домен TCR. В некоторых случаях субъединица TCR содержит трансмембранный домен TCR. В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR. В некоторых случаях субъединица TCR содержит (i) внеклеточный домен TCR, (ii) трансмембранный домен TCR, и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) получены из одной и той же субъединицы TCR. В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3-эпсилон, CD3-гамма или CD3-дельта, или аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации. В некоторых случаях субъединица TCR содержит внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3-дзета, или аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну модификацию. В некоторых случаях домен антитела человека или гуманизированного антитела содержит фрагмент антитела. В некоторых случаях домен антитела человека или гуманизированного антитела содержит scFv или домен V_H . В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует (i) гипервариабельный участок (CDR) 1 легкой цепи (LC), LC CDR2 и LC CDR3 аминокислотной последовательности антигенсвязывающего домена легкой цепи

против CD19, которые на 70-100% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 29, соответственно, и/или (ii) CDR1 тяжелой цепи (HC), HC CDR2 и HC CDR3 аминокислотной последовательности антигенсвязывающего домена тяжелой цепи против CD19, которые на 70-100% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 35, соответственно. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует переменную область легкой цепи, причем переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 49, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 49. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует переменную область тяжелой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 51, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 51. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует (i) CDR1 легкой цепи (LC), LC CDR2 и LC CDR3 аминокислотной последовательности антигенсвязывающего домена легкой цепи против BCMA, которые на 70-100% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41, соответственно, и/или (ii) CDR1 тяжелой цепи (HC), HC CDR2 и HC CDR3 аминокислотной последовательности антигенсвязывающего домена тяжелой цепи против BCMA, которые на 70-100% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 47, соответственно. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует переменную область легкой цепи, причем переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 53, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 53. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует переменную область тяжелой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи,

представленной в SEQ ID NO: 55, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 55. В некоторых случаях TFP содержит внеклеточный домен субъединицы TCR, который содержит внеклеточный домен или его часть из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы CD3-эпсилон TCR, субъединицы CD3-гамма TCR, субъединицы CD3-дельта TCR, их функциональных фрагментов и аминокислотных последовательностей, содержащих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях кодируемый TFP содержит трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы CD3-эпсилон TCR, субъединицы CD3-гамма TCR, субъединицы CD3-дельта TCR, их функциональных фрагментов и аминокислотных последовательностей, содержащих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях кодируемый TFP содержит трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, дзета-цепи TCR, субъединицы CD3-эпсилон TCR, субъединицы CD3-гамма TCR, субъединицы CD3-дельта TCR, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, содержащих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых случаях костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен, полученный из белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), и их аминокислотных последовательностей, содержащих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит лидерную последовательность. В некоторых случаях выделенная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой иРНК.

[00014] В некоторых случаях TFP содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) субъединицы TCR, которая содержит ITAM или его часть из белка, выбранного из группы, состоящей из субъединицы CD3-дзета TCR, субъединицы CD3-эпсилон TCR, субъединицы CD3-гамма TCR, субъединицы CD3-дельта TCR, дзета-цепи TCR, цепи рецептора Fc-эпсилон 1, цепи рецептора Fc-эпсилон 2, цепи рецептора Fc-гамма 1, цепи рецептора Fc-гамма 2a, цепи рецептора Fc-гамма 2b1, цепи рецептора Fc-гамма 2b2, цепи рецептора Fc-гамма 3a, цепи рецептора Fc-гамма 3b, цепи

рецептора Fc-бета 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79B, CD89, CD278, CD66d, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, которые содержат по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях ITAM заменяет ITAM CD3-гамма, CD3-дельта или CD3-эпсилон. В некоторых случаях ITAM выбран из группы, состоящей из субъединицы CD3-дзета TCR, субъединицы CD3-эпсилон TCR, субъединицы CD3-гамма TCR и субъединицы CD3-дельта TCR, и заменяет различные ITAM, выбранные из группы, состоящей из субъединицы CD3-дзета TCR, субъединицы CD3-эпсилон TCR, субъединицы CD3-гамма TCR и субъединицы CD3-дельта TCR.

[00015] В некоторых случаях нуклеиновая кислота содержит аналог нуклеотида. В некоторых случаях аналог нуклеотида выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил (2'-О-MOE), 2'-О-аминопропил, 2'-дезоксифтор, 2'-О-аминопропил (2'-О-AP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-О-DMAP), Т-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-О-DMAEOE), 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA)-модифицированной, закрытой нуклеиновой кислоты (LNA), соединенной этиленовыми мостиками нуклеиновой кислоты (ENA), пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), 1',5'-ангидрогекситоловой нуклеиновой кислоты (HNA), морфолино, метилфосфонатного нуклеотида, тиолфосфонатного нуклеотида и 2'-фтор-N3-P5'-фосфорамидита.

[00016] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула полипептида, кодируемая молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

[00017] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула TFR, содержащая человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен (антигенсвязывающий домен против CD19, анти-CD19 связывающий домен), внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR.

[00018] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула TFR, содержащая человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем указанная молекула TFR способна функционально взаимодействовать с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR.

[00019] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула TFR, содержащая человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный

домен TCR, причем указанная молекула TFP способна функционально интегрироваться в эндогенный комплекс TCR.

[00020] В некоторых случаях выделенная молекула TFP содержит антитело или фрагмент антитела, содержащий человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR. В некоторых случаях CD19-связывающий домен представляет собой scFv или домен V_H. В некоторых случаях CD19-связывающий домен содержит тяжелую цепь, которая на 95-100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 51, ее функциональный фрагмент или ее аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций. В некоторых случаях CD19-связывающий домен содержит легкую цепь, которая на 95-100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 49, ее функциональный фрагмент или ее аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций. В некоторых случаях выделенная молекула TFP содержит внеклеточный домен TCR, который содержит внеклеточный домен или его часть из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы CD3-эпсилон TCR, субъединицы CD3-гамма TCR, субъединицы CD3-дельта TCR, их функциональных фрагментов и их аминокислотных последовательностей, содержащих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях CD19-связывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит (G₄S)_n, где n=1-4.

[00021] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула TFP, содержащая человеческий или гуманизированный ВСМА-связывающий домен (антигенсвязывающий домен против ВСМА, анти-ВСМА связывающий домен), внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR.

[00022] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула TFP, содержащая человеческий или гуманизированный ВСМА-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем указанная молекула TFP способна функционально взаимодействовать с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR.

[00023] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена выделенная молекула TFP, содержащая человеческий или гуманизированный ВСМА-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный

домен TCR, причем указанная молекула TFP способна функционально интегрироваться в эндогенный комплекс TCR.

[00024] В некоторых случаях выделенная молекула TFP содержит антитело или фрагмент антитела, содержащий человеческий или гуманизированный ВСМА-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR. В некоторых случаях ВСМА-связывающий домен представляет собой scFv или домен V_H. В некоторых случаях ВСМА-связывающий домен содержит тяжелую цепь, которая на 95-100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 55, ее функциональный фрагмент или ее аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций. В некоторых случаях ВСМА-связывающий домен содержит легкую цепь, которая на 95-100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, ее функциональный фрагмент или ее аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, но не более 30 модификаций. В некоторых случаях выделенная молекула TFP содержит внеклеточный домен TCR, который содержит внеклеточный домен или его часть из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы CD3-эпсилон TCR, субъединицы CD3-гамма TCR, субъединицы CD3-дельта TCR, их функциональных фрагментов и аминокислотных последовательностей, содержащих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций. В некоторых случаях ВСМА-связывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит (G₄S)_n, где n=1-4. В некоторых случаях выделенная молекула TFP дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых случаях выделенная молекула TFP дополнительно содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых случаях выделенная молекула TFP дополнительно содержит лидерную последовательность.

[00025] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP согласно настоящему изобретению. В некоторых случаях вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора, вектора на основе вируса саркомы Рауса (RSV) или ретровирусного вектора. В некоторых случаях вектор дополнительно содержит промотор. В некоторых случаях вектор представляет собой вектор, транскрибируемый в условиях *in vitro*. В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит поли(A)-хвост. В некоторых

случаях последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'-нетранслируемую область (НТО).

[00026] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена клетка, содержащая вектор согласно настоящему изобретению. В некоторых случаях клетка представляет собой Т-клетку человека. В некоторых случаях Т-клетка представляет собой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетку. В некоторых случаях клетка дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, ассоциированную со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал из внутриклеточного сигнального домена. В некоторых случаях ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

[00027] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетка человека, содержащая по меньшей мере две молекулы TFP, причем указанные молекулы TFP содержат человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, при этом указанная молекула TFP способна функционально взаимодействовать с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR внутри, вблизи и/или на поверхности CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетки человека.

[00028] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен белковый комплекс, содержащий молекулу TFP, содержащую человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и по меньшей мере один эндогенный комплекс TCR.

[00029] В некоторых случаях TCR содержит внеклеточный домен или его часть из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы CD3-эпсилон TCR, субъединицы CD3-гамма TCR и субъединицы CD3-дельта TCR. В некоторых случаях CD19-связывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит (G₄S)_n, где n=1-4.

[00030] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен белковый комплекс, содержащий молекулу TFP, содержащую человеческий или гуманизированный ВСМА-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и по меньшей мере один эндогенный комплекс TCR.

[00031] В некоторых случаях TCR содержит внеклеточный домен или его часть из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи TCR, бета-цепи TCR, субъединицы CD3-эпсилон TCR, субъединицы CD3-гамма TCR и субъединицы CD3-дельта TCR. В некоторых случаях ВСМА-связывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR посредством линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где $n=1-4$.

[00032] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетка человека, содержащая по меньшей мере два различных белка TFR на белковый комплекс согласно настоящему изобретению.

[00033] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ изготовления клетки, включающий трансдукцию Т-клетки вектором согласно настоящему изобретению.

[00034] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ получения популяции РНК-модифицированных клеток, включающий введение транскрибируемой в условиях *in vitro* РНК или синтетической РНК в клетку, причем РНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу TFR согласно настоящему изобретению.

[00035] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки, экспрессирующей молекулу TFR согласно настоящему изобретению или экспрессирующей полипептидную молекулу согласно настоящему изобретению.

[00036] В некоторых случаях клетка представляет собой аутологичную Т-клетку. В некоторых случаях клетка представляет собой аллогенную Т-клетку. В некоторых случаях млекопитающее представляет собой человека.

[00037] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией CD19 или ВСМА, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества молекулы TFR согласно настоящему изобретению, клетки согласно настоящему изобретению или молекулы полипептида согласно настоящему изобретению.

[00038] В некоторых случаях заболевание, связанное с экспрессией CD19 или ВСМА, выбрано из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, рака, злокачественной опухоли, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, предлейкоза, показания, не относящегося к раку, связанного с экспрессией CD19. В некоторых случаях заболевание представляет собой гематологический рак, выбранный из

группы, состоящей из острой В-клеточной лимфоидной лейкемии (B-ALL), острой Т-клеточной лимфоидной лейкемии (T-ALL), острой лимфобластной лейкемии (ALL); хронической миелогенной лейкемии (CML), хронической лимфоцитарной лейкемии (CLL), В-клеточной пролимфоцитарной лейкемии, новообразования из бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лейкоза ворсистых клеток, мелкоклеточной фолликулярной лимфомы, крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, лимфомы MALT-типа, лимфомы из клеток мантийной зоны, лимфомы из клеток маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, новообразования плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, предлейкоза, заболевания, связанного с экспрессией CD19 или BCMA, и их комбинаций. В некоторых случаях клетки, экспрессирующие молекулу TFR, вводят в комбинации с агентом, который повышает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу TFR. В некоторых случаях у млекопитающего высвобождается меньшее количество цитокинов, по сравнению с млекопитающим, которому вводят эффективное количество Т-клетки, экспрессирующей CD19-связывающий химерный антигенный рецептор (CAR) или BCMA-связывающий CAR. В некоторых случаях клетки, экспрессирующие молекулу TFR, вводят в комбинации с агентом, который улучшает один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу TFR. В некоторых случаях клетки, экспрессирующие молекулу TFR, вводят в комбинации с агентом, который лечит заболевание, связанное с CD19 или BCMA.

[00039] Согласно одному аспекту выделенная молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, выделенная полипептидная молекула согласно настоящему изобретению, выделенный TFR согласно настоящему изобретению, комплекс согласно настоящему изобретению, вектор согласно настоящему изобретению или клетка согласно настоящему изобретению предназначены для использования в качестве лекарственного средства.

[00040] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ лечения млекопитающего, имеющего заболевание, связанное с экспрессией CD19 или BCMA, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества молекулы TFR согласно настоящему изобретению, клетки согласно настоящему изобретению или молекулы полипептида согласно настоящему изобретению, причем у указанного млекопитающего высвобождается меньшее количество цитокинов, по

сравнению с млекопитающим, которому вводили эффективное количество Т-клетки, экспрессирующей CD19-связывающий химерный антигенный рецептор (CAR) или ВСМА-связывающий CAR.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[00041] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00042] Новые признаки настоящего изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Признаки и преимущества настоящего изобретения будут более понятны на основании нижеследующего подробного описания, в котором представлены иллюстративные варианты реализации, в которых используются принципы настоящего изобретения, и сопровождающие их чертежи:

[00043] На Фиг. 1 представлена схема, демонстрирующая использование гибридных полипептидов Т-клеточного рецептора (TFP) согласно настоящему изобретению. Типичный TFP содержит CD19-связывающий scFv и полноразмерный полипептид CD3-эпсилон, гибридный посредством линкерной последовательности (G₄S)₃. При выработке или введении в Т-клетку TFP связывается с другими полипептидами эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR) (показано, что TCR содержит два полипептида CD3-эпсилон, один полипептид CD3-гамма, один полипептид CD3-дельта, два полипептида CD3-дзета, одну альфа-субъединицу TCR и одну бета-субъединицу TCR, где горизонтальный серый сегмент представляет плазматическую мембрану) с образованием перепрограммированного TCR, в котором один или оба эндогенных полипептида CD3-эпсилон замещены TFP.

[00044] На Фиг. 2А представлена схема, демонстрирующая примерные варианты гибридных полипептидов перепрограммированного Т-клеточного рецептора (TFP) согласно настоящему изобретению.

[00045] На Фиг. 2А представлен примерный перепрограммированный TCR, содержащий TFP, который содержит CD19-связывающий scFv и полноразмерный полипептид TCR V α , гибридный посредством линкерной последовательности (G₄S)₃.

[00046] На Фиг. 2B представлено несколько примерных перепрограммированных TCR, которые содержат несколько TFP, включая i) CD19-связывающий scFv и полноразмерный полипептид TCR $V\alpha$, гибридный посредством линкерной последовательности $(G_4S)_3$, и ii) CD19-связывающий scFv и полноразмерный полипептид TCR $V\beta$, гибридный посредством линкерной последовательности $(G_4S)_3$.

[00047] На Фиг. 2C представлен примерный перепрограммированный TCR, который содержит несколько TFP, включая i) CD19-связывающий scFv и усеченный (Δ) полипептид TCR, гибридный посредством линкерной последовательности $(G_4S)_3$, и ii) CD19-связывающий scFv и полноразмерный полипептид CD3-эпсилон, гибридный посредством линкерной последовательности $(G_4S)_3$. Усеченный (Δ) полипептид TCR усечен путем делеции $V\alpha$.

[00048] На Фиг. 2D представлен примерный перепрограммированный TCR, который содержит несколько TFP, включая i) CD19-связывающий scFv и усеченный (Δ) полипептид TCR $V\alpha$, гибридный посредством линкерной последовательности $(G_4S)_3$, и ii) CD19-связывающий scFv и усеченный (Δ) полипептид TCR $V\beta$, гибридный посредством линкерной последовательности $(G_4S)_3$. Усеченный (Δ) полипептид TCR усечен путем делеции $V\beta$.

[00049] На Фиг. 3 представлена схема, демонстрирующая использование гибридных полипептидов Т-клеточных рецепторов (TFP) согласно настоящему изобретению. Примерный TFP содержит CD19-связывающий домен V_N и полноразмерный полипептид CD3-эпсилон, гибридный посредством линкерной последовательности $(G_4S)_3$. При выработке Т-клеткой или при введении в Т-клетку TFP связывается с другими полипептидами эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR) (показано, что TCR содержит два полипептида CD3-эпсилон, один полипептид CD3-гамма, один полипептид CD3-дельта, два полипептида CD3-дзета, одну альфа-субъединицу TCR и одну бета-субъединицу TCR, где горизонтальный серый сегмент представляет плазматическую мембрану) с образованием перепрограммированного TCR, в котором один или оба эндогенных полипептида CD3-эпсилон замещены TFP.

[00050] На Фиг.4 представлено несколько схем, демонстрирующих конструкции ДНК, кодирующие различные TFP.

[00051] На Фиг. 5 представлена типичная столбиковая диаграмма поверхностной экспрессии CD19-связывающего LL (длинный линкер) TFP на Т-клетках после трансдукции лентивирусом. Эффекторные Т-клетки представляли собой нетрансдуцированные контрольные клетки или были трансдуцированы анти-CD19-28 ζ CAR или указанными конструкциями анти-CD19 LL TFP. После размножения в течение

10 дней в присутствии ИЛ-2 экспрессию соответствующего CAR или конструкции TFP на поверхности указанных клеток определяли методом проточной цитометрии.

[00052] На Фиг. 6 представлена типичная столбиковая диаграмма поверхностной экспрессии CD19-связывающего SL (короткий линкер) TFP на Т-клетках после трансдукции лентивирусом. Эффекторные Т-клетки представляли собой нетрансдуцированные контрольные клетки или были трансдуцированы анти-CD19-28 ζ CAR или указанными конструкциями анти-CD19 SL TFP. После размножения в течение 7 дней в присутствии ИЛ-2 экспрессию соответствующего CAR или конструкции TFP на поверхности указанных клеток определяли методом проточной цитометрии.

[00053] На Фиг. 7 представлена типичная столбиковая диаграмма поверхностной экспрессии BCMA-связывающего TFP на Т-клетках после трансдукции лентивирусом. Эффекторные Т-клетки представляли собой нетрансдуцированные контрольные клетки или были трансдуцированы конструкциями анти-BCMA-CD3 ϵ или анти-BCMA-CD3 γ TFP. После размножения в течение 10 дней в присутствии ИЛ-2 экспрессию TFP на поверхности указанных клеток определяли методом проточной цитометрии.

[00054] На Фиг. 8 представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая лизис CD19-экспрессирующих клеток-мишеней Raji под действием анти-CD19 LL TFP. Трансдуцированные эффекторные Т-клетки размножали в течение 14 дней перед началом инкубации в течение 18 часов с 1×10^4 клеток-мишеней Raji при соотношении эффекторные клетки:клетки-мишени (E:T) равном 20:1, 10:1 или 5:1. Процент цитотоксичности определяли с помощью количественного исследования цитотоксичности методом проточной цитометрии.

[00055] На Фиг. 9 представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая лизис BCMA-экспрессирующих клеток-мишеней RPMI8226 под действием BCMA-связывающих TFP. Трансдуцированные эффекторные Т-клетки размножали в течение 12 дней перед началом инкубации в течение 4 часов с 1×10^4 клеток-мишеней RPMI8226 при соотношении E:T равном 10:1 или 5:1. Процент цитотоксичности определяли с помощью количественного исследования цитотоксичности методом проточной цитометрии.

[00056] На Фиг. 10А представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая лизис CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa под действием конструкции анти-CD19-28 ζ CAR в зависимости от времени. Трансдуцированные эффекторные Т-клетки размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa. Клеточный индекс, свидетельствующий о цитотоксичности, определяли с помощью количественного исследования RTCA.

[00057] На Фиг. 10B представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая лизис CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa под действием конструкции анти-CD19-CD3 ϵ LL TFP в зависимости от времени. Трансдуцированные эффекторные Т-клетки размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa. Клеточный индекс, свидетельствующий о цитотоксичности, определяли с помощью количественного исследования RTCA.

[00058] На Фиг. 10C представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая лизис CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa под действием конструкции анти-CD19-CD3 γ LL TFP в зависимости от времени. Трансдуцированные эффекторные Т-клетки размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa. Клеточный индекс, свидетельствующий о цитотоксичности, определяли с помощью количественного исследования RTCA.

[00059] На Фиг. 10D представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая лизис CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa под действием конструкции анти-CD19-TCR α s LL TFP в зависимости от времени. Трансдуцированные эффекторные Т-клетки размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa. Клеточный индекс, свидетельствующий о цитотоксичности, определяли с помощью количественного исследования RTCA.

[00060] На Фиг. 10E представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая лизис CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa под действием конструкции анти-CD19-TCR β s LL TFP в зависимости от времени. Трансдуцированные эффекторные Т-клетки размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa. Клеточный индекс, свидетельствующий о цитотоксичности, определяли с помощью количественного исследования RTCA.

[00061] На Фиг. 10F представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая лизис CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa под действием конструкции анти-CD19-TCR α LL TFP в зависимости от времени. Трансдуцированные эффекторные Т-клетки размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa. Клеточный индекс, свидетельствующий о цитотоксичности, определяли с помощью количественного исследования RTCA.

[00062] На Фиг. 10G представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая лизис CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa под действием конструкции анти-CD19-TCR β LL TFP в зависимости от времени. Трансдуцированные эффекторные Т-клетки размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 CD19-

трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa. Клеточный индекс, свидетельствующий о цитотоксичности, определяли с помощью количественного исследования RTCA.

[00063] На Фиг. 11 представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая лизис CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa под действием конструкции CD19-связывающих TFP. Трансдуцированные эффекторные Т-клетки размножали в течение 7 дней перед инкубацией с 1×10^4 CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa. Клеточный индекс, свидетельствующий о цитотоксичности, определяли с помощью количественного исследования RTCA.

[00064] На Фиг. 12 представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая лизис ВСМА-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa под действием ВСМА-связывающих TFP в зависимости от времени. Эффекторные Т-клетки, которые представляли собой нетрансдуцированные контрольные клетки или клетки, трансдуцированные анти-ВСМА-CD3 ϵ или анти-ВСМА-CD3 γ TFP, размножали в течение 7 дней перед инкубацией с 1×10^4 клеток-мишеней линии HeLa или клеток-мишеней линии HeLa-ВСМА. Клеточный индекс, свидетельствующий о цитотоксичности, определяли с помощью количественного исследования RTCA.

[00065] На Фиг. 13 представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая цитолитическую активность Т-клеток, трансдуцированных различными количествами лентивируса, кодирующего анти-CD19-CD3 ϵ LL TFP, в зависимости от времени. Т-клетки, трансдуцированные указанными MOI лентивируса, кодирующего анти-CD19-CD3 ϵ LL TFP, размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa. Определяли клеточный индекс, свидетельствующий о цитотоксичности.

[00066] На Фиг. 14 представлена типичная столбиковая диаграмма, отражающая цитолитическую активность Т-клеток, трансфецированных путем электропорации с использованием транскрибируемой в условиях *in vitro* (IVT) иРНК, кодирующей анти-CD19-CD3 ϵ SL или анти-CD19-CD3 γ SL TRuC. Эффекторные Т-клетки трансфецировали путем электропорации активированных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) транскрибируемой в условиях *in vitro* (IVT) иРНК, кодирующей контрольный белок GFP, анти-CD19-CD3 ϵ SL или анти-CD19-CD3 γ SL TRuC. После размножения в течение 3 дней эффекторные клетки инкубировали в течение 4 часов с 1×10^4 клеток Raji или клеток K562 при соотношении Е:Т равном 10:1. Процент цитотоксичности определяли с помощью количественного исследования цитотоксичности методом проточной цитометрии.

[00067] На Фиг. 15А представлен типичный график высвобождения ИЛ-2 из Т-клеток, трансдуцированных анти-CD19 LL TFP, в ответ на CD19-экспрессирующие клетки-мишени. Эффекторные Т-клетки, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки или клетки, трансдуцированные контрольным CAR, анти-CD19-28 ζ CAT или указанным анти-CD19 LL TFP, размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 Raji или клеток-мишеней K562. Уровни ИЛ-2 определяли с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА).

[00068] На Фиг. 15В представлен типичный график высвобождения ИФН- γ из Т-клеток, трансдуцированных анти-CD19 LL TFP, в ответ на CD19-экспрессирующие клетки-мишени. Эффекторные Т-клетки, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки или клетки, трансдуцированные контрольным CAR, анти-CD19-28 ζ CAT или указанным анти-CD19 LL TFP, размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 клеток-мишеней линии Raji или линии K562. Уровни ИФН- γ определяли с помощью ИФА.

[00069] На Фиг. 15С представлен типичный график высвобождения ИЛ-2 из Т-клеток, трансдуцированных анти-CD19 LL TFP, в ответ на CD19-экспрессирующие клетки-мишени. Эффекторные Т-клетки, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки или клетки, трансдуцированные контрольным CAR, анти-CD19-28 ζ CAT или указанным анти-CD19 LL TFP, размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 клеток-мишеней линии HeLa или линии CD19-HeLa. Уровни ИЛ-2 определяли с помощью ИФА.

[00070] На Фиг. 15D представлен типичный график высвобождения ИФН- γ Т-клетками, трансдуцированными анти-CD19 LL TFP, в ответ на CD19-экспрессирующие клетки-мишени. Эффекторные Т-клетки, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки или клетки, трансдуцированные контрольным CAR, анти-CD19-28 ζ CAT или указанным анти-CD19 LL TFP, размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 клеток-мишеней линии HeLa или линии CD19-HeLa. Уровни ИФН- γ определяли с помощью ИФА.

[00071] На Фиг. 16 представлен типичный график высвобождения ИФН- γ Т-клетками, трансдуцированными CD19-связывающими TFP, в ответ на CD19-экспрессирующие клетки-мишени. Эффекторные Т-клетки, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки или клетки, трансдуцированные указанным CD19-связывающим TFP, размножали в течение 7 дней перед инкубацией с 1×10^4 клеток-мишеней линии HeLa или линии CD19-HeLa. Уровни ИФН- γ определяли с помощью ИФА.

[00072] На Фиг. 17А представлен типичный график высвобождения ИЛ-2 Т-клетками, трансдуцированными ВСМА-связывающими TFP, в ответ на ВСМА-экспрессирующие клетки-мишени. Эффекторные Т-клетки, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки или клетки, трансдуцированные анти-ВСМА-CD3 ϵ или анти-ВСМА-CD3 γ TFP, размножали в течение 7 дней перед инкубацией с 1×10^4 клеток-мишеней линии HeLa или линии HeLa-ВСМА. Выработку ИЛ-2 определяли с помощью платформы 2-Plex Luminex.

[00073] На Фиг. 17В представлен типичный график высвобождения ИФН- γ Т-клетками, трансдуцированными ВСМА-связывающими TFP, в ответ на ВСМА-экспрессирующие клетки-мишени. Эффекторные Т-клетки, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки или клетки, трансдуцированные анти-ВСМА-CD3 ϵ или анти-ВСМА-CD3 γ TFP, размножали в течение 7 дней перед инкубацией с 1×10^4 клеток-мишеней линии HeLa или линии ВСМА-HeLa. Выработку ИФН- γ определяли с помощью платформы 2-Plex LuminexTM.

[00074] На Фиг. 18 представлен типичный график оценки дегрануляции Т-клеток, трансдуцированных CD19-связывающими TFP, в ответ на CD19-экспрессирующие клетки-мишени. Эффекторные Т-клетки, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки или клетки, трансдуцированные анти-CD19-28 ζ CAR, анти-ВСМА-CD3 ϵ LL TFP или анти-ВСМА-CD3 γ LL TFP, размножали в течение 14 дней перед инкубацией с 1×10^4 указанных клеток-мишеней CD19+ve или CD19-ve. Определяли процент CD107+ клеток в пропущенной популяции CD3+CD8+ клеток. Клетки-мишени и эффекторные клетки совместно культивировали в присутствии флуоресцентномеченого антитела к CD107a. Процент Т-клеток в пропущенной популяции CD3 и CD4/CD8 клеток, которые имели положительные результаты окрашивания поверхностного CD107a, затем определяли методом проточной цитометрии.

[00075] На Фиг. 19 представлен типичный график оценки дегрануляции Т-клеток, трансдуцированных ВСМА-связывающими TFP, в ответ на ВСМА-экспрессирующие клетки-мишени. Эффекторные Т-клетки, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки или клетки, трансдуцированные с использованием 50 MOI анти-ВСМА-CD3 ϵ или анти-ВСМА-CD3 γ TFP, размножали в течение 13 дней перед инкубацией с 1×10^4 указанных клеток-мишеней ВСМА+ve RPMI8226. Определяли процент CD107+ клеток в пропущенной популяции CD3+CD8+ клеток.

[00076] На Фиг. 20А представлены типичные графики эффективности в условиях *in vivo* Т-клеток, трансдуцированных анти-CD19 LL TFP, в ксенотрансплантатных моделях генерализованного лейкоза человека. Мышей линии NSG иммунизировали путем

внутривенного введения 5×10^5 клеток Raji за три дня до адоптивного переноса 5×10^6 Т-клеток, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки или клетки, трансдуцированные конструкциями анти-CD19-28 ζ CAR, анти-CD19-CD3 ϵ LL TFP или анти-CD19-CD3 γ LL TFP.

[00077] На Фиг. 20В представлены типичные графики эффективности в условиях *in vivo* Т-клеток, трансдуцированных анти-CD19 LL TFP, в ксенотрансплантатных моделях генерализованного лейкоза человека. Мышей линии NSG иммунизировали путем внутривенного введения 1×10^6 клеток Nalm-6 (справа) за три дня до адоптивного переноса 5×10^6 Т-клеток, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки или клетки, трансдуцированные конструкциями анти-CD19-28 ζ CAR, анти-CD19-CD3 ϵ LL TFP или анти-CD19-CD3 γ LL TFP. Сравнение кривых выживания с помощью логарифмического рангового критерия (Мантеля-Кокса) выявило $p = 0,0001$ (группа 4 по сравнению с 1, 2, 3), $p = 0,0001$ (группа 1 по сравнению с 2, 3) и $p = 0,0004$ (группа 2 по сравнению с 3). Сравнение кривых выживания с использованием критерия Грехана-Бреслоу-Уилкоксона выявило $p = 0,0001$ (группа 4 по сравнению с 1, 2, 3), $p = 0,0001$ (группа 1 по сравнению с 2, 3) и $p = 0,0005$ (группа 2 по сравнению с 3).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00078] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении описаны выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие гибридный белок Т-клеточного рецептора (TCR) (TFP), который содержат субъединицу TCR и домен антитела человека или гуманизированного антитела, содержащий домен связывания CD19. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъединица TCR содержит внеклеточный домен TCR. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения субъединица TCR содержит трансмембранный домен TCR. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения субъединица TCR содержит (i) внеклеточный домен TCR, (ii) трансмембранный домен TCR, и (iii) внутриклеточный домен TCR, причем по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) получены из одной и той же субъединицы TCR. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения субъединица TCR содержит внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен, выбранный из внутриклеточного сигнального домена CD3-эпсилон, CD3-гамма или CD3-дельта, или аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения субъединица TCR содержит

внутриклеточный домен, содержащий стимулирующий домен, выбранный из функционального сигнального домена 4-1BB и/или функционального сигнального домена CD3-дзета, или аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации.

[00079] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен антитела человека или гуманизированного антитела содержит фрагмент антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен антитела человека или гуманизированного антитела содержит scFv или домен V_H.

[00080] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенные молекулы нуклеиновой кислоты содержат (i) CDR1 легкой цепи (LC), LC CDR2 и LC CDR3 из любой аминокислотной последовательности CD19-связывающего домена легкой цепи согласно настоящему изобретению, и/или (ii) CDR1 тяжелой цепи (HC), HC CDR2 и HC CDR3 из любой аминокислотной последовательности CD19-связывающего домена тяжелой цепи согласно настоящему изобретению.

[00081] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций в аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи согласно настоящему изобретению, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности согласно настоящему изобретению. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций в аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи согласно настоящему изобретению, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности согласно настоящему изобретению.

[00082] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения TFR содержит внеклеточный домен субъединицы TCR, который содержит внеклеточный домен или его часть из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3-дельта, CD3-эпсилон или CD3-гамма, или их функционального фрагмента, или аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения кодируемый TFR содержит трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи или бета-цепи TCR, или субъединиц

CD3-эпсилон, CD3-гамма и CD3-дельта TCR, или их функционального фрагмента, или аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[00083] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кодируемый TFP содержит трансмембранный домен, который содержит трансмембранный домен из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи TCR или CD3-эпсилон, CD3-гамма и CD3-дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154, или их функционального фрагмента, или аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[00084] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения кодируемый CD19-связывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR с помощью линкерной последовательности. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n=1-4$. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит длинную линкерную последовательность (LL). В некоторых случаях кодируемая длинная линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n=2-4$. В некоторых случаях кодируемая линкерная последовательность содержит короткую линкерную последовательность (SL). В некоторых случаях кодируемая короткая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n=1-3$.

[00085] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен. В некоторых случаях костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен, полученный из белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), или аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[00086] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит лидерную последовательность.

[00087] В настоящем изобретении также предложены выделенные молекулы полипептида, кодируемого любой из описанных выше молекул нуклеиновых кислот.

[00088] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении также предложены выделенные молекулы гибридного белка Т-клеточного рецептора (TFP), которые содержат человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен, внеклеточный

домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенные молекулы TFP содержат антитело или фрагмент антитела, содержащий человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR.

[00089] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD19-связывающий домен представляет собой scFv или домен V_H . Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения CD19-связывающий домен содержит легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной последовательности согласно настоящему изобретению, или ее функциональный фрагмент, или аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций в аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи согласно настоящему изобретению, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности согласно настоящему изобретению.

[00090] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенные молекулы TFP содержат внеклеточный домен TCR, который содержит внеклеточный домен или его часть из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа- или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3-дельта, CD3-эпсилон или CD3-гамма, или аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций.

[00091] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD19-связывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR с помощью линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит $(G_4S)_n$, где $n=1-4$. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную последовательность (LL). В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n=2-4$. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную последовательность (SL). В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n=1-3$.

[00092] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная молекула TFP дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения выделенная молекула TFP дополнительно содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения выделенные молекулы TFP дополнительно содержат лидерную последовательность.

[00093] В настоящем изобретении также предложены векторы, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую любую из ранее описанных молекул TFP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор дополнительно содержит промотор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор представляет собой транскрибируемый в условиях *in vitro* вектор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит последовательность поли(А). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'-нетранслируемую область (НТО).

[00094] В настоящем изобретении также предложены клетки, которые содержат любые из описанных векторов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка представляет собой Т-клетку человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка представляет собой CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетку. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения клетка дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующую молекулу, которая содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, ассоциированную со вторым полипептидом, который содержит положительный сигнал из внутриклеточного сигнального домена. В некоторых случаях ингибирующие молекулы содержат первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

[00095] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены выделенные молекулы TFP, которые содержат человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем указанная молекула TFP способна функционально взаимодействовать с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR.

[00096] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены выделенные молекулы TFP, которые содержат человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен TCR, причем указанная молекула TFP способна функционально интегрироваться в эндогенный комплекс TCR.

[00097] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетки человека, которые содержат по меньшей мере две молекулы TFP, причем указанные молекулы TFP содержат человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, при этом указанная молекула TFP способна функционально взаимодействовать с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним эндогенным полипептидом TCR внутри, возле и/или на поверхности CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток человека.

[00098] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены белковые комплексы, которые содержат i) молекулу TFP, содержащую человеческий или гуманизированный CD19-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR; и ii) по меньшей мере один эндогенный комплекс TCR.

[00099] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения TCR содержит внеклеточный домен или его часть из белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-цепи или бета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3-дельта, CD3-эпсилон или CD3-гамма. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD19-связывающий домен соединен с внеклеточным доменом TCR с помощью линкерной последовательности. В некоторых случаях линкерная область содержит (G₄S)_n, где n=1-4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную последовательность (LL). В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n=2-4. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную последовательность (SL). В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит (G₄S)_n, где n=1-3.

[000100] В настоящем изобретении также предложены CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетки человека, которые содержат по меньшей мере два различных белка TFP на любой из описанных белковых комплексов.

[000101] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена популяция CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток человека, при этом Т-клетки популяции, по отдельности или вместе, содержат по меньшей мере две молекулы TFP, причем указанные молекулы TFP содержат человеческий или гуманизированный CD19-связывающий или ВСМА-связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен TCR, при этом указанная молекула TFP способна функционально взаимодействовать с эндогенным комплексом TCR и/или по меньшей мере одним

эндогенным полипептидом TCR внутри, возле и/или на поверхности CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток человека.

[000102] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена популяция CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток человека, при этом Т-клетки популяции, по отдельности или вместе, содержат по меньшей мере две молекулы TFP, кодируемые выделенной молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

[000103] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены способы получения клетки, которые включают трансдукцию Т-клеток с использованием описанных векторов.

[000104] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены способы получения популяции РНК-модифицированных клеток, которые включают введение транскрибируемой в условиях *in vitro* РНК или синтетической РНК в клетку, при этом РНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую описанные молекулы TFP.

[000105] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены способы обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, которые включают введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки, экспрессирующей описанные молекулы TFP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка представляет собой аутологичную Т-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка представляет собой аллогенную Т-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения млекопитающее представляет собой человека.

[000106] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены способы лечения млекопитающего, страдающего заболеванием, связанным с экспрессией CD19, которые включают введение указанному млекопитающему эффективного количества клетки, содержащей описанные молекулы TFP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения заболевание, связанное с экспрессией CD19, выбрано из пролиферативного заболевания, такого как рак или злокачественная опухоль, или предракового состояния, такого как миелодисплазия, MDS или предлейкоз, или представляет собой показание, не относящее к раку, связанное с экспрессией CD19. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения заболевание представляет собой гематологический рак, выбранный из группы, включающей один или более видов острого лейкоза, включая, но не ограничиваясь ими, острую В-клеточную лимфоидную лейкемию («B-ALL»), острую Т-клеточную лимфоидную лейкемию («T-ALL»), острую лимфобластную лейкемию (ALL); один или более видов хронического лейкоза, включая, но не ограничиваясь ими, хроническую миелогенную лейкемию (CML),

хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL); дополнительные виды гематологических раковых заболеваний или гематологических состояний, включая, но не ограничиваясь ими, В-клеточную пролимфоцитарную лейкемию, новообразование бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лейкоз ворсистых клеток, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT-типа, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию, миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, новообразование плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема и «предлейкоз», которые представляют собой различные гематологические состояния, общим признаком которых является неэффективная выработка (или дисплазия) миелоидных клеток крови, и заболевание, связанное с экспрессией CD19, включая, но не ограничиваясь ими, атипичные или неклассические виды рака, злокачественные опухоли, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, экспрессирующие CD19, а также их комбинации.

[000107] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки, экспрессирующие любую из описанных молекул TFP, вводят в комбинации с агентом, который облегчает один или более побочных эффектов, связанных с введением клеток, экспрессирующих молекулу TFP. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетку, экспрессирующую любую из описанных молекул TFP, вводят в комбинации с агентом, который лечит заболевание, связанное с CD19.

[000108] В настоящем изобретении также предложена любая из описанных выделенных молекул нуклеиновых кислот, любая из описанных выделенных молекул полипептидов, любой из описанных выделенных TFP, любой из описанных белковых комплексов, любой из описанных векторов или любая из описанных клеток для применения в качестве лекарственного средства.

Определения

[000109] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[000110] Термин «а» и «ап» относится к одному или более чем одному (т.е. по меньшей мере одному) грамматическому объекту изделия. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

[000111] В настоящей заявке «приблизительно» может означать плюс или минус менее чем 1 или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 или более чем 30 процентов, в зависимости от ситуации, и как известно или может быть понятно специалисту в данной области техники.

[000112] В настоящей заявке термин «субъект» или «субъекты» или «индивидуумы» может включать, но не ограничивается ими, млекопитающих, таких как человек или другие млекопитающие, не относящиеся к человеку, например, одомашненные, сельскохозяйственные или дикие животные, а также птиц и водных животных. «Пациенты» являются субъектами, страдающими или подверженными риску развития заболевания, расстройства или состояния, или иначе нуждающимися в композициях и способах согласно настоящему изобретению.

[000113] В настоящей заявке термин «лечить» или «лечение» относится к любому из признаков успешности лечения или облегчения заболевания или состояния. Лечение может включать, например, снижение, задержку или облегчение степени тяжести одного или более симптомов заболевания или состояния, или оно может включать уменьшение частоты возникновения симптомов заболевания, дефекта, расстройства или нежелательного состояния и т.п. у пациента. В настоящей заявке термин «лечить или предотвратить» иногда относится к способу, который обеспечивает определенный уровень лечения или облегчения заболевания или состояния, а также включает ряд результатов, направленных на эту цель, включая, но не ограничиваясь этим, полное предотвращение состояния.

[000114] В настоящей заявке «предотвращение» относится к предотвращению заболевания или состояния, например, образования опухоли, у пациента. Например, если индивидуум, который входит в группу риска развития опухоли или другой формы рака, получает лечение с использованием способов согласно настоящему изобретению, и при этом в дальнейшем у него не развивается опухоль или другая форма рака, то у этого индивидуума заболевание было предотвращено, по меньшей мере в течение продолжительного периода времени.

[000115] В настоящей заявке «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество композиции или ее активного компонента, которое достаточно для того чтобы обеспечить благоприятное действие или иным образом уменьшить вредное, неблагоприятное явление у индивидуума, которому вводят композицию. В настоящей заявке термин «терапевтически эффективная доза» означает дозу, которая обеспечивает одно или более желаемых или желательных (например, полезных) действий, для достижения которых ее вводят, введение осуществляют один или

более раз в течение заданного периода времени. Точная доза будет зависеть от цели лечения, и будет устанавливаться специалистом в данной области техники с использованием известных способов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); и Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

[000116] В настоящей заявке термин «гибридный белок Т-клеточного рецептора (TCR)» или «TFP» включает рекомбинантный полипептид, полученный из различных полипептидов, содержащих TCR, который, как правило, способен i) связываться с поверхностным антигеном на клетках-мишенях, и ii) взаимодействовать с другими полипептидными компонентами интактного комплекса TCR, как правило, при совместном расположении внутри или на поверхности Т-клеток.

[000117] В настоящей заявке термин «CD19» относится к белку 19 кластера дифференцировки, который представляет собой антигенную детерминанту, которая детектируется на клетках-предшественниках В-клеточного лейкоза, других злокачественных В-клетках и большинстве клеток линии нормальных В-клеток. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот человека и мыши могут быть найдены в публичной базе данных, такой как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотная последовательность CD19 человека может быть найдена в UniProt/Swiss-Prot под номером доступа P15391. Каноническая последовательность полипептида человека CD19 может быть найдена в UniProt под номером доступа P15391 (или P15391-1):
 MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKP
 FLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSG
 ELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRD
 SLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRRPAR
 DMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMFSHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVS
 AVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTTPPGSGPQNQYGNVLS
 LPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPEEEEEGEGYEPEP
 DSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSQYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPV
 ARTMDFLSPHGSAWDPSREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSY
 ENMDNPDGPDPAWGGGGRMGWTR (SEQ ID NO: 1).

[000118] Нуклеотидная последовательность, кодирующая CD19 человека, может быть найдена под номером доступа NM001178098. CD19 экспрессируется на большинстве В-клеточных видов рака, включая, например, ALL, CLL и неходжкинскую лимфому (НХЛ). Другие клетки, которые экспрессируют CD19, представлены ниже в определении

«заболевания, связанные с экспрессией CD19». CD19 также является ранним маркером нормальных клеток-предшественников В-клеток. См., например, Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997). В одном примере антигенсвязывающий участок TFP распознает и связывает эпитоп в пределах внеклеточного домена белка CD19, который экспрессируется на злокачественной и нормальной В-клетке.

[000119] В настоящей заявке термин «BCMA» относится к В-клеточному антигену созревания, также известному как член надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 17 (TNFRSF17) и белок 269 кластера дифференцировки (CD269), и представляет собой белок, который у человека кодируется геном TNFRSF17. TNFRSF17 представляет собой рецептор клеточной поверхности, который принадлежит к надсемейству рецепторов ФНО, распознающий фактор активации В-клеток (BAFF) (см., например, Laabi et al., *EMBO* 11 (11): 3897–904 (1992). Этот рецептор экспрессируется в зрелых В-лимфоцитах и может иметь большое значение для развития В-клеток и аутоиммунных реакций. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот человека и мыши могут быть найдены в публичной базе данных, такой как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотная последовательность BCMA человека может быть найдена в UniProt/Swiss-Prot под номером доступа Q02223. Каноническая последовательность полипептида BCMA человека может быть найдена в UniProt под номером доступа Q02223 (или Q02223-1): MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTC LGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYS TVEECTCEDCIKSKPKVDS DHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSSIS AR (SEQ ID NO: 2).

[000120] Нуклеотидная последовательность, кодирующая BCMA человека, может быть найдена под номером доступа NM001192. BCMA экспрессируется на большинстве В-клеточных видов рака, включая, например, лейкоз, лимфомы и множественную миелому. Другие клетки, которые экспрессируют BCMA, представлены ниже в определении «заболевания, связанные с экспрессией BCMA». Было показано, что этот рецептор специфично связывается с членом надсемейства факторов некроза опухолей 13b (лиганд) (TNFSF13B/TALL-1/BAFF) и приводит к активации NF- κ B и MAPK8/JNK. Этот рецептор также связывается с различными членами семейства TRAF и тем самым может передавать сигналы для выживания и пролиферации клеток (см., например, Laabi et al., *Nucleic Acids Research* 22 (7): 1147–54 (1994). В одном примере антигенсвязывающий участок TFP распознает и связывает эпитоп в пределах внеклеточного домена белка BCMA, который экспрессируется на злокачественной и нормальной В-клетке.

[000121] В настоящей заявке термин «антитело» относится к белку или полипептидной последовательности, полученной из молекулы иммуноглобулина, которая специфично связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины поликлонального или моноклонального происхождения или их фрагменты, и могут быть получены из природных или рекомбинантных источников.

[000122] Термины «фрагмент антитела» или «связывающий домен антитела» относятся к по меньшей мере одной части антитела или его рекомбинантных вариантов, которая содержит антигенсвязывающий домен, т.е. к вариательной области, определяющей антигенную специфичность интактного антитела, которая является достаточной для того чтобы обеспечить распознавание и специфичное связывание фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген и его определенный эпитоп. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, одноцепочечные (sc)Fv («scFv») фрагменты антител, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (V_L или V_H), домены V_{HH} верблюдовых и полиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

[000123] Термин «scFv» относится к гибриднему белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариательную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариательную область тяжелой цепи, причем вариательные области легкой цепи и тяжелой цепи непосредственно связаны с помощью короткого гибкого полипептидного мостика, и способны экспрессироваться в виде одной полипептидной цепи, и при этом scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого получен этот фрагмент.

[000124] Термин «вариательная область тяжелой цепи» или «V_H» применительно к антителу относится к фрагменту тяжелой цепи, которая содержит три CDR, расположенные между фланкирующими участками, известными как каркасные участки, причем указанные каркасные участки, как правило, более высококонсервативны, чем CDR, и образуют каркас для поддержки CDR.

[000125] Если не указано иное, в настоящей заявке scFv может содержать вариательные области V_L и V_H в любом порядке, например, по отношению к N-концу и C-концу полипептида, scFv может содержать V_L-линкер-V_H или может содержать V_H-линкер-V_L.

[000126] Часть композиции TFP согласно настоящему изобретению, содержащая антитело или фрагмент антитела, может существовать в различных формах, в которых антигенсвязывающий домен экспрессируется как часть непрерывной полипептидной цепи, содержащей, например, фрагмент однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечное

антитело (scFv), полученное из мышинового антитела, гуманизированного антитела или антитела человека (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.; Harlow et al., 1989, в: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). Согласно одному аспекту антигенсвязывающий домен композиции TFP согласно настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте TFP содержит фрагмент антитела, который содержит scFv или sdAb.

[000127] Термин «тяжелая цепь антитела» относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в природных конформациях, и обычно определяет класс, к которому принадлежит антитело.

[000128] Термин «легкая цепь антитела» относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в молекулах антител в природных конформациях. Каппа («κ») и лямбда («λ») легкие цепи относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела.

[000129] Термин «рекомбинантное антитело» означает антитело, которое получено с использованием технологии рекомбинантной ДНК, такое как, например, антитело, которое экспрессируется системой экспрессии в бактериофагах или дрожжах. Термин также означает антитело, которое было получено путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело и обеспечивающей экспрессию указанного антитела, или аминокислотной последовательности, определяющей антитело, причем последовательность ДНК или аминокислотная последовательность была получена с использованием технологии рекомбинантной ДНК или аминокислотной последовательности, которая доступна и хорошо известна в данной области техники.

[000130] Термин «антиген» или «Ag» относится к молекуле, которая способна специфично связываться с антителом или иным образом провоцировать иммунный ответ. Иммунный ответ может включать выработку антител или активацию специфичных иммунологически компетентных клеток, или и то, и другое.

[000131] Специалист в данной области техники поймет, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Кроме того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалист в данной области техники поймет, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, следовательно, кодирует «антиген», в соответствии с использованием данного термина в настоящем документе. Кроме того,

специалист в данной области техники поймет, что антиген не должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает, но не ограничивается ими, применение частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена, и что подходящие нуклеотидные последовательности сгруппированы в различные комбинации, чтобы кодировать полипептиды, которые вызывают желаемую иммунную реакцию. Кроме того, специалист в данной области техники поймет, что антиген не должен кодироваться «геном» вообще. Очевидно, что антиген может быть синтезирован или может быть получен из биологического образца, или может представлять собой макромолекулу, помимо полипептида. Подходящий биологический образец может включать, но не ограничивается ими, образец ткани, образец опухоли, клетку или жидкость с другими биологическими компонентами.

[000132] Термин «противоопухолевое действие» относится к биологическому эффекту, который может проявляться различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, например, уменьшение объема опухоли, уменьшение количества опухолевых клеток, уменьшение числа метастазов, увеличение продолжительности жизни, уменьшение пролиферации опухолевых клеток, уменьшение выживаемости опухолевых клеток или улучшение различных физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием. «Противоопухолевое действие» также может проявляться в виде способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител согласно настоящему изобретению в первую очередь предотвращать возникновение опухоли.

[000133] Термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от одного и того же индивидуума, которому он будет повторно введен позже.

[000134] Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному из разных животных одного и того же вида или от пациента, который не является индивидуумом, которому вводят материал. Двое или более индивидуумов являются аллогенным по отношению друг к другу, когда гены в одном или более локусов не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал от индивидуумов одного и того же вида может отличаться в достаточной степени генетически, чтобы вызвать антигенное взаимодействие.

[000135] Термин «ксеногенный» относится к трансплантату, полученному от животного другого вида.

[000136] Термин «рак» относится к заболеванию, которое характеризуется быстрым и неконтролируемым размножением аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему к другим

частям тела. Примеры различных видов рака описаны в настоящем документе и включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак печени, рак мозга, лимфому, лейкоз, рак легких и т.п.

[000137] Выражение «заболевание, связанное с экспрессией CD19» и «заболевание, связанное с экспрессией BCMA» включает, но не ограничивается ими, заболевание, связанное с экспрессией CD19 или BCMA, или состояние, связанное с клетками, которые экспрессируют CD19 или BCMA, включая, например, пролиферативные заболевания, такие как рак или злокачественная опухоль, или предраковое состояние, такое как миелодисплазия, миелодиспластический синдром или предлейкоз; или показание, не относящееся к раку, связанное с клетками, которые экспрессируют CD19 или BCMA. Согласно одному аспекту рак, связанный с экспрессией CD19 или BCMA, представляет собой гематологический рак. Согласно одному аспекту гематологический рак представляет собой лейкоз или лимфому. Согласно одному аспекту рак, связанный с экспрессией CD19 или BCMA, включает различные виды рака и злокачественные опухоли, включая, но не ограничиваясь ими, например, один или более видов острой лейкемии, включая, но не ограничиваясь ими, например, острую В-клеточную лимфоидную лейкемию, острую Т-клеточную лимфоидную лейкемию («Т-ALL»); один или более видов хронической лейкемии, включая, но не ограничиваясь ими, CLL или хроническую миелогенную лейкемию (CML). Другие гематологические раковые заболевания или гематологические состояния, связанные с экспрессией CD19, включают, но не ограничиваются ими, например, В-клеточную пролимфоцитарную лейкемию, новообразование бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лейкоз ворсистых клеток, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT-типа, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию, миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, новообразование плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема и «предлейкоз», которые представляют собой разнородную совокупность гематологических состояний, общим признаком которых является неэффективная выработка (или дисплазия) миелоидных клеток крови, и т.п. Другие заболевания, связанные с экспрессией CD19 или BCMA, включают, но не ограничиваются ими, атипичные и/или неклассические виды рака, злокачественные опухоли, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, связанные с

экспрессией CD19 или ВСМА. Показания, не относящие к раку, связанные с экспрессией CD19 или ВСМА, включают, но не ограничиваются ими, аутоиммунное заболевание (например, волчанку, ревматоидный артрит, колит), воспалительные расстройства (аллергию и астму) и трансплантацию.

[000138] Термин «консервативные модификации последовательности» относится к модификациям аминокислот, которые не оказывают существенного влияния или не изменяют характеристики связывания антитела или фрагмента антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Подходящие консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Модификации могут быть введены в антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению с помощью стандартных способов, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные замены аминокислот включают те, в которых остаток аминокислоты заменен остатком аминокислоты, имеющим сходную боковую цепь. Семейства остатков аминокислот, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Следовательно, один или более остатков аминокислот в TFR согласно настоящему изобретению могут быть заменены другими остатками аминокислот из семейства, имеющего сходные боковые цепи, и измененный TFR может быть исследован с помощью функциональных количественных исследований, описанных в настоящем документе.

[000139] Термин «стимуляция» относится к первичной реакции, индуцируемой путем связывания стимулирующего домена или стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) с его когнатным лигандом, что приводит к передаче сигнала, включая, но не ограничиваясь этим, передачу сигнала с участием комплекса TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул и/или реорганизацию структур цитоскелета и т.п.

[000140] Термин «стимулирующая молекула» или «стимулирующий домен» относится к молекуле или ее части, экспрессируемой Т-клеткой, которая обеспечивает

первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность(и), которая регулирует первичную активацию комплекса TCR, тем самым стимулируя его, по меньшей мере в отношении некоторых аспектов пути передачи сигналов с участием Т-клеток. Согласно одному аспекту первичный сигнал инициируется, например, при связывании комплекса TCR/CD3 с молекулой ГКГС, нагруженной пептидом, что ведет к индукции Т-клеточного ответа, включая, но не ограничиваясь ими, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность (также называемая «первичный сигнальный домен»), которая действует стимулирующим образом, может содержать сигнальный мотив пути, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив «ИТАМ». Примеры ИТАМ, содержащего первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которую можно применять в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, ИТАМ, полученные из TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79B, CD278 (также известного как «ICOS») и CD66d.

[000141] Термин «антигенпредставляющая клетка» или «АПК» относится к клетке иммунной системы, такой как вспомогательная клетка (например, В-клетка, дендритная клетка и т.п.), которая представляет чужеродный антиген в комплексе с молекулами основного комплекса гистосовместимости (ГКГС) на ее поверхности. Т-клетки могут распознавать эти комплексы с использованием своих Т-клеточных рецепторов (TCR). АПК обрабатывают антигены и представляют их Т-клеткам.

[000142] В настоящей заявке термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен создает сигнал, который стимулирует иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей TFR, например, TFR-экспрессирующей Т-клетки. Примеры иммунной эффекторной функции, например, в TFR-экспрессирующей Т-клетке, включают цитолитическую активность и активность Т-хелперов, включая секрецию цитокинов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. Типичные первичные внутриклеточные сигнальные домены включают те, которые получены из молекул, ответственных за первичную стимуляцию, или антигензависимую стимуляцию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. Типичные костимулирующие внутриклеточные сигнальные домены включают те, которые получены из молекул, ответственных за костимулирующие сигналы, или антигеннезависимую стимуляцию.

[000143] Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать ITAM («иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив»). Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают, но не ограничиваются ими, ITAM, полученные из CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79B и CD66d DAP10 и DAP12.

[000144] Термин «костимулирующая молекула» относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфично связывается с костимулирующим лигандом, инициируя тем самым костимулирующий ответ со стороны Т-клеток, такой как, но не ограничиваясь им, пролиферация. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от рецепторов антигена или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включают, но не ограничиваются ими, молекулы ГКГС класса 1, BTLA и лиганд Toll-рецептора, а также OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) и 4-1BB (CD137). Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточную часть костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена в следующих семействах белков: белки рецептора ФНО, иммуноглобулин-подобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные активирующие лимфоциты молекулы (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. Примеры подходящих молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 и лиганд, который специфично связывается с CD83, и т.п. Внутриклеточный сигнальный домен может содержать всю внутриклеточную часть или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он получен, или его функциональный фрагмент. Термин «4-1BB» относится к члену надсемейства рецепторов факторов некроза опухолей с аминокислотной последовательностью, представленной в GenBank под номером доступа AAA62478.2, или эквивалентными остатками из вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т.п.; и «костимулирующий домен 4-1BB» определяют как аминокислотные остатки 214-255 из последовательности, представленной в GenBank под номером доступа AAA62478.2, или эквивалентные остатки из вида, отличного от человека, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т.п.

[000145] Термин «кодирующий» относится к природному свойству специфичных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или иРНК, служить в биологических процессах в качестве матриц для синтеза других полимеров и

макромолекул, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и иРНК) или определенную последовательность аминокислот и биологические свойства, обусловленные указанной аминокислотной последовательностью. Следовательно, ген, кДНК, или РНК, кодирует белок, если транскрипция и трансляция иРНК, соответствующей этому гену, приводит к выработке белка в клетке или другой биологической системе. Кодировущая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности иРНК и, как правило, представлена в перечне последовательностей, и некодирующая цепь, использованная в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут быть отнесены к кодирующим белок или другой продукт указанного гена или кДНК.

[000146] Если не указано иное, то «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность», включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными вариантами друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Выражение «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК» также может включать интроны в тех случаях, когда нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, в некоторых вариантах, содержит один или более интронов.

[000147] Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, описанному в настоящем документе, которое является эффективным для достижения конкретного биологического или терапевтического результата.

[000148] Термин «эндогенный» относится к любому материалу, который получен из организма, клетки, ткани или системы или произведен внутри них.

[000149] Термин «экзогенный» относится к любому материалу, поступившему из организма, клетки, ткани или системы или произведенному вне них.

[000150] Термин «экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции конкретной нуклеотидной последовательности, управляемой промотором.

[000151] Термин «вектор для переноса» относится к композиции соединений, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно применять для доставки выделенной нуклеиновой кислоты во внутреннее содержимое клетки. Многочисленные векторы известны в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Следовательно, термин «вектор для переноса» включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Термин также

дополнительно включает неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизин, липосома и т.п. Примеры вирусных векторов для переноса включают, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированных вирусов, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т.п.

[000152] Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности, контролирующие экспрессию, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, которую экспрессируют. Вектор экспрессии содержит достаточное количество *cis*-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут обеспечиваться клеткой-хозяином или в системе экспрессии в условиях *in vitro*. Векторы экспрессии включают все векторы, которые известны в данной области техники, в том числе космиды, плазмиды (например, лишенные оболочки или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

[000153] Термин «лентивирус» относится к роду семейства *Retroviridae*. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов, поскольку они способны инфицировать не делящиеся клетки; они могут доставить значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, поэтому они являются одними из наиболее эффективных векторов для доставки генов. ВИЧ, SIV и FIV являются примерами лентивирусов.

[000154] Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, полученному из по меньшей мере части генома лентивируса, в частности, включая самоинактивирующийся лентивирусный вектор, описанный в Milone et al., *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые могут быть использованы в клинических условиях, включают, но не ограничиваются ими, например, технологию доставки генов LENTIVECTOR™ от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen, и т.п. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и должны быть известны специалистам в данной области техники.

[000155] Термин «гомологичный» или «идентичность» относится к идентичности последовательностей субъединиц между двумя полимерными молекулами, например, между двумя молекулами нуклеиновых кислот, такими как две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или между двумя молекулами полипептидов. В случае если положение субъединицы в обеих молекулах занято аналогичной мономерной субъединицей, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то они

являются гомологичными или идентичными в этом положении. Гомология между двумя последовательностями является прямой функцией числа совпадающих или гомологичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере, который содержит десять субъединиц в длину) положений в двух последовательностях являются гомологичными, то две последовательности на 50% гомологичны; если 90% положений (например, 9 из 10) совпадают или гомологичны, то две последовательности на 90% гомологичны.

[000156] «Гуманизированные» формы антител из вида, отличного от человека (например, мыши), представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина вида, отличного от человека. По большей части, гуманизированные антитела и фрагменты таких антител представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело или фрагмент антитела), в которых остатки из гипервариабельного участка (CDR) реципиента заменены остатками из CDR вида, отличного от человека (донорное антитело), такого как мышь, крыса или кролик, имеющим требуемую специфичность, аффинность и активность. В некоторых случаях остатки каркасного участка Fv (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками из вида, отличного от человека. Кроме того, гуманизированное антитело/фрагмент антитела может содержать остатки, которые не обнаруживаются ни в антителе-реципиенте, ни в импортируемых CDR или каркасных последовательностях. Эти модификации могут дополнительно улучшить и оптимизировать функциональность антитела или фрагмента. В целом, гуманизированное антитело или фрагмент указанного антитела будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все из областей CDR соответствуют таковым иммуноглобулина из вида, отличного от человека, и все или значительная часть FR представляют собой участки из последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело или фрагмент указанного антитела также может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Jones et al., *Nature*, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596, 1992.

[000157] Термин «человеческий» или «полностью человеческий» относится к иммуноглобулину, такому как антитело или фрагмент антитела, когда вся молекула

получена от человека или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной антителу или иммуноглобулину человека.

[000158] Термин «выделенный» означает измененный или удаленный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, которые обнаруживаются у живого животного в природных условиях, не являются «выделенными», однако аналогичная нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сопутствующих материалов в его природном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок может существовать в по существу очищенной форме или может существовать в неприродной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

[000159] Применительно к настоящему изобретению для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот используются следующие сокращения. «А» относится к аденозину, «С» относится к цитозину, «G» относится к гуанозину, «Т» относится к тимидину и «U» относится к уридину.

[000160] Термин «функционально связанный» или «транскрипционный контроль» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, что приводит к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в функциональной связи со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор воздействует на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть смежными друг с другом и, например, если необходимо соединить две области, кодирующие белки, находятся в одной и той же рамке считывания.

[000161] Термин «парентеральное» введение иммуногенной композиции включает, например, подкожную (п/к), внутривенную (в/в), внутримышечную (в/м) или интратермальную инъекцию, внутриопухолевое введение или методики инфузий.

[000162] Термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Если конкретно не ограничено, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые имеют аналогичные связывающие свойства, как и эталонная нуклеиновая кислота, и которые метаболизируются аналогично природным нуклеотидам.

Если не указано иное, то конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно включает консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную в явном виде. В частности, замены вырожденных кодонов могут быть достигнуты путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или более из выбранных (или всех) кодонов заменено неоднозначными основаниями и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

[000163] Термины «пептид» «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из остатков аминокислот, ковалентно соединенных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, при этом максимальное количество аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида, не ограничено. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. В настоящей заявке термин относится к коротким цепям, которые также обычно называются в данной области техники пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, и к более длинным цепям, которые обычно называются в данной области техники белками, которых существует много типов. «Полипептиды» содержат, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, гибридные белки, помимо всего прочего. Полипептид включает природный пептид, рекомбинантный пептид или их комбинацию.

[000164] Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, которая распознается аппаратом транскрипции клетки или введенным синтетическим молекулярным аппаратом, и необходима для инициирования специфичной транскрипции полинуклеотидной последовательности.

[000165] Термин «промотор/регуляторная последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая необходима для экспрессии продукта гена, функционально связанного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях указанная последовательность может быть основной промоторной последовательностью, при этом в других случаях указанная последовательность также может включать последовательность энхансера и другие регуляторные элементы, которые необходимы для экспрессии продукта гена. Промотор/регуляторная последовательность

может, например, представлять собой последовательность, которая экспрессирует продукт гена в ткани специфичным образом.

[000166] Термин «конститутивный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, при наличии функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, вызывает выработку генного продукта в клетке в большинстве или во всех физиологических условиях клетки.

[000167] Термин «индуцируемый» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, при наличии функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, вызывает выработку генного продукта в клетке по существу только если в клетке присутствует индуктор, который соответствует промотору.

[000168] Термин «тканеспецифичный» промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая, при наличии функциональной связи с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, вызывает выработку генного продукта в клетке по существу только если клетка представляет собой клетку из типа ткани, соответствующей промотору.

[000169] Термины «линкер» и «гибкий полипептидный линкер», применительно к scFv, относятся к пептидному линкеру, который состоит из аминокислот, таких как остатки глицина и/или серина, используемых по отдельности или в комбинации, предназначенному для соединения вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гибкий полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser и содержит аминокислотную последовательность $(\text{Gly-Gly-Gly-Ser})_n$, где n представляет собой положительное целое число равное или больше 1. Например, $n=1$, $n=2$, $n=3$, $n=4$, $n=5$, $n=6$, $n=7$, $n=8$, $n=9$ и $n=10$. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гибкие полипептидные линкеры включают, но не ограничиваются ими, $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ или $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения линкеры содержат множественные повторы (Gly_2Ser) , (GlySer) или (Gly_3Ser) . Линкеры, описанные в WO2012/138475 (включен в настоящий документ посредством ссылки), также включены в объем настоящего изобретения. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную последовательность (LL). В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит $(\text{G}_4\text{S})_n$, где $n=2-4$. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную последовательность (SL). В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит $(\text{G}_4\text{S})_n$, где $n=1-3$.

[000170] В настоящей заявке 5'-кэп (также называемый РНК-кэп, РНК-7-метилгуанозиновый кэп или РНК-m7G-кэп) представляет собой модифицированный гуаниновый нуклеотид, который был добавлен к «началу» или на 5'-конце эукариотической матричной РНК вскоре после старта транскрипции. 5'-кэп состоит из терминальной группы, которая соединена с первым транскрибируемым нуклеотидом. Его присутствие является очень важным для распознавания рибосомой и защиты от РНКазы. Добавление кэпа связано с транскрипцией и происходит котранскрипционно так, что каждый процесс влияет на другой. Вскоре после начала транскрипции 5'-конец синтезируемой иРНК связывается с кэп-синтезирующим комплексом, связанным с РНК-полимеразой. Этот ферментный комплекс катализирует химические реакции, которые необходимы для кэппирования иРНК. Синтез протекает как многостадийная биохимическая реакция. Кэппирующий фрагмент может быть модифицирован, чтобы модулировать функциональность иРНК, например, стабильность или эффективность трансляции.

[000171] В настоящей заявке «транскрибируемая в условиях *in vitro* РНК» относится к РНК, предпочтительно иРНК, которая была синтезирована в условиях *in vitro*. Как правило, транскрибируемая в условиях *in vitro* РНК получена из транскрибируемого в условиях *in vitro* вектора. Транскрибируемый в условиях *in vitro* вектор содержит матрицу, используемую для получения транскрибируемой в условиях *in vitro* РНК.

[000172] В настоящей заявке «поли(А)» представляет собой несколько остатков аденозина, прикрепленных с помощью полиаденилирования к иРНК. В предпочтительном варианте реализации конструкции для кратковременной экспрессии последовательность полиА содержит от 50 до 5000, предпочтительно более 64, более предпочтительно более 100, наиболее предпочтительно более 300 или 400 оснований. Последовательности поли(А) могут быть модифицированы химическим или ферментативным путем, чтобы модулировать функциональные возможности иРНК, такие как локализация, стабильность и эффективность трансляции.

[000173] В настоящей заявке «полиаденилирование» относится к ковалентному связыванию полиаденильного фрагмента или его модифицированного варианта с молекулой иРНК. У эукариотических организмов большинство молекул информационной РНК (иРНК) полиаденилированы на 3'-конце. 3'-поли(А) хвост представляет собой длинную последовательность адениновых нуклеотидов (часто несколько сотен), добавленных к пре-иРНК под действием фермента полиаденилатполимеразы. У высших эукариот поли(А) хвост добавляется на транскрипты, которые содержат специфичную последовательность, сигнал полиаденилирования. Последовательность поли(А) и

связанный с ней белок помогают защищать иРНК от разрушения экзонуклеазами. Полиаденилирование также имеет большое значение для терминации транскрипции, экспорта иРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре сразу после транскрипции ДНК в РНК, но дополнительно также может происходить позже в цитоплазме. После прекращения транскрипции цепь иРНК расщепляется под действием эндонуклеазного комплекса, связанного с РНК-полимеразой. Сайт расщепления обычно характеризуется наличием последовательности оснований AAUAAA вблизи сайта расщепления. После расщепления иРНК происходит добавление аденозиновых остатков к свободному 3'-концу в сайте расщепления.

[000174] В настоящей заявке термин «кратковременный» относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение часов, дней или недель, причем период времени, необходимый для экспрессии, меньше, чем период времени для экспрессии гена, интегрированного в геном или содержащегося в стабильном плазмидном репликоне в клетке-хозяине.

[000175] Термин «путь передачи сигнала» относится к биохимической взаимосвязи между различными сигнальными молекулами, которые участвуют в передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. Выражение «рецептор клеточной поверхности» включает молекулу и комплексы молекул, способных принимать сигнал и передавать сигнал через мембрану клетки.

[000176] Термин «субъект» включает живые организмы, у которых может быть вызвана иммунная реакция (например, млекопитающих, человека).

[000177] Термин «по существу очищенная» клетка относится к клетке, которая по существу не содержит других типов клеток. По существу очищенная клетка также относится к клетке, которая была отделена от других типов клеток, с которыми она обычно связана в природном состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин относится только к клеткам, которые были отделены от клеток, с которыми они связаны в природном состоянии. В некоторых аспектах клетки культивируют в условиях *in vitro*. В других аспектах клетки не культивируют в условиях *in vitro*.

[000178] В настоящей заявке термин «терапевтический» означает лечение. Терапевтический эффект достигается путем уменьшения, подавления, ремиссии или эрадикации болезненного состояния.

[000179] В настоящей заявке термин «профилактика» означает профилактику или защитную обработку в отношении заболевания или болезненного состояния.

[000180] Применительно к настоящему изобретению термины «опухолевый антиген» или «антиген гиперпролиферативного расстройства» или «антиген, связанный с гиперпролиферативным расстройством» относятся к антигенам, которые являются общими для конкретных гиперпролиферативных расстройств. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения антигены гиперпролиферативного расстройства согласно настоящему изобретению имеют раковое происхождение, включая, но не ограничиваясь ими, первичную или метастатическую меланому, тимому, лимфому, саркому, рак легких, рак печени, НХЛ, лейкозы, рак матки, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак почек и аденокарциномы, такие как рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак поджелудочной железы и т.п.

[000181] Термин «трансфецированный» или «трансформированный» или «трансдуцированный» относится к процессу, с помощью которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. «Трансфецированная» или «трансформированная» или «трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансфецирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку субъекта и ее потомство.

[000182] Термин «специфично связывается» означает антитело, фрагмент антитела или специфичный лиганд, который распознает и связывается с когнатым партнером по связыванию (например, CD19), присутствующим в образце, но который по существу и в значительной степени не распознает или не связывает другие молекулы в образце.

[000183] Диапазоны: в настоящем документе различные аспекты настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона приведено исключительно для удобства и краткости и не должно быть истолковано как жесткое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, описание диапазона следует рассматривать, как конкретно описывающее все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах данного диапазона. Например, описание диапазона, например, от 1 до 6, следует рассматривать как конкретно раскрытые поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные цифровые значения в пределах данного диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера, диапазон, например, 95-99% идентичность, включает любое значение из 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности, и включает поддиапазоны, такие как 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% и 98-99% идентичность. Широта диапазона не является ограничивающим фактором.

ОПИСАНИЕ

[000184] В настоящем изобретении предложены композиции соединений и способы применения для лечения заболевания, такого как рак, с использованием гибридных белков Т-клеточных рецепторов (TCR). В настоящей заявке «гибридный белок Т-клеточного рецептора (TCR)» или «TFP» содержит рекомбинантный полипептид, полученный из различных полипептидов, содержащих TCR, которые, как правило, способны i) связываться с поверхностным антигеном на клетках-мишенях, и ii) взаимодействовать с другими полипептидными компонентами интактного комплекса TCR, как правило, при совместном расположении внутри или на поверхности Т-клеток. TFP согласно настоящему изобретению обеспечивают значительные преимущества по сравнению с химерными антигенными рецепторами. Термин «химерный антигенный рецептор» или, в другом варианте, «CAR» относится к рекомбинантному полипептиду, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен в форме scFv, трансмембранный домен и цитоплазматические сигнальные домены (также называемые в настоящем документе «внутриклеточные сигнальные домены»), содержащие функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, определенной ниже. Обычно центральный внутриклеточный сигнальный домен CAR получен из дзета-цепи CD3, которая обычно связана с комплексом TCR. Сигнальный домен CD3-дзета может быть гибридизован с одним или более функциональными сигнальными доменами, полученными из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, такой как 4-1BB (т.е., CD137), CD27 и/или CD28.

Гибридные белки Т-клеточных рецепторов (TCR) (TFP)

[000185] В область настоящего изобретения включены рекомбинантные конструкции ДНК, кодирующие TFP, причем указанный TFP содержит фрагмент антитела, который специфично связывается с CD19, например, CD19 человека, при этом последовательность фрагмента антитела является смежной и находится в пределах одной и той же рамки считывания, как и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу TCR или ее часть. В область настоящего изобретения включены рекомбинантные конструкции ДНК, кодирующие TFP, причем указанный TFP содержит фрагмент антитела, который специфично связывается с ВСМА, например, ВСМА человека, при этом последовательность фрагмента антитела является смежной и находится в пределах одной и той же рамки считывания, как и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу TCR или ее часть. TFP согласно настоящему изобретению могут связываться с одной или более эндогенных (или, в другом варианте, одной или более экзогенных, или комбинацией эндогенных и экзогенных субъединиц) субъединиц TCR для того чтобы сформировать функциональный комплекс TCR.

[000186] Согласно одному аспекту TFR согласно настоящему изобретению содержит специфичный в отношении мишени связывающий элемент, иначе называемый антигенсвязывающий домен. Выбор фрагмента зависит от типа и количества антигена-мишени, который характеризует поверхность клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен может быть выбран так, чтобы распознавать антиген-мишень, который выступает в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным болезненным состоянием. Следовательно, примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут выступать в качестве антигенов-мишеней для антигенсвязывающего домена в TFR согласно настоящему изобретению, включают те, которые связаны с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями; аутоиммунными заболеваниями; и раковыми заболеваниями (например, злокачественными заболеваниями).

[000187] Согласно одному аспекту TFR-опосредованный Т-клеточный ответ может быть направлен на антиген, представляющий интерес, путем модификации антигенсвязывающего домена в TFR, который специфично связывается с желаемым антигеном.

[000188] Согласно одному аспекту часть TFR, содержащая антигенсвязывающий домен, содержит антигенсвязывающий домен, который нацелен к CD19. В одном аспекте антигенсвязывающий домен нацелен к CD19 человека. Согласно одному аспекту часть TFR, содержащая антигенсвязывающий домен, содержит антигенсвязывающий домен, нацеленный к ВСМА. В одном аспекте антигенсвязывающий домен нацелен к ВСМА человека.

[000189] Антигенсвязывающий домен может представлять собой любой домен, который связывается с антигеном, включая, но не ограничиваясь ими, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело и их функциональный фрагмент, включая, но не ограничиваясь ими, однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (V_H), переменный домен легкой цепи (V_L) и переменный домен (V_{HH}) нанотела, полученного из верблюдовых, а также альтернативный каркас, известный в данной области техники, чтобы функционировать в качестве антигенсвязывающего домена, такой как рекомбинантный домен фибронектина, антикалин, белок DARPIN и т.п. Аналогичным образом, природный или синтетический лиганд, специфично распознающий и связывающий антиген-мишень, может быть использован в качестве антигенсвязывающего домена для TFR. В некоторых случаях получение антигенсвязывающего домена из того же вида, в котором в конечном итоге будет использован TFR, может обеспечить

преимущества. Например, антигенсвязывающий домен TFP, содержащий остатки антитела человека или остатки гуманизированного антитела, может обеспечить преимущества при применении у человека.

[000190] Следовательно, согласно одному аспекту антигенсвязывающий домен содержит гуманизированное антитело или антитело человека или фрагмент антитела, или антитело или фрагмент антитела мыши. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гуманизированный или человеческий CD19- или BCMA-связывающий домен содержит один или более (например, все три) из гипервариабельного участка легкой цепи 1 (LC CDR1), гипервариабельного участка легкой цепи 2 (LC CDR2) и гипервариабельного участка легкой цепи 3 (LC CDR3) гуманизированного или человеческого CD19- или BCMA-связывающего домена, описанного в настоящем документе, и/или один или более (например, все три) из гипервариабельного участка тяжелой цепи 1 (HC CDR1), гипервариабельного участка тяжелой цепи 2 (HC CDR2) и гипервариабельного участка тяжелой цепи 3 (HC CDR3) гуманизированного или человеческого CD19-связывающего домена, описанного в настоящем документе, например, гуманизированный или человеческий CD19- или BCMA-связывающий домен, содержащий один или более, например, все три, LC CDR, и один или более, например, все три, HC CDR. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гуманизированный или человеческий CD19-связывающий домен содержит один или более (например, все три) из гипервариабельного участка тяжелой цепи 1 (HC CDR1), гипервариабельного участка тяжелой цепи 2 (HC CDR2) и гипервариабельного участка тяжелой цепи 3 (HC CDR3) гуманизированного или человеческого CD19- или BCMA-связывающего домена, описанного в настоящем документе, например, гуманизированный или человеческий CD19- или BCMA-связывающий домен содержит две переменные области тяжелой цепи, каждая из которых содержит HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3, описанные в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гуманизированный или человеческий CD19- или BCMA-связывающий домен содержит переменную область легкой цепи гуманизированного антитела или антитела человека, описанную в настоящем документе, и/или переменную область тяжелой цепи гуманизированного антитела или антитела человека, описанную в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гуманизированный или человеческий CD19- или BCMA-связывающий домен содержит гуманизированную переменную область тяжелой цепи, описанную в настоящем документе, например, по меньшей мере две гуманизированные переменные области тяжелой цепи или переменные области тяжелой цепи человека, описанные в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения CD19- или ВСМА-связывающий домен представляет собой scFv, содержащий легкую цепь и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения CD19- или ВСМА-связывающий домен (например, scFv) содержит: переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи согласно настоящему изобретению, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности согласно настоящему изобретению; и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи согласно настоящему изобретению, или последовательность, которая на 95-99% идентична аминокислотной последовательности согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гуманизированный или человеческий CD19- или ВСМА-связывающий домен представляет собой scFv, и переменная область легкой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе, присоединена к переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе, с помощью линкера, например, линкера, описанного в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гуманизированный CD19- или ВСМА-связывающий домен содержит линкер $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_n$, в котором n равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 3 или 4. Переменная область легкой цепи и переменная область тяжелой цепи scFv может быть, например, в любой из следующих ориентаций: переменная область легкой цепи-линкер-переменная область тяжелой цепи или переменная область тяжелой цепи-линкер-переменная область легкой цепи. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную последовательность (LL). В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит $(\text{G}_4\text{S})_n$, где $n=2-4$. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную последовательность (SL). В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит $(\text{G}_4\text{S})_n$, где $n=1-3$.

[000191] Согласно некоторым аспектам антитело из вида, не относящегося к человеку, представляет собой гуманизированное антитело, в котором специфичные

последовательности или области антитела модифицированы, чтобы увеличить сходство с антителом, которое вырабатывается у человека в природных условиях, или его фрагментом. Согласно одному аспекту антигенсвязывающий домен является гуманизированным.

[000192] Гуманизированное антитело может быть получено с использованием различных способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, прививку CDR (см., например, европейский патент EP239400; международную публикацию WO 91/09967 и патенты США №№5225539, 5530101 и 5585089, каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки), рекомбинацию поверхностных остатков или модификацию поверхности (см., например, европейский патент EP592106 и EP519596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; и Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973, каждый из которых полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки), перестановку цепей (см., например, патент США №5565332, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки), а также методики, описанные, например, в публикации заявки на патент US2005/0042664, публикации заявки на патент US2005/0048617, патенте США №6407213, патенте США №5766886, международной публикации WO 9317105, Tan et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000), Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994), и Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994), которые все полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Обычно каркасные остатки в каркасных участках будут заменены соответствующим остатком из CDR донорного антитела для изменения, например, улучшения, связывания антигена. Подходящие замены в каркасных участках определяют с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, например, путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков для выявления каркасных остатков, важных для связывания антигена, и сравнения последовательностей для выявления нестандартных каркасных остатков в конкретных положениях (см., например, работу Queen et al., патент США №5585089; и Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки).

[000193] Гуманизированное антитело или фрагмент антитела содержит один или более остатков аминокислот, которые остаются в нем из источника, который не относится к человеку. Указанные аминокислотные остатки, не относящиеся к остаткам человека,

часто называют «импортными» остатками, которые обычно берут из «импортного» переменного домена. Согласно настоящему изобретению гуманизированные антитела или фрагменты антител содержат один или более CDR из молекул иммуноглобулина из вида, не относящегося к человеку, и каркасные участки, в которых аминокислотные остатки, составляющие каркас, получены полностью или в основном из зародышевой линии человека. Несколько методик гуманизации антител или фрагментов антител хорошо известны в данной области техники и по существу могут быть выполнены в соответствии со способом, описанным Winter et al (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), путем замены CDR или последовательностей CDR грызунов соответствующими последовательностями антитела человека, т.е. путем прививки CDR (EP 239400; публикация PCT WO91/09967, и патенты США №№4816567; 6331415; 5225539; 5530101; 5585089; 6548640, содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки). В указанных гуманизированных антителах и фрагментах антител последовательность по существу меньшего размера, чем интактный переменный домен человека, заменяли соответствующей последовательностью из вида, отличного от человека. Гуманизированные антитела часто являются антителами человека, в которых некоторые остатки CDR и необязательно некоторые остатки каркасных участков (FR) заменены остатками из аналогичных участков антител грызунов. Гуманизация антител и фрагментов антител также может быть достигнута путем рекомбинации поверхностных остатков или модификации поверхности (EP 592106; EP 519596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6):805-814 (1994); и Roguska et al., *PNAS*, 91:969-973 (1994)) или путем рекомбинации целых цепей (патент США №5565332), содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[000194] Выбор переменных доменов человека, как легких, так и тяжелых, для использования в получении гуманизированных антител проводят для снижения антигенности. В соответствии с так называемым способом «наилучшей подгонки» последовательность переменного домена антитела грызуна подвергают скринингу с использованием полной библиотеки известных последовательностей переменных доменов человека. Последовательность человека, которая максимально сходна с последовательностью грызуна, затем принимают в качестве каркасного участка человека (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987), содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки). В другом способе используют конкретный каркас,

полученный из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Аналогичный каркас может быть использован для нескольких различных гуманизированных антител (см., например, Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993), содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каркасный участок, например, все четыре каркасных участка, вариабельной области тяжелой цепи получен из последовательности зародышевой линии V_H4-4-59. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения каркасный участок может содержать одну, две, три, четыре или пять модификаций, например, замен, например, аминокислоты в соответствующей мышинной последовательности. Согласно одному варианту реализации каркасный участок, например, все четыре каркасных участка вариабельной области легкой цепи получены из последовательности зародышевой линии VK3-1.25. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения каркасный участок может содержать одну, две, три, четыре или пять модификаций, например, замен, например, аминокислоты в соответствующей мышинной последовательности.

[000195] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения часть композиции TFR согласно настоящему изобретению, которая содержит фрагмент антитела, является гуманизированной и сохраняет высокую аффинность в отношении антигена-мишени, а также другие благоприятные биологические свойства. В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения гуманизированные антитела и фрагменты антител получают с помощью анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов обычно доступны и известны специалистам в данной области техники. Существуют компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных последовательностей иммуноглобулинов. Проверка таких образцов позволяет проанализировать вероятную роль остатков в функционировании последовательности иммуноглобулина-кандидата, например, анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина-кандидата связываться с антигеном-мишенью. Следовательно, остатки FR могут быть выбраны и объединены из последовательности-реципиента и импортируемой последовательности так, что достигается желаемая характеристика антитела или фрагмента антитела, например,

повышенная аффинность в отношении антигена-мишени. В целом, остатки CDR непосредственно и наиболее существенно влияют на связывание антигена.

[000196] Гуманизированное антитело или фрагмент антитела может сохранять аналогичную антигенную специфичность, как и исходное антитело, например, согласно настоящему изобретению, способность связываться с CD19 человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гуманизированное антитело или фрагмент антитела может иметь улучшенную аффинность и/или специфичность связывания с CD19 человека или BCMA человека.

[000197] Согласно одному аспекту CD19- или BCMA-связывающий домен характеризуется определенными функциональными признаками или свойствами антитела или фрагмента антитела. Например, согласно одному аспекту часть композиции TFR согласно настоящему изобретению, которая содержит антигенсвязывающий домен, специфично связывается с CD19 человека или BCMA человека. Согласно одному аспекту реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен имеет сходную или аналогичную специфичность связывания с CD19 человека, как и FMC63 scFv, описанный в Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997). Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий доменом, содержащий антитело или фрагмент антитела, причем указанный антигенсвязывающий домен специфично связывается с белком CD19 или BCMA или его фрагментом, при этом антитело или фрагмент антитела содержит вариабельную легкую цепь и/или вариабельную тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым аспектам scFv является смежным и находится в пределах одной и той же рамки считывания, как и лидерная последовательность.

[000198] Согласно одному аспекту CD19- или BCMA-связывающий домен представляет собой фрагмент, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). Согласно одному аспекту CD19-связывающий домен представляет собой Fv, Fab, (Fab')₂ или бифункциональное (например, биспецифичное) гибридное антитело (например, Lanzavecchia et al., *Eur. J. Immunol.* 17, 105 (1987)). Согласно одному аспекту антитело и его фрагменты связываются с белком CD19 с аффинностью, характерной для антитела дикого типа, или с повышенной аффинностью.

[000199] В настоящем изобретении также предложены способы получения антигенсвязывающего домена антитела, специфичного в отношении антигена-мишени (например, CD19, BCMA или любого антигена-мишени, описанного в настоящем документе в другом месте, чтобы нацелить связывающие домены гибридного фрагмента), причем указанный способ позволяет получить путем добавления, удаления, замены или

вставки одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности домена V_H , описанного в настоящем документе, домен V_H , который представляет собой вариант аминокислотной последовательности домена V_H , с последующим необязательным комбинированием домена V_H , полученного указанным способом, с одним или более доменами V_L , и исследованием домена V_H или комбинации V_H/V_L или их комбинации, чтобы выявить конкретный связывающий элемент или антигенсвязывающий домен антитела, специфичный в отношении антигена-мишени, представляющего интерес (например, CD19 или BCMA), и необязательно с одним или более желаемыми свойствами.

[000200] В некоторых случаях домены V_H и scFv могут быть получены в соответствии со способом, известным в данной области техники (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Молекулы scFv могут быть получены путем соединения областей V_H и V_L с использованием гибких полипептидных линкеров. Молекулы scFv содержат линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотным составом. Длина линкера может сильно влиять на сворачивание и взаимодействие переменных областей в scFv. Действительно, при использовании короткого полипептидного линкера (например, примерно 5-10 аминокислот) внутрицепочечное сворачивание предотвращается. Межцепочечное сворачивание также необходимо для сближения двух переменных областей, чтобы сформировать функциональный сайт связывания эпитопа. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную последовательность (LL). В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n=2-4$. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную последовательность (SL). В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где $n=1-3$. Примеры ориентации и размера линкера описаны, например, в Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, публикации заявки на патент США 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 и публикации PCT WO2006/020258 и WO2007/024715, содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[000201] scFv может содержать линкер, содержащий приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более 15 остатков, между областями V_L и V_H . Линкерная последовательность может содержать любую природную аминокислоту. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения линкерная последовательность содержит наборы из повторов остатков глицина и серина, такие как $(Gly_4Ser)_n$, где n представляет собой положительное целое

число, равное или большее 1. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения линкер может представлять собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ или $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$. Изменение длины линкера может сохранить или повысить активность, что приводит к более высокой эффективности в исследованиях активности. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит длинную линкерную последовательность (LL). В некоторых случаях длинная линкерная последовательность содержит $(\text{G}_4\text{S})_n$, где $n=2-4$. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит короткую линкерную последовательность (SL). В некоторых случаях короткая линкерная последовательность содержит $(\text{G}_4\text{S})_n$, где $n=1-3$.

Стабильность и мутации

[000202] Стабильность CD19- или BCMA-связывающего домена, например, молекулы scFv (например, растворимого scFv), можно оценить, исходя из биофизических свойств (например, термической стабильности) стандартной контрольной молекулы scFv или полноразмерного антитела. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термическая стабильность гуманизированного scFv или scFv человека больше на приблизительно 0,1, приблизительно 0,25, приблизительно 0,5, приблизительно 0,75, приблизительно 1, приблизительно 1,25, приблизительно 1,5, приблизительно 1,75, приблизительно 2, приблизительно 2,5, приблизительно 3, приблизительно 3,5, приблизительно 4, приблизительно 4,5, приблизительно 5, приблизительно 5,5, приблизительно 6, приблизительно 6,5, приблизительно 7, приблизительно 7,5, приблизительно 8, приблизительно 8,5, приблизительно 9, приблизительно 9,5, приблизительно 10 градусов, приблизительно 11 градусов, приблизительно 12 градусов, приблизительно 13 градусов, приблизительно 14 градусов, или приблизительно 15 градусов по Цельсию, чем исходного scFv в описанных количественных исследованиях.

[000203] Улучшенная термическая стабильность CD19- или BCMA-связывающего домена, например, scFv, затем придается полной конструкции CD19-TFP, что приводит к улучшению терапевтических свойств CD19- или BCMA-связывающей конструкции TFP. Термическая стабильность CD19- или BCMA-связывающего домена, например, scFv, может быть улучшена по меньшей мере приблизительно на 2 °C или 3 °C, по сравнению со стандартным антителом. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термическая стабильность CD19- или BCMA-связывающего домена, например, scFv, улучшена на 1 °C по сравнению со стандартным антителом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термическая стабильность CD19- -связывающего домена, например, scFv, улучшена на 2 °C по сравнению со стандартным антителом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термическая

стабильность scFv улучшена на 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C или 15 °C, по сравнению со стандартным антителом. Сравнения могут быть сделаны, например, между молекулами scFv, раскрытыми в настоящем документе, и молекулами scFv или фрагментами Fab антитела, из которого были получены scFv, V_H и V_L. Термическая стабильность может быть измерена с использованием способов, известных в данной области техники. Например, в одном варианте реализации, может быть измерена T_M. Способы измерения T_M и другие способы определения стабильности белка более подробно описаны ниже.

[000204] Мутации в scFv (возникающие при гуманизации или прямом мутагенезе растворимого scFv) изменяют стабильность scFv и улучшают общую стабильность scFv и CD19- или BCMA-связывающей конструкции TFR. Стабильность гуманизированного scFv сравнивают с scFv мыши с использованием измерений T_M, температуры денатурации и температуры агрегации. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения CD19- или BCMA-связывающий домен, например, scFv, содержит по меньшей мере одну мутацию, возникшую в процессе гуманизации, так, что мутированный scFv придает повышенную стабильность CD19-связывающей конструкции TFR. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения CD19-связывающий домен, например, scFv, содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мутаций, возникающих в процессе гуманизации, так, что мутированный scFv придает повышенную стабильность конструкции CD19-TFR или BCMA-TFR.

[000205] Согласно одному аспекту реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий домен TFR содержит аминокислотную последовательность, которая гомологична аминокислотной последовательности антигенсвязывающего домена согласно настоящему изобретению, и антигенсвязывающий домен сохраняет желаемые функциональные свойства фрагментов антител к CD19 или к BCMA, описанных в настоящем документе. В одном конкретном аспекте композиция TFR согласно настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. Согласно другому аспекту указанный фрагмент антитела содержит scFv.

[000206] Согласно различным аспектам антигенсвязывающий домен TFR сконструирован путем модификации одной или более аминокислот в одной или обеих переменных областях (например, V_H и/или V_L), например, в пределах одного или более CDR и/или в пределах одного или более каркасных участков. Согласно одному конкретному аспекту композиция TFR согласно настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. Согласно другому аспекту указанный фрагмент антитела содержит scFv.

[000207] Специалист в данной области техники поймет, что антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению могут быть дополнительно модифицированы так, что они будут отличаться по аминокислотной последовательности (например, от дикого типа), но не желаемой активностью. Например, в белок могут быть введены дополнительные нуклеотидные замены, приводящие к аминокислотным заменам в «несущественных» аминокислотных остатках. Например, остаток заменимой аминокислоты в молекуле может быть заменен остатком другой аминокислоты из семейства со сходными боковыми цепями. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения участок аминокислотной последовательности может быть заменен структурно аналогичным участком последовательности, который отличается по порядку и/или композиции членов семейства со сходными боковыми цепями, например, может быть сделана консервативная замена, в которой остаток аминокислоты заменен остатком аминокислоты, имеющим сходную боковую цепь.

[000208] Семейства остатков аминокислот, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

[000209] Процент идентичности, применительно к двум или более нуклеиновым кислотам или полипептидным последовательностям, относится к двум или более последовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности являются «по существу идентичными», если две последовательности имеют определенный процент остатков аминокислот или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (например, 60% идентичность, необязательно 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность определенного участка, или, если не указано иное, всей последовательности), при сравнении и сопоставлении для определения максимального соответствия в окне сравнения, или обозначенного участка, оцененного с помощью одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуальной оценки. Необязательно, идентичность может иметь место на участке, который содержит по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов (или 10

аминокислот) в длину, или более предпочтительно на участке, который содержит от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот) в длину.

[000210] Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей испытуемую и эталонную последовательности вводятся в компьютер, назначают координаты подпоследовательностей, в случае необходимости, а также назначают параметры алгоритма для программы сопоставления последовательностей. Могут быть использованы параметры программы по умолчанию, или могут быть назначены альтернативные параметры. Затем на основании параметров программы алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процент идентичности последовательности для испытуемых последовательностей по отношению к эталонной последовательности. Методы сопоставления последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное сопоставление последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии, предложенного Smith and Waterman, (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с, с помощью алгоритма сопоставления областей гомологии, предложенного Needleman and Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, с помощью поиска сходства с использованием метода Pearson and Lipman, (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, с помощью компьютерных вариантов реализации указанных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), или с помощью мануального сопоставления и визуальной оценки (см., например, Brent et al., (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*)). Два примера алгоритмов, которые пригодны для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, включают алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; и Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализа с помощью BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации.

[000211] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложены модификации аминокислотной последовательности исходного антитела или фрагмента (например, scFv), которые приводят к получению функционально эквивалентных молекул. Например, V_H или V_L из CD19- или BCMA-связывающего домена, например, scFv, входящие в состав TFR, могут быть модифицированы, чтобы сохранить по меньшей мере приблизительно 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99% идентичность каркасного участка исходной области V_H или V_L CD19-связывающего домена, например, scFv. В настоящем изобретении предложены модификации всей конструкции TFP, например, модификации в одной или более аминокислотных последовательностях различных областей конструкции TFP, чтобы получить функционально эквивалентные молекулы. Конструкция TFP может быть модифицирована, чтобы сохранить по меньшей мере приблизительно 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность с исходной конструкцией TFP.

Внеклеточный домен

[000212] Внеклеточный домен может быть получен из природного или из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть получен из любого белка, в частности из связанного с мембраной или трансмембранного белка. Согласно одному аспекту реализации настоящего изобретения внеклеточный домен способен связываться с трансмембранным доменом. Внеклеточный домен конкретного варианта применения в настоящем изобретении может содержать по меньшей мере внеклеточную область(области), например, из альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, или CD3-эпсилон, CD3-гамма или CD3-дельта, или, в другом варианте, CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

Трансмембранный домен

[000213] В целом, последовательность TFP содержит внеклеточный домен и трансмембранный домен, кодируемый одной геномной последовательностью. В других вариантах реализации TFP может быть сконструирован так, чтобы содержать трансмембранный домен, который является гетерологичным по отношению к внеклеточному домену TFP. Трансмембранный домен может содержать одну или более дополнительных аминокислот, смежных с трансмембранной областью, например, одну или более аминокислот, связанных с внеклеточной областью белка, из которой был получен трансмембранный домен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или вплоть до 15 аминокислот внеклеточной области), и/или одну или более дополнительных аминокислот, связанных с внутриклеточной областью белка, из которой был получен трансмембранный белок (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или вплоть до 15 аминокислот внутриклеточной области). Согласно одному аспекту трансмембранный домен представляет собой домен, который связан с одним из других используемых доменов TFP. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован путем замены

аминокислот, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами одного и того же или различных поверхностных мембранных белков, например, чтобы свести к минимуму взаимодействие с другими членами рецепторного комплекса. Согласно одному аспекту трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим TFP на поверхности TFP-Т-клеток. В другом аспекте аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть модифицирована или заменена так, чтобы свести к минимуму взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, присутствующего в том же TFP.

[000214] Трансмембранный домен может быть получен из природного или из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть получен из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Согласно одному аспекту реализации настоящего изобретения трансмембранный домен способен передавать сигналы к внутриклеточному домену(ам) всякий раз, когда TFP связывался с мишенью. Трансмембранный домен конкретного варианта применения в настоящем изобретении может содержать по меньшей мере трансмембранную область (области) из, например, альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

[000215] В некоторых случаях трансмембранный домен может быть присоединен к внеклеточной области TFP, например, антигенсвязывающего домена TFP, с помощью шарнирной области, например, шарнирной области белка человека. Например, в одном варианте реализации, шарнирная область может представлять собой шарнирную область иммуноглобулина (Ig) человека, например, шарнирную область IgG4 или шарнирную область CD8a.

Линкеры

[000216] Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер, содержащий от 2 до 10 аминокислот в длину, может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматической областью TFP. Дублет глицин-серин обеспечивает особенно подходящий линкер. Например, согласно одному аспекту линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер кодируется нуклеотидной последовательностью GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 4).

Цитоплазматический домен

[000217] Цитоплазматический домен TFP может содержать внутриклеточный сигнальный домен, если TFP содержит полипептиды CD3-гамма, дельта или эпсилон; субъединицы TCR-альфа и TCR-бета, как правило, отсутствуют в сигнальном домене. Внутриклеточный сигнальный домен обычно отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую был введен TFP. Термин «эффекторные функции» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клеток, например, может представлять собой цитолитическую активность или вспомогательную активность, включая секрецию цитокинов. Следовательно, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая передает эффекторный функциональный сигнал и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Несмотря на то, что обычно может быть использован полноразмерный внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепь. В той степени, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может быть использована вместо интактной цепи до тех пор, пока она передает эффекторный функциональный сигнал. Термин внутриклеточный сигнальный домен, следовательно, включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи эффекторного функционального сигнала.

[000218] Примеры внутриклеточных сигнальных доменов для использования в TFP согласно настоящему изобретению включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и ко-рецепторы, которые действуют совместно, чтобы инициировать передачу сигнала после связывания антигенного рецептора, а также любое производное или вариант указанных последовательностей и любой рекомбинантной последовательности, которая имеет аналогичную функциональную способность.

[000219] Как известно, сигналы, которые возникают при участии только TCR, не могут вызвать полную активацию наивных Т-клеток, и необходим вторичный и/или костимулирующий сигнал. Следовательно, можно сказать, что активация наивных Т-клеток опосредована двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антигензависимую первичную активацию посредством TCR (первичные внутриклеточные сигнальные домены), а также теми, которые действуют антигеннезависимым способом, чтобы обеспечить вторичный или костимулирующий сигнал (вторичный цитоплазматический домен, например, костимулирующий домен).

[000220] Первичный сигнальный домен регулирует первичную активацию комплекса TCR посредством стимулирующего пути или ингибирующего пути. Первичные

внутриклеточные сигнальные домены, которые действуют стимулирующим путем, могут содержать мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM).

[000221] Примеры ITAM, содержащих первичные внутриклеточные сигнальные домены, которые являются особенно пригодными согласно настоящему изобретению, включают домены из CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79B и CD66d. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения TFR согласно настоящему изобретению содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный сигнальный домен из CD3-эпсилон. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первичный сигнальный домен содержит модифицированный домен ITAM, например, мутированный домен ITAM, который имеет измененную (например, повышенную или пониженную) активность по сравнению с нативным доменом ITAM. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первичный сигнальный домен содержит модифицированный ITAM-содержащий первичный внутриклеточный сигнальный домен, например, оптимизированный и/или усеченный ITAM-содержащий первичный внутриклеточный сигнальный домен. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения первичный сигнальный домен содержит один, два, три, четыре или более мотивов ITAM.

[000222] Внутриклеточный сигнальный домен TFR может содержать сигнальный домен CD3-дзета по отдельности или он может быть объединен с любым другим желаемым внутриклеточным сигнальным доменом (доменами), который можно применять в TFR согласно настоящему изобретению. Например, внутриклеточный сигнальный домен TFR может содержать часть цепи CD3-эпсилон и костимулирующий сигнальный домен. Костимулирующий сигнальный домен относится к части TFR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, за исключением антигенного рецептора или его лигандов, которая необходима для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфично связывается с CD83, и т.п. Например, было показано, что костимуляция CD27 усиливает пролиферацию, эффекторную функцию и выживание TFR-Т-клеток человека в условиях *in vitro* и увеличивает устойчивость и противоопухолевую активность Т-клеток человека в условиях *in vivo* (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706).

[000223] Внутриклеточные сигнальные последовательности в цитоплазматической части TFP согласно настоящему изобретению могут быть связаны друг с другом в случайном или указанном порядке. Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер, например, содержащий от 2 до 10 аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот) в длину, может образовывать связь между внутриклеточными сигнальными последовательностями.

[000224] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения в качестве подходящего линкера может быть использован дублет глицин-серин. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения в качестве подходящего линкера может быть использована отдельная аминокислота, например, аланин или глицин.

[000225] Согласно одному аспекту TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может дополнительно содержать второй TFP, например, второй TFP, который содержит другой антигенсвязывающий домен, например, нацеленный к одной и той же мишени (CD19 или BCMA) или другой мишени (например, CD123). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, если TFP-экспрессирующая клетка содержит два или более различных TFP, то антигенсвязывающие домены различных TFP не взаимодействуют друг с другом. Например, клетка, экспрессирующая первый и второй TFP, может содержать антигенсвязывающий домен первого TFP, например, в виде фрагмента, например, scFv, который не связывается с антигенсвязывающим доменом второго TFP, например, антигенсвязывающий домен второго TFP представляет собой V_{HH} .

[000226] Согласно другому аспекту TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может дополнительно экспрессировать другой агент, например, агент, который повышает активность TFP-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте реализации, агент может являться агентом, который ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующая молекула, например, PD1, может, в некоторых вариантах реализации, уменьшать способность TFP-экспрессирующей клетки вызывать иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TIGIT. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения агент, который ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, ассоциированную со вторым полипептидом, который передает положительный сигнал в клетку, например, с внутриклеточным сигнальным доменом, описанным в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения агент содержит первый полипептид, например, из ингибирующей молекулы, такой как PD1,

LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 и TIGIT, или фрагмент любой из указанных молекул (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена любой из указанных молекул), и второй полипептид, который представляет собой внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем документе (например, содержащий костимулирующий домен (например, 4-1BB, CD27 или CD28, например, описанный в настоящем документе) и/или первичный сигнальный домен (например, сигнальный домен CD3-дзета, описанный в настоящем документе). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения агент содержит первый полипептид PD1 или его фрагмент (например, по меньшей мере часть внеклеточного домена PD1), и второй полипептид внутриклеточного сигнального домена, описанного в настоящем документе (например, сигнального домена CD28, описанного в настоящем документе, и/или сигнального домена CD3-дзета, описанного в настоящем документе). PD1 является ингибирующим членом семейства рецепторов CD28, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клеток (Agata et al. 1996 *Int. Immunol* 8:765-75). Было показано, что два лиганда PD1, PD-L1 и PD-L2, подавляют активацию Т-клеток после связывания с PD1 (Freeman et al. 2000 *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman et al. 2001 *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al. 2002 *Eur J Immunol* 32:634-43). PD-L1 широко экспрессируется в злокачественных опухолях человека (Dong et al. 2003 *J Mol Med* 81:281-7; Blank et al. 2005 *Cancer Immunol. Immunother* 54:307-314; Konishi et al. 2004 *Clin Cancer Res* 10:5094). Подавление иммунитета может быть обращено путем ингибирования локального взаимодействия PD1 с PD-L1.

[000227] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения агент содержит внеклеточный домен (ВКД) ингибирующей молекулы, например, молекула запрограммированной гибели 1 (PD1) может быть гибридизована с трансмембранным доменом и необязательно внутриклеточным сигнальным доменом, таким как 4-1BB и CD3-дзета (также называемым в настоящем документе как PD1 TFP). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD1 TFP, при использовании в комбинациях с CD19-связывающим TFP, описанным в настоящем документе, улучшает устойчивость Т-клетки. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения TFP представляет собой PD1 TFP, содержащий внеклеточный домен PD1. В другом варианте, в настоящем изобретении предложены TFP, содержащие антитело или фрагмент антитела, такой как scFv, который специфично связывается с лигандом молекулы запрограммированной гибели 1 (PD-L1) или лигандом молекулы запрограммированной гибели 2 (PD-L2).

[000228] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена популяция TFP-экспрессирующих Т-клеток, например, TFP-Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения популяция TFP-экспрессирующих Т-клеток содержит смесь клеток, экспрессирующих различные TFP. Например, в одном варианте, популяция TFP-Т-клеток может содержать первую клетку, экспрессирующую TFP, содержащий CD19- или BCMA-связывающий домен, описанный в настоящем документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, содержащий другой CD19- или BCMA-связывающий домен, например, CD19- или BCMA-связывающий домен, описанный в настоящем документе, который отличается от CD19-связывающего домена в TFP, экспрессированном в первой клетке. В качестве другого примера, популяция TFP-экспрессирующих клеток может содержать первую клетку, экспрессирующую TFP, который содержит CD19- или BCMA-связывающий домен, например, описанный в настоящем документе, и вторую клетку, экспрессирующую TFP, который содержит антигенсвязывающий домен к мишени, отличной от CD19 или BCMA (например, к другому, ассоциированному с опухолью антигену).

[000229] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена популяция клеток, в которой по меньшей мере одна клетка в популяции экспрессирует TFP, содержащий CD19- или BCMA-связывающий домен, описанный в настоящем документе, и вторая клетка, экспрессирующая другой агент, например, агент, который повышает активность TFP-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте реализации, агент может являться агентом, который ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующая молекула, например, может, в некоторых вариантах реализации, уменьшать способность TFP-экспрессирующей клетки вызывать иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR β . Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения агент, который ингибирует ингибирующую молекулу, содержит первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, ассоциированную со вторым полипептидом, который передает положительный сигнал в клетку, например, с внутриклеточным сигнальным доменом, описанным в настоящем документе.

[000230] В настоящем изобретении предложены способы получения транскрибируемой в условиях *in vitro* РНК, кодирующей TFP. В настоящем изобретении также предложена РНК, кодирующая конструкцию TFP, которая может быть непосредственно трансфецирована в клетку. Способ получения иРНК для использования в трансфекции может включать транскрипцию в условиях *in vitro* (IVT) матрицы с использованием специально сконструированных праймеров, с последующим добавлением

последовательности поли(А), чтобы получить конструкцию, содержащую 3'- и 5'-нетранслируемую последовательность («НТО»), 5'-кэп и/или сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, которую экспрессируют, и последовательность поли(А), обычно содержащую 50-2000 оснований. РНК, полученная с помощью указанного способа, может эффективно трансфецировать различные виды клеток. Согласно одному аспекту матрица содержит последовательности для TFR.

[000231] Согласно одному аспекту CD19-связывающий или BCMA-связывающий TFR кодируется информационной РНК (иРНК). Согласно одному аспекту настоящего изобретения иРНК, кодирующую CD19-связывающий или BCMA-связывающий TFR, вводят в Т-клетку для получения TFR-Т-клеток. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения транскрибируемая в условиях *in vitro* РНК TFR может быть введена в клетку в качестве одной из форм кратковременной трансфекции. РНК получают с помощью транскрипции в условиях *in vitro* с использованием матрицы, полученной с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Представляющая интерес ДНК из любого источника может быть непосредственно преобразована с помощью ПЦР в матрицу для синтеза иРНК в условиях *in vitro* с использованием соответствующих праймеров и РНК-полимеразы. Источником ДНК может быть, например, геномная ДНК, плазмидная ДНК ДНК фага, кДНК, синтетическая последовательность ДНК или ДНК из любого другого соответствующего источника ДНК. Желаемая матрица для транскрипции в условиях *in vitro* представляет собой TFR согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ДНК, которая будет использована для ПЦР, содержит открытую рамку считывания. ДНК может быть получена из природной последовательности ДНК из генома организма. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота может содержать некоторые или все из 5'-и/или 3'-нетранслируемых областей (НТО). Нуклеиновая кислота может содержать экзоны и интроны. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ДНК, которая будет использована для ПЦР, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты человека. В другом варианте ДНК, которая будет использована для ПЦР, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты человека, включая 5'- и 3'-НТО. В другом варианте ДНК может представлять собой искусственную последовательность ДНК, которая обычно не экспрессируется в организме в природных условиях. Типичная искусственная последовательность ДНК представляет собой последовательность, которая содержит участки генов, которые лигированы вместе, чтобы образовать открытую рамку считывания, кодирующую гибридный белок. Участки ДНК,

которые лигированы вместе, могут быть получены из одного организма или более чем из одного организма.

[000232] ПЦР применяют для получения матрицы для транскрипции в условиях *in vitro* иРНК, которая используется для трансфекции. Способы проведения ПЦР хорошо известны в данной области техники. Праймеры для использования в ПЦР сконструированы так, чтобы содержать участки, которые являются по существу комплементарными участкам ДНК, которая будет использована в качестве матрицы для ПЦР. В настоящей заявке термин «по существу комплементарны» относится к последовательностям нуклеотидов, в которых большинство или все из оснований в последовательности праймера являются комплементарными, или одно или более оснований являются некомплементарными или несовпадающими. По существу комплементарные последовательности могут сплавляться или гибридизоваться с предполагаемой мишенью ДНК в условиях сплавания, используемых для ПЦР. Праймеры могут быть сконструированы так, чтобы быть по существу комплементарными любой части ДНК-матрицы. Например, праймеры могут быть сконструированы для амплификации части нуклеиновой кислоты, которая обычно транскрибируется в клетках (открытая рамка считывания), включая 5'- и 3'-НТО. Праймеры также могут быть предназначены для амплификации фрагмента нуклеиновой кислоты, который кодирует определенную область, представляющую интерес. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения праймеры предназначены для амплификации кодирующей области кДНК человека, включая все или части 5'- и 3'-НТО. Праймеры, которые можно применять для ПЦР, могут быть получены с помощью методов синтеза, которые хорошо известны в данной области техники. «Прямые праймеры» представляют собой праймеры, содержащие область нуклеотидов, которые являются по существу комплементарными нуклеотидам на ДНК-матрице, расположенным выше 5'-конца относительно последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована. В настоящей заявке термин «расположенный выше 5'-конца» используется для обозначения положения выше 5'-конца по отношению к последовательности ДНК, подлежащей амплификации, по отношению к кодирующей цепи. «Обратные праймеры» представляют собой праймеры, содержащие область нуклеотидов, которые по существу комплементарны матрице двухцепочечной ДНК, расположенной ниже 3'-конца относительно последовательности ДНК, которая должна быть амплифицирована. В настоящей заявке термин «расположенный ниже 3'-конца» используется для обозначения положения ниже 3'-конца по отношению к последовательности ДНК, подлежащей амплификации, по отношению к кодирующей цепи.

[000233] Любая ДНК-полимераза, которую можно применять для ПЦР, может быть использована в способах, описанных в настоящем документе. Реагенты и полимеразы коммерчески доступны из различных источников.

[000234] Также могут быть использованы химические структуры, способные усиливать стабильность и/или эффективность трансляции. РНК предпочтительно содержит 5'- и 3'-НТО. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения 5'-НТО содержит от одного до 3000 нуклеотидов в длину. Длина последовательностей 5'- и 3'-НТО, которые будут добавлены к кодирующей области, может быть изменена различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, конструирование праймеров для ПЦР, которые сплавляются с различными участками НТО. Используя этот подход, специалист в данной области техники может модифицировать длины 5'- и 3'-НТО, необходимых для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибированной РНК.

[000235] 5'- и 3'-НТО могут быть природными, эндогенными 5'- и 3'-НТО для нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. В другом варианте, последовательности НТО, которые не являются эндогенными по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, могут быть добавлены путем включения последовательности НТО в прямой и обратный праймеры или с помощью любых других модификаций матрицы. Использование последовательностей НТО, которые не являются эндогенными по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, может быть пригодным для модификации стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, как известно, AU-обогащенные элементы в последовательностях 3'-НТО могут уменьшать стабильность иРНК. Следовательно, 3'-НТО могут быть выбраны или сконструированы для повышения стабильности транскрипции РНК на основании свойств НТО, которые хорошо известны в данной области техники.

[000236] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения 5'-НТО может содержать последовательность Козак из эндогенной нуклеиновой кислоты. В другом варианте, если 5'-НТО, которая не является эндогенной по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, добавляют с помощью ПЦР, как описано выше, то консенсусная последовательность Козак может быть изменена путем добавления последовательности 5'-НТО. Последовательности Козак могут повысить эффективность трансляции некоторых транскриптов РНК, однако, по-видимости, не требуются для всех РНК для обеспечения эффективной трансляции. Необходимость присутствия последовательностей Козак для многих иРНК известна в данной области техники. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения 5'-НТО может

представлять собой 5'-НТО из РНК-вируса, РНК-геном которого стабилен в клетках. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения различные нуклеотидные аналоги могут быть использованы в 3' или 5'-НТО, чтобы препятствовать разрушению иРНК экзонуклеазами.

[000237] Чтобы обеспечить синтез РНК из ДНК-матрицы без клонирования генов, промотор транскрипции должен быть присоединен к ДНК-матрице выше 5'-конца относительно транскрибируемой последовательности. Если последовательность, которая функционирует в качестве промотора для РНК-полимеразы, добавляют к 5'-концу прямого праймера, то промотор РНК-полимеразы включается в продукт ПЦР в выше 5'-конца относительно открытой рамки считывания, которая должна быть транскрибирована. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения промотор представляет собой промотор полимеразы T7, описанный в настоящем документе в другом месте. Другие подходящие промоторы включают, но не ограничиваются ими, промоторы РНК-полимеразы T3 и SP6. Консенсусные нуклеотидные последовательности для промоторов T7, T3 и SP6 известны в данной области техники.

[000238] Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения иРНК содержит кэп на 5'-конце и 3'-поли(А) последовательность, которые определяют связывание рибосомы, инициацию трансляции и стабильность иРНК в клетке. На матрице круговой ДНК, например, плазмидной ДНК, РНК-полимераза синтезирует длинный конкатамерный продукт, который не пригоден для экспрессии в эукариотических клетках. Транскрипция плазмидной ДНК, линеаризованной на конце 3'-НТО, приводит к синтезу иРНК нормального размера, которая не является эффективной при трансфекции в эукариотические клетки, даже если она была полиаденилирована после транскрипции.

[000239] На матрице линейной ДНК РНК-полимераза фага T7 может продлить 3'-конец транскрипта после последнего основания матрицы (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003).

[000240] Молекулярное клонирование является стандартным способом интеграции участков полиА/Т в матрицу ДНК. Однако последовательность полиА/Т, интегрированная в плазмидную ДНК, может привести к нестабильности плазмиды, поэтому плазмидные ДНК-матрицы, полученные из бактериальных клеток, часто сильно загрязнены делециями и другими абберациями. Это делает процедуры клонирования не только трудоемкими и длительными, но зачастую и ненадежными. Именно поэтому очень необходим способ, который позволяет конструировать ДНК-матрицы с 3'-концевым участком полиА/Т без использования молекулярного клонирования.

[000241] Сегмент полиА/Т транскрипционной матрицы ДНК может быть получен в ходе ПЦР с использованием обратного праймера, содержащего полиТ-хвост, такой как полиТ-хвост, содержащий 100 оснований (размер может составлять 50-5000 Т), или после ПЦР, проведенной любым другим способом, включая, но не ограничиваясь ими, лигирование ДНК или рекомбинацию в условиях *in vitro*. Поли(А)-хвосты также обеспечивают стабильность РНК и уменьшают их разрушение. Как правило, длина поли(А)-хвоста положительно коррелирует с устойчивостью транскрибированной РНК. В одном из вариантов реализации поли(А)-хвост содержит от 100 до 5000 аденозиновых оснований.

[000242] Поли(А)-хвосты РНК могут быть дополнительно продлены после транскрипции в условиях *in vitro* с использованием поли(А)-полимеразы, такой как поли(А)-полимераза из штамма *E. coli* (E-PAP). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения увеличение длины поли(А)-хвоста от 100 нуклеотидов до 300-400 нуклеотидов приводит приблизительно к двукратному увеличению эффективности трансляции РНК. Помимо этого присоединение различных химических групп к 3'-концу может увеличить стабильность иРНК. Подходящие концевые удлинения могут содержать модифицированные/искусственные нуклеотиды, аптамеры и другие соединения. Например, аналоги АТФ могут быть включены в поли(А)-хвост с использованием поли(А)-полимеразы. Аналоги АТФ могут дополнительно повысить стабильность РНК.

[000243] 5'-Кэпы также обеспечивают стабильность молекул РНК. В предпочтительном варианте реализации РНК, полученные способами, описанными в настоящем документе, содержат 5'-кэп. 5'-Кэп обеспечивается с использованием методик, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

[000244] РНК, полученные способами, описанными в настоящем документе, также могут содержать последовательность сайта внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES может представлять собой любую вирусную, хромосомную или синтетическую последовательность, которая инициирует кэп-независимое связывание рибосомы с иРНК и способствует инициации трансляции. Любые растворенные вещества, пригодные для клеточной электропорации, которые могут содержать факторы, увеличивающие проницаемость и жизнеспособность клетки, такие как сахара, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и поверхностно-активные вещества, могут быть включены.

[000245] РНК может быть введена в клетки-мишени с использованием любого из ряда различных способов, например, коммерчески доступных способов, которые включают, но

не ограничиваются ими, электропорацию (Amaha Nucleofector-II (Amaha Biosystems, Кельн, Германия)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Бостон, Массачусетс, США) или Gene Pulser II (BioRad, Денвер, Колорадо, США), Multiporator (Eppendorf, Гамбург, Германия), трансфекцию опосредованную катионными липосомами, с использованием липофекции, инкапсуляцию полимерами, опосредованную пептидами трансфекцию или системы для биолистической доставки частиц, такие как «генные ружья» (см., например, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)).

Конструкции нуклеиновых кислот, кодирующих TFP

[000246] В настоящем изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие одну или более конструкций TFP, описанных в настоящем документе. Согласно одному аспекту молекула нуклеиновой кислоты обеспечена в виде транскрипта информационной РНК. Согласно одному аспекту молекула нуклеиновой кислоты обеспечена в виде конструкции ДНК.

[000247] Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие желаемые молекулы, могут быть получены с использованием рекомбинантных способов, известных в данной области техники, таких как, например, скрининг библиотек из клеток, экспрессирующих ген, путем получения гена из вектора, который, как известно, содержит указанный ген, или путем выделения непосредственно из клеток и тканей, содержащих указанный ген, с использованием стандартных методик. В другом варианте, представляющий интерес ген может быть получен с помощью способов синтеза, а не клонирования.

[000248] В настоящем изобретении также предложены векторы, в которые вставлены ДНК согласно настоящему изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирусы, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают длительную, устойчивую интеграцию трансгена и его распространение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы имеют дополнительное преимущество по сравнению с векторами, полученными из онко-ретровирусов, таких как вирусы лейкоза мышей, поскольку они могут обеспечивать трансдукцию непролиферирующих клеток, таких как гепатоциты. Также их дополнительное преимущество заключается в низкой иммуногенности.

[000249] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую желаемый TFP согласно настоящему изобретению, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения экспрессия нуклеиновых кислот, кодирующих TFP, может быть осуществлена с использованием транспозонов, таких как

транспозон «Спящая красавица», *crispr*, *CAS9* и нуклеазы с доменом «цинковые пальцы». См. работы June et al. 2009 *Nature Reviews Immunology* 9.10: 704-716, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки.

[000250] Конструкции для экспрессии согласно настоящему изобретению также можно применять для иммунизации нуклеиновой кислотой и для генной терапии с использованием стандартных протоколов доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники (см., например, патенты США №№5399346, 5580859, 5589466, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки). Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен вектор для генной терапии.

[000251] Нуклеиновая кислота может быть клонирована в ряд векторов. Например, нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор, включая, но не ограничиваясь ими, плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы для получения зонда и векторы для секвенирования.

[000252] В свою очередь вектор экспрессии может быть введен в клетку в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), а также в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно применять в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В целом, подходящий вектор содержит сайт инициации репликации, который является функциональным по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора, удобные сайты рестрикции эндонуклеазами и один или более селективных маркеров, (например, WO 01/96584, WO 01/29058 и патент США №6326193).

[000253] Целый ряд систем на основе вирусов был разработан для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген может быть введен в вектор и упакован в ретровирусные частицы с использованием способов, известных в данной области техники. Рекомбинантный вирус затем может быть выделен и доставлен к клеткам субъекта в условиях *in vivo* или *ex vivo*. Ряд ретровирусных систем известен в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения используются аденовирусные векторы. Ряд аденовирусных векторов известен в данной

области техники. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения используются лентивирусные векторы.

[000254] Дополнительные промоторные элементы, например, энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области, которая локализована на 30-110 пар оснований выше 5'-конца сайта инициации, хотя было показано, что ряд промоторов содержит функциональные элементы, расположенные ниже сайта инициации. Расстояние между промоторными элементами часто является различным, так, что функция промотора сохраняется, если элементы инвертированы или перемещены относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (ТК) расстояние между элементами промотора может быть увеличено до 50 пар оснований, прежде чем активность начинает снижаться. Как представляется, в зависимости от промотора отдельные элементы могут функционировать совместно или независимо друг от друга, чтобы активировать транскрипцию.

[000255] Примером промотора, который способен экспрессировать трансген TFP в Т-клетках млекопитающих, является промотор EF1a. Нативный промотор EF1a стимулирует экспрессию альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментативную доставку аминоацил-тРНК к рибосоме. Промотор EF1a широко используется в плаزمидях экспрессии у млекопитающих, и было показано, что он является эффективными в стимулировании экспрессии TFP из трансгенов, клонированных в лентивирусный вектор (см., например, Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)). Другим примером промотора является последовательность промотора немедленных ранних генов цитомегаловируса (ЦМВ). Указанная последовательность промотора представляет собой последовательность сильного конститутивного промотора, способного вызывать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней. Однако также могут быть использованы другие конститутивные промоторные последовательности, включая, но не ограничиваясь ими, промотор генов раннего ответа вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса птичьего лейкоза, промотор генов немедленного раннего ответа вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, но не ограничиваясь ими, промотор актина, промотор миозина, промотор фактора элонгации-1a, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. В дальнейшем настоящее изобретение не должно быть ограничено использованием конститутивных промоторов. Индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть настоящего изобретения. Применение

индуцируемого промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный индуцировать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, если ее экспрессия необходима, или подавить экспрессию, если экспрессия не требуется. Примеры индуцируемых промоторов включают, но не ограничиваясь ими, промотор металлотионеина, промотор глюкокортикоидов, промотор прогестерона и регулируемый тетрациклином промотор.

[000256] Для того чтобы оценить экспрессию полипептида TFR или его части, вектор экспрессии, который будет введен в клетку, также может содержать селективный маркерный ген или ген-репортер или оба, чтобы облегчить идентификацию и отбор экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые стремились трансфецировать или инфицировать вирусными векторами. Согласно другим аспектам отдельная часть ДНК может нести селективный маркер, и он может быть использован в процедуре совместной трансфекции. Селективные маркеры и гены-репортеры могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями, чтобы обеспечить экспрессию в клетках-хозяевах. Подходящие селективные маркеры содержат, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как нео и т.п.

[000257] Гены-репортеры используют для выявления потенциально трансфецированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В целом, ген-репортер представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в организме или ткани реципиента, и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется посредством какого-либо легко детектируемого свойства, например, ферментативной активности. Экспрессию гена-репортера количественно исследуют в подходящее время после введения ДНК в клетки-реципиенты. Подходящие гены-репортеры могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с использованием известных способов или получены на коммерческой основе. В целом, конструкция с минимальной 5'-фланкирующей областью, вызывающая высокий уровень экспрессии гена-репортера, определена в качестве промотора. Подходящие промоторные области могут быть связаны с геном-репортером и используются для оценки способности агентов модулировать транскрипцию, инициированную промотором.

[000258] Способы введения и экспрессии генов в клетку известны в данной области техники. Применительно к вектору экспрессии, подходящий вектор может быть легко

введен в клетку-хозяина, например, клетку млекопитающих, бактерий, дрожжей или насекомых, любым способом, известным в данной области техники. Например, вектор экспрессии может быть перенесен в клетку-хозяина с помощью физических, химических или биологических способов.

[000259] Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение с фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Предпочтительный способ введения полинуклеотида в клетку-хозяина включает трансфекцию фосфатом кальция.

[000260] Биологические способы введения полинуклеотида, представляющего интерес, в клетку-хозяина включают использование векторов ДНК и РНК. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым способом для вставки генов в клетки млекопитающих, например, клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п. (см., например, патенты США №№ 5350674 и 5585362).

[000261] Химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы, и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Типичная коллоидная система для использования в качестве носителя для доставки в условиях *in vitro* и в условиях *in vivo* представляет собой липосому (например, везикулу с искусственной мембраной). Доступны другие современные способы нацеленной доставки нуклеиновых кислот, например, доставка полинуклеотидов с использованием нацеленных наночастиц или другой подходящей системы доставки субмикронного размера.

[000262] В том случае, если используется невирусная система доставки, типичный носитель для доставки представляет собой липосому. Использование липидных составов предусмотрено в настоящем изобретении для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (в условиях *in vitro*, в условиях *ex vivo* или в условиях *in vivo*). Согласно другому аспекту нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водном внутреннем содержимом липосомы, диспергирована в липидном бислое липосомы, присоединена к липосоме посредством связывающей молекулы, которая связана как с липосомой, так и с

олигонуклеотидом, включенном в липосому, может находиться в комплексе с липосомой, может быть диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, может быть комбинирована с липидом, может содержаться в виде суспензии в липиде, может содержаться или может быть в комплексе с мицеллой, или может быть связана иным образом с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/вектором экспрессии, не ограничены какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, указанные композиции могут присутствовать в двухслойной структуре, в виде мицелл или в виде «свернутой» структуры. Указанные композиции также могут быть просто диспергированы в растворе, возможно, с образованием агрегатов, которые не являются однородными по размеру и форме. Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут быть природными или синтетическими липидами. Например, липиды включают жирные капли, которые естественным образом возникают в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминспирты и альдегиды.

[000263] Липиды, пригодные для применения, могут быть получены из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин («DMPC») может быть получен из Sigma, Сент-Луис, Миссури, США; дицетилфосфат («DCP») может быть получен из K&K Laboratories (Плейнвью, Нью-Йорк, США); холестерин («Choi») может быть получен из Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин («DMPG») и другие липиды могут быть получены из Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, Алабама, США). Исходные растворы липидов в хлороформе или смеси хлороформ/метанол можно хранить при температуре приблизительно -20 °C. Хлороформ используют в качестве единственного растворителя, поскольку он испаряется легче, чем метанол. «Липосома» это общий термин, охватывающий различные одно- и многослойные липидные носители, образованные путем создания замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы могут быть охарактеризованы как везикулярные структуры с фосфолипидной двухслойной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы имеют множество липидных слоев, разделенных водной средой. Многослойные липосомы образуются спонтанно при суспендировании фосфолипидов в избытке водного раствора. Липидные компоненты претерпевают самостоятельную перегруппировку перед образованием замкнутых структур и заключают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). Однако в область настоящего изобретения также включены композиции, которые имеют различные структуры в растворе, по сравнению с нормальной везикулярной структурой. Например,

липиды могут образовывать мицеллярную структуру или просто существуют в виде неомогенных агрегатов молекул липидов. В область настоящего изобретения также включены комплексы липофектамин-нуклеиновые кислоты.

[000264] Независимо от способа, используемого для введения экзогенной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, или иного способа воздействия на клетку ингибитора согласно настоящему изобретению, для того чтобы подтвердить наличие последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине, можно осуществлять различные количественные исследования. Подходящие количественные исследования включают, например, «молекулярно-биологические» количественные исследования, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн-блоттинг и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» количественные исследования, такие как детектирование присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, с помощью иммунологических способов (ИФА и вестерн-блоттинга), или с помощью количественных исследований, описанных в настоящем документе для выявления агентов в пределах объема настоящего изобретения.

[000265] В настоящем изобретении также предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFP. Согласно одному аспекту вектор TFP может быть непосредственно трансдуцирован в клетку, например, в Т-клетку. Согласно одному аспекту вектор представляет собой вектор для клонирования или вектор для экспрессии, например, вектор, включающий, но не ограничивающийся ими, одну или более плазмид (например, плазмид для экспрессии, векторов для клонирования, миниколец, минивекторов, двойных микрохромосом), ретровирусные и лентивирусные векторные конструкции. Согласно одному аспекту реализации настоящего изобретения вектор способен экспрессировать конструкцию TFP в Т-клетках млекопитающих. Согласно одному аспекту реализации настоящего изобретения Т-клетки млекопитающих представляют собой Т-клетки человека.

Источники Т-клеток

[000266] Перед пролиферацией и генетической модификацией источник Т-клеток получают из субъекта. Термин «субъект» предназначен для включения живых организмов, у которых может быть вызвана иммунная реакция (например, млекопитающих). Примеры субъектов включают человека, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные виды. Т-клетки могут быть получены из различных источников, включая моноклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асцитов, плеврального выпота, ткань селезенки и опухоли. Согласно некоторым аспектам настоящего

изобретения может быть использовано любое число Т-клеточных линий, доступных в данной области техники. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Т-клетки могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта, используя любое число методик, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение в градиенте фиколла™. Согласно одному предпочтительному аспекту клетки из циркулирующей крови индивидуума получают путем афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Согласно одному аспекту клетки, собранные путем афереза, могут быть промыты, чтобы удалить фракцию плазмы и поместить клетки в подходящий буфер или среду для последующих этапов обработки. Согласно одному аспекту настоящего изобретения клетки промывают в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ). В другом аспекте промывочный раствор не содержит кальция и может не содержать магния, также могут отсутствовать многие, если не все, двухвалентные катионы. Начальные шаги активации в отсутствие кальция могут привести к повышенной активации. Специалисты в данной области техники легко поймут, что этап промывки можно осуществлять с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, например, с использованием полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, устройства для обработки клеток Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывки клетки могут быть повторно суспендированы в различных биологически совместимых буферах, таких как, например, не содержащий Са и Mg ФСБ, PlasmaLyte A или другой физиологический раствор с добавлением или без буфера. В другом варианте, нежелательные компоненты образца после афереза могут быть удалены, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

[000267] Согласно одному аспекту Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови путем лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, путем центрифугирования в градиенте Percoll™ или с помощью проточного элютриационного центрифугирования. Конкретная субпопуляция Т-клеток, таких как CD3⁺, CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и CD45RO⁺ Т-клетки, может быть дополнительно выделена с использованием методик положительного или отрицательного отбора. Например, согласно одному аспекту Т-клетки выделяют путем инкубации с гранулами, конъюгированными с антителами к CD3/CD28 (например, 3×28), такими как Dynabeads™ М-450 CD3/CD28 Т, в течение периода времени, достаточного для положительного отбора желаемых Т-клеток. Согласно одному аспекту период времени составляет приблизительно 30 минут. Согласно другому аспекту период времени находится в диапазоне от 30 минут

до 36 часов или дольше, и может быть равен любому целому значению в указанном диапазоне. Согласно другому аспекту период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. Согласно другому предпочтительному аспекту период времени составляет от 10 до 24 часов. Согласно одному аспекту период времени инкубации составляет 24 часа. Более длительные периоды инкубации могут быть использованы для выделения Т-клеток в любой ситуации, если присутствует несколько Т-клеток по сравнению с другими типами клеток, например, выделение проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. В свою очередь, использование более длительных периодов инкубации может повысить эффективность захвата CD8⁺ Т-клеток. Следовательно, путем простого уменьшения или удлинения времени инкубации обеспечивают связывание Т-клеток с CD3/CD28-гранулами, и/или путем увеличения или уменьшения соотношения количества гранул и Т-клеток (как описано далее в настоящем документе) субпопуляции Т-клеток могут быть подвергнуты предпочтительно положительному или отрицательному отбору при инициации культуры или в других временных точках в ходе процесса отбора. Кроме того, путем увеличения или уменьшения соотношения антител к CD3 и/или антител к CD28 на гранулах или другой поверхности, субпопуляции Т-клеток могут быть подвергнуты предпочтительно положительному или отрицательному отбору при инициации культуры или в других желаемых временных точках. Специалист в данной области техники поймет, что многократные этапы отбора также могут быть использованы применительно к настоящему изобретению. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения желательным может быть проведение отбора и использование «неотобранных» клеток в процессе активации и размножения. «Неотобранная» клетка также может быть подвергнута дальнейшим этапам отбора.

[000268] Обогащение Т-клеточной популяции путем отрицательной селекции может быть достигнуто с помощью комбинации антител, направленных к поверхностным маркерам, уникальным для отрицательно отобранных клеток. Один из способов заключается в сортировке клеток и/или отборе с помощью отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, при которой используют коктейль из моноклональных антител, направленных к поверхностным маркерам клеток, присутствующим на клетках, отобранных с помощью отрицательной селекции. Например, для обогащения CD4⁺ клетками путем отрицательной селекции коктейль моноклональных антител, как правило, содержит антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения желательным может оказаться обогащение или положительный отбор регуляторных Т-клеток, которые, как правило,

экспрессируют CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+ и FoxP3+. В другом варианте, согласно некоторым аспектам настоящего изобретения регуляторные Т-клетки истощают с помощью гранул, конъюгированных с антителом к C25, или с помощью другого аналогичного способа отбора.

[000269] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения может быть отобрана популяция Т-клеток, которые экспрессируют один или более из ИФН- γ ФНО-альфа, ИЛ-17А, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ГМ-КСФ, ИЛ-10, ИЛ-13, гранзима В и перфорина, или другие соответствующие молекулы, например, другие цитокины. Методы скрининга для оценки экспрессии в клетках могут быть определены, например, с помощью способов, описанных в публикации PCT WO 2013/126712.

[000270] Для выделения желаемой популяции клеток с помощью положительного или отрицательного отбора можно варьировать концентрацию клеток и поверхностей (например, частиц, таких как гранул). Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения желательным может быть значительное уменьшение объема, в котором смешивают гранулы и клетки (например, увеличение концентрации клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и гранул. Например, согласно одному аспекту используемая концентрация составляет 2 млрд. клеток/мл. Согласно одному аспекту используемая концентрация составляет 1 млрд. клеток/мл. Согласно другому аспекту используемая концентрация составляет более 100 млн. клеток/мл. Согласно другому аспекту используемая концентрация составляет 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 млн. клеток/мл. Согласно другому аспекту используемая концентрация составляет 75, 80, 85, 90, 95 или 100 млн. клеток/мл. Согласно другому аспекту используемая концентрация составляет 125 или 150 млн. клеток/мл. Использование высоких концентраций может привести к увеличению выхода клеток, активации клеток, а также пролиферации клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток позволяет более эффективно захватывать клетки, которые слабо экспрессируют антигены-мишени, представляющие интерес, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или выделять клетки из образцов, в которых присутствуют многие опухолевые клетки (например, клетки крови при лейкозе, опухолевая ткань и т.д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение, и их получение является желательным. Например, использование высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективный отбор CD8+ Т-клеток, которые обычно более слабо экспрессируют CD28.

[000271] Согласно родственному аспекту желательным может быть использование более низких концентраций клеток. При значительном разбавлении смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы) взаимодействие между частицами и

клетками сведено к минимуму. Указанный способ позволяет отбирать клетки, которые экспрессируют большое количество желаемых антигенов, которые будут связаны с частицами. Например, CD4⁺ Т-клетки экспрессируют более высокие уровни CD28 и захватываются более эффективно, чем CD8⁺ Т-клетки в разбавленных концентрациях. Согласно одному аспекту используемая концентрация клеток составляет 5×10^6 /мл. Согласно другим аспектам используемая концентрация может составлять приблизительно от 1×10^5 /мл до 1×10^6 /мл, и любое целое значение в указанном диапазоне. Согласно другим аспектам клетки можно инкубировать на ротационном шейкере с различной скоростью в течение различных периодов времени и при 2-10 °С или при комнатной температуре.

[000272] Т-клетки для стимуляции также могут быть заморожены после этапа промывки. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы настоящего изобретения полагают, что замораживание и последующий этап оттаивания обеспечивает более равномерный продукт за счет удаления гранулоцитов и в некоторой степени моноцитов в клеточной популяции. После этапа промывки, на котором происходит удаление плазмы и тромбоцитов, клетки могут быть суспендированы в растворе для замораживания. В то время как многие растворы и параметры замораживания известны в данной области техники и будут пригодны применительно к настоящему изобретению, один способ включает использование ФСБ, содержащего 20% ДМСО и 8% сывороточного альбумина человека, или культуральной среды, содержащей 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% ДМСО, или 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% ДМСО, или другие подходящие среды для замораживания клеток, содержащие, например, Hespan и PlasmaLyte A, клетки затем замораживают при -80 °С со скоростью 1°С/мин и хранят в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота. Могут быть использованы другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемое немедленное замораживание при -20 °С или в жидком азоте. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения криоконсервированные клетки оттаивают и промывают, как описано в настоящем документе, и оставляют на один час при комнатной температуре перед активацией с использованием способов согласно настоящему изобретению.

[000273] Применительно к настоящему изобретению также предусмотрен сбор образцов крови или продуктов афереза у субъекта в течение некоторого периода времени, до того момента, когда могут потребоваться размноженные клетки, описанные в настоящем документе. Следовательно, источник клеток, которые размножают, может быть собран в любой необходимый момент времени, и желаемые клетки, такие как Т-

клетки, могут быть выделены и заморожены для дальнейшего использования в Т-клеточной терапии для любого числа заболеваний или состояний, в отношении которых Т-клеточная терапия обеспечит положительный результат, таких как те, которые описаны в настоящем документе. Согласно одному аспекту реализации настоящего изобретения образец крови или продукт афереза получают в целом от здорового субъекта. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения образец крови или продукт афереза получают в целом от здорового субъекта, который подвергается риску развития заболевания, но у которого заболевание еще не развилось, и клетки, представляющие интерес, выделяют и замораживают для последующего использования. Согласно некоторым аспектам Т-клетки могут быть размножены, заморожены и использованы в более позднее время. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения образцы собирают у пациента вскоре после диагностики определенного заболевания, описанного в настоящем документе, но до применения каких-либо способов лечения. Согласно другому аспекту клетки выделяют из образца крови или афереза от субъекта до применения любого числа соответствующих способов лечения, включая, но не ограничиваясь ими, обработку агентами, такими как натализумаб, эфализумаб, противовирусными агентами, химиотерапию, облучение, применение иммуносупрессивных агентов, таких как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, мофетил, и FK506, антител или других иммунодеструктивных агентов, таких как CAMPATH, антитела к CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенольная кислота, стероиды, FR901228 и облучение.

[000274] Согласно другому аспекту настоящего изобретения Т-клетки получены от пациента непосредственно после лечения, которое не затрагивает функциональность Т-клеток у субъекта. В связи с этим было отмечено, что после определенных способов лечения рака, в частности, лечения с использованием препаратов, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты, как правило, восстанавливаются после лечения, качество полученных Т-клеток может быть оптимальным или их способность к пролиферации в условиях *ex vivo* может быть улучшена. Аналогичным образом, после манипуляции в условиях *ex vivo* с использованием способов, описанных в настоящем документе, указанные клетки могут быть в предпочтительном состоянии для усиления приживания и пролиферации в условиях *in vivo*. Следовательно, применительно к настоящему изобретению предусмотрен сбор клеток крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки ростка кроветворения во время данной фазы восстановления. Кроме того, согласно некоторым аспектам настоящего изобретения мобилизацию (например, мобилизацию с

использованием ГМ-КСФ) и схемы кондиционирования можно применять для создания состояния у субъекта, которое является благоприятным для репопуляции, рециркуляции, регенерации и/или пролиферации конкретных типов клеток, особенно во время определенного промежутка времени после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

Активация и пролиферация Т-клеток

[000275] Т-клетки могут быть активированы и размножены с использованием способов, описанных, например, в патентах США №№6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; и в публикации заявки на патент США 20060121005.

[000276] Как правило, Т-клетки согласно настоящему изобретению могут быть размножены за счет контакта с поверхностью, содержащей присоединенный к ней агент, который стимулирует передачу сигнала, связанного с комплексом CD3/TCR, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, Т-клеточные популяции могут быть стимулированы, как описано в настоящем документе, например, путем контакта с антителом к CD3, или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем контакта с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в комбинации с кальциевым ионофором. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клетки используют лиганд, который связывается со вспомогательной молекулой. Например, популяция Т-клеток может быть приведена в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для того чтобы стимулировать пролиферацию CD4⁺ Т-клеток или CD8⁺ Т-клеток используют антитело к CD3 и антитело к CD28. Примеры антитела к CD28 включают 9.3, В-Т3, XR-CD28 (Diacclone, Безансон, Франция), также могут быть использованы другие способы, широко известные в данной области техники (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Naanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

[000277] Т-клетки, которые подверглись воздействию в течение различных периодов времени, могут иметь различные характеристики. Например, типичные клетки крови или продуктов афереза мононуклеарных клеток периферической крови содержат популяцию хелперных Т-клеток (ТН, CD4⁺), которая превышает популяцию цитотоксических или супрессорных Т-клеток (ТС, CD8⁺). Пролиферация Т-клеток в условиях *ex vivo* путем стимуляции рецепторов CD3 и CD28 позволяет получить популяцию Т-клеток, которая приблизительно за 8-9 дней до этого состояла преимущественно из ТН клеток, в то время

как приблизительно через 8-9 дней популяция Т-клеток содержит увеличивающуюся популяцию ТС клеток. Соответственно, в зависимости от цели лечения, инфузия субъекту популяции Т-клеток, содержащей преимущественно ТН-клетки, может обеспечить преимущества. Аналогичным образом, если была выделена антигенспецифичная подгруппа ТС-клеток, то более интенсивная пролиферация указанной подгруппы может обеспечить преимущества.

[000278] Помимо этого, в дополнение к маркерам CD4 и CD8, экспрессия других фенотипических маркеров значительно различается во время пролиферации клеток, однако в значительной степени является воспроизводимой. Следовательно, подобная воспроизводимость дает возможность адаптировать продукт активированных Т-клеток для конкретных целей.

[000279] После конструирования CD19-связывающего или BCMA-связывающего TFR различные количественные исследования могут быть использованы для оценки активности молекулы, такой как, но не ограничиваясь этим, способность к пролиферации Т-клеток после антигенной стимуляции, поддержание пролиферации Т-клеток при отсутствии повторной стимуляции, а также различных видов противораковой активности в соответствующих моделях *in vitro* и животных моделях. Количественные исследования для оценки действия CD19-связывающих или BCMA-связывающих TFR более подробно описаны ниже.

[000280] Исследование экспрессии TFR в первичных Т-клетках с помощью вестерн-блоттинга можно использовать для детектирования присутствия мономеров и димеров (см., например, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). В общих чертах, Т-клетки (смесь CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в соотношении 1:1), экспрессирующих TFR, размножали в условиях *in vitro* в течение более чем 10 дней с последующим лизисом, и проводили электрофорез в ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях. TFR детектировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к цепи TCR. Аналогичные подгруппы Т-клеток используют для электрофореза в ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях, чтобы оценить образование ковалентного димера.

[000281] Пролиферацию TFR⁺ Т-клеток после стимуляции антигеном в условиях *in vitro* можно измерить с помощью проточной цитометрии. Например, смесь CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток стимулируют α -CD3/ α -CD28 и АПК с последующей трансдукцией лентивирусными векторами, экспрессирующими GFP под контролем промоторов, которые будут исследованы. Типичные промоторы включают промоторы генов немедленного раннего ответа ЦМВ, EF-1 α , убиквитина С или фосфоглицерокиназы (PGK). Флуоресценцию GFP оценивали на 6-й день культивирования в подгруппах CD4⁺

и/или CD8⁺ Т-клеток с помощью проточной цитометрии (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). В другом варианте, смесь CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток стимулируют на 0-й день с использованием магнитных гранул, покрытых α -CD3/ α -CD28, и трансдуцируют TFP на 1-й день с использованием бицистронного лентивирусного вектора, экспрессирующего TFP наряду с EGFP, используя последовательность проскока рибосомы 2A. Культуры повторно стимулируют клетками CD19⁺ K562 (K562-CD19), клетками K562 дикого типа (K562 дикого типа) или клетками K562, экспрессирующими hCD32 и 4-1BBL, в присутствии антитела к CD3 и антитела к CD28 (K562-BBL-3/28) после промывки. Экзогенный ИЛ-2 добавляют к культурам каждый день в концентрации 100 МЕ/мл. GFP⁺ Т-клетки подсчитывают с помощью проточной цитометрии с использованием подсчета на основе гранул (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)).

[000282] Устойчивая пролиферация TFP⁺ Т-клеток в отсутствие повторной стимуляции также может быть измерена (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). В общих чертах, средний объем Т-клетки (фемтолитры (fl)) измеряют на 8-й день культивирования с использованием счетчика частиц Coulter Multisizer III после стимуляции магнитными гранулами, покрытыми α -CD3/ α -CD28, на 0-й день и трансдукции указанным TFP на 1-й день.

[000283] Животные модели также могут быть использованы для измерения активности TFP-Т-клеток. Например, ксенотрансплантатная модель с использованием TFP⁺ Т-клеток, специфичных в отношении CD19 человека, может быть использована для лечения первичного пре-B-ALL человека у мышей с ослабленным иммунитетом (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). В общих чертах, после формирования ALL мышей случайным образом распределяют по группам лечения. Различное количество модифицированных Т-клеток совместно инъецируют в соотношении 1:1 мышам линии NOD/SCID/ γ ^{-/-}, несущим B-ALL. Количество копий каждого вектора в ДНК из селезенки мышей оценивают в различные моменты времени после инъекции Т-клеток. У животных еженедельно оценивают степень тяжести лейкоза. Количество CD19⁺ B-ALL бластных клеток в периферической крови измеряют у мышей, получавших инъекции α -CD19-дзета TFP⁺ Т-клеток, или Т-клеток, трансдуцированных контрольной конструкцией. Кривые выживаемости для групп сравнивают с помощью логарифмического рангового критерия. Также может быть проанализировано абсолютное количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток периферической крови через 4 недели после инъекции Т-клеток мышам NOD/SCID/ γ ^{-/-}. Мышам инъецируют лейкозные клетки и через 3 недели инъецируют Т-клетки, модифицированные для экспрессии TFP с помощью бицистронного

лентивирусного вектора, который кодирует TFP, связанный с eGFP. Т-клетки нормируют до 45-50% внесенных GFP⁺ Т-клеток путем смешивания с Т-клетками, трансдуцированными контрольной конструкцией, перед инъекцией, и подтверждают методом проточной цитометрии. Животных еженедельно обследуют для оценки признаков лейкоза. Кривые выживаемости для групп TFP⁺ Т-клеток сравнивают с помощью логарифмического рангового критерия.

[000284] Может быть проведена оценка дозозависимого ответа на лечение с использованием TFP (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). Например, периферическую кровь получают через 35-70 дней после развития лейкоза у мышей, которым на 21-й день вводили TFP-Т-клетки, эквивалентное количество Т-клеток, трансдуцированных контрольной конструкцией, или не вводили Т-клетки. У мышей из каждой группы случайным образом брали кровь для определения количества CD19⁺ B-ALL бластных клеток периферической крови и затем умерщвляли на 35 и 49 день. Остальных животных оценивали на 57 и 70 день.

[000285] Оценка клеточной пролиферации и продукции цитокинов была описана ранее, например, в Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). В общих чертах, оценку TFP-опосредованной пролиферации проводят в планшетах для микротитрования путем смешивания промытых Т-клеток с клетками K562, экспрессирующими CD19 (K19) или CD32 и CD137 (KT32-BBL), чтобы получить окончательное соотношение Т-клетки:K562 равное 2:1. Клетки K562 облучают гамма-излучением перед использованием. Моноклональные антитела к CD3 (клон ОКТ3) и к CD28 (клон 9.3) добавляют к культурам с клетками KT32-BBL для использования в качестве положительного контроля для стимуляции пролиферации Т-клеток, поскольку эти сигналы поддерживают длительную пролиферацию CD8⁺ Т-клеток в условиях *ex vivo*. Т-клетки подсчитывают в культурах с использованием флуоресцентных гранул CountBright™ (Invitrogen) и проточной цитометрии, как описано производителем. TFP⁺ Т-клетки идентифицируют по экспрессии GFP, используя Т-клетки, которые модифицированы с использованием EGFP-2A-соединенных TFP-экспрессирующих лентивирусных векторов. Для TFP⁺ Т-клеток, не экспрессирующих GFP, TFP⁺ Т-клетки детектируют с использованием биотинилированного рекомбинантного белка CD19 и вторичного конъюгата авидин-фикоэритрин. Экспрессию CD4⁺ и CD8⁺ на Т-клетках также одновременно детектируют с использованием специфичных моноклональных антител (BD Biosciences). Измерения цитокинов выполняют в супернатантах, собранных через 24 часа после повторной стимуляции с использованием набора для цитометрического определения цитокинов на основе гранул, специфичных в отношении

TH1/TH2 человека (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями изготовителя. Флуоресценцию оценивают с помощью проточного цитометра FACSCalibur, и данные анализируют в соответствии с инструкциями изготовителя.

[000286] Цитотоксичность можно оценить с помощью стандартного количественного исследования высвобождения изотопа ^{51}Cr (см., например, Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)). В общих чертах, клетки-мишени (линии K562 и первичные про-B-ALL клетки) загружают ^{51}Cr (в виде NaCrO_4 , New England Nuclear) при 37 °C в течение 2 ч при частом перемешивании, дважды промывают в полной среде RPMI и высевают на планшеты для микротитрования. Эффекторныe Т-клетки смешивают с клетками-мишенями в лунках в полной среде RPMI при различных соотношениях эффекторные клетки:клетки-мишени (E:T). Также готовят дополнительные лунки, содержащие только среду (спонтанное высвобождение, SR) или 1% раствор детергента тритон X100 (общее высвобождение, TR). После 4 часов инкубации при 37 °C супернатант из каждой лунки собирают. Высвобожденный ^{51}Cr затем измеряют с помощью счетчика гамма-частиц (Packard Instrument Co., Волтем, Массачусетс, США). Эксперименты при каждом условии выполняют по меньшей мере три раза, и процент лизиса вычисляют по следующей формуле: % лизиса = $(\text{ER} - \text{SR}) / (\text{TR} - \text{SR})$, где ER представляет собой среднее количество высвобожденного ^{51}Cr для каждого экспериментального условия.

[000287] Визуализирующие технологии могут быть использованы для оценки специфичного перемещения и распространения TFP в животных моделях, несущих опухоли. Такие количественные исследования были описаны, например, в Barrett et al., *Human Gene Therapy* 22:1575-1586 (2011). В общих чертах, мышам NOD/SCID/ $\gamma\text{c}^{-/-}$ (NSG) вводят внутривенно клетки Nalm-6 и через 7 дней вводят Т-клетки, которые за 4 часа перед введением подвергают электропорации конструкциями TFP. Т-клетки, стабильно трансфецированные лентивирусной конструкцией для экспрессии люциферазы светлячка, и мышей подвергают визуализирующим методам исследований для оценки биолюминесценции. В другом варианте, терапевтическую эффективность и специфичность однократной инъекции TFP+ Т-клеток в ксенотрансплантатной модели NALM-6 можно измерить следующим образом: мышам линии NSG вводят NALM-6, трансдуцированные для стабильной экспрессии люциферазы светлячка, и затем через 7 дней в хвостовую вену вводят однократную инъекцию Т-клеток после электропорации CD19 TFP. Животных подвергают визуализирующим методам исследований в различные моменты времени после инъекции. Например, у типичных мышей могут быть получены тепловые карты плотности фотонов лейкоза, положительного на наличие люциферазы светлячка, на 5-й день (за 2 дня до лечения) и 8-й день (24 ч после введения TFP + PBL).

[000288] Другие количественные исследования, включая те, которые описаны в разделе примеров в настоящем документе, а также те, которые известны в данной области техники, также могут быть использованы для оценки CD19-связывающей или ВСМА-связывающей конструкции TFP согласно настоящему изобретению.

Способы терапевтического применения

Заболевания и/или расстройства, связанные с CD19 или ВСМА

[000289] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания, связанного с экспрессией CD19 или ВСМА. Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания, в котором часть опухоли не экспрессирует CD19 или ВСМА, и часть опухоли экспрессирует CD19 или ВСМА. Например, TFP согласно настоящему изобретению можно применять для лечения субъектов, которые получали лечение заболевания, связанного с повышенным уровнем экспрессии CD19 или ВСМА, причем субъект, который получал лечение повышенных уровней CD19 или ВСМА, имеет заболевание, связанное с повышенным уровнем CD19 или ВСМА.

[000290] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий CD19-связывающий или ВСМА-связывающий TFP, функционально связанный с промотором для экспрессии в Т-клетках млекопитающих. Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложена рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая CD19 или ВСМА TFP, для использования в лечении CD19- или ВСМА-экспрессирующих опухолей, причем указанная рекомбинантная Т-клетка, экспрессирующая CD19 или ВСМА TFP, называется CD19 или ВСМА TFP-Т. Согласно одному аспекту CD19 или ВСМА TFP-Т согласно настоящему изобретению способна вступать в контакт с клеткой опухоли посредством по меньшей мере одного из CD19-связывающего или ВСМА-связывающего TFP согласно настоящему изобретению, экспрессирующегося на ее поверхности так, что TFP-Т нацелена на клетку опухоли и рост опухоли ингибируется.

[000291] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ ингибирования роста CD19- или ВСМА-экспрессирующей опухолевой клетки, включающий приведение клетки опухоли в контакт с CD19 или ВСМА TFP Т-клеткой согласно настоящему изобретению так, что TFP-Т активируется в ответ на антиген и нацелено воздействует на раковую клетку, при этом рост опухоли ингибируется.

[000292] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложен способ лечения рака у субъекта. Способ включает введение субъекту CD19 или ВСМА TFP Т-клетки согласно настоящему изобретению так, что у субъекта излечивается рак. Пример

рака, который поддается лечению с помощью CD19 или BCMA TFP T-клетки согласно настоящему изобретению, включает рак, связанный с экспрессией CD19 или BCMA. Согласно одному аспекту настоящего изобретения рак, связанный с экспрессией CD19 или BCMA, представляет собой гематологический рак. Согласно одному аспекту гематологический рак представляет собой лейкоз или лимфу. Согласно одному аспекту рак, связанный с экспрессией CD19, включает разные виды рака и злокачественные опухоли, включая, но не ограничиваясь ими, например, один или более видов острых лейкозий, включая, но не ограничиваясь ими, например, острую В-клеточную лимфоидную лейкемию («B-ALL»), острую Т-клеточную лимфоидную лейкемию («T-ALL»), острую лимфобластную лейкемию (ALL); один или более видов хронической лейкемии, включая, но не ограничиваясь ими, хроническую миелогенную лейкемию (CML), хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL). Дополнительные виды гематологических раковых заболеваний или гематологических состояний, связанных с экспрессией CD19 или BCMA, включают, но не ограничиваются ими, В-клеточную пролимфоцитарную лейкемию, новообразование бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лейкоз ворсистых клеток, мелкоклеточную и крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT-типа, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию, миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, новообразование плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема и «предлейкоз», которые представляют собой разнородную совокупность гематологических состояний, общим признаком которых является неэффективная выработка (или дисплазия) миелоидных клеток крови, и т.п. Помимо этого заболевание, связанное с экспрессией CD19 или BCMA, включает, но не ограничивается ими, например, атипичные и/или неклассические виды рака, злокачественные опухоли, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, связанные с экспрессией CD19 или BCMA.

[000293] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак, который можно лечить с использованием CD19 или BCMA TFP, например, описанный в настоящем документе, представляет собой множественную миелому. Множественная миелома представляет собой рак крови, характеризующийся накоплением клона плазматических клеток в костном мозге. Современные способы лечения множественной миеломы включают, но не ограничиваются ими, лечение с использованием леналидомида, который является аналогом талидомида. Леналидомид имеет несколько видов активности,

которые включают противоопухолевую активность, ингибирование ангиогенеза и иммуномодуляцию. Как правило, клетки миеломы, как полагают, являются отрицательными в отношении экспрессии CD19 или BCMA, согласно результатам проточной цитометрии. Настоящее изобретение основывается на том факте, что небольшой процент опухолевых клеток миеломы экспрессирует CD19 или BCMA. Следовательно, в некоторых вариантах реализации, CD19 или BCMA TFP, например, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для нацеливания на клетки-мишени миеломы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапия с применением CD19 или BCMA TFP может быть использована в комбинации с одним или более дополнительными способами терапии, например, лечением с использованием леналидомида.

[000294] В настоящем изобретении предложен тип клеточной терапии, при которой Т-клетки генетически модифицированы для экспрессии TFP, и указанные TFP-экспрессирующие Т-клетки вводят реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенная клетка способна вызывать гибель опухолевых клеток реципиента. В отличие от терапии антителами TFP-экспрессирующие Т-клетки способны к репликации в условиях *in vivo*, это приводит к их долговременному сохранению, что может обеспечить устойчивый контроль опухоли. В различных аспектах Т-клетки, введенные пациенту, или их потомство, сохраняются в организме пациента в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения Т-клетки пациенту.

[000295] В настоящем изобретении также предложен тип клеточной терапии, при которой Т-клетки модифицированы, например, с помощью транскрибируемой в условиях *in vitro* РНК для кратковременной экспрессии TFP, и TFP-экспрессирующие Т-клетки вводят путем инфузии реципиенту, нуждающемуся в этом. Введенная путем инфузии клетка способна вызвать гибель опухолевых клеток реципиента. Следовательно, в различных аспектах Т-клетки, введенные пациенту, присутствуют в течение менее чем одного месяца, например, в течение трех недель, двух недель или одной недели, после введения Т-клетки пациенту.

[000296] Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы настоящего изобретения полагают, что противоопухолевый иммунный ответ,

вызванный TFP-экспрессирующими Т-клетками, может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ, или, в другом варианте, может быть связан с соотношением непосредственного иммунного ответа и косвенного иммунного ответа. Согласно одному аспекту TFP-трансдуцированные Т-клетки проявляют специфичную секрецию провоспалительных цитокинов и сильную цитолитическую активность в ответ на раковые клетки человека, экспрессирующие антиген CD19 или ВСМА, являются резистентными к ингибированию растворимым CD19 или ВСМА, опосредуют неспецифичный цитолиз и опосредуют регрессию установленной опухоли человека. Например, не содержащие антиген опухолевые клетки в гетерогенной области CD19-экспрессирующей или ВСМА-экспрессирующей опухоли могут быть восприимчивы к косвенному разрушению под действием CD19-перенаправленных или ВСМА-перенаправленных Т-клеток, которые ранее взаимодействовали с соседними антигенположительными раковыми клетками.

[000297] Согласно одному аспекту настоящего изобретения TFP-модифицированные Т-клетки человека согласно настоящему изобретению могут представлять собой тип вакцины для иммунизации в условиях *ex vivo* и/или терапии в условиях *in vivo* у млекопитающих. Согласно одному аспекту млекопитающее представляет собой человека.

[000298] При иммунизации в условиях *ex vivo* перед введением клетки млекопитающему по меньшей мере один из указанных этапов осуществляют в условиях *in vitro*: i) пролиферацию клеток, ii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP, в клетки, или iii) криоконсервацию клеток.

[000299] Процедуры в условиях *ex vivo* хорошо известны в данной области техники и более подробно обсуждаются ниже. В общих чертах, клетки выделяют у млекопитающего (например, человека) и генетически модифицируют (т.е., трансдуцируют или трансфецируют в условиях *in vitro*) с помощью вектора экспрессии TFP, описанного в настоящем документе. TFP-модифицированные клетки могут быть введены млекопитающему-реципиенту, чтобы обеспечить терапевтическое действие. Млекопитающее-реципиент может представлять собой человека, и TFP-модифицированные клетки могут быть аутологичными по отношению к реципиенту. В другом варианте, клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к реципиенту.

[000300] Процедуру пролиферации гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников в условиях *ex vivo*, описанную в патенте США №5199942, включенном в настоящую заявку посредством ссылки, можно применять в отношении клеток согласно настоящему изобретению. Другие подходящие способы известны в данной области техники, в этой связи настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным

способом пролиферации клеток в условиях *ex vivo*. В общих чертах, способы культивирования в условиях *ex vivo* и пролиферации Т-клеток включают: (1) сбор CD34+ гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников из образцов периферической крови или экплантов костного мозга млекопитающего; и (2) пролиферацию указанных клеток в условиях *ex vivo*. В дополнение к клеточным факторам роста, описанным в патенте США № 5199942, для культивирования и пролиферации клеток могут быть использованы другие факторы, такие как flt3-L, ИЛ-1, ИЛ-3 и лиганд c-kit.

[000301] Помимо использования вакцины на основе клеток, применительно к иммунизации в условиях *ex vivo*, в настоящем изобретении также предложены композиции и способы иммунизации в условиях *in vivo*, чтобы вызывать у пациента иммунный ответ на антиген.

[000302] Как правило, клетки, активированные и размноженные, как описано в настоящем документе, могут быть использованы в лечении и предотвращении заболеваний, которые возникают у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. В частности, TFP-модифицированные Т-клетки согласно настоящему изобретению применяют в лечении заболеваний, расстройств и состояний, связанных с экспрессией CD19 или BCMA. В некоторых аспектах клетки согласно настоящему изобретению применяют в лечении пациентов с риском развития заболеваний, расстройств и состояний, связанных с экспрессией CD19 или BCMA. Следовательно, в настоящем изобретении предложены способы лечения или предотвращения заболеваний, расстройств и состояний, связанных с экспрессией CD19 или BCMA, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества TFP-модифицированных Т-клеток согласно настоящему изобретению.

[000303] Согласно одному аспекту настоящего изобретения TFP-Т-клетки согласно настоящему изобретению можно применять для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак или злокачественная опухоль, или предракового состояния, такого как миелодисплазия, MDS или предлейкоз. Согласно одному аспекту рак представляет собой гематологический рак. Согласно одному аспекту гематологический рак представляет собой лейкоз или лимфому. Согласно одному аспекту TFP-Т-клетки согласно настоящему изобретению можно применять для лечения рака и злокачественных опухолей, таких как, но не ограничиваясь ими, острые лейкемии, включая, но не ограничиваясь ими, например, острую В-клеточную лимфоидную лейкемию («B-ALL»), острую Т-клеточную лимфоидную лейкемию («T-ALL»), острую лимфобластную лейкемию (ALL); один или более видов хронической лейкемии, включая, но не ограничиваясь ими, хроническую

миелогенную лейкемию (CML), хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL); дополнительных видов гематологических раковых заболеваний или гематологических состояний, включая, но не ограничиваясь ими, В-клеточную пролимфоцитарную лейкемию, новообразование бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лейкоз ворсистых клеток, мелкоклеточную и крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT-типа, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию, миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, новообразование плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема и предлейкоз, которые представляют собой разнородную совокупность гематологических состояний, общим признаком которых является неэффективная выработка (или дисплазия) миелоидных клеток крови, и т.п. Помимо этого заболевание, связанное с экспрессией CD19 или BCMA, включает, но не ограничивается ими, например, атипичные и/или неклассические виды рака, злокачественные опухоли, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, связанные с экспрессией CD19 или BCMA. Показания, не относящиеся к раку, связанные с экспрессией CD19 или BCMA, включают, но не ограничиваются ими, например, аутоиммунное заболевание (например, волчанку), воспалительные заболевания (аллергию и астму) и трансплантацию.

[000304] TFR-модифицированные Т-клетки согласно настоящему изобретению могут быть введены по отдельности или в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как ИЛ-2 или другие цитокины, или популяции клеток.

Гематологический рак

[000305] Гематологические раковые состояния включают такие виды рака как лейкоз и злокачественные лимфопролиферативные состояния, которые влияют на кровь, костный мозг и лимфатическую систему.

[000306] Лейкемия может быть классифицирована как острая лейкемия и хроническая лейкемия. Острая лейкемия может быть дополнительно классифицирована как острая миелогенная лейкемия (AML) и острая лимфоидная лейкемия (ALL). Хроническая лейкемия включает хроническую миелогенную лейкемию (CML) и хроническую лимфоидную лейкемию (CLL). Другие связанные состояния включают миелодиспластический синдром (MDS, ранее известный как «предлейкоз»), которые представляют собой разнородную совокупность гематологических состояний, общим

признаком которых является неэффективная выработка (или дисплазия) миелоидных клеток крови и риск трансформации в AML.

[000307] В настоящем изобретении предложены композиции и способы лечения рака. Согласно одному аспекту рак представляет собой гематологический рак, включая, но не ограничиваясь ими, лейкоз или лимфому. Согласно одному аспекту TFP-T-клетки согласно настоящему изобретению можно применять для лечения различных видов рака и злокачественных опухолей, таких как, но не ограничиваясь ими, например, острые лейкемии, включая, но не ограничиваясь ими, например, острую В-клеточную лимфоидную лейкемию («B-ALL»), острую Т-клеточную лимфоидную лейкемию («T-ALL»), острую лимфобластную лейкемию (ALL); один или более видов хронической лейкемии, включая, но не ограничиваясь ими, хроническую миелогенную лейкемию (CML), хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL); дополнительных видов гематологических раковых заболеваний или гематологических состояний, включая, но не ограничиваясь ими, В-клеточную пролимфоцитарную лейкемию, новообразование бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лейкоз ворсистых клеток, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, лимфому MALT-типа, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию, миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, новообразование плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема и предлейкоз, которые представляют собой разнородную совокупность гематологических состояний, общим признаком которых является неэффективная выработка (или дисплазия) миелоидных клеток крови и т.п. Помимо этого заболевание, связанное с экспрессией CD19 или BCMA, включает, но не ограничивается ими, например, атипичные и/или неклассические виды рака, злокачественные опухоли, предраковые состояния или пролиферативные заболевания, связанные с экспрессией CD19 или BCMA.

[000308] В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования пролиферации или уменьшения популяции CD19- или BCMA-экспрессирующих клеток, включающие приведение популяции клеток, содержащих CD19- или BCMA-экспрессирующую клетку, в контакт с CD19-связывающей или BCMA-связывающей TFP-T-клеткой согласно настоящему изобретению, которая связывается с CD19- или BCMA-экспрессирующей клеткой. Согласно конкретному аспекту в настоящем изобретении предложены способы ингибирования пролиферации или уменьшения популяции раковых

клеток, экспрессирующих CD19 или ВСМА, включающие приведение популяции CD19- или ВСМА-экспрессирующих раковых клеток в контакт с CD19-связывающей или ВСМА-связывающей TFP-T-клеткой согласно настоящему изобретению, которая связывается с CD19- или ВСМА-экспрессирующей клеткой. Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы ингибирования пролиферации или уменьшения популяции раковых клеток, экспрессирующих CD19 или ВСМА, включающие приведение популяции CD19- или ВСМА-экспрессирующих раковых клеток в контакт с CD19-связывающей или ВСМА-связывающей TFP-T-клеткой согласно настоящему изобретению, которая связывается с CD19- или ВСМА-экспрессирующей клеткой. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения CD19-связывающая или ВСМА-связывающая TFP-T-клетка согласно настоящему изобретению уменьшает долю, число, количество или процент клеток и/или раковых клеток по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% у субъекта, который страдает миелоидным лейкозом или другим видом рака, связанного с CD19- или ВСМА-экспрессирующими клетками, или в животной модели указанных заболеваний, по сравнению с отрицательным контролем. Согласно одному аспекту настоящего изобретения субъект представляет собой человека.

[000309] В настоящем изобретении также предложены способы предотвращения, лечения и/или контроля заболевания, связанного с CD19- или ВСМА-экспрессирующими клетками (например, гематологического рака или атипичного рака, экспрессирующего CD19 или ВСМА), включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, CD19-связывающей или ВСМА-связывающей TFP-T-клетки согласно настоящему изобретению, которая связывается с CD19- или ВСМА-экспрессирующей клеткой. Согласно одному аспекту реализации настоящего изобретения субъект представляет собой человека. Неограничивающие примеры расстройств, связанных с CD19- или ВСМА-экспрессирующими клетками, включают аутоиммунные заболевания (такие как волчанка), воспалительные заболевания (такие как аллергии и астма) и различные виды рака (такие как различные виды гематологического рака или атипичные виды рака, экспрессирующие CD19 или ВСМА).

[000310] В настоящем изобретении также предложены способы предотвращения, лечения и/или контроля заболевания, связанного с CD19- или ВСМА-экспрессирующими клетками, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, CD19-связывающей или ВСМА-связывающей TFP-T-клетки согласно настоящему изобретению, которая

связывается с CD19- или ВСМА-экспрессирующей клеткой. Согласно одному аспекту настоящего изобретения субъект представляет собой человека.

[000311] В настоящем изобретении предложены способы предотвращения рецидива рака, связанного с CD19- или ВСМА-экспрессирующими клетками, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, CD19-связывающей или ВСМА-связывающей TFP-T-клетки согласно настоящему изобретению, которая связывается с CD19- или ВСМА-экспрессирующей клеткой. Согласно одному аспекту настоящего изобретения способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества CD19-связывающей или ВСМА-связывающей TFP-T-клетки согласно настоящему изобретению, которая связывается с CD19- или ВСМА-экспрессирующей клеткой, в комбинации с эффективным количеством другой терапии.

Комбинированные способы лечения

[000312] TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может быть использована в комбинации с другими известными агентами и способами лечения. В настоящей заявке введение «в комбинации» означает, что два (или более) различных способа лечения доставляют субъекту в то время, когда указанный субъект страдает от расстройства, например, два или более способов лечения доставляют после того, как у субъекта был поставлен диагноз расстройства, и до того, как расстройство было излечено или устранено, или лечение было прекращено по другим причинам. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один способ лечения продолжают доставлять в тот момент, когда начинается доставка второго способа лечения, так, что курсы введения перекрываются. Такую ситуацию иногда называют в данном документе как «одновременная доставка» или «совпадающая по времени доставка». Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения доставка одного способа лечения заканчивается до начала доставки другого способа лечения. Согласно некоторым вариантам реализации любого из указанных случаев лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второй способ лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдают при меньшей интенсивности второго способа лечения, или второй способ лечения снижает симптомы в большей степени, чем можно было бы наблюдать при введении второго способа лечения в отсутствие первого способа лечения, или аналогичную ситуацию наблюдают при применении первого способа лечения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения доставку осуществляют так, что уменьшение симптома или другой параметр, связанный с расстройством, больше, чем можно было бы наблюдать при использовании одного способа лечения, доставленного в отсутствие другого. Действие

двух способов лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или более чем аддитивным. Доставка может быть осуществлена так, что действие первого доставленного способа лечения по-прежнему детектируется во время доставки второго способа лечения.

[000313] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения «по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент» включает TFP-экспрессирующую клетку. В настоящем изобретении также предложены Т-клетки, которые экспрессируют несколько TFP, которые связываются с одинаковыми или различными антигенами-мишенями, или одинаковыми или различными эпитопами на одном и том же антигене-мишени. В настоящем изобретении также предложены популяции Т-клеток, в которых первая подгруппа Т-клеток экспрессирует первый TFP, и вторая подгруппа Т-клеток экспрессирует второй TFP.

[000314] TFP-экспрессирующие клетки, описанные в настоящем документе, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно, в составе одной и той же композиции или в виде отдельных композиций, или последовательно. В случае последовательного введения TFP-экспрессирующую клетку, описанную в настоящем документе, можно вводить первой, и дополнительный агент может быть введен вторым, или порядок введения может быть обратным.

[000315] В других аспектах, TFP-экспрессирующая клетка, описанная в настоящем документе, может быть использована в схеме лечения в комбинации с хирургическим вмешательством, химиотерапией, облучением, иммуносупрессивными агентами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, мофетил и FK506, антителами или другими иммунодеструктивными агентами, такими как CAMPATH, антителами к CD3 или другими видами терапии на основе антител, цитоксином, флударабином, циклоспорином, FK506, рапамицином, микофенольной кислотой, стероидами, FR901228, цитокинами и облучением, пептидной вакциной, например, описанной в Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.

[000316] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекту может быть введен агент, который уменьшает или улучшает побочный эффект, связанный с введением TFP-экспрессирующей клетки. Побочные эффекты, связанные с введением TFP-экспрессирующей клетки, включают, но не ограничиваются ими, синдром высвобождения цитокинов (CRS) и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), также называемый синдром активации макрофагов (MAS). Симптомы CRS включают высокую температуру, тошноту, преходящую гипотензию, гипоксию и т.п. Соответственно, способы, описанные в настоящем документе, могут включать введение субъекту TFP-

экспрессирующей клетки согласно настоящему изобретению и последующее введение агента для контроля повышенных уровней растворимого фактора, который высвобождается в результате лечения с использованием TFP-экспрессирующей клетки. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения растворимый фактор, уровень которого повышен у субъекта, представляет собой один или более из ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-2 и ИЛ-6. Следовательно, агент, введенный для лечения указанного побочного эффекта, может быть агентом, который нейтрализует один или более из указанных растворимых факторов. Такие агенты включают, но не ограничиваются ими, стероид, ингибитор ФНО- α и ингибитор ИЛ-6. Пример ингибитора ФНО включает энтанерцепт. Пример ингибитора ИЛ-6 включает тоцилизумаб (toc).

[000317] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекту может быть введен агент, который усиливает активность TFP-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте реализации, агент может являться агентом, который ингибирует ингибирующую молекулу. Ингибирующая молекула, например, белок запрограммированной гибели 1 (PD1), может, в некоторых вариантах реализации, уменьшать способность TFP-экспрессирующей клетки индуцировать иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR-бета. Ингибирование ингибирующей молекулы, например, путем ингибирования на уровне ДНК, РНК или белка, может оптимизировать функциональную активность TFP-экспрессирующей клетки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибиторная нуклеиновая кислота, например, дцРНК, например, миРНК или кшРНК, может быть использована для ингибирования экспрессии ингибиторной молекулы в TFP-экспрессирующей клетке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой кшРНК. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ингибирующая молекула оказывает ингибиторное действие в TFP-экспрессирующей клетке. В указанных вариантах реализации молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию ингибирующей молекулы, связана с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент, например, все из компонентов, TFP. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ингибитор ингибиторного сигнала может представлять собой, например, антитело или фрагмент антитела, который связывается с ингибирующей молекулой. Например, агент может представлять собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с PD1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4 (например, ипилимумаб (также упоминаемый как MDX-010 и MDX-101, который доступен коммерчески как ервой (YervoyTM); Bristol-Myers Squibb; тремелидумаб

(моноклональное антитело IgG2, доступное от Pfizer, ранее известное как тицилимумаб, CP-675206)). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с TIM3. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с LAG3.

[000318] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, который усиливает активность TFP-экспрессирующей клетки, может представлять собой, например, гибридный белок, содержащий первый домен и второй домен, причем указанный первый домен представляет собой ингибирующую молекулу или ее фрагмент, и указанный второй домен представляет собой полипептид, который связан с положительным сигналом, например, полипептид, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид, который связан с положительным сигналом, может содержать костимулирующий домен CD28, CD27, ICOS, например, внутриклеточный сигнальный домен CD28, CD27 и/или ICOS, и/или первичный сигнальный домен, например, CD3-дзета, например, описанный в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок экспрессируется той же клеткой, которая экспрессирует TFP. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок экспрессируется клеткой, например, Т-клеткой, которая не экспрессирует CD19-связывающий TFP.

Фармацевтические композиции

[000319] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать TFP-экспрессирующую клетку, например, множество TFP-экспрессирующих клеток, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Подходящие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный буферный солевой раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Согласно одному аспекту композиции согласно настоящему изобретению изготовлены для внутривенного введения.

[000320] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены способом, который является подходящим для заболевания, которое лечат (или предотвращают). Количество и частота введения будет определяться такими

факторами, как состояние пациента, а также тип и степень тяжести заболевания пациента, тем не менее, соответствующие дозировки могут быть определены с помощью клинических исследований.

[000321] Согласно одному варианту реализации фармацевтическая композиция по существу не содержит примеси, например, отсутствуют детектируемые уровни примеси, например, выбранной из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компетентного по репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, gag ВИЧ, остаточных гранул, покрытых антителом к CD3/CD28, мышинных антител, объединенной сыворотки крови человека, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов культуральных сред, клеток-упаковщиков вектора или компонентов плазмид, бактерии и грибка. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения бактерия представляет собой по меньшей мере одну бактерию, выбранную из группы, состоящей из *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus pyogenes* группы A.

[000322] Если указано «иммунологически эффективное количество», «противоопухолевое эффективное количество», «ингибирующее опухоль эффективное количество» или «терапевтическое количество», точное количество композиций согласно настоящему изобретению, подлежащее введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени инфицирования или метастазов, и состояния пациента (субъекта). Как правило, можно утверждать, что фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетки, описанные в настоящем документе, может быть введена в дозировке от 10^4 до 10^9 клеток/кг массы тела, в некоторых случаях от 10^5 до 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения в пределах указанных диапазонов. Композиции Т-клеток также можно вводить несколько раз в указанных дозировках. Клетки могут быть введены с помощью методик инфузии, которые обычно известны в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

[000323] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения желательным может быть введение активированных Т-клеток субъекту с последующим повторным отбором крови (или проведением афереза), активация Т-клеток в образце в соответствии с настоящим изобретением, и повторная инфузия активированных и размноженных Т-клеток пациенту. Указанный способ можно осуществлять несколько раз каждые несколько недель. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения Т-клетки могут быть активированы из образцов крови объемом от 10 см^3 до 400 см^3 . Согласно некоторым

аспектам настоящего изобретения Т-клетки активируют из образцов крови объемом 20 см³, 30 см³, 40 см³, 50 см³, 60 см³, 70 см³, 80 см³, 90 см³ или 100 см³.

[000324] Введение субъектам композиций можно осуществлять любым удобным способом, включая аэрозольную ингаляцию, инъекцию, прием внутрь, переливание, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в настоящем документе, могут быть введены пациенту трансартериально, подкожно, внутривенно, внутримышечно, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутривенно. Согласно одному аспекту композиции Т-клеток согласно настоящему изобретению вводят пациенту с помощью внутривенной или подкожной инъекции. Согласно одному аспекту композиции Т-клеток согласно настоящему изобретению вводят путем внутривенной инъекции. Композиции Т-клеток могут быть введены непосредственно в опухоль, лимфатический узел или очаг инфекции.

[000325] В конкретном иллюстративном аспекте субъекты могут подвергаться лейкоферезу, при котором лейкоциты собирают, обогащают или обедняют в условиях *ex vivo* для отбора и/или выделения клеток, представляющих интерес, например, Т-клеток. Подходящие выделенные Т-клетки могут быть размножены с помощью способов, известных в данной области техники, и обработаны так, что может быть введена одна или более конструкций TFP согласно настоящему изобретению, создавая тем самым TFP-экспрессирующую Т-клетку согласно настоящему изобретению. Субъекты, нуждающиеся в этом, впоследствии могут пройти стандартное лечение с использованием высоких доз химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, после или одновременно с введением трансплантата, субъектам путем инфузии вводят размноженные TFP Т-клетки согласно настоящему изобретению. В дополнительном аспекте размноженные клетки вводят до или после хирургического вмешательства.

[000326] Дозировка вышеуказанных способов лечения, которую будут вводить пациенту, будет варьироваться в зависимости от точного характера состояния, подлежащего лечению, и реципиента указанного способа лечения. Масштабирование доз для введения человеку может быть выполнено в соответствии с практикой, принятой в данной области техники. Доза для CAMPATH, например, как правило, будет находиться в диапазоне от 1 до приблизительно 100 мг для взрослого пациента, как правило, при ежедневном введении в течение периода от 1 до 30 дней. Предпочтительная суточная доза составляет от 1 до 10 мг/сутки, хотя в некоторых случаях могут быть использованы более высокие дозы до 40 мг/сутки (описанные в патенте США №6120766).

[000327] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения TFP вводят в Т-клетки, например, с использованием транскрипции в условиях *in vitro*, и субъект (например, человек) получает начальное введение TFP Т-клеток согласно настоящему изобретению, и одно или более последующих введений TFP Т-клеток согласно настоящему изобретению, причем одно или более последующих введений осуществляют менее чем через 15 дней, например, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или через 2 дня после предыдущего введения. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекту (например, человеку) вводят TFP Т-клетки согласно настоящему изобретению чаще, чем один раз в неделю, например, TFP Т-клетки согласно настоящему изобретению вводят 2, 3 или 4 раза в неделю. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекту (например, человеку) вводят TFP Т-клетки чаще одного раза в неделю (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (также упоминается в настоящем документе как цикл), в течение последующей недели TFP Т-клетки не вводят, и затем осуществляют одно или более дополнительных введений TFP Т-клеток (например, более одного введения TFP Т-клеток в неделю) субъекту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения субъект (например, человек) получает более одного цикла TFP Т-клеток, и промежуток времени между каждым циклом составляет менее 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 дней. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения TFP Т-клетки вводят через день, чтобы достичь 3-х введений в неделю. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения TFP Т-клетки согласно настоящему изобретению вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

[000328] Согласно одному аспекту CD19 TFP Т-клетки получают с использованием лентивирусных векторов, таких как лентивирус. TFP-Т-клетки, полученные с помощью указанного способа, будут иметь стабильную экспрессию TFP.

[000329] Согласно одному аспекту TFP Т-клетки кратковременно экспрессируют векторы TFP в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. Кратковременная экспрессия TFP может быть осуществлена путем доставки вектора РНК TFP. Согласно одному аспекту настоящего изобретения РНК TFP трансдуцируют в Т-клетку путем электропорации.

[000330] Потенциальная проблема, которая может возникнуть у пациентов, которых лечат с использованием кратковременно экспрессирующих TFP Т-клеток (в частности, TFP Т-клеток, несущих scFv мыши), заключается в анафилактической реакции после многократных обработок.

[000331] Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы настоящего изобретения полагают, что такая анафилактическая реакция может быть вызвана развитием у пациента гуморального ответа на TFP, т.е. антител к TFP, имеющих изотип IgE. Считается, что вырабатывающие антитело клетки пациента претерпевают переключение класса от изотипа IgG (который не вызывает анафилактической реакции) к изотипу IgE, если перерыв в воздействии антигена составляет десять-четырнадцать дней.

[000332] Если пациент имеет высокий риск выработки антител к TFP в течение кратковременной терапии с использованием TFP (например, тех, которые получают с помощью РНК-трансдукции), то перерывы между инфузиями TFP Т-клеток не должны длиться более чем от десяти до четырнадцати дней.

ПРИМЕРЫ

[000333] Настоящее изобретение будет более подробно описано ниже со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Данные примеры приведены исключительно с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения, если не указано иное. Следовательно, настоящее изобретение никоим образом не должно быть истолковано как ограниченное нижеследующими примерами, и подразумевает включение любых и всех вариантов, которые стали очевидными в результате изложения идей, предусмотренных в настоящем документе. Полагают, что обычный специалист в данной области техники может, используя предшествующее описание и следующие иллюстративные примеры, получить и использовать соединения согласно настоящему изобретению и осуществить заявленные способы без подробного описания. Следующие рабочие примеры конкретно указывают на различные аспекты настоящего изобретения и не должны быть истолкованы, как ограничивающие каким-либо образом остальную часть описания.

Пример 1: Конструкции TFP

[000334] CD19-связывающие конструкции TFP конструировали путем клонирования фрагмента ДНК CD19-связывающего scFv, соединенного с фрагментом ДНК CD3 или TCR с помощью последовательности ДНК, кодирующей короткий линкер (SL): AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO: 5) или длинный линкер (LL): AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO: 6), в вектор P510 (System Biosciences (SBI)) в сайтах XbaI и EcoRI.

[000335] Полученные конструкции CD19-связывающих TRuC включали p510_antiCD19_LL_TCR α (анти-CD19-scFv-длинный линкер-полноразмерная α -цепь Т-клеточного рецептора человека;), p510_antiCD19_LL_TCR α C (анти-CD19-scFv-длинный

линкер-константная область α -цепи Т-клеточного рецептора человека), p510_antiCD19_LL_TCR β (анти-CD19-scFv-длинный линкер-полноразмерная бета-цепь Т-клеточного рецептора человека), p510_antiCD19_LL_TCR β C (анти-CD19-scFv-длинный линкер-константная область бета-цепи Т-клеточного рецептора человека), p510_antiCD19_LL_CD3 γ (анти-CD19-scFv-длинный линкер-цепь CD3 γ человека), p510_antiCD19_LL_CD3 δ (анти-CD19-scFv-длинный линкер-цепь CD3 δ человека), p510_antiCD19_LL_CD3 ϵ (анти-CD19-scFv-длинный линкер-цепь CD3 ϵ человека), p510_antiCD19_SL_TCR β (анти-CD19-scFv-короткий линкер-полноразмерная β -цепь Т-клеточного рецептора человека), p510_antiCD19_SL_CD3 γ (анти-CD19-scFv-короткий линкер-цепь CD3 γ человека), p510_antiCD19_SL_CD3 δ (анти-CD19-scFv-короткий линкер-цепь CD3 δ человека), p510_antiCD19_SL_CD3 ϵ (анти-CD19-scFv-короткий линкер-цепь CD3 ϵ человека).

[000336] Конструкцию CD19-связывающего CAR, p510_antiCD19_28 ζ , получали путем клонирования синтезированной ДНК, кодирующей CD19-связывающий фрагмент, частичный внеклеточный домен CD28, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный домен CD28 и CD3-дзета, в вектор p510 в сайтах XbaI и EcoRI.

[000337] Конструкции BCMA-связывающих TFP получали путем клонирования фрагмента ДНК BCMA-связывающего scFv, соединенного с фрагментом ДНК CD3 с помощью последовательности ДНК, кодирующей линкер: GGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO: 7), в вектор p510 (SBI) в сайтах XbaI и EcoRI. Полученные конструкции BCMA-связывающих TFP включали p510_antiBCMA_CD3 γ (анти-BCMA-scFv-линкер-цепь CD3 γ человека) и p510_antiBCMA_CD3 ϵ (анти-BCMA-scFv-линкер-цепь CD3 ϵ человека).

[000338] Полноразмерный BCMA синтезировали и клонировали в p514 (SBI) в сайтах BamHI и NheI, чтобы получить конструкцию p514_BCMA, использованную для получения стабильных линий клеток-мишеней.

[000339] Конструкции TFP, нацеленные к белку активации фибробластов (FAP) и карбоангидразе-9 (CAIX), получали путем клонирования фрагмента ДНК scFv, нацеленного к FAP или CAIX, соединенного с фрагментом ДНК CD3 с помощью последовательности ДНК, кодирующей линкер: GGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO: 7), в вектор p510 (SBI) в сайтах XbaI и EcoRI. Конструкции TFP, нацеленных к FAP или CAIX, которые могут быть получены, включают p510_anti FAP_CD3 γ (анти-FAP scFv-линкер-цепь CD3 γ человека) и p510_antiFAP_CD3 ϵ (анти-FAP scFv-линкер-цепь CD3 ϵ человека) и p510_antiCAIX_CD3 γ (анти-CAIX scFv-линкер-цепь CD3 γ человека) и p510_antiCAIX_CD3 ϵ (анти CAIX scFv-линкер-цепь CD3 ϵ человека).

[000340] Полноразмерные FAP и CAIX могут быть синтезированы и клонированы в p514 (SBI) в сайтах BamHI и NheI, чтобы получить конструкции p514_FAP и p514_CAIX, которые могут быть использованы для создания стабильных линий клеток-мишеней.

[000341] Примеры последовательностей конструкций представлены ниже:

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ КОНСТРУКЦИЙ

Целевая конструкция

***P514_BCMA* (SEQ ID NO: 8)**

```

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
61 acatgcotta caaggagaga aaaagcacccg tgcattgccga ttggtggaag taaggtagta
121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaacctga
181 attgccgat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacataa acgggtctct
241 ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa
301 gcctcaataa agcttgocct gagtgcttca agtagtgtgt gccgtctgt tgtgtgactc
361 tggtaactag agatccctca gacctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagtggcgc
421 ccgaacaggg acctgaaagc gaaagggaaa ccagagctct ctgcacgag gactcggctt
481 gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtacgcc aaaaattttg
541 actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga
601 attagatcgc gatgggaaaa aattcggtta aggccagggg gaaagaaaaa atataaatta
661 aaacatatag tatgggcaag caggagagcta gaacgattcg cagttaatcc tggcctgtta
721 gaaacatcag aaggctgtag acaaatactg ggacagctac aacctccct tcagacagga
781 tcagaagaac ttagatcatt atataatata gtagcaacc tctatttgtt gcatcaaag
841 atagagataa aagacacca ggaagcttta gacaagatag aggaagagca aaacaaaagt
901 aagaccaccg cacagcaagc ggccactgat cttcagacct ggaggaggag atatgaggga
961 caattggaga agtgaattat ataaatataa agtagtaaaa attgaacct taggagtagc
1021 acccaccaag gcaaagagaa gagggtgca gagagaaaaa agagcagtgg gaataggagc
1081 tttgttctt gggttcttg gagcagcagg aagcactatg ggcgacgct caatgacgct
1141 gacggtacag gccagacaat tattgtcttg tatagtgcag cagcagaaca atttgctgag
1201 ggctattgag gcgcaacagc atctgttgca actcacagtc tggggcatca agcagctcca
1261 ggcaagaatc ctggctgttg aaagatacct aaaggatcaa cagctcctgg ggatttgggg
1321 ttgctctgga aaactcattt gcaccactgc tgtgccttg aatgctagtt ggagtaataa
1381 atctctgga cagatttgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
1501 acaagaatta ttggaattag ataatgggc aagtttgttg aattggttta acataacaaa
1561 ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gttaagaat

```

1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcggt
 1681 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttctact tggcagtaca
 1981 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaa at gggcggtagg cgtgtacggg gggagggtta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatcgccctg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagattct
 2281 agagctagcg ccgccaccat gctccagatg gctggccagt gcagccagaa cgagtacttc
 2341 gacagcctgc tgcaagcctg catcccttgc cagctgcggg gcagcagcaa caccacccc
 2401 ctgacctgcc agcgggtactg caacgccagc gtgaccaaca gcgtgaaggg caccaacgcc
 2461 atcctgtgga cctgcctggg cctgagcctg atcatcagcc tggccgtgtt cgtgctgatg
 2521 ttctgtctgc ggaagatcaa cagcgagccc ctgaaggacg agttcaagaa caccggcagc
 2581 ggctgtctgg gcatggccaa catcgacctg gaaaagagcc ggaccggcga cgagatcatc
 2641 ctgcccagag gcctggagta caccgtggaa gagtgtacct gcgaggactg catcaagagc
 2701 aagcccaagg tggacagcga ccactgcttc cctctgcccg ccatggaaga gggcgccacc
 2761 atcctggtga caacaaagac caacgactac tgcaagagcc tgccctgccg cctgagcgcc
 2821 accgagatcg agaagtccat cagcgccaga tgaggatccg cggccgcaag gatctgcgat
 2881 cgctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg
 2941 ggaggggtcg gcaattgaac ggggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt
 3001 gatgtcgtgt actggctccg cttttttccc gaggggtggg gagaaccgta tataagtga
 3061 gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca gctgaagctt
 3121 cgaggggctc gcatctctcc ttcacgcgcg cgccgcccta cctgaggccg ccatccacgc
 3181 cggttgagtc gcgttctgcc gcctcccgcc tgtggtgcct cctgaactgc gtccgcccgc
 3241 taggtaagtt taaagctcag gtcgagaccg ggcctttgtc cggcgctccc ttggagccta
 3301 cctagactca gccggctctc cacgctttgc ctgacctgc ttgctcaact ctacgtcttt
 3361 gtttcgtttt ctgttctgcg ccgttacaga tccaagctgt gaccggcgcc tacgtcgaga
 3421 tgattgaaca agatggattg cacgcagggt ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg
 3481 gctatgactg ggcacaacag acaatcggt gctctgatgc cgccgtgttc cggctgtcag
 3541 cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg aatgaactgc
 3601 aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccgcgacggg cgttccttgc gcagctgtgc

3661 tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg
 3721 atctoctgtc atctcacctt gtcctgcog agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc
 3781 ggcggtgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg aaacatcgca
 3841 tcgagcgagc acgtactcgg atggaagcog gtcttgtcga tcaggatgat ctggacgaag
 3901 agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc atgcccgacg
 3961 gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg
 4021 gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcgaccgc tatcaggaca
 4081 tagogttggc taccogtgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc
 4141 tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcac cgccttctat cgccttcttg
 4201 acgagtttct ctgactcgac aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg
 4261 gtattcttaa ctatgttgct ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt
 4321 atcatgctat tgcttcccgat atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcttggttgc
 4381 tgtctcttta tgaggagttg tggcccggtg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcaactgtg
 4441 ttgctgacgc aacccccact ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga
 4501 ctttgccttt cccctccct attgccacgg cggaactcat cgcgcctgc cttgcccgct
 4561 gctggacagg ggctcggctg ttgggcaactg acaattccgt ggtgttgcg gggaaatcat
 4621 cgtcctttcc ttggctgctc gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct
 4681 gctaogtccc ttcggccctc aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgcgggctc
 4741 tgcggcctct tccgcgtctt cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccc
 4801 cctccccgcc tggtaacctt aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac
 4861 tttttaaaag aaaagggggg actggaaggg ctaattcact cccaacgaag ataagatctg
 4921 ctttttgctt gtactgggtc tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc
 4981 taactaggga acccactgct taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg
 5041 tgtgcccgtc tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg
 5101 tggaaaatct ctagcagtag tagttcatgt catcttatta ttcagtattt ataacttgca
 5161 aagaaatgaa tatcagagag tgagaggaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa
 5221 taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagtgtg
 5281 ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctggc tctagctatc ccgcccctaa
 5341 ctccgcccac ccgccccta actccgcca gttccgcca ttctccgcc catggctgac
 5401 taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt
 5461 agtgaggagg cttttttgga ggcctagact tttgcagaga cggcccaaat togtaatcat
 5521 ggtoatagct gtttctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag
 5581 ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaatagag gagctaactc acattaattg
 5641 cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa

5701 tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct tctcgcctca
 5761 ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg
 5821 taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc
 5881 agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggcgg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc
 5941 cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac
 6001 tataaagata ccaggcggtt ccccttgaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc
 6061 tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata
 6121 gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc
 6181 acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgag ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca
 6241 acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag
 6301 cgaggatatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta
 6361 gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg
 6421 gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc
 6481 agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt
 6541 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatitt ggtcatgaga ttatcaaaaa
 6601 ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat
 6661 atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga
 6721 tctgtctatt tcgttcatcc atagtgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac
 6781 gggaggggctt accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg
 6841 ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg
 6901 caactttatc cgcttcac cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt
 6961 cgccagttaa tagtttgcgc aacgttggtt ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct
 7021 cgtcgttttg tatggcttca ttcagctcgg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat
 7081 ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta
 7141 agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcaat gcataattct cttactgtca
 7201 tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat
 7261 agtgtatgag gcgaccaggt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac
 7321 atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcgggcgga aaactctcaa
 7381 ggatottacc gctgttgaga tccagttoga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt
 7441 cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg
 7501 caaaaaaggg aataaggcgc acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat
 7561 attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt
 7621 agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct
 7681 aagaaacat tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccttttc

7741 gtctcgcgcg tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg
 7801 tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg
 7861 gtgttggcgg gtgtcggggc tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag
 7921 tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacagggc
 7981 gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg atcgggtcgg gcctcttcgc
 8041 tattacgcca gctggcgaaa gggggatgtg ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag
 8101 ggttttccca gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtgc caagctg.

Конструкции CAR

p510_antiCD19_28z (SEQ ID NO: 9)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcacccg tgcattgccg ttggtggaag taagggtgta
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgcgcgat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc tgcagtcttc aagtagtgtg tgcccgctctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaagggaa accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agogggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagctc agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcattcaaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatattgagg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccaccaa ggcaagaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttcct tgggttcctt ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctcttg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga

1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgtgg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgtgg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcggt
 1681 tcagaccacac ctccaacccc cgagggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca
 1981 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggg gggagggtta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatcgcttgg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca
 2341 gcattcctcc tgatcccaga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gagtcacat cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaa
 2461 tggatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctaccatac atcaagatta
 2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtgga agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgcc acttactttt gccaacagg taatacgctt
 2641 ccgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc
 2701 aagcccgat ctggcgaggg atccaccaag ggcgagggtg aactgcagga gtcaggacct
 2761 ggcttgggtg cgccctcaca gagcctgtcc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 ccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa agggctctgga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaac cacatactat aattcagctc tcaaatccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagtttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagccattt actactgtgc caaacattat tactacggtg gtagctatgc tatggactac
 3061 tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcggcog caattgaagt tatgtatcct
 3121 cctccttacc tagacaatga gaagagcaat ggaaccatta tccatgtgaa agggaaacac
 3181 ctttgtccaa gtcccctatt tcccggacct tctaagccct tttgggtgct ggtggtggtt
 3241 gggggagtcc tggcttgcta tagcttgcta gtaacagtgg cttttattat tttctgggtg
 3301 aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgcccggcc
 3361 gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gcccaccac gcgacttcgc agcctatcgc
 3421 tccagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag
 3481 ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtacg atgttttgga caagagacgt

3541 ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac
 3601 aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagt agattgggat gaaaggcgag
 3661 cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac
 3721 acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctcgt aagaattcgg atccgcgcc
 3781 gcgaaggatc tgcgatcgt ccggtgccg tcagtgggca gagcgacat cgcacacagt
 3841 ccccgagaag ttggggggag gggtcggcaa ttgaacgggt gcctagagaa ggtggcggg
 3901 ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttccgagg gtgggggaga
 3961 accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttctttt cgcaacgggt ttgccgccag
 4021 aacacagctg aagcttcgag gggctcgcgt ctctccttca cgcgccgcc gccctacctg
 4081 aggccgccat ccacgccgt tgagtcgcgt tctgccgcct cccgcctgtg gtgcctcctg
 4141 aactgcgtcc gccgtctagg taagtttaa gctcaggtcg agaccgggc tttgtccggc
 4201 gctcccttg agcctacct gactcagccg gctctccacg ctttgctga cctgtcttg
 4261 tcaactctac gtctttgtt cgttttctgt tctgcgcgt tacagatcca agctgtgacc
 4321 ggcgctacg ctagatgacc gagtacaagc ccacggtcg cctcgccacc cgcgacgacg
 4381 tcccagggc cgtacgcacc ctccgcgcg cgttcgccga ctacccgcc acgcgccaca
 4441 ccgtcgatcc ggaccgccac atcgagcggg tcaccgagct gcaagaactc ttctcagc
 4501 gcgtcgggct cgacatcggc aaggtgtggg tcgcggacga cggcgcccg gtggcggtct
 4561 ggaccacgcc ggagagcgtc gaagcgggg cggtgttcgc cgagatcggc ccgcgcatgg
 4621 ccgagttgag cggttcccg ctggccgcgc agcaacagat ggaaggcctc ctggcgccgc
 4681 accggcccaa ggagcccgcg tggttccttg ccaccgtcgg cgtctcgccc gaccaccagg
 4741 gcaagggctt ggcagcgcc gtcgtgctc ccggagtga ggcgccgag cgcgcgggg
 4801 tgccgcctt cctggagacc tccgcgccc gcaacctccc cttctacgag cggctcggct
 4861 tcaccgtcac cgcgacgtc gagtgcccg aaggaccgc cacttggtgc atgaccgcga
 4921 agcccggtgc ctgagtgc aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg
 4981 gtattcttaa ctatgttgc cttttacgc tatgtggata cgctgctta atgccttgt
 5041 atcatgctat tgcttccgt atggcttca tttctcctc cttgtataaa tcttggttg
 5101 tgtctcttta tgaggagttg tggccggtg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtg
 5161 ttgctgacgc aaccccaact ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttcggga
 5221 ctttogcttt cccctccct attgccacgg cggaactcat cgcgcctgc cttgccgct
 5281 gctggacagg ggctcggctg ttggcactg acaattccgt ggtgttgtc gggaaatcat
 5341 cgtcctttcc ttggtgctc gcctgtgtt ccacctggat tctgcgggg acgtccttct
 5401 gctacgtccc ttcggccctc aatccagcgg accttcctc ccgcggcctg ctgccgctc
 5461 tgcggcctct tccgcgtct cgccttcgoc ctacagcag tcggatctcc ctttgggccg
 5521 cctccccgcc tggtaacctt aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac

5581 tttttaaaag aaaagggggg actggaaggg ctaattcact cccaacgaaa ataagatctg
 5641 ctttttgctt gtactgggtc tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc
 5701 taactaggga acccactgct taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgc tcaagtagtg
 5761 tgtgcccgtc tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg
 5821 tggaaaatct ctagcagtag tagttcatgt catcttatta ttcagtattt ataacttgca
 5881 aagaaatgaa tatcagagag tgagaggaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa
 5941 taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt
 6001 ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctggc tctagctatc cggcccctaa
 6061 ctccgcccag ttccgcccac tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag
 6121 aggcgcaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag
 6181 gcctagactt ttgcagagac ggcccaaatt cgtaatcatg gtcatactg tttcctgtgt
 6241 gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag
 6301 cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt
 6361 tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag
 6421 gcggtttgcg tattgggcgc tcttcgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggctg
 6481 ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacggta tccacagaat
 6541 caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta
 6601 aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa
 6661 atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc
 6721 cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt
 6781 ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt aggtatctca
 6841 gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc
 6901 accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtcaa cccgtaaga cagcattat
 6961 cgccactggc agcagocact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggoggtgcta
 7021 cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct
 7081 gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac
 7141 aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa
 7201 aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa
 7261 actcacgtta agggattttg gtcatagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt
 7321 taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca
 7381 gttaccaatg cttaatcagt gaggcacct tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca
 7441 tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc
 7501 ccagtgcctg aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa
 7561 accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc

7621 agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagtgc gccagttaat agtttgccga
 7681 acgttggtgc cattgctaca ggcacgtggt tgtcacgctc gtggtttggt atggcttcat
 7741 tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgacg ccccatgttg tgcaaaaaag
 7801 cggttagctc cttcggtcct ccgacgttgc tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac
 7861 tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt
 7921 ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt
 7981 gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc
 8041 tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat
 8101 ccagttcgat gtaaccactc cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca
 8161 gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgga
 8221 cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg
 8281 gttattgtct catgagcgga tacatatgtg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg
 8341 ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga
 8401 cattaacctc taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgcgt ttccgtgatg
 8461 acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg
 8521 atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg tgcggggct
 8581 ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaa
 8641 taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcacagggcg ccattcgcca ttcaggctgc
 8701 gcaactgttg ggaaggcgga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag
 8761 ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttccag tcacgacgtt
 8821 gtaaaacgac ggccagtgcc aagctg.

p526A_19BBZ (SEQ ID NO: 10)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcacgc tgcacgccga ttggtggaag taaggtggtg
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgcgcacg tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctgggttaga ccagatctga gcctggggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta
 301 agcctcaata aagcttgccg tgagtgcctc aagtagtgtg tgcccgctctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtagcg caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagctc agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt

721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccacacaa ggcaaagaga agagtgggtgc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcgc tcaatgacgc
 1141 tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagatttgg aatcacacga cctggatgga gtgggacaga gaaattaaca
 1441 attacacaag cttataacac tccttaattg aagaatcgca aaaccagcaa gaaaagaatg
 1501 aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagtttgtg gaattggttt aacataacaa
 1561 attggctgtg gtatataaaa ttattcataa tgatagtagg aggcttggtg ggtttaagaa
 1621 tagtttttgc tgtactttct atagtgaata gagttaggca gggatattca ccattatcgt
 1681 ttcagaccca cctcccaacc ccgaggggac ccgacaggcc cgaaggaata gaagaagaag
 1741 gtggagagag agacagagac agatccattc gattagtga cggatctcga cggtatcggg
 1801 taacttttaa aagaaaaggg gggattgggg ggtacagtgc aggggaaaga atagtagaca
 1861 taatagcaac agacatacaa actaaagaat tacaaaaaca aattacaaaa ttcaaaattt
 1921 tatcgatact agtggatctg cgatcgctcc ggtgcccgtc agtgggcaga gcgcacatcg
 1981 cccacagtcc ccgagaagtt ggggggaggg gtcggcaatt gaacgggtgc ctagagaagg
 2041 tggcgcgggg taaactggga aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt tccgagggt
 2101 gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg ttctttttcg caacgggttt
 2161 gccgccagaa cacagctgaa gcttcgaggg gctcgcctct ctcttcacg cggccgccgc
 2221 cctacctgag gccgccatcc acgccggttg agtcgcgttc tgccgcctcc cgctgtggt
 2281 gcctoctgaa ctgcgtccgc cgtctaggtg agtttaaagc tcaggtcgag accgggcctt
 2341 tgtccggcgc tcccttgag cctacctaga ctacgccgc tctccacgt ttgcctgacc
 2401 ctgcttgctc aactctacgt ctttgtttog ttttctgttc tgccgcgtta cagatccaag
 2461 ctgtgaccgg cgcctactct agagccgcca ccatggccct gcctgtgaca gctctgctgc
 2521 tgcccttggc cctgctgctc catgccgcca gaccgatat ccagatgacc cagaccacca
 2581 gcagcctgag cgccagcctg ggcatagag tgaccatcag ctgccgggcc agccaggaca
 2641 tcagcaagta cctgaactgg tatcagcaga aaccgacgg caccgtgaag ctgctgatct
 2701 accacaccag cagactgcac agcggcgtgc ccagcagatt ttctggcagc ggctccggca

2761 ccgactacag cctgaccatc tccaacctgg aacaggaaga tatcgctacc tactttctgtc
 2821 agcaaggcaa caccctgccc tacaccttog gcggaggcac caagctggaa atcacaggcg
 2881 gcggaggatc tggcggaggt ggaagtggcg gaggcggcag cgaagtgaaa ctgcaggaaa
 2941 gcggccctgg cctgggtggc ctttctcagt ctctgtccgt gacctgtacc gtgtccggcg
 3001 tgtccctgcc cgattatggc gtgtcctgga tccggcagcc tcccagaaag ggccctggaat
 3061 ggctggggcgt gatctggggc agcgagacaa cctactacaa cagcgccctg aagtcccggc
 3121 tgaccatcat caaggacaac tccaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga
 3181 ccgaogacac cgccatctac tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca
 3241 tggactactg gggccagggc accagcgtga ccgtgtctag cacaaccacc cctgcccta
 3301 gacctccac cccagcccca acaattgcca gccagcctct gtctctgcgg ccgaagctt
 3361 gtagacctgc tgccggcgga gccgtgcaca ccagaggact ggatttcgcc tgcgacatct
 3421 acatctgggc ccctctggcc ggcacatgtg gcgtgctgct cctcagcctg gtcacaccc
 3481 tgtactgcaa gcggggcaga aagaaactgc tctacatctt caagcagccc ttcatgcggc
 3541 ccgtgcagac cacacaggaa gaggacggct gtcctgcag attccccgag gaagaagaag
 3601 gcggctgcga gctgagagtg aagttcagca gatccgccga cggccctgcc taccagcagg
 3661 gacagaacca gctgtacaac gagctgaacc tgggcagacg ggaagagtac gacgtgctgg
 3721 acaagcggag aggcagagat cccgagatgg gcggcaagcc cagacggaag aatccccagg
 3781 aaggcctgta taacgaactg cagaaagaca agatggccga ggccctacagc gagatcggaa
 3841 tgaaggcgga gcggagaaga ggcaagggcc acgatggcct gtaccagggc ctgagcaccg
 3901 ccaccaagga cacctacgat gccctgcaca tgcaggccct gccaccaga gaattcgaag
 3961 gatccgcggc cgctgagggc agaggaagtc ttctaacatg cggtgacgtg gaggagaatc
 4021 ccggcccttc cggaatggag agcgacgaga gcggcctgcc cgccatggag atcgagtgcc
 4081 gcatcaccgg caccctgaac ggcgtggagt tcgagctggt gggcggcgga gagggcacc
 4141 ccaagcaggc ccgcatgacc aacaagatga agagcaccaa aggcgcccctg accttcagcc
 4201 cctacctgct gagccacgtg atgggctacg gcttctacca cttcggcacc taccacagc
 4261 gctacgagaa ccccttctg cagccatca acaacggcgg ctacaccaac acccgcatcg
 4321 agaagtacga ggacggcggc gtgctgcaog tgagcttcag ctaccgctac gaggcggcc
 4381 gcgtgatcgg cgacttcaag gtggtgggca ccggcttccc cgaggacagc gtgatcttca
 4441 ccgacaagat catccgcagc aacgccaccg tggagcacct gcaccccatg ggcgataacg
 4501 tgtgtgtggg cagcttcgcc cgcaccttca gcctgcgca cggcggctac tacagcttcg
 4561 tgggtggacag ccacatgcac ttcaagagcg ccatccacc cagcatcctg cagaacgggg
 4621 gccccatgtt cgcttccgc cgcgtggagg agctgcacag caacaccgag ctgggcatcg
 4681 tggagtacca gcacgocctt aagaccccca tcgccttcgc cagatccgc gotcagtcgt
 4741 ccaattctgc cgtggacggc accgccggac ccggctccac cggatctcgc tagagctgaa

4801 tctaagtcga caatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta
 4861 actatgttgc tccttttaag ctatgtgat acgtgtcttt aatgcctttg tatcatgcta
 4921 ttgcttcccg tatggctttc attttctcct ccttgtataa atcctgggtg ctgtctcttt
 4981 atgaggagtt gtggcccggt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgcaactgtg tttgtgacg
 5041 caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct cctttccggg actttcgctt
 5101 tccccctccc tattgccacg gcggaactca tcgccgcctg ccttgcccg cgtgtggacag
 5161 gggctcggct gttgggcact gacaattcog tgggtgtgtc ggggaaatca tgcctcttc
 5221 cttggctgct cgctgtgtt gccacctgga ttctgcgcg gacgtccttc tgcacgtcc
 5281 cttggccct caatccagcg gaccttcct cccgcggcct gctgccggct ctgcggcctc
 5341 ttccgcgtct tcgccttcgc cctcagacga gtcggatctc cctttgggcc gcctccccgc
 5401 ctggtacctt taagaccaat gacttacaag gcagctgtag atcttagcca ctttttaaaa
 5461 gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac tcccaacgaa aataagatct gctttttgct
 5521 tgtactgggt ctctctggtt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg ctaactaggg
 5581 aaccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt gtgtgccctg
 5641 ctgttgtgtg actctggtta ctagagatcc ctcagaccct tttagtcagt gtgaaaatc
 5701 tctagcagta gtagttcatg tcactttatt attcagtatt tataacttgc aaagaaatga
 5761 atatcagaga gtgagaggaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat
 5821 agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc
 5881 aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg ctctagctat cccgcccta actccgcca
 5941 gttccgcca ttctccgcc catggctgac taattttttt tatttatgca gaggcgagg
 6001 ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggcctagact
 6061 tttgcagaga cggcccaaat tcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt
 6121 atccgctcac aattccacac aacatacag cgggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg
 6181 cctaatgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg
 6241 gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc
 6301 gtattgggcg ctcttcgct tcctcgtcga ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc
 6361 ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata
 6421 acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg
 6481 cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcaciaa aatcgacgt
 6541 caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccttgaa
 6601 gctccctcgt gcgtctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgccttc
 6661 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgtg taggtatctc agttcgggtg
 6721 aggtogttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg
 6781 ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtgaa acacgactta tcgccactgg

6841 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct
 6901 tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgogctctgc
 6961 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg
 7021 ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac ggcagaaaa aaaggatctc
 7081 aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt
 7141 aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa
 7201 aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat
 7261 gcttaatcag tgaggcacct atctcagoga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct
 7321 gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc ccagtgctg
 7381 caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag
 7441 ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta
 7501 attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg
 7561 ccatttgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg
 7621 gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct
 7681 ccttcgggtcc tccgatogtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta
 7741 tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg
 7801 gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc
 7861 cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg
 7921 gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga
 7981 tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg
 8041 ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat
 8101 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc
 8161 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca
 8221 catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct
 8281 ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtctcgcgcg tttcgggtgat gacggtgaaa
 8341 acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga
 8401 gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg gtgtcggggc tggcttaact
 8461 atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa atacgcaca
 8521 gatgcgtaag gagaaaatac cgcacaggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt
 8581 gggaaggcg atcgggtcgg gcctcttcgc tattacgcca gctggcgaaa gggggatgtg
 8641 ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag ggttttccca gtcacgacgt tgtaaacga
 8701 cggccagtgc caagctg.

Конструкции TFP (TRuC)

p510_antiCD19_LL_TCRalpha (SEQ ID NO: 11)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcotta caaggagaga aaaagcacog tgcattgccga ttggtggaag taagggtgta
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgcogcat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc tgcagtcttc aagtagtggtg tgcccgctctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgagg ggcgcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggtt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcattcaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatattgagg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccaccaa ggcaagaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctcttg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaactcgaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgttg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggtgtgtg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtg gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcggt
 1681 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcgggt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttctact tggcagtaca
 1981 tctacgtatt agtcacgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtag atcaatgggc

2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggg gggagggtta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatcgcttgg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacaccca
 2341 gcattcctcc tgatcccaga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gagtacccat cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaa
 2461 tggatatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctaccatac atcaagatta
 2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtgga agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgac acttactttt gccaacaggg taatacgctt
 2641 ccgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc
 2701 aagcccgat ctggcgaggg atccaccaag ggcgagggtga aactgcagga gtcaggacct
 2761 ggcttgggtg cgccctcaca gagcctgtcc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 cccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa aggggtctgga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaaac cacatactat aattcagctc tcaaattccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagccattt actactgtgc caaacattat tactacgggtg gtagctatgc tatggactac
 3061 tggggtcagg gaacctcagt caccgtctcc tcagcggcgg caattgaagt tatgtatcct
 3121 cctccttacc taggtggcgg cggttctggt ggcggcgggt ctggtggcgg cggttctctc
 3181 gaggtgaatg gagagaatgt ggagcagcat ccttcaacct tgagtgtcca ggaggagac
 3241 agcgtgttta tcaagtgtac ttattcagac agtgcctcaa actacttccc ttggtataag
 3301 caagaacttg gaaaaagacc tcagcttatt atagacattc gttcaaagt gggcgaaaag
 3361 aaagaccaac gaattgctgt tacattgaac aagacagcca aacatttctc cctgcacatc
 3421 acagagaccc aacctgaaga ctcggtgtgc tacttctgtg cagcaagtag gaaggactct
 3481 gggggttacc agaaagtta ctttggaact ggaacaaagc tccaagtcac cccaaatatac
 3541 cagaaccctg accctgocgt gtaccagctg agagactcta aatccagtga caagtctgtc
 3601 tgctatttca ccgattttga ttctcaaaaca aatgtgtcac aaagtaagga ttctgatgtg
 3661 tatatcacag acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaagag caacagtgtc
 3721 gtggcctgga gcaacaaatc tgactttgca tgtgcaaagc ccttcaacaa cagcattatt
 3781 ccagaagaca ccttcttccc cagcccagaa agttcctgtg atgtcaagct ggtcgagaaa
 3841 agctttgaaa cagatacgaa cctaaacttt caaaacctgt cagtgattgg gttccgaatc
 3901 ctctctctga aagtggcggg gtttaatatg ctcatgacgc tgcggctgtg gtccagctga
 3961 taagaattcg atccgoggcc gcgaaggatc tgcgatcgtc ccggtgcccg tcagtgggca
 4021 gagcgcacat cgcccacagt ccccgagaag ttggggggag gggtcggcaa ttgaacgggt

4081 gcctagagaa ggtggcgcg ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt
 4141 tttcccgagg gtgggggaga accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt
 4201 cgcaacgggt ttgccgccag aacacagctg aagcttcgag gggctcgcat ctctccttca
 4261 cgcgcccggc gccctacctg aggccgccat ccacgccggt ttagtcgcgt tctgccgcct
 4321 ccgcctgtg gtgcctctg aactgcgtcc gccgtctagg taagttaaa gctcaggtcg
 4381 agaccgggccc tttgtccggc gctcccttgg agcctaccta gactcagccg gctctccacg
 4441 ctttgcctga ccctgcttgc tcaactctac gtctttgttt cgttttctgt tctgcccgt
 4501 tacagatcca agctgtgacc ggcgccctacg ctagatgacc gagtacaagc ccacgggtgcg
 4561 cctcgccacc cgcgacgacg tccccagggc cgtacgcacc ctcgccggcg cgttcgccga
 4621 ctaccccgcc acgcgccaca ccgtcgatcc ggaccgccac atcgagcggg tcaccgagct
 4681 gcaagaactc ttcctcacgc gcgtcgggct cgacatcggc aaggtgtggg tcgcggacga
 4741 cggcgccgcg gtggcggctt ggaccacgcc ggagagcgtc gaagcggggg cgggtgttcgc
 4801 cgagatcggc ccgcgcatgg ccgagttgag cggttcccg cttggccgcg agcaacagat
 4861 ggaaggcctc ctggcgccgc accggcccaa ggagcccgcg tggttcctgg ccaccgtcgg
 4921 cgtctcgccc gaccaccagg gcaagggtct gggcagcgcc gtcgtgctcc ccggagtgga
 4981 ggccggccgag cgcgcggggg tgcccgctt cctggagacc tccgcgccc gcaacctccc
 5041 cttctacgag cggctcggct tcaccgtcac cgccgacgtc gaggtgcccg aaggaccgcg
 5101 cacctggtgc atgaccgca agcccgggtc ctgagtcgac aatcaacctc tggattacaa
 5161 aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgc ctttttacgc tatgtggata
 5221 cgctgcttta atgccttct atcatgctat tgcttcccg atggctttca tttctcctc
 5281 cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta tgaggagttg tggcccgttg tcaggcaacg
 5341 tggcgtggtg tgcaactgtt ttgctgacgc aacccccact ggttggggca ttgccaccac
 5401 ctgtcagctc ctttcggga ctttcgctt cccctccct attgccacgg cggaactcat
 5461 cgcgcctgc cttgccgct gctggacagg ggctcggctg ttgggcaactg acaattccgt
 5521 ggtgttgtcg gggaaatcat cgtcctttcc ttggctgctc gcctgtgttg ccacctggat
 5581 tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc ttcgccctc aatccagcgg accttcctc
 5641 ccgcggcctg ctgcggctc tgcggcctt tccgctctt cgccttcgcc ctcagacgag
 5701 tcggatctcc ctttgggccc cctccccgcc tggtagcttt aagaccaatg acttacaagg
 5761 cagctgtaga tcttagccac ttttaaaaag aaaagggggg actggaaggg ctaattcact
 5821 cccaacgaaa ataagatctg ctttttgctt gtactgggtc tctctggta gaccagatct
 5881 gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct taagcctcaa taaagcttgc
 5941 cttgagtgct tcaagtagtg tgtgccgctc tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc
 6001 tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtag tagttcatgt catcttatta
 6061 ttcagtatct ataacttgca aagaaatgaa tatcagagag tgagaggaac ttgtttattg

6121 cagcattataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt
 6181 tttcaactgca ttctagttgt ggtttgtoca aactcatcaa tgtatcttat catgtctggc
 6241 tctagctatc ccgcccctaa ctccgcccag ttccgcccac tctccgcccc atggctgact
 6301 aatttttttt atttatgcag aggccgagga cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta
 6361 gtgaggaggc ttttttggag gcctagactt ttgcagagac ggcccaaatt cgtaatcatg
 6421 gtcatactgt tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacagagc
 6481 cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc
 6541 gttgogctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat
 6601 cggccaacgc gcggggagag gcggtttgog tattggggcg tcttccgctt cctcgctcac
 6661 tgactcgctg cgctcggctg ttccgctcg ggcagcggta tcagctcact caaaggcggg
 6721 aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca
 6781 gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc
 6841 ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact
 6901 ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct
 6961 gccgcttacc ggataacctgt ccgcttttct cccctcggga agcgtggcg tttctcatag
 7021 ctacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca
 7081 cgaaccccc gttcagcccg accgctcgcg cttatccggg aactatcgtc ttgagtcaa
 7141 ccggtaaga cagacttat cgcactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc
 7201 gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag
 7261 aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg
 7321 tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca
 7381 gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc
 7441 tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag
 7501 gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata
 7561 tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgt
 7621 ctgtctatct cgttcacca tagttgctg actccccgct gtgtagataa ctacgatacg
 7681 ggagggttta ccatctggcc ccagtctgca aatgataccg cgagaccac gctcaccggc
 7741 tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggtcctgc
 7801 aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccg gaagctagag taagtagttc
 7861 gccagttaat agtttgcga acgttggtgc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc
 7921 gtcgttttgt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc
 7981 ccccatgttg tgcaaaaaag cgttagctc cttcggtcct ccgacgttg tcagaagtaa
 8041 gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat
 8101 gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata

8161 gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtaata cgggataata ccgcgccaca
 8221 tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag
 8281 gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc
 8341 agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc
 8401 aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata
 8461 ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta
 8521 gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta
 8581 agaaaccatt attatcatga cattaacct aaaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg
 8641 tctcgcgcgt ttccgtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt
 8701 cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg
 8761 tgttggcggg tgcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt
 8821 gcaccatatg cgggtgtgaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcacagcg
 8881 ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaaggcgca tcggtgcggg cctcttcgct
 8941 attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg
 9001 gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgcc aagctg.

p510_antiCD19_LL_TCRalphaC (SEQ ID NO: 12)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcacgc tgcacgccga ttggtggaag taagggtgta
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgcgcgat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc ttagtgcttc aagtagtgtg tgcccgctctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agogggggag
 601 aattagatcg cgtgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcacaaaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatattgagg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtgc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag

1081 ctttgttcct tgggttcctg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacggtaca ggcagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgttg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcggt
 1681 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aacttttaaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttctact tggcagtaca
 1981 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatcgcttgg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca
 2341 gcattcctcc tgatccaga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gagtccatc cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaa
 2461 tggatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctaccatac atcaagatta
 2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgoc acttactttt gccaacaggg taatacgctt
 2641 cgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc
 2701 aagcccggat ctggcgaggg atccaccaag ggcgaggtga aactgcagga gtcaggacct
 2761 ggcttggttg cgccctcaca gagcctgtoc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 cccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa agggctctgga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaaac cacatactat aattcagctc tcaaatccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagtttcc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagocattt actactgtgc caaacattat tactacggtg gtagctatgc tatggactac
 3061 tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcggccg caattgaagt tatgtatcct

3121 cctccttacc taggtggcgg cggttctggt ggcggcgggt ctggtggcgg cggttctctc
 3181 gagccaaata tccagaaccc tgacctgcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt
 3241 gacaagtctg tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag
 3301 gattctgatg tgtatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag
 3361 agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaaa tctgactttg catgtgcaa cgccttcaac
 3421 aacagcatta ttccagaaga caccttcttc cccagcccag aaagttcctg tgatgtcaag
 3481 ctggtcgaga aaagctttga aacagatacg aacctaaact ttcaaacct gtcagtgatt
 3541 gggttccgaa tcctcctcct gaaagtggcc gggtttaatc tgctcatgac gctgcggctg
 3601 tggtcagct gataagaatt cgatccggc cgcgaagga tctgcgatc ctccgggtgc
 3661 cgtcagtggg cagagcgcac atcgcccaca gtccccgaga agttgggggg aggggtcggc
 3721 aattgaacgg gtgcctagag aaggtggcgc ggggtaaact gggaaagtga tgctgtgtac
 3781 tggctccgcc ttttcccgga ggggtgggga gaaccgtata taagtgcagt agtcgccgtg
 3841 aacgttcttt ttcgcaacgg gtttccgcc agaacacagc tgaagcttcg aggggctcgc
 3901 atctctcctt caccgccccg ccgccctacc tgaggccgcc atccacgcc gttgagtcgc
 3961 gttctgccgc ctccgcctg tggtccttc tgaactgcgt ccgccgtcta ggtaagttta
 4021 aagctcaggt cgagaccggg ctttgtccg gcgctccctt ggagcctacc tagactcagc
 4081 cggctctcca cgctttgcct gacctgtgt gctcaactct acgtctttgt ttcgttttct
 4141 gttctgcgcc gttacagatc caagctgtga ccggcgcccta cgctagatga ccgagtaaa
 4201 gccacagggt cgcctcgcca cccgcgacga cgtccccagg gccgtacgca cctcgcgcg
 4261 cgcgttcgcc gactaccccg ccacgcgcca caccgtgat ccggaccgcc acatcgagcg
 4321 ggtcaccgag ctgcaagaac tcttctcac gcgcgtcggg ctcgacatcg gcaaggtgtg
 4381 ggtcgcggac gacggcgccg cgggtggcgt ctggaccacg ccggagagcg tcgaagcggg
 4441 ggcggtgttc gccgagatcg gcccgcgcat ggccgagttg agcggttccc ggctggccgc
 4501 gcagcaacag atggaaggcc tcctggcgcc gcaccggccc aaggagccc cgtggttctt
 4561 ggccaccgtc ggctctcgc ccgaccacca gggcaagggt ctgggcagcg ccgtcgtgct
 4621 ccccgagtg gaggcggccg agcgcgccgg ggtgcccgc ttcttgaga cctcgcgcc
 4681 ccgaacctc cccttctacg agcggtcgtg cttaccgtc accgccgac togaggtgcc
 4741 cgaaggaccg cgcacctggt gcatgaccg caagcccgtt gcctgagtcg acaatcaacc
 4801 tctggattac aaaatttgt aaagattgac tggattctt aactatgtt ctcttttac
 4861 gctatgtgga tacgtgtgt taatgcctt gtatcatgt attgcttccc gtatggcttt
 4921 cattttctcc tccttgata aatcctggt gctgtctct tatgaggagt tgtggccgt
 4981 tgtcaggcaa cgtggcgtg tgtgcaactgt gtttgctgac gcaacccca ctggttggg
 5041 cattgccacc acctgtcagc tcctttccgg gactttcgt ttccccctc ctattgccac
 5101 ggcggaactc atcgccgct gccttgccg ctgctggaca ggggctcggc tgttgggcac

5161 tgacaattcc gtggtgttgt cggggaaatc atcgtccttt ccttggtgc tcgcctgtgt
 5221 tgccacctgg attctgogcg ggacgtcctt ctgctacgtc ccttcggccc tcaatccagc
 5281 ggaccttcct tcccgcggcc tgctgccggc tctgccgcct cttccgcgtc ttgccttcg
 5341 ccctcagacg agtcggatct ccccttgggc cgcctccccg cctggtacct ttaagaccaa
 5401 tgacttacaa ggcagctgta gatcttagcc actttttaaa agaaaagggg ggactggaag
 5461 ggctaattca ctcccaacga aaataagatc tgccttttgc ttgtactggg tctctctggt
 5521 tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaaccactg ctttagcctc
 5581 aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt gactcttgta
 5641 actagagatc cctcagaccc ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcagt agtagttcat
 5701 gtcactttat tattcagtat ttataacttg caaagaaatg aatatcagag agtgagagga
 5761 acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa
 5821 ataaagcatt tttttactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt
 5881 atcatgtctg gctctagcta tcccgcctt aactccgcc agttccgcc attctccgcc
 5941 ccatggctga ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct
 6001 attccagaag tagtgaggag gcttttttgg aggccctagc ttttgagag acggcccaaa
 6061 ttcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgtca caattccaca
 6121 caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagag tgagctaact
 6181 cacattaatt gcgttgogct cactgccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct
 6241 gcattaatga atcgccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttcgc
 6301 ttctcgtc actgactgc tgcgctcgtt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca
 6361 ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg
 6421 agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca
 6481 taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa
 6541 cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgogctctcc
 6601 tgttcgacc ctgccgtta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc
 6661 gctttctcat agctcagct gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct
 6721 gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg
 6781 tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag
 6841 gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggocctaacta
 6901 cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg
 6961 aaaaagagtt gtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt
 7021 tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt
 7081 ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt tggcatgag
 7141 attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat

7201 ctaaagtata tatgagtaaa cttggtotga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc
 7261 tatctcagcg atctgtotat ttctgtcacc catagttgcc tgactccccg togtgtagat
 7321 aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc
 7381 acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag
 7441 aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag
 7501 agtaagtagt tcgccagtta atagtttgog caacgttggt gccattgcta caggcatcgt
 7561 ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg
 7621 agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt
 7681 tgtcagaagt aagtggccg cagtgttacc actcatggtt atggcagcac tgcataattc
 7741 tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc
 7801 attctgagaa tagtgtatgc ggccagccag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa
 7861 taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt ctccggggcg
 7921 aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca ctctgtcacc
 7981 caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagcaa aaacaggaag
 8041 gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt
 8101 cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt
 8161 tgaatgtatt tagaaaaata acaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc
 8221 acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggogtatcac
 8281 gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcgggtg tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct
 8341 cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag ccgctcaggg
 8401 cgcgtcagcg ggtgttgccg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat
 8461 tgtactgaga gtgcaccata tgcgggtgta aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata
 8521 ccgcatcagg cgcattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgc
 8581 ggctctctcg ctattaogcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg
 8641 ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagt ccaagctg.

p510_antiCD19_LL_TCRbeta (SEQ ID NO: 13)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattccga ttggtggaag taaggtggta
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgccgcat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctgggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccaactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc ttagtgcttc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct

481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcagggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccacacaa ggcaaagaga agagtgggtgc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgcgtg
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgttg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcggt
 1681 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttctact tggcagtaca
 1981 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaa at gggcggtagg cgtgtacggt gggaggttta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatcgcttg agacgccatc cacgctgttt tgacctcat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacaccca
 2341 gcatttctcc tgatcccaga catccagatg acacagacta catcttccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gattcaccat cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaaat
 2461 tggatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctaccatac atcaagatta

2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgcc acttactttt gccaacaggg taatacgctt
 2641 ccgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc
 2701 aagcccggat ctggcgaggg atccaccaag ggcgaggtga aactgcagga gtcaggacct
 2761 ggcttggtgg cgccctcaca gagcctgtcc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 cccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa agggctctgga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaaac cacatactat aattcagctc tcaaattccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagccatth actactgtgc caaacattat tactacgggtg gtagctatgc tatggactac
 3061 tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcgggcg caattgaagt tatgtatcct
 3121 cctccttacc taggtggcgg cggttctggt ggcgggcggtt ctggtggcgg cggttctctc
 3181 gagctgggag caggcccagt ggattctgga gtcacacaaa ccccaaagca cctgatcaca
 3241 gcaactggac agcgagtgc gctgagatgc tcccctaggt ctggagacct ctctgtgtca
 3301 tgggtaccaac agagcctgga ccagggcctc cagttcctca ttcagtatta taatggagaa
 3361 gagagagcaa aaggaaacat tcttgaacga ttctccgcac aacagttccc tgacttgac
 3421 tctgaactaa acctgagctc tctggagctg ggggactcag ctttgtatth ctgtgccagc
 3481 agcccccgga caggcctgaa cactgaagct ttctttggac aaggcaccag actcacagtt
 3541 gtagaggacc tgaacaaggt gttcccaccc gagtgcgtg tgtttgagcc atcagaagca
 3601 gagatctccc acacccaaaa ggccacactg gtgtgcctgg ccacaggctt cttccccgac
 3661 cacgtggagc tgagctggtg ggtgaatggg aaggaggtgc acagtggggt cagcacggac
 3721 ccgcagcccc tcaaggagca gcccgccctc aatgactcca gatactgcct gagcagccgc
 3781 ctgagggtct cggccacctt ctggcagaac ccccgcaacc acttccgctg tcaagtccag
 3841 ttctacgggc tctcgagaa tgacgagtgg acccaggata gggccaaacc cgtcaccag
 3901 atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca gactgtggct ttacctcgtt gtctaccag
 3961 caaggggtcc tgtctgccac catcctctat gagatcctgc tagggaaggc caccctgtat
 4021 gctgtgctgg tcagcgccct tgtgttgatg gccatggtca agagaaagga tttctgataa
 4081 gaattcgatc cgcggccgcg aaggatctgc gatcgctcgg gtgcccgtca gtgggcagag
 4141 cgcacatcgc ccacagtccc cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aacgggtgcc
 4201 tagagaaggt ggcgcggggt aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt
 4261 cccgaggggtg ggggagaacc gtatataagt gcagtagtgc ccgtgaacgt tctttttcgc
 4321 aacgggtttg ccgccagaac acagctgaag cttcgagggg ctgcgcatctc tctttcacgc
 4381 gccgcgccgc ctacctgagg ccgccatcca cgccggttga gtcgcgttct gccgcctccc
 4441 gcctgtggtg cctcctgaac tgctccgoc gtctaggtaa gtttaaagct caggtcgaga
 4501 ccgggccttt gtccggcgct cccttgagc ctacctagac tcagccggct ctccacgctt

4561 tgccctgaccc tgcttgctca actctacgtc tttgtttcgt tttctgttct gcgcggttac
 4621 agatocaaagc tgtgaccggc gcctacgcta gatgaccgag tacaagccca cgggtgcgcct
 4681 cgccacccgc gacgacgtcc ccagggccgt acgcaccctc gccgccgcgt tcgccgacta
 4741 ccccgccacg cgccacaccg tcgatccgga ccgccacatc gagcgggtca ccgagctgca
 4801 agaactcttc ctacgcgcg tcgggctoga catcggaag gtgtgggtcg cggacgacgg
 4861 cgccgcggtg gcggtctgga ccacgccgga gagcgtcgaa gcgggggcgg tgttcgccga
 4921 gatcggcccg cgcattggccg agttgagcgg ttcccggtg gccgcgcagc aacagatgga
 4981 aggcctcctg gcgcgcgacc ggcccaagga gccgcgtgg ttcttgcca ccgtcggcgt
 5041 ctgcgccgac caccagggca agggctcggg cagcgcgctc gtgctccccg gattggaggc
 5101 ggccgagcgc gccggggtgc ccgccttctt ggagacctcc gcgccccgca acctcccctt
 5161 ctacgagcgg ctcggttca ccgtaccgc cgacgtcgag gtgcccgaag gaccgcgcac
 5221 ctggtgcatg acccgcaagc ccggtgcctg agtcgacaat caacctctg attacaaaat
 5281 ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct ttacgctat gtgatacgc
 5341 tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttccgctatg gctttcattt tctcctcctt
 5401 gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtg cccgttgtca ggcaacgtgg
 5461 cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac cccactggt tggggcattg ccaccacctg
 5521 tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc
 5581 cgctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg ggcactgaca attcgtggt
 5641 gttgtcgggg aaatcatcgt ctttccttg gctgctcgc tgtgttgcca cctggattct
 5701 gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc ttcttcccg
 5761 cggcctgctg ccggctctgc ggcccttcc gcgtcttcgc cttcgccctc agacgagtcg
 5821 gatctccctt tgggcgcct cccgcctgg tacctttaag accaatgact tacaaggcag
 5881 ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa aggggggact ggaagggcta attcactccc
 5941 aacgaaaata agatctgctt tttgcttgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag
 6001 cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgcctt
 6061 gattgcttca agtagtgtgt gccgctctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca
 6121 gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagtagtag ttcatgtcat cttattatc
 6181 agtatttata acttgcaaag aaatgaatat cagagagtga gaggaacttg tttattgcag
 6241 cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaataaa gcattttttt
 6301 cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggctct
 6361 agctatcccg cccctaactc cgccagttc cgccattct ccgccccatg gctgactaat
 6421 tttttttatt tatgcagagg ccgaggcgc ctcggcctct gagctattcc agaagtagtg
 6481 aggaggcttt tttggaggcc tagacttttg cagagacggc ccaaattcgt aatcatggtc
 6541 atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg

6601 aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt
 6661 gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg
 6721 ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga
 6781 ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatatca gctcactcaa aggcggtaat
 6841 acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca
 6901 aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc
 6961 tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata
 7021 aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc
 7081 gottaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc
 7141 acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga
 7201 accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc
 7261 ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag
 7321 gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag
 7381 gacagtatth ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag
 7441 ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca
 7501 gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga
 7561 cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat
 7621 cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga
 7681 gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag gcacctatct cagcgatctg
 7741 tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga
 7801 gggccttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc
 7861 agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtccgtgaac
 7921 tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc
 7981 agttaatagt ttgcgaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt caogctcgtc
 8041 gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc
 8101 catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt
 8161 ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc
 8221 atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg
 8281 tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag
 8341 cagaacttta aaagtgtca tcattgaaa acgttcttgc gggcgaaaac tctcaaggat
 8401 cttaccgctg ttgagatcca gttcgtatga acccactcgt gcaccaact gatcttcagc
 8461 atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa
 8521 aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aataactcata ctcttccttt ttcaatatta
 8581 ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa

8641 aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga
 8701 aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacaggc cctttcgtct
 8761 cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac
 8821 agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt
 8881 tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcacagag cagattgtac tgagagtga
 8941 ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca
 9001 ttccgatttc aggtcgcgca actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgtctatt
 9061 acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt
 9121 ttccagtcga cgacgttgta aaacgacggc cagtgcgaag ctg

p510_antiCD19_LL_TCRbetaC (SEQ ID NO: 14)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattgccga ttggtggaag taaggtggta
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgccgat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc ttagtgcttc aagtagtgtg tgcccgctctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaagggaa accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcattcaaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatattgagg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtg agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa

1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgtgg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgtgg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcggt
 1681 tcagaccacac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattog attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca
 1981 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatgcctgg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca
 2341 gcattcctcc tgatcccaga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gagtcccat cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaa
 2461 tggatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctaccatac atcaagatta
 2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgcc acttactttt gccaacaggg taatacgctt
 2641 ccgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc
 2701 aagcccggat ctggcgaggg atccaccaag ggcgaggtga aactgcagga gtcaggacct
 2761 ggcttggtgg cgcctcaca gagcctgtoc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 cccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa agggctctgga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaaac cacatactat aattcagctc tcaaattccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagccattt actactgtgc caaacattat tactacggtg gtagctatgc tatggactac
 3061 tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcggccg caattgaagt tatgtatcct
 3121 cctccttacc taggtggcgg cggttctggt ggcggcggtt ctggtggcgg cggttctctc
 3181 gaggaggacc tgaacaaggt gttcccaccc gaggtcgctg tgtttgagcc atcagaagca
 3241 gagatctccc acacccaaaa ggccacactg gtgtgcctgg ccacaggctt cttccccgac
 3301 cacgtggagc tgagctggtg ggtgaatggg aaggaggtgc acagtggggt cagcacagac
 3361 ccgcagcccc tcaaggagca gcccgccctc aatgactcca gatactgcct gagcagccgc
 3421 ctgagggtct cggccacctt ctggcagaac ccccgcaacc acttccgctg tcaagtccag

3481 ttctacgggc tctcggagaa tgacgagtgg acccaggata gggccaaacc cgtcaccag
 3541 atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca gactgtggct ttacctcggt gtocaccag
 3601 caaggggtcc tgtctgccac catcctctat gagatcctgc tagggaaggc caccctgtat
 3661 gctgtgctgg tcagcgccct tgtgttgatg gccatggcca agagaaagga tttctgataa
 3721 gaattcgatc cgcggccgcg aaggatctgc gatcgctccg gtgcccgtca gtgggcagag
 3781 cgcacatcgc ccacagtccc cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aacgggtgcc
 3841 tagagaaggt ggcgcggggt aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt
 3901 cccgagggtg ggggagaacc gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt ttttttcgc
 3961 aacgggtttg ccgccagaac acagctgaag cttcgagggg ctgcacatc tccttcacgc
 4021 gcccgcgccc ctacctgagg ccgccatcca cgcgggtga gtgcggttct gccgcctccc
 4081 gcctgtggtg cctcctgaac tgcgtccgcc gtctaggtaa gtttaaagct caggctcgaga
 4141 ccgggccttt gtccggcgct cccttgaggc ctacctagac tcagccggct ctccacgctt
 4201 tgcctgacct tgcttgctca actctacgtc tttgtttcgt tttctgttct gcgcccgtac
 4261 agatccaagc tgtgaccggc gcctacgcta gatgaccgag tacaagcca cgggtgcgct
 4321 cgccacccgc gacgacgtcc ccagggccgt acgcaccctc gccgcgcgt togccgacta
 4381 ccccgccacg cgccacaccg tcgatccgga ccgccacatc gagcgggtca ccgagctgca
 4441 agaactcttc ctacgcgcg tcgggctoga catcggcaag gtgtgggtcg cggacgacgg
 4501 cgccgcggtg gcggtctgga ccacgcgga gagcgtcgaa gcgggggcgg tgttcgccga
 4561 gatcggcccg cgcattggcg agttgagcgg ttcccggctg gccgcgcagc aacagatgga
 4621 aggcctcctg gcgcccgcac ggcccaagga gccgcgtgg ttccctggcca ccgtcggcgt
 4681 ctgcccgcac caccaggga agggtctggg cagcgcgctc gtgctccccg gaggggagc
 4741 ggccgagcgc gccggggtgc ccgccttctt ggagacctcc gcgccccgca acctcccctt
 4801 ctacgagcgg ctcggttca ccgtcaccgc cgacgtcgag gtgcccgaag gaccgcgcac
 4861 ctggtgcatg acccgcaagc ccggtgcctg agtcgacaat caacctctgg attacaaaat
 4921 ttgtgaaaga ttgactggtg ttcttaacta tgttgctcct ttacgctat gtggatacgc
 4981 tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttcccgatg gctttcattt tctcctcctt
 5041 gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg ccggttgcca ggcaacgtgg
 5101 cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac cccactggt tggggcattg ccaccacctg
 5161 tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc
 5221 cgctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg ggcactgaca attccgtggt
 5281 gttgtcgggg aatcatcgt cctttccttg gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct
 5341 gcgcgggacg tcctctgct acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc ttcttcccgc
 5401 cggcctgctg ccggtctgct ggccctcttc gcgtcttcgc cttcgccctc agacgagtcg
 5461 gatctccctt tgggcgcgct cccgcctgg tacctttaag accaatgact tacaaggcag

5521 ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa aggggggact ggaagggcta attcactccc
 5581 aacgaaaata agatctgctt tttgcttgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag
 5641 cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgcctt
 5701 gagtgcctca agtagtgtgt gcccgctctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca
 5761 gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagtagtag ttcatgtcat cttattattc
 5821 agtatttata acttgcaaag aaatgaatat cagagagtga gaggaacttg tttattgcag
 5881 cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt
 5941 cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggctct
 6001 agctatcccg cccctaactc cgcccagttc cgccattct cgcgccatg gctgactaat
 6061 tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctcgccctct gagctattcc agaagtagtg
 6121 aggaggcttt tttggaggcc tagacttttg cagagacggc ccaaattcgt aatcatggtc
 6181 atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg
 6241 aagcataaag tgtaaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt
 6301 gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg
 6361 ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga
 6421 ctgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat
 6481 acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca
 6541 aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc
 6601 tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata
 6661 aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc
 6721 gottaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc
 6781 acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga
 6841 accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc
 6901 ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag
 6961 gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag
 7021 gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag
 7081 ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgtt gcaagcagca
 7141 gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta cggggtctga
 7201 cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat
 7261 ctacacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga
 7321 gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag gcacctatct cagcgatctg
 7381 tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact cccgctcgtg tagataacta cgatacggga
 7441 gggottacca tctggoccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc
 7501 agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtctgcaac

7561 tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc
 7621 agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt caogctcgtc
 7681 gtttggtatg gcttcattca gtcocggttc ccaacgatca aggcgagta catgatcccc
 7741 catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt
 7801 ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc
 7861 atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg
 7921 tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cggcacatag
 7981 cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac totcaaggat
 8041 cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc
 8101 atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa
 8161 aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta
 8221 ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa
 8281 aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga
 8341 aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc ctttctgtct
 8401 cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccg agacggtcac
 8461 agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccg caggcgcggt cagcgggtgt
 8521 tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac tgagagtga
 8581 ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca
 8641 ttcgccattc aggtcgcga actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt
 8701 acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt
 8761 ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc cagtccaag ctg.

p510_antiCD19_LL_CD3gamma (SEQ ID NO: 15)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcacgc tgcatgccga ttggtggaag taagggtgta
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgcgcgat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct ogatacaata aacgggtctc
 241 tctgggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc ttagtgcttc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgagg ggcgcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt

721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccacacaa ggcaaagaga agagtgggtgc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgttg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt
 1681 tcagaccacac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca
 1981 totacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtag atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tocgcccat
 2161 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatcgcttg agacgccatc cagcgtgttt tgacctcat agaagattct
 2281 agagcgcga ccatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca
 2341 gcattcctcc tgatccaga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gagtacccat cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaa
 2461 tggatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctaccatac atcaagatta
 2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgcc acttactttt gccaacagg taatacgctt
 2641 ccgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc
 2701 aagcccgat ctggcgaggg atccaccaag ggcgaggtga aactgcagga gtcaggacct

2761 ggccctggtgg cgccctcaca gagcctgtcc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 ccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa agggctctgga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaaac cacatactat aattcagctc tcaaattccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagccattt actactgtgc caaacattat tactacggtg gtagctatgc tatggactac
 3061 tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcgcccg caattgaagt tatgtatcct
 3121 cctccttacc taggtggcgg cggttctggt ggcgggcggt ctggtggcgg cggttctctc
 3181 gagcagtcaa tcaaaggaaa ccacttggtt aagggtgatg actatcaaga agatggttcg
 3241 gtacttctga cttgtgatgc agaagccaaa aatatcacat ggtttaaaga tgggaagatg
 3301 atcggttcc taactgaaga taaaaaaaa tggaatctgg gaagtaatgc caaggacca
 3361 cgagggatgt atcagtgtaa aggatcacag aacaagtcaa aaccactcca agtgtattac
 3421 agaattgtgc agaactgcat tgaactaaat gcagccacca tatctggctt tctctttgct
 3481 gaaatcgtca gcattttcgt ccttctgtt ggggtctact tcattgctgg acaggatgga
 3541 gtccgccagt cgagagcttc agacaagcag actctgttgc ccaatgacca gctctaccag
 3601 cccctcaagg atcgagaaga tgaccagtac agccaccttc aaggaaacca gttgaggagg
 3661 aattgataag aattcgatcc gcggccgcga aggatctgcg atcgctccgg tgcccgtcag
 3721 tgggcagagc gcacatcgcc cacagtcccc gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga
 3781 acgggtgcct agagaaggtg gcgcggggta aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc
 3841 cgcccttttc ccgagggtgg gggagaaccg tatataagt cagtagtcgc cgtgaacgtt
 3901 ctttttcgca acgggtttgc cgccagaaca cagctgaagc ttcgaggggc tcgcatctct
 3961 ccttcacgcg ccgcccgcgc tacctgaggc cgccatccac gccggttag tcgcgttctg
 4021 ccgcctcccg cctgtggtgc ctctgaact gcgtccgcgc tctaggtgaa tttaaagctc
 4081 aggtcgagac cgggcctttg tccggcgctc ccttgagacc tacctagact cagccggctc
 4141 tccaogcttt gcctgaacct gcttgcctaa ctctacgtct ttgtttcgtt ttctgttctg
 4201 cgccgttaca gatccaagct gtgaccggcg cctacgctag atgaccgagt acaagccac
 4261 ggtgcgcctc gccaccgcgc acgacgtccc cagggccgta cgcaccctcg ccgcccgtt
 4321 cgccgactac cccgccacgc gccacaccgt cgatccggac cgccacatcg agogggtcac
 4381 cgagctgcaa gaactcttcc tcacgcgcgt cgggctcgac atcggcaagg tgtgggtcgc
 4441 ggacgacggc gccgcggtgg cgttctggac cacgccggag agcgtcgaag cgggggcggt
 4501 gtccgccgag atcggcccgc gcatggccga gttgagcgg tcccggttg ccgcgcagca
 4561 acagatggaa ggcctcctgg cgccgcaccg gcccaaggag cccgcgtggt tcttgccac
 4621 cgtggcgctc tcgcccgacc accagggcaa gggctctggc agcgcctcg tgctccccg
 4681 agtggaggcg gccgagcgcg ccgggtgoc cgcccttctg gagacctccg cgcgccgaa
 4741 cctccccctc tacgagcggc tcggcttcac cgtcaccgcc gacgtcgagg tgcccgaagg

4801 accgcgcacc tggatcatga cccgcaagcc cggatgcctga gtcgacaatc aacctctgga
 4861 ttacaaaatt tgtgaaagat tgactggat tcttaactat gttgctcctt ttacgctatg
 4921 tggatacgct gctttaatgc ctttgtatca tgctattgct tcccgatagg ctttcatttt
 4981 ctctccttg tataaatcct ggttgctgto tctttatgag gagttgtggc ccgttgctag
 5041 gcaacgtggc gtggtgtgca ctgtgtttgc tgacgcaacc cccactggtt ggggcattgc
 5101 caccacctgt cagctccttt ccgggacttt cgtttccccc ctccctattg ccacggcgga
 5161 actcatcgcc gcctgccttg cccgctgctg gacaggggct cggctgttgg gcactgacaa
 5221 ttccgtggtg ttgtcgggga aatcatcgto ctttccttgg ctgctcgctt gtgttgccac
 5281 ctggattctg cgcgggacgt ctttctgcta cgtcccttgc gccctcaatc cagcggacct
 5341 tccttccgcg ggctgctgc cggctctgcg gcctcttcgc cgtcttcgcc ttgcacctca
 5401 gacgagtcgg atctcccttt gggccgcctc cccgcctggt acctttaaga ccaatgactt
 5461 acaaggcagc ttagatctt agccactttt taaaagaaaa ggggggactg gaagggctaa
 5521 ttactccca acgaaaataa gatctgcttt ttgcttgta cgggtctctc tggtagacc
 5581 agatctgagc ctgggagctc tctgctaac tagggaaccc actgcttaag cctcaataaa
 5641 gcttgcttg agtgcttcaa gtagtgtgtg cccgtctgtt gtgtgactct ggtaactaga
 5701 gatccctcag acccttttag tcagtgtgga aaatctctag cagtagtagt tcatgtcatc
 5761 ttattattca gtattataa cttgcaaaga aatgaatato agagagttag aggaacttgt
 5821 ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaatttc acaataaag
 5881 catTTTTTt actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg
 5941 tctggctcta gctatccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc cggccatgg
 6001 ctgactaatt tttttatatt atgcagaggc cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca
 6061 gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct agacttttgc agagacggcc caaattcgtat
 6121 atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat
 6181 acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg gggatgcctaa tgagttagct aactcacatt
 6241 aattgcgttg cgtcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta
 6301 atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgtctt ccgcttcctc
 6361 gctcactgac tcgtcgctc cggctgttgc gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa
 6421 ggcggttaata cgttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa
 6481 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct
 6541 ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgac
 6601 aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctctgctgct ctctgtttcc
 6661 gacctgccc cttaccgat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc
 6721 tcatagctca cgtgttaggt atctcagttc ggtgtaggto gttcgtcca agctgggctg
 6781 tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga

6841 gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag
 6901 cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta actacggcta
 6961 cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag
 7021 agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgttg
 7081 caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac
 7141 ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggta tgagattatc
 7201 aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag
 7261 tatatatgag taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc
 7321 agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt tgccctgactc cccgtcgtgt agataactac
 7381 gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc
 7441 accggtcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg
 7501 tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag
 7561 tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc
 7621 acgctcgtcg tttggtatgg ctccattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac
 7681 atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag
 7741 aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata attctcttac
 7801 tgcattgcca tccgtaagat gctttctgt gactgggtgag tactcaacca agtcattctg
 7861 agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc
 7921 gccacatagc agaactttaa aagtgtcat catttgaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact
 7981 ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcatgtaa cccactcgtg caccacactg
 8041 atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa
 8101 tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt
 8161 tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcgataca tatttgaatg
 8221 tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga
 8281 cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc
 8341 ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccga
 8401 gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgctc
 8461 agcgggtggtt ggcggtgtc ggggctggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact
 8521 gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat
 8581 caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgccggcctc
 8641 ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac
 8701 gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgccaagc tg.

p510_antiCD19_LL_CD3delta (SEQ ID NO: 16)

1 acgctgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca

61 acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcctgccga ttggtggaag taagggtgta
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgccgcat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tcttggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccaactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc ttagtgcttc aagtagtggtg tgcccgctctg ttgtgtgact
 361 ctggttaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcggg ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggtt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaa
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatattgagg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtg agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacgttaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaactcgaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgtgg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgttg tatataaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt
 1681 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aacttttaaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ctttatggga ctttcctact tggcagtaca
 1981 totacgtatt agtcacogct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga

2101 gtttgttttg gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtaoagg gggaggttta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatcgctgg agacgccatc cagcgtgttt tgacctccat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgtttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacaccca
 2341 gcattcctcc tgatcccaga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gagtcccat cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaa
 2461 tggatatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctaccatac atcaagatta
 2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgcc acttactttt gccaacaggg taatacgctt
 2641 ccgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc
 2701 aagcccggat ctggcgaggg atccaccaag ggcgaggatg aactgcagga gtcaggacct
 2761 ggcttggtgg cgccctcaca gagcctgtcc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 cccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa agggctctgga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaaac cacatactat aattcagctc tcaaattccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagtttct ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagccattt actactgtgc caaacattat tactacgggtg gtagctatgc tatggactac
 3061 tggggatcaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcggccg caattgaagt tatgtatcct
 3121 cctccttacc tagtgggcgg cggttctggt ggcgggcgtt ctggtggcgg cggttctctc
 3181 gagttcaaga tacctataga ggaacttgag gacagagtgt ttgtgaattg caataccagc
 3241 atcacatggg tagagggaac ggtgggaaca ctgctctcag acattacaag actggacctg
 3301 ggaaaacgca tcctggaccc acgaggaata tataggtgta atgggacaga tatatacaag
 3361 gacaaagaat ctaccgtgca agttcattat cgaatgtgcc agagctgtgt ggagctggat
 3421 ccagccaccg tggtggcat cattgtcact gatgtcattg ccactctgct ccttgctttg
 3481 ggagtcttct gctttgctgg acatgagact ggaaggctgt ctggggctgc cgacacacaa
 3541 gctctgttga ggaatgacca ggtctatcag cccctccgag atcgagatga tgctcagtac
 3601 agccaccttg gaggaactg ggctcggaac aagtataag aattcgatcc gcggccgcca
 3661 aggatctgcg atcgctccg tgcccgtcag tgggcagagc gcacatcgcc cacagtcccc
 3721 gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga acgggtgcct agagaagggt gcgcggggta
 3781 aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc cgccttttct ccgagggtgg gggagaaccg
 3841 tatataagtg cagtagtcgc cgtgaacgtt ctttttcgca acgggtttgc cgccagaaca
 3901 cagctgaagc ttcgaggggc tcgcatctct ccttcacgag cccgcccgcg tacctgaggc
 3961 cgccatccac gccggttgag tcgcgttctg ccgcctcccg cctgtggtgc ctctgaact
 4021 gcgtccgccc tctaggtgag tttaaagctc aggtcgagac cgggcctttg tccggcgctc
 4081 ccttgagacc tacctagact cagccggctc tccacgcttt gcctgacctt gcttgctcaa

4141 ctctacgtct ttgtttcggt ttctgttctg cgccgttaca gatccaagct gtgaccggcg
 4201 cctacgctag atgaccgagt acaagccac ggtgcgcctc gccaccgcg acgacgtccc
 4261 cagggccgta cgcaccctcg ccgcccgtt cgccgactac cccgccacgc gccacaccgt
 4321 cgatccggac cgccacatcg agcgggtcac cgagctgcaa gaactcttcc tcacgcgcgt
 4381 cgggctcgac atcggaagg tgtgggtcgc ggacgacggc gccgcggtgg cggctctggac
 4441 caccgccgag agcgtogaag cggggcggt gttcgccgag atcgcccgcc gcattggccga
 4501 gttgagcggg tcccggctgg ccgcccagca acagatggaa ggctccttgg cggcgaccg
 4561 gcccaggag cccgcgtggt tcctggccac cgtcggcgtc tcgcccagcc accagggcaa
 4621 gggctctggc agcgcctcg tgctccccgg agtggaggcg gccgagcgcg ccgggggtgcc
 4681 cgcttctctg gagacctcgc cgccccgcaa cctccccctc tacgagcggc tcggcttcac
 4741 cgtcaccgcc gacgtcgagg tgccgaagg accgcgcacc tgggtcatga cccgaagcc
 4801 cgggtgcctga gtcgacaatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat tgactggtat
 4861 tottaactat gttgctcctt ttacgtatg tggatacgt gctttaatgc ctttgtatca
 4921 tgctattgct tcccgatagg ctttcatttt ctctccttg tataaatcct ggttgctgtc
 4981 tctttatgag gagggtggc ccgttgctag gcaacgtggc gtggtgtgca ctgtgtttgc
 5041 tgacgcaacc cccactggtt ggggcattgc caccacctgt cagctccttt ccgggacttt
 5101 cgctttcccc ctccctattg ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg cccgctgctg
 5161 gacaggggct cggctgttgg gcactgacaa ttccgtggtg ttgtcgggga aatcatcgtc
 5221 ctttcttgg ctgctgcct gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt ctttctgcta
 5281 cgtcccttcg gccctcaatc cagcggacct tccttccgc gccctgctgc cggctctgcg
 5341 gcctcttccg cgtcttcgcc ttccgctca gacgagtcgg atctcccttt gggccgcctc
 5401 cccgcctggt acctttaaga ccaatgactt acaaggcagc tgtagatctt agccactttt
 5461 taaaagaaaa ggggggactg gaagggttaa ttactccca acgaaaataa gatctgcttt
 5521 ttgcttgtag tgggtctctc tggtagaac agatctgagc ctgggagctc totggctaac
 5581 tagggaacc actgcttaag cctcaataaa gcttgccttg agtgcttcaa gtagtgtgtg
 5641 cccgtctgtt gtgtgactct ggtaactaga gatccctcag acccttttag tcagtgtgga
 5701 aaatctctag cagtagtagt tcatgtcatc ttattattca gtatttataa cttgcaaaga
 5761 aatgaatatc agagagttag aggaacttgt ttattgcagc ttataatgt tacaataaa
 5821 gcaatagcat cacaatttc acaataaag ctttttttc actgcattct agttgtggtt
 5881 tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggctcta gctatccgc cctaactcc
 5941 gccagttcc gccattctc cgcccatgg ctgactaatt tttttattt atgcagaggc
 6001 cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct
 6061 agacttttgc agagacggcc caaatctgta atcatggtca tagctgttcc ctgtgtgaaa
 6121 ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg

6181 ggggtgcctaa tgagtgaagt aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca
 6241 gtogggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg
 6301 tttgcgtatt gggcgccttt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg
 6361 gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg
 6421 ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa
 6481 ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc aaaaaaatcg
 6541 acgctcaagt cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc
 6601 tggaagctcc ctcgtgogct ctctgtttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc
 6661 ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc
 6721 ggtgtaggtc gttcgcctca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg
 6781 ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga gtccaaccgg gtaagacacg acttatcgcc
 6841 actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga
 6901 gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc
 6961 tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaa
 7021 caccgctggt agcgggtggt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg
 7081 atctcaagaa gatcctttga tctttctac ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc
 7141 acgttaaggg attttggta tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa
 7201 ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta
 7261 ccaatgctta atcagtggag cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt
 7321 tgctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag
 7381 tgctgcaatg atacgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca
 7441 gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgctt ccatccagtc
 7501 tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt
 7561 tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag
 7621 ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcgg
 7681 tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat
 7741 ggttatggca gcaactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt
 7801 gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc
 7861 ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat
 7921 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag
 7981 ttcgatgtaa cccactcgtg caccctaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt
 8041 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg
 8101 gaaatgttga ataactatc tcttctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta
 8161 ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaataaa taggggttcc

8221 ggcacacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt
 8281 aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg
 8341 tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc
 8401 cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt ggccgggtgtc ggggctggct
 8461 taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc
 8521 gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcac caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa
 8581 ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg
 8641 atgtgtgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tccagtcac gaogttgtaa
 8701 aacgacggcc agtgccaagc tg.

p510_antiCD19_LL_CD3epsilon (SEQ ID NO: 17)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattgccga ttggtggaag taaggtggta
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgccgcac tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctgggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc tgcagtcttc aagtagtgtg tgcccgctctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaagggaa accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagctc agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatattgagg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtg agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa

1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgtgg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgtgg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcggt
 1681 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattog attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ctttatggga ctttcctact tggcagtaca
 1981 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatgcctgg agacgccatc cagctgttt tgacctcat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca
 2341 gcattcctcc tgatcccaga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gagtcccat cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaa
 2461 tggatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctaccatac atcaagatta
 2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgcc acttactttt gccaacagg taatacgctt
 2641 ccgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc
 2701 aagcccgat ctggcgagg atccaccaag ggcgaggtga aactgcagga gtcaggacct
 2761 ggctgtgtg cgccctcaca gagcctgtoc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 cccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa agggctctga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaaac cacatactat aattcagctc tcaaatccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagccattt actactgtgc caaacattat tactacggtg gtagctatgc tatggactac
 3061 tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcgccg caattgaagt tatgtatcct
 3121 cctccttacc taggtggcgg cggttctggt ggcggcggtt ctggtggcgg cggttctctc
 3181 gaggatggt atgaagaaat ggtgtgtatt acacagacac catataaagt ctccatctct
 3241 ggaaccacag taatattgac atgccctcag tatcctggat ctgaaatact atggcaacac
 3301 aatgataaaa acataggcgg tgatgaggat gataaaaaca taggcagtga tgaggatcac
 3361 ctgtcactga aggaattttc agaattggag caaagtgggtt attatgtctg ctacccaga
 3421 ggaagcaaac cagaagatgc gaacttttat ctctacctga gggcaagagt gtgtgagaac

3481 tgcattgaga tggatgtgat gtcggtggcc acaattgtca tagtggacat ctgcatcact
 3541 gggggcttgc tgctgctggt ttactactgg agcaagaata gaaaggccaa ggccaagcct
 3601 gtgacacgag gagcgggtgc tggcggcagg caaaggggac aaaacaagga gaggccacca
 3661 cctgttccca acccagacta tgagcccato cggaaggcc agcgggacct gtattctggc
 3721 ctgaatcaga gacgcatctg ataagaattc gatccgcggc cggaaggat ctgcgatcgc
 3781 tccggtgccc gtcagtgggc agagcgcaca tcgcccacag tccccgagaa gttgggggga
 3841 ggggtcggca attgaacggg tgcctagaga aggtggcgcg gggtaaactg ggaaagtgat
 3901 gtctgttact ggctccgcct ttttcccgag ggtgggggag aaccgtatat aagtgcagta
 3961 gtccgctgta acgttctttt tcgcaacggg ttgcccga gaacacagct gaagcttcga
 4021 ggggctcgca tctctccttc acgcgcccgc cgccctacct gaggccgcca tccacgccgg
 4081 ttgagtcgcg ttctgcggc tcccgcctgt ggtgcctcct gaactgcgtc cgccgtctag
 4141 gtaagtttaa agctcaggtc gagaccgggc ctttgtccgg cgctcccttg gagcctacct
 4201 agactcagcc ggctctccac gctttgcctg accctgcttg ctcaactcta cgtctttgtt
 4261 tcgttttctg ttctgcggc ttacagatcc aagctgtgac cggcgccctac gctagatgac
 4321 cgagtacaag cccacgggtgc gcctcgccac ccgcgacgac gtccccaggg ccgtacgcac
 4381 cctcgccgcc gcgttcggc actacccgc cagcgccac accgtcgatc cggaccgcca
 4441 catcgagcgg gtcaccgagc tgcaagaact cttcctcacg cgcgtcgggc tcgacatcgg
 4501 caaggtgttg gtcgcgagc acggcgccgc ggtggcggtc tggaccacgc cggagagcgt
 4561 cgaagcgggg gcggtgttcg ccgagatcgg ccgcgcgatg gccgagttga gcggttccg
 4621 gctggccgcg cagcaacaga tggaaggcct cctggcgccg caccggccca aggagccgc
 4681 gtggttcttg gccaccgtcg gcgtctcgcc cgaccaccag ggcaagggtc tgggcagcgc
 4741 cgtcgtgctc cccggagtgg aggcggccga gcgcgcggg gtgcccgcct tcttgagac
 4801 ctccgcgcc cgcaacctcc ctttctacga gcggtcggc ttaccgtca ccgccgacgt
 4861 cgaggtgccc gaaggaccgc gcacctggtg catgaccgc aagccgggtg cctgagtcga
 4921 caatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta actatgttg
 4981 tctttttacg ctatgtgat acgtgcttt aatgccttg tatcatgcta ttgcttccg
 5041 tatggctttc attttctct cttgtataa atcctggttg ctgtctctt atgaggagtt
 5101 gtggcccggt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgactgtg ttgctgacg caacccccac
 5161 tggttggggc attgccacca cctgtcagct ctttccggg actttcgctt tccccctcc
 5221 tattgccacg gcggaactca tcgcccctg ctttggccg tgctggacag gggctcggct
 5281 gttgggcact gacaattccg tgggtgtgtc ggggaaatca tcgtcctttc cttggctgct
 5341 cgctgtgtt gccacctgga ttctgcggg gacgtccttc tgctacgtcc cttcgccct
 5401 caatocagcg gaccttctt cccgcggcct gctgccggt ctgcggcctc ttccgcgtct
 5461 tcgccttcgc cctcagacga gtcggatctc ctttggggc gcctccccgc ctggtacctt

5521 taagaccaat gacttacaag gcagctgtag atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg
 5581 gactggaagg gctaattcac tcccaacgaa aataagatct gctttttgct tgtactgggt
 5641 ctctctgggt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg ctaactaggg aaccactgc
 5701 ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt gtgtgcccgt ctgttgtgtg
 5761 actctggtaa ctagagatcc ctgagacct tttagtcagt gtggaaaatc tctagcagta
 5821 gtagttcatg tcatottatt attcagtatt tataacttgc aaagaaatga atatcagaga
 5881 gtgagaggaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia
 5941 atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca
 6001 atgtatctta tcatgtctgg ctctagctat cccgccccta actccgccc gttccgccc
 6061 ttctccgccc catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgctcggc
 6121 ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggcctagact tttgcagaga
 6181 cggcccaaat tcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac
 6241 aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgagt
 6301 gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc
 6361 gtgccagctg catlaaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg
 6421 ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg
 6481 atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa
 6541 gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc
 6601 gtttttccat aggtccgccc cccctgacga gcatcaciaa aatcgacgtc caagtcagag
 6661 gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgtt cccctggaa gtcctctgt
 6721 gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg
 6781 aagcgtggcg ctttctcata gctcacgtg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg
 6841 ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccg
 6901 taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac
 6961 tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgt acagagttct tgaagtgggt
 7021 gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt
 7081 taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg
 7141 tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc
 7201 tttgatcttt tctacggggt ctgacgtca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt
 7261 ggcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt
 7321 taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag
 7381 tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct gactccccgt
 7441 cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc ccagtgctg caatgatacc
 7501 gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc

7561 cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg
 7621 ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac
 7681 aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg
 7741 atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggctc
 7801 tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact
 7861 gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc
 7921 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat
 7981 acgggataat accgcgcac atagcagaac tttaaaagt ctcattcattg gaaaacgttc
 8041 ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac
 8101 tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa
 8161 aacaggaagg caaatgccg caaaaaagg aataaggcg acacggaaat gttgaatact
 8221 catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg
 8281 atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg
 8341 aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct ataaaaatag
 8401 gcgtatcacg aggccctttc gtctcgcgog tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca
 8461 catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc
 8521 ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg gtgtcggggc tggcttaact atgcggcatc
 8581 agagcagatt gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag
 8641 gagaaaatac cgcacagggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaaggcgg
 8701 atcgggtcgg gcctcttcgc tattacgcca gctggcgaaa ggggatgtg ctgcaaggcg
 8761 attaagttgg gtaacgccag ggttttccca gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtgc
 8821 caagctg.

p510_antiCD19_SL_CD3epsilon (SEQ ID NO: 18)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcaccc tgcatgccga ttggtggaag taaggtggtg
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgccgat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc ttagtgcttc aagtagtgtg tgcccgctctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg gcacaggcaa gaggcgagg ggcgcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agogggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt

661 aaaacatata gtatgggcaa gcagggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccacacaa ggcaaagaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttcct tgggttcctt ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacgttaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgttg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt
 1681 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca
 1981 tctacgtatt agtcacgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaa at gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatgcgctgg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca
 2341 gcattcctcc tgatcccaga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gagtcccat cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaa at
 2461 tggatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctaccatac atcaagatta
 2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgoc acttactttt gccaacaggg taatacgctt
 2641 ccgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc

2701 aagcccggat ctggcgaggg atccaccaag ggcgaggtga aactgcagga gtcaggacct
 2761 ggccctggtg cgccctcaca gagcctgtcc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 cccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa agggctctgga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaaac cacatactat aattcagctc tcaaattccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagccattt actactgtgc caaacattat tactacggtg gtagctatgc tatggactac
 3061 tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcggccg caggtggcgg cggttctggt
 3121 ggcggcgggt ctggtggcgg cggttctctc gaggatggta atgaagaaat ggggtgtatt
 3181 acacagacac catataaagt ctccatctct ggaaccacag taatattgac atgccctcag
 3241 tatcctggat ctgaaatact atggcaacac aatgataaaa acataggcgg tgatgaggat
 3301 gataaaaaca taggcagtga tgaggatcac ctgtcactga aggaattttc agaattggag
 3361 caaagtgggt attatgtctg ctaccccaga ggaagcaaac cagaagatgc gaacttttat
 3421 ctctacctga gggcaagagt gtgtgagaac tgcattggaga tggatgtgat gtcggtggcc
 3481 acaattgtca tagtggacat ctgcatcact gggggccttc tgctgctggt ttactactgg
 3541 agcaagaata gaaaggccaa ggccaagcct gtgacacgag gagcgggtgc tggcggcagg
 3601 caaaggggac aaaacaagga gaggccacca cctgttccca acccagacta tgagcccatc
 3661 cggaagggcc agcgggacct gtattctggc ctgaatcaga gacgcatctg ataagaattc
 3721 gatccgcggc cgcgaggat ctgcgatgc tccggtgccc gtcagtgggc agagcgcaca
 3781 tcgcccacag tcccgcagaa gttgggggga ggggtcggca attgaacggg tgcctagaga
 3841 aggtggcgcg gggtaaaact ggaaagtgat gtcgtgtact ggctccgcct ttttcccgag
 3901 ggtgggggag aaccgtatat aagtgcagta gtcgccgtga acgttctttt tcgcaacggg
 3961 tttgccgcca gaacacagct gaagcttoga ggggctcgca tctctccttc acgcgcccgc
 4021 cgccctacct gaggcgcgca tccacgcgg ttgagtcgag ttctgcccgc tccgcctgt
 4081 ggtgcctcct gaactgogtc cgccgtctag gtaagttaa agctcaggtc gagaccgggc
 4141 ctttgtccgg cgctcccttg gagcctacct agactcagcc ggctctccac gctttgcctg
 4201 accctgcttg ctcaactcta cgtctttgtt tcgttttctg ttctgcgccg ttacagatcc
 4261 aagctgtgac cgcgccctac gctagatgac cgagtacaag cccacggtgc gcctcgccac
 4321 ccgcgacgac gtccccaggg ccgtacgcac cctcgccgcc gcgttcgccc actacccgc
 4381 cacgcgccac accgtcgatc cggaccgcca catcgagcgg gtcaccgagc tgcaagaact
 4441 cttoctcacg cgcgctgggc tcgacatcgg caaggtgtgg gtcgcgagc acggcgccgc
 4501 ggtggcggtc tggaccacgc cggagagcgt cgaagcgggg gcggtgttcg ccgagatcgg
 4561 cccgcgcatg gccgagttga gcggttccg gctggccgag cagcaacaga tggaaggcct
 4621 cctggcgccg caccggocca aggagccgc gtggttctg gccaccgtcg gogtctcgcc
 4681 cgaccaccag ggcaagggtc tgggcagcgc cgtcgtgctc cccggagtgg aggcggccga

4741 gcgcgcggg gtgcccgcct tcctggagac ctccgcgccc cgcaacctcc ccttctacga
 4801 gcggctcggc ttcacogtca ccgccgacgt cgaggtgccc gaaggaccgc gcacctggtg
 4861 catgaccgcg aagcccgggtg cctgagtoga caatcaacct ctggattaca aaatttgtga
 4921 aagattgact ggtattotta actatgttgc tccttttacg ctatgtggat acgctgcttt
 4981 aatgcctttg tatcatgcta ttgcttccg tatggcttgc attttctcct ccttgataa
 5041 atcctgggtg ctgtctcttt atgaggagtt gtggcccgtt gtcaggcaac gtggcgtggt
 5101 gtgcactgtg tttgctgacg caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct
 5161 cctttccggg actttogctt tccccctccc tattgccacg gcggaactca togccgcctg
 5221 ccttgccgcg tgctggacag gggctcggct gttgggcact gacaattccg tgggtgtgtc
 5281 ggggaaatca tcgtcctttc cttggctgct cgcctgtgtt gccacctgga ttctgcgcgg
 5341 gacgtccttc tgctacgtcc cttcggccct caatccagcg gaccttcctt cccgcggcct
 5401 gctgccggct ctgcggcctc ttccgcgtct tcgccttcgc cctcagacga gtcggatctc
 5461 cctttgggcc gcctccccgc ctggtacctt taagaccaat gacttacaag gcagctgtag
 5521 atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac toccaacgaa
 5581 aataagatct gctttttgct tgtactgggt ctctctggtt agaccagatc tgagcctggg
 5641 agctctctgg ctaactaggg aaccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc
 5701 ttcaagtagt gtgtgcccgt ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctcagacct
 5761 tttagttagt gtggaaaatc tctagcagta gtagttcatg tcattcttatt attcagtatt
 5821 tataacttgc aaagaaatga atatcagaga gtgagaggaa cttgtttatt gcagcttata
 5881 atggttacia ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc
 5941 attctagttg tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcattgtctg ctctagctat
 6001 cccgccccta actccgcccga gttccgcccga ttctccgccc catggctgac taattttttt
 6061 tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg
 6121 ctttttttga ggcctagact tttgcagaga cggcccaaat tcgtaatcat ggtcatagct
 6181 gtttctgtg tgaattgtt atccgtcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat
 6241 aaagtgtaaa gcctggggtg cctaattgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc
 6301 actgcccgtt ttccagtgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa toggccaacg
 6361 cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggog ctcttcgct tcctcgtca ctgactcgt
 6421 gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgt atcagctcac tcaaaggcgg taatacgtt
 6481 atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc
 6541 caggaaccgt aaaaaggccg cgttgtggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga
 6601 gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata
 6661 ccaggcgctt ccccttgaa gctccctogt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac
 6721 cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg

6781 taggtatctc agttcgggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc
 6841 cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt ottgagtcca acccggttaag
 6901 acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt
 6961 aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt
 7021 atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg
 7081 atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac
 7141 gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc ttgatcttt tctacggggt ctgacgctca
 7201 gtggaacgaa aactcaogtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac
 7261 ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac
 7321 ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt
 7381 tcgttcattc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt
 7441 accatctggc cccagtgtcg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt
 7501 atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc
 7561 cgctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa
 7621 tagtttgccg aacgttggtt ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg
 7681 tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt
 7741 gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc
 7801 agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt
 7861 aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg
 7921 gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac
 7981 tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc
 8041 gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tctgtcaccc aactgatctt cagcatcttt
 8101 tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg
 8161 aataaggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag
 8221 catttatcag gttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa
 8281 acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat
 8341 tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcaog aggcctttc gtctcgcgcg
 8401 tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg
 8461 tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg
 8521 gtgtcggggc tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat
 8581 gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacagggc gccattcgcc
 8641 attcaggctg cgcaactgtt gggaaggcg atcggtcgg gcctcttcgc tattacgcc
 8701 gctggcgaag gggggatgtg ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag ggttttccca
 8761 gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtgc caagctg.

p510_antiCD19_SL_CD3gamma (SEQ ID NO: 19)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattgccga ttggtggaag taaggtggta
 121 cgatogtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgccgcat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctgggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc ttagtgcttc aagtagtgtg tgcccgctctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgcgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagctc agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatattgagg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtgc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttctc tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgtgg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt
 1681 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca

1981 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaa at gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatcgctg agacgccatc cagcgtgttt tgacctccat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgtttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacaccca
 2341 gcattcctcc tgatcccaga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gagtcaacct cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaa at
 2461 tggatatcagc agaaaccaga tggaaactgt aaactcctga tctaccatac atcaagatta
 2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgcc acttactttt gccaacaggg taatacgctt
 2641 ccgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc
 2701 aagcccggat ctggcgaggg atccaccaag ggcgaggtga aactgcagga gtcaggacct
 2761 ggctgtgtg cgccctcaca gagcctgtcc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 cccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa agggctctgga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaaac cacatactat aattcagctc tcaaattccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagccattt actactgtgc caaacattat tactacgggt gtagctatgc tatggactac
 3061 tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcgcccg caggtggcgg cggttctggt
 3121 ggcgggcgtt ctggtggcgg cggttctctc gagcagtcaa tcaaaggaaa ccacttggtt
 3181 aaggtgtatg actatcaaga agatggttcg gtacttctga cttgtgatgc agaagccaaa
 3241 aatatcacat ggtttaaaga tgggaagatg atcggcttcc taactgaaga taaaaaaaaa
 3301 tggaatctgg gaagtaatgc caaggacca cgagggatgt atcagtgtaa aggatcacag
 3361 aacaagtcaa aaccactcca agtgtattac agaattgtgc agaactgcat tgaactaaat
 3421 gcagccacca tatctggctt tctctttgct gaaatcgtca gcattttcgt ccttgctgtt
 3481 ggggtctact tcattgctgg acaggatgga gttcgccagt cgagagcttc agacaagcag
 3541 actctgttgc ccaatgacca gctctaccag cccctcaagg atcgagaaga tgaccagtac
 3601 agccaccttc aaggaaacca gttgaggagg aattgataag aattcgatcc gcggccgga
 3661 aggatctgcg atcgctccgg tgcccgctag tgggcagagc gcacatgcc cacagtcccc
 3721 gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga acgggtgcct agagaagggt gcgcggggta
 3781 aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc cgcccttttc ccgagggtgg gggagaaccg
 3841 tatataagtg cagtagtcgc cgtgaacgtt ctttttcgca acgggtttgc cgccagaaca
 3901 cagctgaagc ttcgaggggc tcgcatctct ccttcacgcg cccgccgccc taactgaggc
 3961 cgccatccac gccggttgag tcgcgttctg ccgcctcccg cctgtggtgc ctctgaact

4021 gcgtccgccg tctaggtaag tttaaagctc aggtcgagac cgggcctttg tccggcgctc
 4081 ccttgagacc tacctagact cagccggctc tccacgcttt gcctgaccct gcttgctcaa
 4141 ctctacgtct ttgtttcggt ttctgttctg cgccgttaca gatccaagct gtgaccggcg
 4201 cctacgctag atgaccgagt acaagccac ggtgcgcctc gccaccgcg acgacgtccc
 4261 cagggccgta cgcaccctcg ccgcccggtt cgccgactac cccgccacgc gccacaccgt
 4321 cgatccggac cgccacatcg agcgggtcac cgagctgcaa gaactcttcc tcacgcgcgt
 4381 cgggctcgac atcggaagg tgtgggtgc ggacgacggc gccgcggtgg cggctctggac
 4441 cagccggag agcgtogaag cggggcggt gtctgcgag atcgcccgcc gcattggcca
 4501 gttgagcggg tcccggctgg ccgcccagca acagatggaa ggctctctgg cggccgaccg
 4561 gccaaggag cccgcgtggt tcctggccac cgtcggcgctc tcgcccagacc accagggcaa
 4621 gggctctggc agcgcgctcg tgctccccgg agtggaggcg gccgagcgcg cgggggtgcc
 4681 cgcttctctg gagacctccg cggcccgcaa cctccccctc tacgagcgcg tcggcttcac
 4741 cgtcaccgcc gacgtcgagg tgccgaagg accgcgcacc tgggtgatga cccgaagcc
 4801 cgggtgcctga gtcgacaatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat tgactggtat
 4861 tottaactat gttgctcctt ttacgtatg tggatacgt gctttaatgc ctttgtatca
 4921 tgctattgct tcccgatagg ctttcatttt ctctccttg tataaatcct ggttgctgtc
 4981 totttatgag gattgtggc ccgttgtcag gcaacgtggc gtggtgtgca ctgtgtttgc
 5041 tgacgaacc cccactggtt ggggcattgc caccacctgt cagctccttt ccgggacttt
 5101 cgctttcccc ctccctattg ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg ccgctgctg
 5161 gacaggggct cggctgttgg gcaactgaca ttccgtggtg ttgtcgggga aatcatcgtc
 5221 ctttcttgg ctgctgcct gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt ccttctgcta
 5281 cgtcccttcg gccctcaatc cagcggacct tccttccgc ggctgctgc cggctctgcg
 5341 gcctcttcg cgtcttcgcc ttccgctca gacgagtcgg atctcccttt gggccgcctc
 5401 cccgcctggt acctttaaga ccaatgactt acaaggcagc tgtagatctt agccactttt
 5461 taaaagaaaa ggggggactg gaagggctaa ttactccca acgaaaataa gatctgcttt
 5521 ttgcttgtag tgggtctctc tggtagacc agatctgagc ctgggagctc tctggctaac
 5581 tagggaacc actgcttaag cctcaataaa gcttgccctg agtgcttcaa gtagtgtgtg
 5641 cccgtctgtt gtgtgactct ggtaactaga gatccctcag acccttttag tcagtgtgga
 5701 aaatctctag cagtagtagt tcatgtcatc ttattattca gtatttataa cttgcaaaga
 5761 aatgaatatc agagagttag aggaacttgt ttattgcagc ttataatgt tacaataaa
 5821 gcaatagcat cacaaatttc acaataaag ctttttttc actgcattct agttgtggtt
 5881 tgtcaaaact catcaatgta tcttatcatg tctggctcta gctatccgc cctaactcc
 5941 gccagttcc gccattctc cgcccatgg ctgactaatt tttttattt atgcagaggc
 6001 cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct

6061 agacttttgc agagacggcc caaatctgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa
 6121 ttgttatccg ctcaaatc cacaacaat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg
 6181 ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca
 6241 gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg
 6301 tttgcgtatt gggcgtctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg
 6361 gctgcggcga gcgttatcag ctactcaaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg
 6421 ggataacgca gaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa
 6481 ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg
 6541 acgtcaagt cagaggtagc gaaaccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc
 6601 tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc
 6661 ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc
 6721 ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg
 6781 ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc
 6841 actggcagca gccactggtg acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga
 6901 gttcttgaag tggtagccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc
 6961 tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac
 7021 caccgctggg agcgggtggt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg
 7081 atctcaagaa gatcctttga tctttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc
 7141 acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa
 7201 ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta
 7261 ccaatgctta atcagttagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt
 7321 tgccctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag
 7381 tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca
 7441 gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc
 7501 tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt
 7561 tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag
 7621 ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg
 7681 tagctccttc ggtcctccga tcgttgcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat
 7741 gggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt
 7801 gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc
 7861 ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat
 7921 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag
 7981 ttcatgtaa cccactogtg caccgaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt
 8041 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg

8101 gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta
 8161 ttgtotcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc
 8221 gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt
 8281 aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg
 8341 tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc
 8401 cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt ggccgggtgtc ggggctggct
 8461 taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc
 8521 gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcac caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa
 8581 ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttgcctatta cgcagctgg cgaaaggggg
 8641 atgtgtgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tccagtcac gacgttgtaa
 8701 aacgacggcc agtccaagc tg.

p510_antiCD19_SL_CD3delta (SEQ ID NO: 20)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattccga ttggtggaag taagggtgta
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgccgcac tgacagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctgggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgcctta
 301 agcctcaata aagcttgccct tgagtgtctc aagtagtgtg tgcccgctctg ttgtgtgact
 361 ctggttaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaagggaa accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagctc agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcattcaaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatattgagg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacgttaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgcgtg
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg

1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgttg aatttggttta acataacaaa
 1561 ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gttaaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcggt
 1681 tcagaccacac ctccaacccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattog attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca
 1981 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcaccaaatt caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaaatt gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtta tataagcaga gtcgttttag
 2221 tgaaccgtca gatcgcttg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca
 2341 gcatttctcc tgatccaga catccagatg acacagacta catctccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gagtcccat cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaa
 2461 tggatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctaccatac atcaagatta
 2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgcc acttactttt gccaacagg taatacgctt
 2641 ccgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc
 2701 aagcccggat ctggcgaggg atccaccaag ggcgaggtga aactgcagga gtcaggacct
 2761 ggcttggttg cgcctcaca gagcctgtcc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 cccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa agggctctgga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaaac cacatactat aattcagctc tcaaatccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagccattt actactgtgc caaacattat tactacggtg gtagctatgc tatggactac
 3061 tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcggccg caggtggcgg cggttctggt
 3121 ggcggcggtt ctggtggcgg cggttctctc gagttcaaga tacctataga ggaacttgag
 3181 gacagagtgt ttgtgaattg caataccagc atcacatggg tagagggaac ggtgggaaca
 3241 ctgctctcag acattacaag actggacctg ggaaaacgca tcctggaccc acgaggaata
 3301 tataggtgta atgggacaga tatatacaag gacaaagaat ctaccgtgca agttcattat

3361 cgaatgtgcc agagctgtgt ggagctggat ccagccaccg tggctggcat cattgtcact
 3421 gatgtcattg ccactctgct ccttgctttg ggagtcttct gctttgctgg acatgagact
 3481 ggaaggctgt ctggggctgc cgacacacaa gctctgttga ggaatgacca ggtctatcag
 3541 cccctccgag atcgagatga tgctcagtac agccaccctg gaggaactg ggctcggaac
 3601 aagtataag aattcgatcc gcggccgcga aggatctgcg atcgctccgg tgcccgtcag
 3661 tgggcagagc gcacatogcc cacagtcccc gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga
 3721 acgggtgcct agagaaggtg gcgcggggta aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc
 3781 cgcccttttc ccgagggtgg gggagaacog tatataagtg cagtagtcgc cgtgaacgtt
 3841 ctttttcgca acgggtttgc cgccagaaca cagctgaagc ttcgaggggc tcgcatctct
 3901 ccttcacgcg cccgccgccc tacctgaggc cgccatccac gccggttag tgcggttctg
 3961 ccgcctcccg cctgtggtgc ctctgaact gcgtccgcg tctaggtag tttaaagctc
 4021 aggtcgagac cgggcctttg tccggcgctc ccttgagacc tacctagact cagccggctc
 4081 tccacgcttt gcctgaccct gcttgcctaa ctctacgtct ttgtttcgtt ttctgttctg
 4141 cgccgttaca gatccaagct gtgaccggcg cctacgctag atgaccgagt acaagccac
 4201 ggtgcgcctc gccaccgcg acgacgtccc cagggccgta cgcaccctcg ccgccgcgtt
 4261 cgccgactac cccgccacgc gccacaccgt cgatccggac cgccacatcg agcgggtcac
 4321 cgagctgcaa gaactcttcc tcacgcgcgt cgggctcgac atcggcaagg tgtgggtcgc
 4381 ggacgacggc gccgcgggtg cggctctggac cagccggag agcgtcgaag cgggggcgggt
 4441 gttcgccgag atcggcccg gcctggccga gttgagcgg tcccggtg cgcgcagca
 4501 acagatggaa ggcctcctgg cgccgcaccg gcccaggag cccgcgtggt tcctggccac
 4561 cgtcggcgctc tcgcccgaac accagggcaa gggctctggc agcgcgtcg tgctccccgg
 4621 agtggaggcg gccgagcgc cgggggtgcc cgccttcctg gagacctcg cgcgccgcaa
 4681 cctccccttc tacgagcggc tcggcttcac cgtcaccgcc gacgtcgagg tgcccgaagg
 4741 accgogcacc tggatcatga cccgcaagcc cgggtgcctga gtcgacaatc aacctctgga
 4801 ttacaaaatt tgtgaaagat tgactgggat tcttaactat gttgctcctt ttacgctatg
 4861 tggatacgct gctttaatgc ctttgtatca tgctattgct tccgctatgg ctttcatttt
 4921 ctctccttg tataaatcct ggttgcgtgc tctttatgag gattgtggc ccgttgtcag
 4981 gcaacgtggc gtggtgtgca ctgtgtttgc tgacgcaacc cccactggtt ggggcattgc
 5041 caccacctgt cagctccttt ccgggacttt cgctttcccc ctccctattg ccacggcgga
 5101 actcatcgcc gcctgccttg cccgctgctg gacaggggt cggctgttgg gcaactgaaa
 5161 ttccgtggtg ttgtcgggga aatcatcgtc ctttccttgg ctgctcgct gtgttgccac
 5221 ctggattctg cgcgggacgt cttctgcta cgtccctcg gccctcaatc cagcggacct
 5281 tccttccgc gccctgctgc cggctctgog gcctcttccg cgtcttcgcc ttgcctca
 5341 gacgagtcgg atctcccttt gggccgcctc cccgcctggt acctttaaga ccaatgactt

5401 acaaggcagc ttagatctt agccactttt taaaagaaaa ggggggactg gaagggctaa
 5461 ttactccca acgaaaataa gatctgctt ttgcttgtag tgggtctctc tggtagacc
 5521 agatctgagc ctgggagctc tctggctaac tagggaaccc actgcttaag cctcaataaa
 5581 gcttgccctg agtgcttcaa gtagtggtg cccgtctgtt gtgtgactct ggtaactaga
 5641 gatccctcag acccttttag tcagtgtgga aaatctctag cagtagtagt tcatgtcatc
 5701 ttattattca gtatttataa cttgcaaaga aatgaatata agagagttag aggaacttgt
 5761 ttattgcagc ttataatggt taaaaataaa gcaatagcat caaaaatttc aaaaataaag
 5821 catTTTTTt actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tottatcatg
 5881 tctggctcta gctatccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc cggccatgg
 5941 ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca
 6001 gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct agacttttgc agagacggcc caaattcgta
 6061 atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat
 6121 acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt
 6181 aattgcgttg cgctactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta
 6241 atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttctc
 6301 gctactgac tcgtgcgct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa
 6361 ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa
 6421 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct
 6481 ccgccccct gacgagcatc aaaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgac
 6541 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc
 6601 gaccctgcc cttaccgat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc
 6661 tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg
 6721 tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga
 6781 gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag
 6841 cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta actacggcta
 6901 cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag
 6961 agttggtagc tcttgatccg gaaacaaaac caccgctggt agcgggtggt ttttgtttg
 7021 caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatccttga tctttctac
 7081 ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggta tgagattatc
 7141 aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa ttaaaatga agttttaat caatctaaag
 7201 tatatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta atcagtagg cacctatctc
 7261 agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac
 7321 gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc
 7381 accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg

7441 tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag
 7501 tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca togtggtgtc
 7561 acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac
 7621 atgatccccc atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga togttgtcag
 7681 aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata attctcttac
 7741 tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg
 7801 agaatagtgt atcgggcgac cgagttgtct ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc
 7861 gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggogaaaact
 7921 ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcatgtaa cccactcgtg caccacactg
 7981 atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa
 8041 tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttctttt
 8101 tcaatattat tgaagcattt atcaggggta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg
 8161 tatttagaaa aataaataa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga
 8221 cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc
 8281 ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccga
 8341 gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgctc
 8401 agcgggtgtt ggcggtgtc ggggctggct taactatgag gcacagagc agattgtact
 8461 gagagtgcac catatgcggg gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat
 8521 caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc
 8581 ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac
 8641 gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgccaagc tg.

p510_antiCD19_SL_TCRbeta (SEQ ID NO: 21)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcacgg tgcatgccga ttggtggaag taagggtgta
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgcgcat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct ogatacaata aacgggtctc
 241 tctgggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc ttagtgcttc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaagggaa accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagcgt agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt

721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccacacaa ggcaaagaga agagtgggtgc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttcct tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgttg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt
 1681 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca
 1981 totacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtag atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tocgcccat
 2161 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggttta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatcgcttg agacgccatc cagcgtgttt tgacctcat agaagattct
 2281 agagcgcca ccatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca
 2341 gcattcctcc tgatccaga catccagatg acacagacta catcctccct gtctgcctct
 2401 ctgggagaca gagtcccat cagttgcagg gcaagtcagg acattagtaa atatttaa
 2461 tggatcagc agaaaccaga tggaactgtt aaactcctga tctaccatac atcaagatta
 2521 cactcaggag tcccatcaag gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc
 2581 attagcaacc tggagcaaga agatattgcc acttactttt gccaacagg taatacgctt
 2641 ccgtacacgt tcggaggggg gactaagttg gaaataacag gctccacctc tggatccggc
 2701 aagcccgat ctggcgaggg atccaccaag ggcgaggtga aactgcagga gtcaggacct

2761 ggccctggtgg cgccctcaca gaggctgtcc gtcacatgca ctgtctcagg ggtctcatta
 2821 ccgactatg gtgtaagctg gattcgccag cctccacgaa agggctctgga gtggctggga
 2881 gtaatatggg gtagtgaaac cacatactat aattcagctc tcaaattccag actgaccatc
 2941 atcaaggaca actccaagag ccaagttttc ttaaaaatga acagtctgca aactgatgac
 3001 acagccattt actactgtgc caaacattat tactacgggtg gtagctatgc tatggactac
 3061 tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcggccg cagggtggcg cggttctggt
 3121 ggcgggcggtt ctggtgggcg cggttctctc gagctgggag caggcccagt ggattctgga
 3181 gtcacacaaa ccccaaagca cctgatcaca gcaactggac agcgagtgc gotgagatgc
 3241 tcccctaggt ctggagacct ctctgtgtca tggtagcaac agagcctgga ccagggcctc
 3301 cagttcctca ttcagtatta taatggagaa gagagagcaa aaggaaacat tcttgaacga
 3361 ttctccgcac aacagttccc tgacttgca tctgaactaa acctgagctc tctggagctg
 3421 ggggactcag ctttgtatct ctgtgccagc agcccccgga caggcctgaa cactgaagct
 3481 ttctttggac aaggcaccag actcacagtt gtagaggacc tgaacaaggt gttcccaccc
 3541 gaggtcgctg tgtttgagcc atcagaagca gagatctccc acacccaaaa ggccacactg
 3601 gtgtgcctgg ccacaggctt cttccccgac cacgtggagc tgagctggtg ggtgaatggg
 3661 aaggaggtgc acagtggggt cagcacggac ccgcagcccc tcaaggagca gcccgccctc
 3721 aatgactcca gatactgcct gagcagccgc ctgagggtct cggccacctt ctggcagaac
 3781 ccccgcaacc acttcgcctg tcaagtccag ttctacgggc tctcgagaa tgacgagtgg
 3841 acccaggata gggccaaacc cgtcaccag atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca
 3901 gactgtggct ttacctgggt gtccaccag caaggggtcc tgtctgccac catcctctat
 3961 gagatcctgc tagggaaggc caccctgtat gctgtgctgg tcagcgccct tgtgttgatg
 4021 gccatggtca agagaaagga tttctgataa gaattcgatc cgcggccgcg aaggatctgc
 4081 gatcgctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc ccacagtccc cgagaagttg
 4141 gggggagggg tcggcaattg aacgggtgoc tagagaaggt ggcggggggt aaactgggaa
 4201 agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt cccgagggtg ggggagaacc gtatataagt
 4261 gcagtagtcg ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg ccgccagaac acagctgaag
 4321 cttagagggg ctgcgctctc tctttcacgc gcccgccgcc ctacctgagg ccgccatcca
 4381 cgccggttga gtgcggttct gccgcctccc gcctgtggtg cctcctgaac tgcgtccgcc
 4441 gtctaggtaa gtttaaagct caggctcgaga ccgggccttt gtccggcgct cccttgagc
 4501 ctacctagac tcagccggct ctccacgctt tgcctgacct tgcttgctca actctacgtc
 4561 tttgtttcgt tttctgttct gcgccgttac agatccaagc tgtgaccggc gcctacgcta
 4621 gatgaccgag tacaagccca cgggtgcgct cgccaccgcg gacgacgtcc ccagggccgt
 4681 acgcaccctc gccgcgcgct tcgccgacta ccccgccacg cgccacaccg togatccgga
 4741 ccgccacatc gagcgggtca ccgagctgca agaactcttc ctcacgcgcg tcgggctcga

4801 catcggcaag gtgtgggtcg cggacgacgg cgccgcggtg gcggtctgga ccacgccgga
 4861 gagcgtcgaa gcggggggcg tgttcgccga gatcgggccg cgcattggccg agttgagcgg
 4921 ttcccggtcg gccgcgcagc aacagatgga aggcctcctg gcgccgcacc ggcccaagga
 4981 gcccgcggtg ttccctggcca ccgtcggcgt ctgccccgac caccagggca agggctctggg
 5041 cagcgccgtc gtgtccccc gagtggaggc ggccgagcgc gccggggtgc ccgccttcct
 5101 ggagacctcc gcgccccgca acctccctt ctacgagcgg ctgggcttca ccgtcaccgc
 5161 cgacgtcgag gtgccgaag gaccgcgcac ctggtgcatg acccgcaagc ccggtgcctg
 5221 agtogacaat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta
 5281 tgttgctcct tttaacctat gtggatacgc tgccttaatg cctttgtatc atgctattgc
 5341 ttcccgatcg gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc tgggtgctgt ctctttatga
 5401 ggagttgttg cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac
 5461 cccactggt tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc
 5521 cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgctgct ggacaggggc
 5581 tcggctgttg ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg aaatcatcgt cctttccttg
 5641 gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc
 5701 ggccctcaat ccagcggacc ttccctcccg cggcctgctg ccggctctgc ggccctcttc
 5761 gcgtcttcgc cttcgccctc agacgagtcg gatctccctt tgggcccctt ccccgctgg
 5821 tacctttaag accaatgact tacaaggcag ctgtagatct tagccacttt taaaagaaa
 5881 aggggggact ggaagggcta attcactccc aacgaaaata agatctgctt ttgtcttgta
 5941 ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc
 6001 cactgcttaa gcctcaataa agcttgccct gagtgcttca agtagtgtgt gcccgctctg
 6061 tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gacctttta gtcagtgtgg aaaatctcta
 6121 gcagtagtag ttcatgtcat cttattattc agtatttata acttgcaaag aaatgaatat
 6181 cagagagtga gaggaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca
 6241 tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac
 6301 tcatcaatgt atcttatcat gtctggctct agctatcccg cccctaactc cggccagttc
 6361 cgccattct ccgcccattg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc
 6421 ctggcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt ttggaggcc tagacttttg
 6481 cagagacggc ccaaattcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc
 6541 gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta
 6601 atgagttagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa
 6661 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgctat
 6721 tgggogctct tccgttcct cgctcactga ctgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg
 6781 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc

6841 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt
 6901 gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gaogctcaag
 6961 tcagaggtgg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc
 7021 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc
 7081 ttogggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt
 7141 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt
 7201 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc
 7261 agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa
 7321 gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtatit ggtatctgcg ctctgctgaa
 7381 gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg
 7441 tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga
 7501 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg
 7561 gatitttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg
 7621 aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt
 7681 aatcagttag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact
 7741 ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat
 7801 gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg
 7861 aaggggcgag cgcagaagtg gtctgtcaac ttatccgcc tccatccagt ctattaattg
 7921 ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat
 7981 tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc
 8041 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt
 8101 cggctcctcc atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc
 8161 agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga
 8221 gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc
 8281 gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa
 8341 acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta
 8401 acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttaccagcg tttctgggtg
 8461 agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg
 8521 aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat
 8581 gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt
 8641 tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa
 8701 aaataggcgt atcacgaggc ctttcgtct cgcgcttgc ggtgatgacg gtgaaaacct
 8761 ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag
 8821 acaagcccgt caggcgcgct cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc

8881 ggcatcagag cagattgtac tgagagtga ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg
 8941 cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttccgcatc aggctgcga actgttggga
 9001 agggcgatcg gtgcgggcct ctctgctatt acgccagctg gcgaaaggg gatgtgtcgc
 9061 aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtc cgacgttgta aaacgacggc
 9121 cagtccaag ctg.

p510_antiBCMA_CD3epsilon (SEQ ID NO: 22)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcatgccga ttggtggaag taagggtgta
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgcgcat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc ttagtgcttc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaagggaa accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcatcaaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg
 961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacgttaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgttg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt

1681 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattog attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat taaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ctttatggga ctttcctact tggcagtaca
 1981 totacgtatt agtcatogct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcaccaaatt caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tocgcccat
 2161 tgacgcaaatt gggcggtagg cgtgtacggt gggaggttta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatcgcttgg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgtttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacaccca
 2341 gcattcctcc tgatcccaca ggtgcagctg gtgcagagcg gcgcggaagt gaaaaaacg
 2401 ggcgcgagcg tgaaagttag ctgcaaagcg agcggctata gctttccgga ttattatatt
 2461 aactgggtgc gccaggcgcc gggccagggc ctggaatgga tgggctggat ttattttgcg
 2521 agcggcaaca gcgaatataa ccagaaattt accggccgcg tgacctgac cgcgatacc
 2581 agcagcagca ccgcgtatat ggaactgagc agcctgcgca gcgaagatac cgcggtgtat
 2641 ttttgcgca gcctgtatga ttatgattgg tattttgatg tgtggggcca gggcaccatg
 2701 gtgaccgtga gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc
 2761 gatattgtga tgaccagac cccgctgagc ctgagcgtga ccccgggcga accggcgagc
 2821 attagctgca aaagcagcca gagcctggtg catagcaacg gcaacaccta tctgcattgg
 2881 tatctgcaga aaccgggcca gagccgcag ctgctgattt ataaagttag caaccgcttt
 2941 agcggcgtgc cggatcgctt tagcggcagc ggcagcggcg cggattttac cctgaaaatt
 3001 agcgcgctgg aagcgaaga tgtggcgctg tattattgcg cggaaccag ccatgtgccg
 3061 tggacctttg gccagggcac caaactggaa attaaaagcg gtggcggcgg ttctggtggc
 3121 ggcggttctg gtggcggcgg ttctctcgag gatggtaatg aagaaatggg tgggtattaca
 3181 cagacaccat ataaagtctc catctctgga accacagtaa tattgacatg ccctcagtat
 3241 cctggatctg aaatactatg gcaacacaat gataaaaaca taggcggtga tgaggatgat
 3301 aaaaacatag gcagtgatga ggatcacctg tcaactgaagg aattttcaga attggagcaa
 3361 agtggttatt atgtctgcta cccagagga agcaaaccag aagatgcgaa cttttatctc
 3421 tacctgaggg caagagtgtg tgagaactgc atggagatgg atgtgatgtc ggtggccaca
 3481 attgtcatag tggacatctg catcaactggg ggcttgctgc tgctggttta ctactggagc
 3541 aagaatagaa aggccaaggc caagcctgtg acacgaggag cgggtgctgg cggcaggcaa
 3601 aggggacaaa acaaggagag gccaccacct gttccaacc cagactatga gocatccgg
 3661 aaaggccagc gggacctgta ttctggcctg aatcagagac gcatctgata agaattcggg

3721 tccgcggccg cgaaggatct gcgatcgctc cgggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc
 3781 gccacagtc cccgagaagt tggggggagg ggtcggcaat tgaacgggtg octagagaag
 3841 gtggcgcggg gtaaacctggg aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg
 3901 tgggggagaa ccgtatataa gtgcagtagt cgcctgaac gttctttttt gcaacgggtt
 3961 tgccgccaga acacagctga agcttcgagg ggctcgcato tctccttcac gcgcccgccg
 4021 ccctacctga ggccgccatc caccgcggtt gagtcgcgtt ctgccgcctc ccgcctgtgg
 4081 tgccctctga actgcgtccg ccgtctaggt aagtttaaaag ctcaggtcga gaccgggcct
 4141 ttgtccggcg ctcccttggg gcctacctag actcagccgg ctctccacgc ttgtcctgac
 4201 cctgcttgct caactctacg tctttgtttc gttttctgtt ctgcgccgtt acagatccaa
 4261 gctgtgaccg gcgcctacgc tagatgaccg agtacaagcc caccgtgcgc ctgccacccc
 4321 gcgacgacgt ccccgaggcc gtacgcaccc tcgccgcgc gttcgccgac taccgcgcca
 4381 cgcgccacac cgtcgatccg gaccgccaca tcgagcgggt caccgagctg caagaactct
 4441 tcctcacgcg cgtcgggctc gacatcggca aggtgtgggt cgcggacgac ggcccgcggg
 4501 tggcgggtctg gaccacgccg gagagcgtcg aagcgggggc ggtgttcgcc gagatcgccc
 4561 cgcgcatggc cgagttgagc ggttcccgcc tggccgcgca gcaacagatg gaaggcctcc
 4621 tggcgccgca ccggcccaag gagcccgctg ggttcctggc caccgtcggc gtctcgcccg
 4681 accaccaggg caagggtctg ggcagcgccg tcgtgctccc cggagtggag gcggccgagc
 4741 gcgcgggggt gccgccttc ctggagacct ccgcgcccgc caacctcccc ttctacgagc
 4801 ggctcggctt caccgtcacc gccgacgtcg aggtgcccga aggaccgcgc acctggtgca
 4861 tgaccgcaa gcccggtgcc tgagtcgaca atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa
 4921 gattgactgg tattottaac tatgttgctc cttttacgt atgttgatac gctgctttaa
 4981 tgcccttgta tcatgtatt gcttccgta tggctttcat tttctcctcc ttgtataaat
 5041 cctggttgct gtctctttat gaggagtgtt ggcccgttgt caggcaacgt ggctgtgtgt
 5101 gcaactgtgtt tgctgaogca acccccactg gttggggcat tgccaccacc tgtcagctcc
 5161 tttccgggac tttcgctttc cccctcccta ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc
 5221 ttgcccgctg ctggacaggg gctcggctgt tgggcaactga caattccgtg gtgttgctgg
 5281 ggaaatcatc gtcccttctt tggctgctcg cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga
 5341 cgtccttctg ctacgtccct tcggccctca atccagcgga ccttccttcc cgcggcctgc
 5401 tgccggctct gcggcctctt ccgcgtcttc gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc
 5461 tttgggcccgc ctccccgcct ggtaccttta agaccaatga cttacaaggc agctgtagat
 5521 cttagccact ttttaaaaga aaagggggga ctggaagggc taattcactc ccaacgaaaa
 5581 taagatctgc tttttgcttg tactgggtct ctctggttag accagatctg agcctgggag
 5641 ctctctggct aactaggga cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc ttgagtgtt
 5701 caagtagtgt gtgccgtct gttgtgtgac tctgtaact agagatccct cagacccttt

5761 tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtagt agttcatgtc atcttattat tcagtattta
 5821 taacttgcaa agaaatgaat atcagagagt gagaggaaact tgtttattgc agottataat
 5881 ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat
 5941 tctagttgtg gtttgtocaa actcatcaat gtatcttata atgtctggct ctagctatcc
 6001 cgcccctaac tccgccaggt tccgccatt ctccgcccc tggctgacta atttttttta
 6061 tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct
 6121 tttttggagg cctagacttt tgcagagacg gcccaaattc gtaatcatgg tcatagctgt
 6181 ttctgtgtg aaattgttat ccgctcaca ttcacacaa catacgagcc ggaagcataa
 6241 agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaatgtcg ttgcgctcac
 6301 tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg
 6361 cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctgcctcact gactcgtgc
 6421 gctcggctgt tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat
 6481 ccacagaatc aggggataac gcaggaaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca
 6541 ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgccc cctgacgagc
 6601 atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc
 6661 aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg
 6721 gatacctgtc cgcttttctc ctttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta
 6781 ggtatctcag ttcgggtgtg gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccgc
 6841 ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggttaagac
 6901 acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag
 6961 gcggtgctac agagtctttg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat
 7021 ttggtatctg cgctctgtg aagccagtta ctttcggaaa aagagttggt agctcttgat
 7081 ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc
 7141 gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gaogctcagt
 7201 ggaacgaaaa ctacagttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct
 7261 agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaacct
 7321 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacagcatc tgtctatttc
 7381 gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg ttagataaac tacgatacgg gagggcttac
 7441 catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctacccggct ccagatttat
 7501 cagcaataaa ccagccagcc ggaaggggcg agcgcagaag tggctcctgca actttatccg
 7561 cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagtttaata
 7621 gtttgcgcaa cgttggtgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgttttgta
 7681 tggcttcatt cagctcoggt tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt
 7741 gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag

7801 tgttatcact catggttatg gcagcaactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa
 7861 gatgcttttc tgtgactggt gactactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc
 7921 gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt
 7981 taaaagtgtc catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc
 8041 tgttgagatc cagttgatg taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta
 8101 ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaaggga
 8161 taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca
 8221 tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac
 8281 aaataggggt tccgcgcaca tttcccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta
 8341 ttatcatgac attaacctat aaaaatagga gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcggtt
 8401 tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgct
 8461 tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt
 8521 gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatatgc
 8581 ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc cattcgccat
 8641 tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cggcgggc ctcttcgcta ttacgccagc
 8701 tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttccagt
 8761 cacgacgttg taaaacgacg gccagtgcc agctg

p510_antiBCMA_CD3gamma (SEQ ID NO: 23)

1 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca
 61 acatgcotta caaggagaga aaaagcacgc tgcatgccga ttggtggaag taaggtggtg
 121 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga
 181 attgcgcgat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc
 241 tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta
 301 agcctcaata aagcttgcc tgcagcttc aagtagtgtg tgcccgctctg ttgtgtgact
 361 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg
 421 cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct
 481 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgagg ggcgcgactg gtgagtacgc caaaaatttt
 541 gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag
 601 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt
 661 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt
 721 agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttacagacagg
 781 atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag
 841 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag
 901 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatattgagg

961 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag
 1021 caccacacaa ggcaaagaga agagtgggtgc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag
 1081 ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc
 1141 tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga
 1201 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc
 1261 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg
 1321 gttgctcttg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata
 1381 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa
 1441 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga
 1501 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgttg aatttggtta acataacaaa
 1561 ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat
 1621 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt
 1681 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg
 1741 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt
 1801 aacttttaaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat
 1861 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt
 1921 atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca
 1981 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtag atcaatgggc
 2041 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 2101 gtttgttttg gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 2161 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtta tataagcaga gctcgtttag
 2221 tgaaccgtca gatcgcttg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagattct
 2281 agagccgcca ccatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca
 2341 gcattcctcc tgatccaca ggtgcagctg gtgcagagcg gcgcggaagt gaaaaaacg
 2401 ggcgcgagcg taaaagttag ctgcaaagcg agcggctata gctttccgga ttattatatt
 2461 aactgggtgc gccaggcgcc gggccagggc ctggaatgga tgggctggat ttattttgcg
 2521 agcggcaaca gcgaatataa ccagaaatct accggccgag tgacctgac ccgcgatacc
 2581 agcagcagca ccgcgtatat ggaactgagc agcctgcgca gcgaagatac cgcggtgtat
 2641 ttttgcgga gcctgtatga ttatgattgg tattttgatg tgtggggcca gggcaccatg
 2701 gtgaccgtga gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc
 2761 gatattgtga tgaccagac cccgctgagc ctgagcgtga ccccgggcga accggcgagc
 2821 attagctgca aaagcagcca gagcctggtg catagcaacg gcaacaccta tctgcattgg
 2881 tatctgcaga aaccgggcca gagcccgag ctgctgattt ataaagttag caaccgcttt
 2941 agcggcgtgc cggatcgctt tagcggcagc ggcagcggcg cggattttac cctgaaaatt

3001 agccgcgtgg aagcgggaaga tgtgggcgtg tattattgcg cggaaaccag ccatgtgccg
 3061 tggacctttg gccagggcac caaactggaa attaaaagcg gtggcggcgg ttctggtggc
 3121 ggcggttctg gtggcggcgg ttctctcgag cagtcaatca aaggaaacca cttggttaag
 3181 gtgtatgact atcaagaaga tggttcggta cttctgactt gtgatgcaga agccaaaaat
 3241 atcacatggt ttaaagatgg gaagatgac ggcttcctaa ctgaagataa aaaaaaatgg
 3301 aatctgggaa gtaatgocaa ggacccacga gggatgtatc agtgtaaagg atcacagaac
 3361 aagtcaaaac cactccaagt gtattacaga atgtgtcaga actgcattga actaaatgca
 3421 gccaccatat ctggctttct ctttctgaa atcgtcagca ttttctcct tgctgttggg
 3481 gtctacttca ttgtggaca ggatggagt cgcagtcga gagcttcaga caagcagact
 3541 ctgttgccca atgaccagct ctaccagccc ctcaaggatc gagaagatga ccagtacagc
 3601 caccttcaag gaaaccagtt gaggaggaat tgataagaat tcggatccgc ggccgcgaag
 3661 gatctgcgat cgctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga
 3721 gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac ggggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa
 3781 ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctcgc ctttttccc gaggggtggg gagaaccgta
 3841 tataagtgca gtagtcgccc tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca
 3901 gctgaagctt cgaggggctc gcatctctcc ttcacgcgcc cgcgcacctc cctgaggccg
 3961 ccatccacgc cggttgagtc gcgttctgcc gcctccgcc tgtggtgcct cctgaactgc
 4021 gtccgcgctc taggtaagtt taaagctcag gtcgagaccg ggctttgtc cggcgtcccc
 4081 ttggagccca cctagactca gccggtctc caccgttgc ctgaccctgc ttgctcaact
 4141 ctacgtcttt gtttcgtttt ctgttctgcg ccgttacaga tccaagctgt gaccggcgcc
 4201 tacgctagat gaccgagtac aagcccacgg tgcgcctcgc caccgcgac gacgtcccca
 4261 gggccgtacg caccctcgcc gccgcgttgc ccgactaccc cgcacgcgc cacaccgtcg
 4321 atccggaccg ccacatcgag cgggtcaccg agctgcaaga actcttcctc acgcgcgtcg
 4381 ggctogacat cggcaaggtg tgggtcgogg acgacggcgc cgcggtggcg gtctggacca
 4441 cgcgggagag cgtcgaagcg gggcggtgt tcgccgagat cggccgcgc atggccgagt
 4501 tgagcggttc ccggttgcc gcgcagcaac agatggaagg cctcctggcg ccgcaccggc
 4561 ccaaggagcc cgcgtggttc ctggccaccg tcggcgtctc gcccgaccac cagggaagg
 4621 gtctgggcag cgcgtcgtg ctccccggag tggaggcggc cgagcgcgc ggggtgccc
 4681 ccttctgga gacctccgc cccgcaacc tccccttcta cgagcggctc ggcttcaccg
 4741 tcaccgccga cgtcgaggtg cccgaaggac cgcgcacctg gtgcatgacc cgcaagccc
 4801 gtgcctgagt cgacaatcaa cctctggatt acaaaatttg tgaaagattg actggtattc
 4861 ttaactatgt tgctcctttt acgctatgtg gatacgtgc tttaatgcct ttgtatcatg
 4921 ctattgcttc ccgtatggct ttcatcttct cctccttgta taaatcctgg ttgctgtctc
 4981 tttatgagga gttgtggccc gttgtcaggc aacgtggcgt ggtgtgcact gtgtttgctg

5041 acgcaacccc cactgggttg ggcattgcca ccacctgtca gtccttttcc gggactttcg
 5101 ctttccccct ccctattgcc acggcggaac tcatcgccgc ctgccttgcc cgctgctgga
 5161 caggggctcg gctgttgggc actgacaatt ccgtggtgtt gtcgggaaa tcatcgtcct
 5221 ttctttggct gtcgcctgt gttgccacct ggattctgcg cgggacgtcc ttctgctacg
 5281 tcccttcggc cctcaatcca gcggaccttc cttcccgagg cctgctgccg gctctgcggc
 5341 ctcttcggcg tcttcgcctt cgcctcaga cgagtcggat ctccctttgg gccgcctccc
 5401 cgcttggtac cttaagacc aatgacttac aaggcagctg tagatcttag ccacttttta
 5461 aaagaaaagg ggggactgga agggctaatt cactcccaac gaaaataaga totgcttttt
 5521 gcttgctactg ggtctctctg gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta
 5581 gggaaccac tgcttaagcc tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc
 5641 cgtctgttgt gtgactctgg taactagaga tccctcagac ctttttagtc agtgtggaaa
 5701 atctctagca gtagtagttc atgtcatctt attattcagt atttataact tgcaaagaaa
 5761 tgaatatcag agagtgagag gaacttgitt attgcagctt ataatggta caaataaagc
 5821 aatagcatca caaatctcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg
 5881 tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tggctctagc tatcccgccc ctaactccgc
 5941 ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatctt ttttatttat gcagaggccg
 6001 aggcgcctc ggctctgag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt ggaggcctag
 6061 acttttgcag agacggcca aattcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt
 6121 gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg
 6181 gtgcctaattg agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt
 6241 cgggaaacct gtctgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt
 6301 tgcgtatttg gcgtctttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc
 6361 tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtataacg gttatccaca gaatcagggg
 6421 ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg
 6481 ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac
 6541 gctcaagtca gaggtggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg
 6601 gaagctccct cgtgcgctct cctgttcoga ccctgccgct taccgatac ctgtccgctt
 6661 ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg
 6721 ttaggtcgt tcgctccaag ctgggtgtg tgcacgaacc cccggttcag ccgaccgct
 6781 gcgccttata cggtactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac
 6841 tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt
 6901 tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc
 6961 tgotgaagcc agttaccttc gaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca
 7021 ccgctggtag cgggtgtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat

7081 ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac
 7141 gttaagggat tttggatcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt
 7201 aaaaatgaag ttttaaatac atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc
 7261 aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg
 7321 cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg
 7381 ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc
 7441 cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta
 7501 ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg
 7561 ttgccattgc tacaggcatc gtgggtgcac gctcgtcgtt tggatatggct tcattcagct
 7621 ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccac gttgtgcaaa aaagcggtta
 7681 gtccttccgg tcctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgta tcaactcatg
 7741 ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga
 7801 ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt
 7861 gcccgcgctc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca
 7921 ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt
 7981 cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt
 8041 ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga
 8101 aatgttgaat actcatactc ttcttttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt
 8161 gtctcatgag cggatacata ttgaaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc
 8221 gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa
 8281 cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttctgtctgc gcgtttcggg gatgacgggtg
 8341 aaaaacctctg acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg
 8401 ggagcagaca agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta
 8461 actatgcggc atcagagcag attgtactga gaggcacca tatgcgggtg gaaataccgc
 8521 acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggccgcatc gccattcagg ctgcgcaact
 8581 gttgggaagg gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaagggggat
 8641 gtgctgcaag gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa
 8701 cgacggccag tgccaagctg.

Пример 2: Последовательности антител

Создание последовательностей антител

[000342] Каноническая последовательность полипептида CD19 человека представляет собой последовательность под номером доступа UniProt P15391 (или P15391-1). Каноническая последовательность полипептида ВСМА человека представляет

собой последовательность под номером доступа UniProt Q02223 (или Q02223-1). В настоящем изобретении предложены полипептиды антител, которые способны специфично связываться с полипептидом CD19 человека или полипептидом BCMA человека, или полипептидом FAP человека, или полипептидом BCMA человека, и их фрагменты или домены. Антитела к CD19, FAP, CAIX и BCMA могут быть получены с использованием различных технологий (см., например, (Nicholson et al, 1997). В указанной работе мышинные антитела к CD19, FAP, CAIX или BCMA используют в качестве исходного материала, гуманизация мышинных антител к CD19, FAP, CAIX или BCMA является желательной для клинических условий, при которых специфичные для мышцы остатки могут индуцировать антигенный ответ у человека, направленный против антител мышцы (НАМА), у субъектов, получающих лечение с использованием гибридного белка (TFP) Т-клеточных рецепторов (TCR), то есть лечение с использованием Т-клеток, трансдуцированных конструкцией TFP.CD19, TFP.FAP, TFP.CAIX или TFP.BCMA. Гуманизацию осуществляют путем прививки областей CDR из мышинового антитела к CD19, FAP, CAIX или BCMA на соответствующие акцепторные каркасные участки зародышевой линии человека, необязательно содержащие другие модификации CDR и/или каркасных участков. В настоящем изобретении нумерация остатков антител и фрагментов антитела указана в соответствии с системой Кабат (Kabat) (Kabat E. A. et al, 1991; Chothia et al, 1987).

Создание scFv

[000343] Гуманизированные IgG или IgG человека к CD19, FAP, CAIX или BCMA используют для создания последовательностей scFv для конструкций TFP. Получают последовательности ДНК, кодирующие домены V_L и V_H человека или гуманизированные домены V_L и V_H , и кодоны для конструкций необязательно оптимизируют для экспрессии в клетках из *Homo sapiens*. Порядок, в котором домены V_L и V_H появляются в scFv, варьируется (т.е., возможна ориентация V_L - V_H или V_H - V_L), и три копии субъединицы «G4S» или «G4S» $(G4S)_3$ соединяют переменные домены с получением домена scFv. Плазмидные конструкции, содержащие scFv к CD19, FAP, CAIX и BCMA, необязательно могут содержать метки Flag, His или другие аффинные метки, и могут быть введены путем электропорации в клетки линии HEK293 или другие пригодные линии клеток человека или млекопитающих, и очищены. Подтверждающие количественные исследования включают исследование связывания методом проточной цитометрии, кинетический анализ с использованием Proteon и окрашивание CD19-экспрессирующих клеток.

[000344] Примеры CD19-связывающих или BCMA-связывающих CDR из доменов V_L и V_H и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, соответственно, представлены ниже:

CD19-связывающий домен

[000345] CDR1 легкой цепи, нацеленный к CD19

Кодирующая последовательность: AGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAA (SEQ ID NO: 24).

Аминокислотная последовательность: RASQDISK (SEQ ID NO: 25).

[000346] CDR2 легкой цепи, нацеленный к CD19

Кодирующая последовательность: ATCTACCATACATCAAGATTA (SEQ ID NO: 26).

Аминокислотная последовательность: IYHTSRL (SEQ ID NO: 27).

[000347] CDR3 легкой цепи, нацеленный к CD19

Кодирующая последовательность: CAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACG (SEQ ID NO: 28).

Аминокислотная последовательность: QQGNTLPYT (SEQ ID NO: 29).

[000348] CDR1 тяжелой цепи, нацеленный к CD19

Кодирующая последовательность: GGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGC (SEQ ID NO: 30).

Аминокислотная последовательность: GVSLPDYGVV (SEQ ID NO: 31).

[000349] CDR2 тяжелой цепи, нацеленный к CD19

Кодирующая последовательность: GTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTC (SEQ ID NO: 32).

Аминокислотная последовательность: VIWGSETTYNSAL (SEQ ID NO: 33).

[000350] CDR3 тяжелой цепи, нацеленный к CD19

Кодирующая последовательность: CATATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTAC (SEQ ID NO: 34).

Аминокислотная последовательность: HYYYGGSYAMDY (SEQ ID NO: 35).

BCMA-связывающий домен

[000351] CDR1 легкой цепи, нацеленный к BCMA

Кодирующая последовательность: AAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGCAT (SEQ ID NO: 36).

Аминокислотная последовательность: KSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 37).

[000352] CDR2 легкой цепи, нацеленный к BCMA

Кодирующая последовательность: AAAGTGAGCAACCGCTTTAGC (SEQ ID NO: 38).

Аминокислотная последовательность: KVSNRFS (SEQ ID NO: 39).

[000353] CDR3 легкой цепи, нацеленный к BCMA

Кодирующая последовательность: GCGGAAACCAGCCATGTGCCGTGGACC (SEQ ID NO: 40).

Аминокислотная последовательность: AETSHVPWT (SEQ ID NO: 41).

[000354] CDR1 тяжелой цепи, нацеленный к BCMA

Кодирующая последовательность:

AAAGCGAGCGGCTATAGCTTTCCGGATTATTATATTAAC (SEQ ID NO: 42).

Аминокислотная последовательность: KASGYSFPDYYIN (SEQ ID NO: 43).

[000355] CDR2 тяжелой цепи, нацеленный к BCMA

Кодирующая последовательность:

TGGATTTATTTTGCAGCGGCAACAGCGAATATAACCAGAAATTTACCGGC (SEQ ID NO: 44)

Аминокислотная последовательность: WIYFASGNSEYNQKFTG (SEQ ID NO: 45).

[000356] CDR3 тяжелой цепи, нацеленный к BCMA

Кодирующая последовательность: CTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTG (SEQ ID NO: 46).

Аминокислотная последовательность: LYDYDWYFDV (SEQ ID NO: 47).

[000357] Вариабельная область легкой цепи антитела к CD19

Кодирующая последовательность:

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTC
ACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCA
GAAACCAGATGGAACCTGTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGG
AGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAG
CAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCC
GTACACGTTCCGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACA (SEQ ID NO: 48).

Аминокислотная последовательность:

DIQMTQTTSSLASLGDRVITISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT (SEQ ID NO: 49).

[000358] Вариабельная область тяжелой цепи антитела к CD19

Кодирующая последовательность:

GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTC
CGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCC
CCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCA
CATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGA

GCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATTTACTACT
GTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAA
CCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 50).

Аминокислотная последовательность:

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETYY
NSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVT
VSS (SEQ ID NO: 51).

[000359] Вариабельная область легкой цепи антитела к BCMA

Кодирующая последовательность:

GATATTGTGATGACCCAGACCCCGCTGAGCCTGAGCGTGACCCCGGGCGAACCGGC
GAGCATTAGCTGCAAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATAGCAACGGCAACACCTATC
TGCATTGGTATCTGCAGAAACCGGGCCAGAGCCCGCAGCTGCTGATTTATAAAGTG
AGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCGCGGA
TTTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTATTGCGC
GGAAACCAGCCATGTGCCGTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAAATTAAAA
GC (SEQ ID NO: 52).

Аминокислотная последовательность:

DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS
NRFSGVDPDRFSGSGSGADFTLKISRVEAEDVGVYYCAETSHVPWTFGQGTKLEIKS
(SEQ ID NO: 53).

[000360] Вариабельная область тяжелой цепи антитела к BCMA

Кодирующая последовательность:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGA
AAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATAGCTTTCCGGATTATTATATTAACCTGGGTGC
GCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATTTATTTTGCGAGCGGC
AACAGCGAATATAACCAGAAATTTACCGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAG
CAGCAGCACCGCGTATATGGAACCTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGT
ATTTTTCGCGGAGCCTGTATGATTATGATTGGTATTTTGATGTGTGGGGCCAGGGCA
CCATGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 54).

Аминокислотная последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVRQAPGQGLEWMGWIFYASGNSEYNQ
KFTGRVTMTRDTSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASLYDYFDVWGQGMVTVSS (SEQ
ID NO: 55).

Источник субъединиц TCR

[000361] Все субъединицы комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) человека содержат внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Комплекс TCR человека содержит полипептид CD3-эпсилон, полипептид CD3-гамма, полипептид CD3-дельта, полипептид CD3-дзета, полипептид альфа-цепи TCR и полипептид бета-цепи TCR. Каноническая последовательность полипептида CD3-эпсилон человека может быть найдена в базе данных UniProt под номером доступа P07766. Каноническая последовательность полипептида CD3-гамма человека может быть найдена в базе данных UniProt под номером доступа P09693. Каноническая последовательность полипептида CD3-дельта человека может быть найдена в базе данных UniProt под номером доступа P043234. Каноническая последовательность полипептида CD3-дзета человека может быть найдена в базе данных UniProt под номером доступа P20963. Каноническая последовательность альфа-цепи TCR человека может быть найдена в базе данных UniProt под номером доступа Q6ISU1. Каноническая последовательность С-области бета-цепи TCR человека может быть найдена в базе данных UniProt под номером доступа P01850, последовательность V области бета-цепи TCR человека может быть найдена в базе данных UniProt под номером доступа P04435.

[000362] Каноническая последовательность полипептида CD3-эпсилон человека: MQSGTHWRVLGLCLLSVGVGWQDGNEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDMVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPPVNPDPYEPYRKQGRDLYSGLNQRRRI (SEQ ID NO: 56)

[000363] Каноническая последовательность полипептида CD3-гамма человека: MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLA VGVYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO: 57).

[000364] Каноническая последовательность полипептида CD3-дельта человека: MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTVGTTLSITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO: 58).

[000365] Каноническая последовательность полипептида CD3-дзета человека: MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 59).

[000366] Каноническая последовательность альфа-цепи TCR человека:
MAGTWLLLLALGCPALPTGVGGTPFPSLAPPIMLLVDGKQQMVVVCLVLDVAPPGLD
SPIWFSAGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGPAGEGHS
RSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGGALWLGVLRLLLFKLLLFDLLLTCSCLCDPA
GPLPSPATTTLRALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTTPGRKPGSPVWG
EGSYLSSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAGAA (SEQ ID NO: 60).

[000367] Каноническая последовательность С-области альфа-цепи TCR человека:
PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVDYITDKTVLDMRSMDFK
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIG
FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO: 61).

[000368] Каноническая последовательность V области CTL-L17 альфа-цепи TCR человека:
MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDY
FLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAAK
GAGTASKLTFGTGTRLQVTL (SEQ ID NO: 62)

[000369] Каноническая последовательность С-области бета-цепи TCR человека:
EDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTD
PQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV
TQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRK
DF (SEQ ID NO: 63).

[000370] Каноническая последовательность V-области CTL-L17 бета-цепи TCR человека:
MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQT
LGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERP KGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSLAG
LNQPQHFGDGTRLSIL (SEQ ID NO: 64)

[000371] Каноническая последовательность V-области YT35 бета-цепи TCR человека:
MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTM
MRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSFSTCS
ANYGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO: 65).

[000372] Пример последовательности тяжелой цепи анти-BCMA:

Создание TFP из доменов TCR и scFv

[000373] CD19 или BCMA scFv рекомбинантно соединены с CD3-эпсилон или другими субъединицами TCR (см. 1C) с использованием линкерной последовательности, такой как G₄S, (G₄S)₂, (G₄S)₃ или (G₄S)₄. В настоящем изобретении используют различные линкеры и конфигурации scFv. Альфа-цепь TCR и бета-цепь TCR использовали для

создания TFP в виде полноразмерных полипептидов или только их константных доменов. Любая вариабельная последовательность альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR пригодна для изготовления TFP.

Векторы экспрессии TFP

[000374] В настоящем изобретении предложены векторы экспрессии, содержащие: промотор (энхансер-промотор цитомегаловируса (ЦМВ)), сигнальную последовательность, чтобы обеспечить секрецию, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий эписомную репликацию и репликацию у прокариот (например, точка начала репликации SV40 и ColE1 или другие, известные в данной области техники), и элементы, обеспечивающие отбор (ген устойчивости к ампициллину и селективный маркер зеоцин).

[000375] Предпочтительно конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующей TFP, клонируют в лентивирусный вектор экспрессии, и экспрессию подтверждают на основании количества и качества ответа эффекторных Т-клеток, трансдуцированных TFP.CD19 («CD19.TFP» или «CD19.TFP Т-клетки», или «TFP.CD19», или «TFP.CD19 Т-клетки») в ответ на CD19+ клетки-мишени, TFP.FAP-трансдуцированных Т-клеток («FAP.TFP» или «FAP.TFP Т-клетки», или «TFP.FAP», или «TFP.FAP Т-клетки») в ответ на FAP+ клетки-мишени, TFP.CAIX-трансдуцированных Т-клеток («CAIX.TFP» или «CAIX.TFP Т-клетки», или «TFP.CAIX», или «TFP.CAIX Т-клетки») в ответ на CAIX+ клетки-мишени, или TFP.BCMA-трансдуцированных Т-клеток («BCMA.TFP» или «BCMA.TFP Т-клетки», или «TFP.BCMA», или «TFP.BCMA Т-клетки») в ответ на BCMA+ клетки-мишени. Ответы эффекторных Т-клеток включают, но не ограничиваются ими, размножение, пролиферацию и удвоение клеток, выработку цитокинов и лизис клеток-мишеней или цитолитическую активность (т.е. дегрануляцию).

[000376] Лентивирусные векторы-переносчики TFP.CD19, TFP.FAP, TFP.CAIX или TFP.BCMA используют для получения геномного материала, упакованного в VSVg-псевдотипированные лентивирусные частицы. ДНК лентивирусного вектора-переносчика смешивают с тремя компонентами для упаковки вируса VSVg, gag/pol и rev в комбинации с реагентом для трансфекции Lipofectamine™ для их переноса в клетки 293. Через 24 и 48 часов среды собирают, фильтруют и концентрируют с помощью ультрацентрифугирования. Полученный вирусный препарат хранят при -80 °С. Количество трансдуцирующих единиц определяют титрованием на клетках SupT1. Перенаправленные Т-клетки TFP.CD19, TFP.FAP, TFP.CAIX или TFP.BCMA получают путем активации свежих наивных Т-клеток с использованием гранул, покрытых антителом к CD3 α и CD28, в течение 24 часов и затем добавляют соответствующее

количество трансдуцирующих единиц, чтобы получить желаемую долю трансдуцированных Т-клеток. Полученные модифицированные Т-клетки размножают, до достижения состояния покоя и уменьшения в размере, после чего их замораживают для последующего анализа. Количество и размеры клеток измеряют с использованием Multisizer III (Beckman Coulter). Перед криоконсервацией процент трансдуцированных клеток (экспрессирующих TFP.CD19, TFP.FAP, TFP.CAIX или TFP.BCMA на клеточной поверхности) и относительную интенсивность флуоресценции в результате экспрессии определяют методом проточной цитометрии. На основании данных гистограммы оценивают относительные уровни экспрессии TFP путем сравнения процента трансдуцированных клеток с относительной интенсивностью флуоресценции для указанных клеток.

[000377] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения несколько TFP вводят с помощью трансдукции Т-клеток несколькими вирусными векторами.

Оценка цитолитической активности, способности к пролиферации и секреции цитокинов перенаправленных Т-клеток, несущих гуманизированный TFP

[000378] Функциональные способности TFP.CD19, TFP.FAP, TFP.CAIX или TFP.BCMA Т-клеток вырабатывать TFP, которые экспрессируются на клеточной поверхности, и вызывать гибель опухолевых клеток-мишеней, пролиферировать и секретировать цитокины определяли с помощью количественных исследований, известных в данной области техники.

[000379] МКПК человека (например, кровь после афереза у нормального донора, наивные Т-клетки которого получают путем отрицательной селекции в отношении Т-клеток, CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов) обрабатывают интерлейкином-2 (ИЛ-2) человека, и затем активируют гранулами, покрытыми антителами к CD3 α и CD28, например, в 10% RPMI при 37 °C, 5% CO₂ перед проведением трансдукции с использованием TFP-кодирующих лентивирусных векторов. Количественные исследования методом проточной цитометрии используют, чтобы подтвердить присутствие TFP на поверхности клеток, например, с помощью антитела к FLAG или антитела к вариабельной области мыши. Выработку цитокинов (например, ИФН- γ) измеряют с помощью ИФА или других количественных способов исследований.

Пример 3: Эффективность TFP Т-клеток человека в мышинной модели ALL человека

[000380] Первичные клетки ALL человека могут быть выращены у мышей с ослабленным иммунитетом (например, NSG или NOD) без их культивирования в условиях *in vitro*. Аналогичным образом, культивируемые линии клеток ALL человека могут

индуцировать лейкоз у таких мышей. Мышей, несущих ALL, можно использовать для проверки эффективности Т-клеток человека TFP.CD19, TFP.FAP, TFP.CAIX или TFP.BCMA, например, в модели HALLX5447. Исследуемым показателем в указанной модели является выживание мышей после внутривенной (в/в) инфузии клеток ALL в отсутствие и в присутствии внутривенно введенных Т-клеток человека TFP.CD19, TFP.FAP, TFP.CAIX или TFP.BCMA.

Пример 4: Лечение с использованием TFP Т-клеток человека в ксенотрансплантатной мышинной модели солидных опухолей в условиях *in vivo*

[000381] Эффективность Т-клеток человека TFP.CD19 или TFP.BCMA также может быть проверена в мышинных моделях с ослабленным иммунитетом, несущих подкожные солидные опухоли, полученные из CD19- или BCMA-экспрессирующих клеток ALL человека, линий клеток CLL или НХЛ человека. Сжатие опухоли в ответ на лечение с использованием Т-клеток человека TFP.CD19, TFP.FAP, TFP.CAIX или TFP.BCMA можно оценить путем измерения размера опухоли штангенциркулем или путем регистрации интенсивности сигнала флуоресценции GFP, испускаемого GFP-экспрессирующими опухолевыми клетками.

[000382] Первичные клетки солидной опухоли человека могут быть выращены у мышей с ослабленным иммунитетом без культивирования в условиях *in vitro*. Примеры клеток солидных опухолей включают линии клеток солидных опухолей, такие как линии, доступные в Атласе генома рака (TCGA) и/или Общей энциклопедии линий раковых клеток (CCLE см. Barretina et al., Nature 483:603 (2012)). Примеры клеток солидных опухолей включают первичные опухолевые клетки, выделенные из карциномы почек, рака молочной железы, рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака мозга, рака печени, рака поджелудочной железы, рака почек или рака желудка. Такие мыши могут быть использованы для проверки эффективности Т-клеток TFP.CD19, TFP.FAP, TFP.CAIX или TFP.BCMA в ксенотрансплантатных моделях опухолей человека (см., например, Morton et al., Nat. Protocol. 2:247 (2007)). После имплантации или подкожной инъекции 1×10^6 - 1×10^7 первичных клеток (обработанные коллагеназой общие суспензии опухолей в материале внеклеточного матрикса) или фрагментов опухоли (фрагменты первичной опухоли в материале внеклеточного матрикса), опухолям обеспечивали время для роста до 200-500 мм³ перед началом лечения.

Пример 5: Демонстрация мультиплексных полипептидов TFP и применение мультиплексных перенаправленных Т-клеток, несущих гуманизированный TFP

[000383] Полипептиды TFP, представленные в настоящем документе, способны функционально связываться с эндогенными полипептидами субъединиц TCR с образованием функциональных комплексов TCR. В настоящем документе множество TFP в лентивирусных векторах используют для трансдукции Т-клеток, чтобы создать функциональный, мультиплексный рекомбинантный комплекс TCR. Например, в настоящем изобретении предложена Т-клетка, содержащая: i) первый TFP, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен из полипептида CD3-дзета, и фрагмент антитела scFv, специфичный в отношении CD19, FAP, CAIX или BCMA, и ii) второй TFP, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен из полипептида CD3-гамма, и фрагмент антитела, специфичный в отношении CD19, FAP, CAIX или BCMA. Первый TFP и второй TFP способны взаимодействовать друг с другом и с полипептидами эндогенных субъединиц TCR, образуя тем самым функциональный комплекс TCR.

[000384] Применение указанных Т-клеток, несущих мультиплексный гуманизированный TFP.CD19, TFP.FAP, TFP.CAIX или TFP.BCMA, продемонстрировано в гемобластозах и солидных опухолях, как это описано в примерах 2 и 3 выше.

Пример 6: Получение Т-клеток, трансдуцированных TFP

Получение лентивирусов

[000385] Лентивирус, кодирующий соответствующие конструкции, получали следующим образом. 5×10^6 HEK293FT-клеток высевали в чашку диаметром 100 мм и размножали до достижения 70-90% конfluence в течение ночи. По 2,5 мкг ДНК указанных плазмид и 20 мкл смеси для упаковки лентивируса (ALSTEM, каталожный номер VP100, см. Приложение В3) разводили в 0,5 мл DMEM или среды OPTI-MEM I без сыворотки и осторожно перемешивали. В отдельной пробирке 30 мкл реагента для трансфекции NanoFect (ALSTEM, каталожный номер NF100) разводили в 0,5 мл DMEM или среды OPTI-MEM I без сыворотки и осторожно перемешивали. Растворы NanoFect/DMEM и ДНК/DMEM смешивали и встряхивали в течение 10-15 секунд перед инкубацией смеси DMEM-плазмида-NanoFect при комнатной температуре в течение 15 минут. Полный комплекс для трансфекции, полученный на предыдущем этапе, добавляли по каплям к планшету с клетками и покачивали, чтобы равномерно диспергировать комплекс для трансфекции в планшете. Затем планшет инкубировали в течение ночи при 37 °C в инкубаторе в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. На следующий день супернатант заменяли 10 мл свежей среды, и вносили 20 мкл ViralBoost (500×, ALSTEM, каталожный номер VB100). Затем планшеты инкубировали при 37 °C еще в течение 24 часов. Супернатант, содержащий лентивирусы, затем собирали в 50 мл стерильную коническую

центрифужную пробирку с крышкой и помещали на лед. После центрифугирования при 3000 об./мин в течение 15 минут при 4 °С очищенный супернатант фильтровали с использованием стерильного фильтра с размером пор 0,45 мкм с низким связыванием белка, и вирус затем выделяли путем ультрацентрифугирования при 25000 об./мин (Beckmann, L8-70M) в течение 1,5 часов при 4 °С. Осадок удаляли и повторно суспендировали в средах DMEM, и концентрации/титры лентивирусов определяли с помощью количественной ОТ-ПЦР с использованием набора Lenti-X qRT-PCR Titration (Clontech; каталожный номер 631235). Любую остаточную плазмидную ДНК удаляли путем обработки ДНКазой I. Исходный препарат вируса немедленно использовали для инфицирования или распределяли на аликвоты и хранили при - 80 °С для последующего использования.

[000386] Аналогичные эксперименты можно осуществлять с конструкциями FAP.TFP и CAIX.TFP.

Выделение МНПК

[000387] Мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) получали из цельной крови или лейкоцитарной пленки. Цельную кровь собирали в 10 мл вакуумный контейнер с гепарином и обрабатывали немедленно или хранили в течение ночи при 4 °С. Приблизительно 10 мл цельной антикоагулированной крови смешивали со стерильным забуференным фосфатом физиологическим раствором (ФСБ), чтобы получить общий объем 20 мл в конической центрифужной пробирке объемом 50 мл (ФСБ, pH=7,4, без $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$). 20 мл смеси кровь/ФСБ затем осторожно наслаивали на поверхность 15 мл Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, 17-1440-03) перед центрифугированием при 400g в течение 30-40 мин при комнатной температуре без применения тормоза.

[000388] Лейкоцитарную пленку получали от Research Blood Components (Бостон, Массачусетс, США). Пробирки Leucosep (Greiner bio-one) подготавливали путем добавления 15 мл Ficoll-Paque (GE Health Care) и центрифугировали при 1000 g в течение 1 минуты. Лейкоцитарную пленку разводили в ФСБ в соотношении 1:3 (pH=7,4, без Ca^{2+} или Mg^{2+}). Разведенную лейкоцитарную пленку переносили в пробирку Leucosep™ и центрифугировали при 1000 g в течение 15 минут без применения тормоза. Слой клеток, содержащих мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), которые можно наблюдать на границе раздела разбавленная плазма/Ficoll, осторожно удаляли, чтобы свести к минимуму загрязнения Ficoll. Остаточный Ficoll, тромбоциты и белки плазмы затем удаляли путем промывки МНПК три раза в 40 мл ФСБ и центрифугирования при 200 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки подсчитывали с помощью гемоцитометра. Промытые МНПК промывали еще один раз средами CAR-T

(AIM V-AlbuMAX (BCA) (Life Technologies) с добавлением 5% сыворотки АВ и 1,25 мкг/мл амфотерицина В (Gemini Bioproducts, Вудланд, Калифорния, США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). В другом варианте, промытые МКПК переносили в изотермические флаконы и замораживали при -80°C в течение 24 ч перед хранением в жидком азоте для последующего использования.

[000389] Аналогичные эксперименты можно осуществлять с конструкциями FAP.TFP и CAIX.TFP.

Активация Т-клеток

[000390] Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), полученные из цельной крови или лейкоцитарной пленки, стимулировали с использованием магнитных гранул, конъюгированных с антителами к CD28 и CD3 человека, в течение 24 часов перед вирусной трансдукцией. Свежевыделенные МКПК промывали один раз в средах CAR-T (AIM V-AlbuMAX (BCA) (Life Technologies) с добавлением 5% сыворотки АВ и 1,25 мкг/мл амфотерицина В (Gemini Bioproducts), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) без huИЛ-2, перед повторным суспендированием до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл в средах CAR-T с добавлением 300 МЕ/мл ИЛ-2 человека (из $1000\times$ исходного раствора; Invitrogen). Если МНПК ранее были заморожены, то их оттаивали и повторно суспендировали в концентрации 1×10^7 клеток/мл в 9 мл подогретой (37°C) среды DMEM (Life Technologies) в присутствии 10% ФБС, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при концентрации 1×10^6 клеток/мл перед еще одной промывкой в среде CART с повторным суспендированием, чтобы получить концентрацию 1×10^6 клеток/мл в среде CAR-T, после этого добавляли ИЛ-2, как описано выше.

[000391] Перед активацией магнитные гранулы, конъюгированные с антителами к CD28 и CD3 человека, (Invitrogen), промывали три раза в 1 мл стерильного ФСБ ($1\times$), pH=7,4, с использованием магнитной стойки, чтобы выделить гранулы из раствора, перед повторным суспендированием в среде CAR-T с добавлением 300 МЕ/мл ИЛ-2 человека до конечной концентрации 4×10^7 гранул/мл. МКПК и гранулы затем смешивали в соотношении 1:1 гранулы/клетки путем перенесения 25 мкл (1×10^6 гранул) гранул в 1 мл МКПК. Желаемое число аликвот затем распределяли в одиночные лунки 12-луночного планшета для культивирования клеток с низкой адгезией или необработанного планшета для культивирования клеток, и инкубировал при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 24 часов перед вирусной трансдукцией.

[000392] Аналогичные эксперименты можно осуществлять с конструкциями FAP.TFP и CAIX.TFP.

Трансдукция/трансфекция и пролиферация Т-клеток

[000393] После активации МКПК инкубировали в течение 24 ч при 37 °С, 5% CO₂. Лентивирус оттаивали на льду, и 5×10^6 лентивирусных частиц вместе с 2 мкл Transplus (Alstem) на 1 мл сред (конечное разведение 1:500) добавляли в каждую лунку к 1×10^6 клеток. Клетки инкубировали в течение еще 24 ч перед повторным добавлением вируса. В другом варианте, лентивирус оттаивали на льду, и соответствующий вирус добавляли при 5 или 50 MOI в присутствии 5 мкг/мл полибрена (Sigma). Клетки инокулировали путем осаждения при 100 g в течение 100 мин при комнатной температуре. Затем клетки размножали в присутствии 300 МЕ/мл ИЛ-2 человека в течение 6-14 дней (общее время инкубации зависит от конечного числа необходимых CAR-T-клеток). Концентрации клеток исследовали каждые 2-3 дня, в это же время добавляли среды для поддержания клеточной суспензии в плотности 1×10^6 клеток/мл.

[000394] В некоторых случаях активированные МКПК подвергали электропорации транскрибируемой в условиях *in vitro* (IVT) иРНК (Фиг. 14). МКПК человека стимулировали с помощью гранул Dynabeads (ThermoFisher) в соотношении 1:1 в течение 3 дней в присутствии 300 МЕ/мл рекомбинантного ИЛ-2 человека (R&D System). Гранулы удаляли перед электропорацией. Клетки промывали и повторно суспендировали в среде OPTI-MEM (ThermoFisher) в концентрации $2,5 \times 10^7$ клеток/мл. По 200 мкм суспензии клеток (5×10^6 клеток) переносили в кюветы с 2 мм зазором Electroporation Cuvettes Plus™ (Harvard Apparatus BTX) и предварительно охлаждали на льду. 10 мкг IVT иРНК TFP добавляли к суспензии клеток. Смесь иРНК/клетка затем подвергали электропорации при 200 В в течение 20 мс с использованием системы для электропорации ECM830 Square Wave (Harvard Apparatus BTX). Сразу после электропорации клетки переносили в свежую среду для культивирования клеток (не содержащая сыворотки среда AIM V AlbuMAX (BCA) + 5% сыворотки АВ человека + 300 МЕ/мл ИЛ-2) и инкубировали при 37 °С.

[000395] Аналогичные эксперименты можно осуществлять с конструкциями FAP.TFP и CAIX.TFP.

Подтверждение экспрессии TFP с помощью окрашивания клеток

[000396] После лентивирусной трансдукции или электропорации иРНК экспрессию анти-CD19, анти-FAP, анти-CAIX и анти-BCMA CAR и TFP подтверждали с помощью проточной цитометрии с использованием антитела к Fab мыши для детектирования мышиного анти-CD19, анти-FAP, анти-CAIX или анти-BCMA scFv. Т-клетки промывали три раза в 3 мл буфера для окрашивания (ФСБ, 4% БСА) и повторно суспендировали в ФСБ до достижения концентрации 1×10^6 клеток на лунку. Для исключения мертвых клеток клетки инкубировали с Live dead aqua (Invitrogen) в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали в ФСБ и повторно суспендировали в 50 мкл буфера для окрашивания.

Чтобы блокировать рецепторы Fc 1 мкл нормального козьего IgG, разбавленного в соотношении 1:100 (Life Technologies), добавляли в каждую пробирку и инкубировали на льду в течение 10 мин. По 1 мл буфера для проточной цитометрии добавляли в каждую пробирку, хорошо перемешивали, и клетки осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. Поверхностную экспрессию scFv TFP детектировали с использованием меченых биотином нормальных поликлональных антител козы к F(ab)₂ антитела мыши (Life Technologies), при этом меченые биотином нормальные поликлональные антитела IgG козы (Life Technologies) использовали в качестве контроля изотипа. Оба антитела добавляли в концентрации 10 мкг/мл в реакционном объеме 100 мкл. Клетки затем инкубировали при 4 °C в течение 45 мин, промывали один раз, повторно суспендировали в буфере для проточной цитометрии, и блокировали с использованием нормального IgG мыши (Invitrogen) путем добавления 100 мкл нормального IgG мыши, разбавленного в соотношении 1:1000, в каждую пробирку. Затем клетки инкубировали на льду в течение 10 мин, промывали буфером для окрашивания и повторно суспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания. Затем клетки окрашивали путем добавления 1,0 мкл меченого фикоэритрином (PE) стрептавидина (BD Biosciences), и APC-конъюгированное антитело к CD3 человека (клон-UCHT1, BD Biosciences), PerCP/Cy5.5-конъюгированное антитело к CD8 человека (клон-SK1, BD Biosciences) и Pacific Blue-конъюгированное антитело к CD4 человека (клон-RPA-T4 BD Biosciences) добавляли в каждую пробирку. Проточную цитометрию проводили с использованием LSRFortessaTM X20 (BD Biosciences), и данные получали с использованием программного обеспечения FACS diva и анализировали с помощью FlowJo (Treestar, Inc., Ашланд, Орегон, США). От 20% до 40% трансдуцированных Т-клеток экспрессировали CD19-связывающий CAR, CD19-связывающий LL TFP, CD19-связывающий SL TFP или BCMA-связывающий TFP, что указывает на сопоставимые уровни трансдукции и поверхностной экспрессии конструкций CAR и TFP (Фиг. 5-7).

[000397] Аналогичные эксперименты можно осуществлять с конструкциями FAP.TFP и CAIX.TFP.

Пример 7: Количественное исследование цитотоксичности методом проточной цитометрии

[000398] Клетки-мишени, которые были положительными или отрицательными в отношении соответствующих мишеней CD19, FAP, CAIX или BCMA, помечали с помощью флуоресцентного красителя, сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE). Указанные клетки-мишени смешивали с эффекторными Т-клетками, которые представляли собой нетрансдуцированные клетки, трансдуцированные контрольными

конструкциями CAR-T клетки или клетки, трансдуцированные TFP. После указанного периода инкубации процент мертвых или живых CFSE-меченых клеток-мишеней и клеток-мишеней для отрицательного контроля определяли для каждой культуры эффектор/клетка-мишень с помощью проточной цитометрии. Процент выживаемости клеток-мишеней в каждой культуре Т-клетка + клетка-мишень рассчитывали по отношению к лункам, содержащим только клетки-мишени.

[000399] Цитотоксическую активность эффекторных Т-клеток измеряли методом проточной цитометрии путем сравнения количества выживших клеток-мишеней в отсутствие или в присутствии эффекторных Т-клеток после совместной инкубации эффекторных клеток и клеток-мишеней. В экспериментах с использованием CD19 TFP или CAR-T-клеток клетки-мишени представляли собой CD19-положительные клетки лимфомы Беркитта линии Raji (ATCC, CCL-86), в то время как клетки, используемые в качестве отрицательного контроля, представляли собой CD19-отрицательные клетки линии K562 (ATCC, CCL-243). В экспериментах с использованием BCMA TFP Т-клеток клетки-мишени представляли собой BCMA-положительные RPMI-8226 плазмацитомные/миеломные клетки (ATCC, CCL-155), в то время как клетки, используемые в качестве отрицательного контроля, представляли собой BCMA-отрицательные клетки лимфомы Беркитта линии Raji (ATCC, CCL-86).

[000400] Клетки-мишени промывали один раз и повторно суспендировали в ФСБ до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл. Флуоресцентный краситель, сукцинимиდიловый эфир карбоксифлуоресцеина (CFSE) (ThermoFisher), добавляли к суспензии клеток в концентрации 0,03 мкМ, и клетки инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Реакцию мечения останавливали путем добавления к суспензии клеток полноценной культуральной среды (RPMI-1640 + 10% HI-FBS) в объеме, который в 5 раз превышал реакционный объем, и клетки инкубировали в течение еще 2 мин при комнатной температуре. Клетки осаждали центрифугированием и повторно суспендировали в среде для оценки цитотоксичности (не содержащая фенолового красного среда RPMI1640 (Invitrogen) с добавлением 5% сыворотки АВ (Gemini Bioproducts) до конечной концентрации 2×10^5 клеток/мл. Пятьдесят микролитров суспензии клеток-мишеней, меченых CFSE (эквивалентно 10000 клеток), добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном (Corning).

[000401] Эффекторные Т-клетки трансдуцированные конструкциями BCMA TFP, совместно с нетрансдуцированными Т-клетками в качестве отрицательного контроля, промывали и суспендировали до конечной концентрации 2×10^6 клеток/мл или 1×10^6 клеток/мл в среде для оценки цитотоксичности. По 50 мкл суспензий эффекторных Т-

клеток (эквивалентно 100000 или 50000 клеток) добавляли к высаженным клеткам-мишеням, чтобы получить соотношение эффекторные клетки:клетки-мишени 10:1 или 5:1, соответственно, в общем объеме 100 мкл. Культуры затем смешивали, осаждали и инкубировали в течение 4 часов при 37 °C, 5% CO₂. Немедленно после указанной инкубации 7AAD (7-аминоактиномицин D) (BioLegend) добавляли к культуре клеток, как рекомендовано изготовителем, и исследование методом проточной цитометрии проводили с помощью BD Fortessa X-20 (BD Biosciences). Анализ данных проточной цитометрии проводили с использованием программного обеспечения FlowJo (TreeStar, Inc).

[000402] Процент выживания для клеток-мишеней RPMI-8226 рассчитывали путем деления числа живых клеток-мишеней RPMI-8226 (CFSE+ 7-AAD) в образце, содержащем эффекторные Т-клетки и клетки-мишени, на количество живых клеток RPMI-8226 (CFSE+ 7-AAD) в образце, содержащем только клетки-мишени. Цитотоксичность для эффекторных клеток рассчитывали как процент гибели клеток для RPMI-8226=100% - процент выживания для клеток RPMI-8226.

[000403] Как было описано ранее, Т-клетки, трансдуцированные анти-CD19-28ζ конструкцией CAR, проявляли цитотоксичность в отношении CD19-экспрессирующих В-клеток Raji, по сравнению с Т-клетками, которые не были трансдуцированы или были трансдуцированы контрольной конструкцией CAR, не обладающей специфичностью в отношении CD19 (Фиг. 8). Однако Т-клетки, трансдуцированные анти-CD19-CD3ε, более эффективно индуцировали цитотоксичность в отношении мишеней Raji, чем CD19-связывающая контрольная конструкция CAR, при всех проверенных соотношениях эффектор:мишень. Анти-CD19-CD3γ TFP также вызывали устойчивую цитотоксичность, которая превышала цитотоксичность, наблюдаемую при использовании CD19-связывающих CAR, при соотношениях эффектор:мишень от 5 до 10:1 (Фиг. 8). Некоторую степень цитотоксичности наблюдали при использовании CD19-связывающего TCRα TFP и CD19-связывающего TCRβ TFP. Аналогичные результаты были получены при использовании CD19-связывающего TFP, который был сконструирован с другой шарнирной областью. Аналогичным образом, цитотоксичность в отношении CD19-экспрессирующих клеток-мишеней Raji была больше при использовании Т-клеток, трансдуцированных CD19-связывающим CD3ε TFP или CD19-связывающим CD3γ TFP, чем цитотоксичность, наблюдаемая для Т-клеток, трансдуцированных CD19-связывающим CAR.

[000404] Т-клетки, которые подвергали электропорации с использованием иРНК, кодирующей TFP, специфичные в отношении CD19, также проявляли устойчивую цитотоксичность в отношении CD19-экспрессирующих В-клеток Raji, тогда как при

использовании контрольной конструкции или конструкций CD19-связывающих TRuC не было обнаружено существенной гибели CD19-отрицательных клеток K562, CD19-специфичную гибель клеток Raji наблюдали при использовании Т-клеток, трансдуцированных анти-CD19-CD3 ϵ SL или анти-CD19-CD3 γ SL TRuC (Фиг. 14).

[000405] Т-клетки, трансдуцированные TFP, специфичным в отношении В-клеточного антигена созреваия (BCMA), также проявляли устойчивую цитотоксичность в отношении BCMA-экспрессирующих клеток RPMI8226. Т-клетки, трансдуцированные анти-BCMA-CD3 ϵ или анти-BCMA-CD3 γ TFP, эффективно индуцировали цитотоксичность в отношении BCMA-экспрессирующих клеток-мишеней RPMI8226. При соотношении эффекторные клетки:клетки-мишени 10:1 почти 100% клеток-мишеней подвергались цитолизу (Фиг. 9).

[000406] Аналогичные эксперименты можно осуществлять с конструкциями FAP.TFP и CAIX.TFP.

Пример 8: Оценка цитотоксичности с помощью количественного исследования цитотоксичности в режиме реального времени

[000407] CD19-связывающие и BCMA-связывающие TFP также проявляли превосходную цитотоксичность по сравнению с CD19-связывающими CAR в формате количественного исследования цитотоксичности в режиме реального времени (RTCA). Количественное исследование RTCA позволяет измерить электрическое сопротивление прикрепленного монослоя клеток-мишеней в каждой лунке специализированного 96-луночного планшета в режиме реального времени и позволяет получить окончательный показатель в виде значения, которое называется клеточный индекс. Изменения клеточного индекса указывают на разрушение монослоя клеток-мишеней в результате гибели клеток-мишеней при совместной инкубации с эффекторными Т-клетками. Следовательно, цитотоксичность эффекторных Т-клеток может быть оценена как изменение клеточного индекса лунок, содержащих клетки-мишени и эффекторные Т-клетки, по сравнению с лунками, содержащими только клетки-мишени.

[000408] Клетки-мишени для RTCA представляли собой клетки линии HeLa, экспрессирующие CD19 (CD19-HeLa) или BCMA (BCMA-HeLa), при этом исходные нетрансдуцированные клетки линии HeLa использовали в качестве отрицательного контроля. ДНК, кодирующую полноразмерный CD19 человека или BCMA человека, синтезировали в GeneArt (ThermoFisher) и встраивали в сайт множественного клонирования лентивирусного вектора с двумя промоторами, pCDH514B (System Bioscience), несущего неомицин в качестве селективного маркера, под контролем промотора EF1a. Лентивирус, несущий вектор, кодирующий CD19, или вектор,

кодирующий ВСМА, затем упаковывали. Клетки линии HeLa трансдуцировали с использованием лентивирусов, несущих CD19 или ВСМА, в течение 24 часов и затем отбирали в присутствии G418 (1 мг/мл). Экспрессию CD19 или ВСМА трансдуцированными клетками CD19-HeLa или ВСМА-HeLa подтверждали методом проточной цитометрии с использованием антител к CD19 человека или к ВСМА человека (BioLegend, клон 19A2; Miltenyi, клон REA315).

[000409] Прикрепленные клетки-мишени культивировали в среде DMEM с добавлением 10% ФБС, 1% смеси антибиотиков и противогрибковых агентов (Life Technologies). Чтобы получить RTCA 50 мкл среды RPMI добавляли в соответствующие лунки Е-планшета (ACEA Biosciences, Inc., каталожный номер JL-10-156010-1A). Затем планшет помещали в прибор RTCA MP (ACEA Biosciences, Inc.), и соответствующий макет планшета и график количественного исследования вводили в программу RTCA 2.0, как описано в руководстве производителя. Измерение в начальных условиях проводили каждые 15 мин, чтобы получить 100 измерений. Затем к каждой исследуемой лунке добавляли 1×10^4 клеток-мишеней в объеме 100 мкл, и клетки оставляли в покое для осаждения в течение 15 минут. Планшет возвращали в считывающее устройство и возобновляли регистрацию показаний.

[000410] На следующий день эффекторные Т-клетки промывали и повторно суспендировали в среде для исследования цитотоксичности (не содержащая фенолового красного среда RPMI1640 (Invitrogen) с добавлением 5% сыворотки АВ (Gemini Bioproducts; 100-318)). Планшет затем извлекали из прибора, и эффекторные Т-клетки, суспендированные в среде для оценки цитотоксичности (не содержащая фенолового красного среда RPMI1640 (Invitrogen) с добавлением 5% сыворотки АВ), добавляли в каждую лунку в количестве 100000 клеток или 50000 клеток, чтобы достичь соотношения эффекторные клетки:клетки-мишени 10:1 или 5:1, соответственно. Планшет затем помещали обратно в прибор. Измерение проводили каждые 2 мин для получения 100 измерений и затем через каждые 15 мин для получения 1000 измерений.

[000411] В количественном исследовании RTCA гибель CD19-трансдуцированных клеток линии HeLa наблюдали при использовании Т-клеток, трансдуцированных анти-CD19-28 ζ CAR, о чем свидетельствовало уменьшение клеточного индекса в зависимости от времени после добавления эффекторных клеток, по сравнению с клетками линии HeLa по отдельности или клетками линии HeLa, которые инкубировали совместно с Т-клетками, трансдуцированными контрольной конструкцией CAR (Фиг. 11). Однако гибель клеток-мишеней под действием Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19-CD3 ϵ TFP или анти-ВСМА-CD3 γ TFP, была более выраженной и быстрой, чем та, которую наблюдали

при использовании CD19-связывающего CAR. Например, в течение 4 часов после добавления Т-клеток, трансдуцированных анти-CD19-CD3 ϵ TFP, наблюдали почти полную гибель CD19-экспрессирующих клеток-мишеней. При использовании Т-клеток, трансдуцированных рядом конструкций TFP, содержащих другие CD3 и TCR, наблюдали незначительную гибель клеток-мишеней или гибель клеток отсутствовала. Аналогичные результаты были получены при действии CD19-связывающих TFP, сконструированных с использованием другой шарнирной области. Цитотоксичность в отношении CD19-трансдуцированных клеток-мишеней линии HeLa также была выше для Т-клеток, трансдуцированных анти-CD19-CD3 ϵ TFP или анти-CD19-CD3 γ TFP, чем при использовании Т-клеток, трансдуцированных CD19-связывающим CAR.

[000412] Т-клетки, трансдуцированные ВСМА-связывающими TFP, также проявляли устойчивую цитотоксичность в отношении ВСМА-экспрессирующих клеток RPMI8226. Как показано на Фиг. 9, Т-клетки, трансдуцированные анти-ВСМА-CD3 ϵ TFP или анти-ВСМА-CD3 γ TFP, эффективно индуцировали цитотоксичность в отношении ВСМА-экспрессирующих клеток-мишеней RPMI8226. При соотношении эффекторные клетки:клетки-мишени 10:1 почти 100% клеток-мишеней подвергались цитолизу (Фиг. 12).

[000413] Цитотоксическая активность TFP-трансдуцированных Т-клеток зависела от дозы по отношению к количеству вируса (MOI), использованному для трансдукции. Увеличение степени гибели клеток CD19-HeLa наблюдали при увеличении MOI лентивирусов, несущих анти-CD19-CD3 ϵ TFP, дополнительно усиливая взаимосвязь между трансдукцией TFP и цитотоксической активностью (Фиг. 13).

[000414] Аналогичные эксперименты можно осуществлять с конструкциями FAP.TFP и CAIX.TFP.

Пример 9: Исследование секреции ИЛ-2 и ИФН- γ методом ИФА

[000415] Другой мерой активации и пролиферации эффекторных Т-клеток, связанной с распознаванием клеток, несущих родственный антиген, является выработка эффекторных цитокинов, таких как интерлейкин-2 (ИЛ-2) и интерферон-гамма (ИФН- γ).

[000416] Количественные исследования методом ИФА для определения ИЛ-2 человека (каталожный номер EH2IL2, Thermo Scientific) и ИФН- γ (каталожный номер KHC4012, Invitrogen) осуществляли, как описано в листках-вкладышах. В общих чертах, по 50 мкл разведенных стандартов или образцов в двух повторах добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета и затем вносили по 50 мкл биотинилированного антитела. Образцы смешивали, осторожно постукивая планшет несколько раз. По 50 мкл стандартного раствора для разведения затем добавляли во все лунки, которые не

содержали стандартов или образцов, и планшет тщательно запечатывали клейкой крышкой планшета перед инкубацией в течение 3 часов при комнатной температуре (20-25 °C). Крышку планшета затем удаляли, содержимое планшетов также удаляли, и каждую лунку заполняли промывочным буфером. Процедуру промывки повторяли в общей сложности 3 раза, и планшет переносили на бумажные полотенца или другой абсорбирующий материал. По 100 мкл приготовленного раствора стрептавидин-ПХ добавляли в каждую лунку, и закрывали новой крышкой планшета перед инкубацией в течение 30 минут при комнатной температуре. Крышку планшета затем удаляли, содержимое планшетов также удаляли, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата ТМВ. Реакционную смесь оставляли на 30 мин для проявления окрашивания при комнатной температуре в темноте, после чего в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора для остановки реакции. Проводили измерение оптической плотности в планшете. Оптическую плотность измеряли в течение 30 минут после остановки реакции на планшет-ридере для ИФА при длине волны 450 нм и 550 нм. Значения, полученные при регистрации при 550 нм, вычитали из значений, полученных при регистрации при 450 нм, и количество ИЛ-2 в неизвестных образцах рассчитывали по отношению к значениям, полученным из стандартной кривой ИЛ-2.

[000417] В другом варианте, количественные исследования в формате 2-Plex проводили с использованием набора Human Cytokine Magnetic Buffer Reagent (Invitrogen, LNB0001M), набора Human IL-2 Magnetic Bead (Invitrogen, LHC0021M) и набора Human IFN- γ Magnetic Bead (Invitrogen, LHC4031M). В общих чертах, по 25 мкл гранул, конъюгированных с антителом к ИЛ-2 человека, и гранул, конъюгированных с антителом к ИФН- γ , добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета и промывали, используя следующие рекомендации: две промывки с использованием 200 мкл 1 $\times$ промывочного раствора, приведение планшета в контакт с магнитным сепаратором для 96-луночного планшета (Invitrogen, A14179), инкубация гранул в течение 1 мин для осаждения и декантирование жидкости. Затем 50 мкл инкубационного буфера добавляли в каждую лунку планшета, содержащую 100 мкл разведенных стандартов в двух повторах, или 50 мкл образцов (супернатантов из количественных исследований цитотоксичности) и 50 мкл раствора для разведения для количественного исследования в трех повторах в общем объеме 150 мкл. Образцы смешивали в темноте при 600 об./мин с использованием орбитального шейкера с орбитальным радиусом 3 мм в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшет промывали в соответствии с вышеупомянутыми принципами промывки, и в каждую лунку добавляли 100 мкл биотинилированного детектирующего антитела к ИЛ-2 и антитела к ИФН- γ . Образцы смешивали в темноте при 600 об./мин с

использованием орбитального шейкера с орбитальным радиусом 3 мм в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывали в соответствии с вышеупомянутыми принципами промывки, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл стрептавидина-R-фикоэритрина. Образцы смешивали в темноте при 600 об./мин с использованием орбитального шейкера с орбитальным радиусом 3 мм в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшет промывали 3 раза в соответствии с вышеупомянутыми принципами промывки, и после декантирования жидкости образцы повторно суспендировали в 150 мкл 1× промывочного раствора. Образцы смешивали в темноте при 600 об./мин с использованием орбитального шейкера с орбитальным радиусом 3 мм в течение 3 мин и хранили в течение ночи при 4 °C. После этого планшет промывали в соответствии с вышеупомянутыми принципами промывки, и образцы повторно суспендировали в 150 мкл 1× промывочного раствора.

[000418] Планшет считывали с использованием системы MAGPIX (Luminex) и программного обеспечения xPONENT. Анализ полученных данных проводили с использованием аналитического программного обеспечения MILLIPLEX, которое обеспечивает стандартную кривую и концентрации цитокинов.

[000419] На Фиг. 15 показано, что, по сравнению с нетрансдуцированными клетками, или Т-клетками, трансдуцированными контрольным CAR, Т-клетки, трансдуцированные CD19-связывающим TFP, вырабатывают более высокие уровни ИЛ-2 и ИФН- γ при совместном культивировании с клетками Raji, которые эндогенно экспрессируют CD19, или с CD19-трансдуцированными клетками линии HeLa. Напротив, совместное культивирование с CD19-отрицательными клетками K562 или нетрансдуцированными клетками HeLa приводит к незначительному высвобождению цитокинов из TFP-трансдуцированных Т-клеток или вообще не сопровождается выработкой цитокинов. В соответствии с предыдущими данными по цитотоксичности CD19-связывающие TFP, сконструированные с использованием другой шарнирной области, обеспечивают аналогичные результаты при совместном культивировании с клетками-мишенями, несущими CD19 (Фиг. 16).

[000420] В соответствии с предыдущими данными по цитотоксичности анти-CD19-CD3 ϵ и анти-CD19-CD3 γ обеспечивают самые высокие уровни ИЛ-2 и ИФН- γ из всех конструкций TFP (Фиг. 15 и 16). Однако выработка цитокинов Т-клетками, трансдуцированными анти-CD19-CD3 ϵ TFP и анти-CD19-CD3 γ TFP, была сопоставима с таковой для Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 28 ζ CAR, несмотря на TFP, демонстрирующие намного более высокие уровни лизиса клеток-мишеней (Фиг. 8 и 11). Возможность того, что TFP могут более эффективно лизировать клетки-мишени, чем

CAR, но при этом высвобождают сопоставимые или более низкие уровни провоспалительных цитокинов, представляет собой потенциальное преимущество TFR по сравнению с CAR, поскольку повышенные уровни указанных цитокинов были связаны с ограничивающей дозой токсичностью для различных способов адоптивной терапии с применением CAR-T.

[000421] Т-клетки, трансдуцированные анти-BCMA-CD3 ϵ TFR или анти-BCMA-CD3 γ TFR, также вырабатывали ИЛ-2 и ИФН- γ при совместном культивировании с клетками BCMA-HeLa, но не контрольными клетками линии HeLa, которые не экспрессируют BCMA (Фиг. 17).

[000422] Аналогичные эксперименты можно осуществлять с конструкциями FAP.TFR и CAIX.TFR.

Пример 10: Исследование поверхностного экспонирования CD107a методом проточной цитометрии

[000423] Дополнительный количественный способ исследования активации Т-клеток заключается в оценке поверхностного экспонирования CD107a, связанного с лизосомами мембранного белка (LAMP-1), который расположен в мембране цитоплазматических цитолитических гранул покоящихся клеток. Дегрануляция эффекторных Т-клеток, которая является необходимым условием для цитолитической активности, приводит к мобилизации CD107a к поверхности клетки после индуцированного активацией экзоцитоза гранул. Следовательно, поверхностное экспонирование CD107a обеспечивает дополнительную меру активации Т-клеток, помимо выработки цитокинов, которая сильно коррелирует с цитотоксичностью.

[000424] Клетки-мишени и эффекторные клетки промывали по отдельности и повторно суспендировали в среде для оценки цитотоксичности (RPMI + 5% сыворотки АВ человека + 1% смеси антибиотиков и противогрибковых агентов). Количественное исследование проводили путем комбинирования 2×10^5 эффекторных клеток с 2×10^5 клеток-мишеней в 100 мкл конечного объема в 96-луночных планшетах с U-образным дном (Corning) в присутствии 0,5 мкл/лунку PE/Cy7-меченого антитела к CD107a человека (LAMP-1) (клон H4A3, BD Biosciences). Культуры затем инкубировали в течение 1 часа при 37 °C, 5% CO₂. Немедленно после инкубации 10 мкл ингибитора секреции монтензина, разбавленного в соотношении 1:10 (1000 $\times$ раствор, BD GolgiStopTM), осторожно добавляли в каждую лунку, не затрагивая клетки. Затем планшеты инкубировали в течение еще 2,5 часов при 37 °C, 5% CO₂. После указанной инкубации клетки окрашивали APC-конъюгированным антителом к CD3 человека (клон UCHT1, BD Biosciences), PerCP/Cy5.5-конъюгированным антителом к CD8 человека (клон SK1, BD Biosciences) и

меченым Pacific Blue антителом к CD4 человека (клон RPA-T4, BD Biosciences), и затем инкубировали в течение 30 минут при 37 °C, 5% CO₂. Клетки затем промывали 2 раза буфером для проточной цитометрии и ресуспендировали в 100 мкл буфера для проточной цитометрии и в 100 мкл буфера IC fix перед проведением исследования.

[000425] Экспонирование CD107a на поверхности Т-клеток определяли методом проточной цитометрии. Проточную цитометрию проводили на приборе LSRFortessa™ X20 (BD Biosciences), и анализ данных проточной цитометрии выполняли с использованием программного обеспечения FlowJo (Treestar, Inc., Эшланд, Орегон, США). Процент эффекторных клеток CD8⁺ в пропущенной популяции CD3, которые были CD107⁺ve, определяли для каждой культуры эффекторные клетки/клетки-мишени.

[000426] В соответствии с предыдущими данными по цитотоксичности и высвобождению цитокинов совместное культивирование CD19-экспрессирующих клеток-мишеней, таких как клетки Raji или Nalm-6, с эффекторными Т-клетками, трансдуцированными анти-CD19 28ζ CAR, индуцировало увеличение поверхностного экспонирования CD107a в 3-5 раз, по сравнению с действием эффекторных клеток, инкубированных с CD19-ve клетками-мишенями (Фиг. 18). Для сравнения, в тех же условиях анти-CD19-CD3ε LL или анти-CD19-CD3γ LL TFP-экспрессирующие эффекторные клетки индуцировали поверхностное экспонирование CD107a в 5-7 раз сильнее. CD19-связывающие TFP, сконструированные с использованием другой шарнирной области, оказывали аналогичное действие после совместного культивирования с клетками-мишенями, несущими CD19.

[000427] По сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками, клетки, трансдуцированные анти-BCMA-CD3ε или анти-BCMA-CD3γ TFP, также увеличивали поверхностное экспонирование CD107a при совместном культивировании с клетками BCMA⁺ve RPMI8226 (Фиг. 19). Полученные результаты указывают на то, что TFP-трансдуцированные эффекторные Т-клетки активируются и подвергаются дегрануляции при воздействии клеток-мишеней, экспрессирующих когнатный антиген.

[000428] Аналогичные эксперименты можно осуществлять с конструкциями FAP.TFP и CAIX.TFP.

Пример 11: Исследования эффективности у мышей в условиях *in vivo*

[000429] Чтобы оценить способность эффекторных Т-клеток, трансдуцированных CD19-связывающими TFP, вызывать противоопухолевые ответы в условиях *in vivo*, эффекторные Т-клетки, трансдуцированные анти-CD19-28ζ CAR, анти-CD19-CD3ε LL TFP или анти-CD19-CD3γ LL TFP, адаптивно переносили мышам линии NOD/SCID/IL-

2R γ -/- (NSG-JAX), которым ранее прививали клетки лейкоза человека CD19+ Raji или Nalm6.

[000430] Самок мышей линии NOD/SCID/IL-2R γ -/- (NSG-JAX), в возрасте не менее 6 недель до начала исследования, получали из The Jackson Laboratory (артикул 005557) и акклиматизировали в течение 3 дней перед использованием в экспериментах. Клетки лейкоза человека Raji и NALM-6 для прививки поддерживали в логарифмической фазе в культуре до сбора и подсчета с использованием трипанового синего, чтобы определить число жизнеспособных клеток. В день прививки опухоли клетки центрифугировали при 300g в течение 5 мин и повторно суспендировали в предварительно нагретом стерильном ФСБ до достижения концентрации 1×10^6 клеток/100 мкл (NALM-6) или 5×10^5 клеток/100 мкл (Raji). Готовили Т-клетки для адоптивного переноса, которые не были трансдуцированы или были трансдуцированы конструкциями анти-CD19-28 ζ CAR, анти-CD19-CD3 ϵ LL TFP или анти-CD3 γ LL TFP. В 0-й день исследования 10 животных в каждой экспериментальной группе иммунизировали путем внутривенного введения 5×10^5 клеток линии Raji или 1×10^6 клеток линии NALM-6. Через 3 дня 5×10^6 указанных популяций эффекторных Т-клеток внутривенно вводили каждому животному в 100 мкл стерильного ФСБ. Результаты подробных клинических наблюдений за животными регистрировали ежедневно до проведения эвтаназии. Измерения массы тела проводили у всех животных еженедельно до смерти или эвтаназии. Всех животных умерщвляли через 35 дней после адоптивного переноса исследуемых и контрольных продуктов. Любых животных с признаками агонии в ходе исследования умерщвляли по усмотрению руководителя исследования после консультации с ветеринаром.

[000431] По сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками адоптивный перенос Т-клеток, трансдуцированных анти-CD19-28 ζ CAR, анти-CD19-CD3 ϵ LL TFP или анти-CD19-CD3 γ LL TFP, увеличивал выживаемость мышей, несущих опухоль Raji (Фиг. 20А) и Nalm6 (Фиг. 20В), это свидетельствует о том, что Т-клетки, трансдуцированные CD19-связывающим CAR и TFP, были способны вызывать гибель клеток-мишеней с соответствующим увеличением выживаемости в указанных мышинных моделях. В совокупности полученные данные указывают на то, что TFP представляют собой альтернативную платформу для модификации химерных рецепторов, которые проявляют превосходную антигенспецифичную цитолитическую активность по сравнению с CAR первого поколения в условиях *in vitro* и в условиях *in vivo*.

[000432] Аналогичные эксперименты можно осуществлять с конструкциями FAP.TFP и CAIX.TFP.

[000433] Несмотря на то, что предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения были представлены и описаны в настоящем документе, специалисты в данной области техники поймут, что указанные варианты реализации приведены исключительно в качестве примера. Многочисленные варианты, изменения и замены будут очевидны специалистам в данной области техники без отступления от сущности настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантов реализации настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, могут быть использованы при реализации настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что способы и конструкции в пределах объема указанной формулы изобретения и их эквиваленты тем самым включены в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая

(I) Т-клетку из субъекта-человека, причем Т-клетка содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, кодирующую гибридный белок (TFP) Т-клеточного рецептора (TCR), причем TFP содержит:

- (a) субъединицу TCR, содержащую
 - (i) по меньшей мере часть внеклеточного домена TCR,
 - (ii) трансмембранный домен TCR, и
 - (iii) внутриклеточный домен TCR; и
- (b) антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD19 или В-клеточный антиген созревания (BCMA);

причем внеклеточный домен TCR субъединицы TCR и антигенсвязывающий домен функционально связаны, и

при этом указанный TFP встраивается в TCR при экспрессии в Т-клетке; и

(II) фармацевтически приемлемый носитель.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой внутриклеточный домен TCR, содержащий стимулирующий домен из внутриклеточного сигнального домена CD3-эпсилон, CD3 гамма или CD3 дельта.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, в которой внеклеточный домен TCR, трансмембранный домен TCR и/или внутриклеточный домен TCR субъединицы TCR являются из CD3-эпсилон, CD3 гамма, CD3 дельта, TCR альфа или TCR бета.4.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, в которой антигенсвязывающий домен представляет собой домен антитела млекопитающего.

5. Фармацевтическая композиция по п. 4, в которой домен антитела млекопитающего является доменом мышинового, человеческого или гуманизированного антитела.

6. Фармацевтическая композиция по п. 4 или 5, в которой домен антитела млекопитающего содержит scFv или однодоменное антитело, причем однодоменное антитело необязательно представляет собой V_H домен.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-6, в которой домен антитела млекопитающего специфически связывает CD19.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, в которой антигенсвязывающий домен содержит (i) CDR1 легкой цепи (LC), LC CDR2 и LC CDR3 аминокислотной последовательности анти-CD19 связывающего домена легкой цепи, которые на 70-100% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 29, соответственно, и/или (ii) CDRтяжелой цепи (HC), HC CDR2 и HC CDR3 аминокислотной

последовательности анти-CD19 связывающего домена тяжелой цепи, которые на 70-100% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 35, соответственно.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-6, в которой антигенсвязывающий домен связывает BCMA.

10. Фармацевтическая композиция по п. 9, в которой антигенсвязывающий домен содержит (i) CDR1 легкой цепи (LC), LC CDR2 и LC CDR3 аминокислотной последовательности анти-BCMA связывающего домена легкой цепи, которые на 70-100% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41, соответственно, и/или (ii) CDRтяжелой цепи (HC), HC CDR2 и HC CDR3 аминокислотной последовательности анти-BCMA связывающего домена тяжелой цепи, которые на 70-100% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 47, соответственно.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-10, в которой антигенсвязывающий домен и внеклеточный домен TCR субъединицы TCR функционально связаны линкерной последовательностью, причем необязательно линкерная последовательность содержит $(G_4S)_n$, где n= от 1 до 4.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-11, в которой по меньшей мере два из (i), (ii) и (iii) происходят из одной и той же субъединицы TCR, причем необязательно (i), (ii) и (iii) происходят из одной и той же субъединицы.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-12, в которой молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую костимулирующий домен, необязательно костимулирующий домен представляет собой функциональный сигнальный домен, полученный из белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) и 4-1BB (CD137), и их аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере одну, но не более 20 модификаций.

14. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1-13, в которой указанная Т-клетка представляет собой первичную Т-клетку.

15. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1-14, в которой указанная Т-клетка представляет собой CD8+ или CD4+ Т-клетку.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-15, в которой Т-клетка дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую по меньшей мере часть ингибирующей молекулы, где по меньшей мере часть ингибирующей молекулы ассоциирует со вторым полипептидом, который содержит

положительный сигнал из внутриклеточного сигнального домена, необязательно ингибирующая молекула содержит первый полипептид, который содержит по меньшей мере часть PD1, и второй полипептид, содержащий костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

17. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 1-16, в которой (i), (ii) и (iii) происходят из CD3 эпсилон.

18. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую TFR по любому из п.п. 1-17.

19. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую TFR по любому из п.п. 1-17.

20. Способ лечения млекопитающего, страдающего раком, включающий введение указанному млекопитающему эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-17.

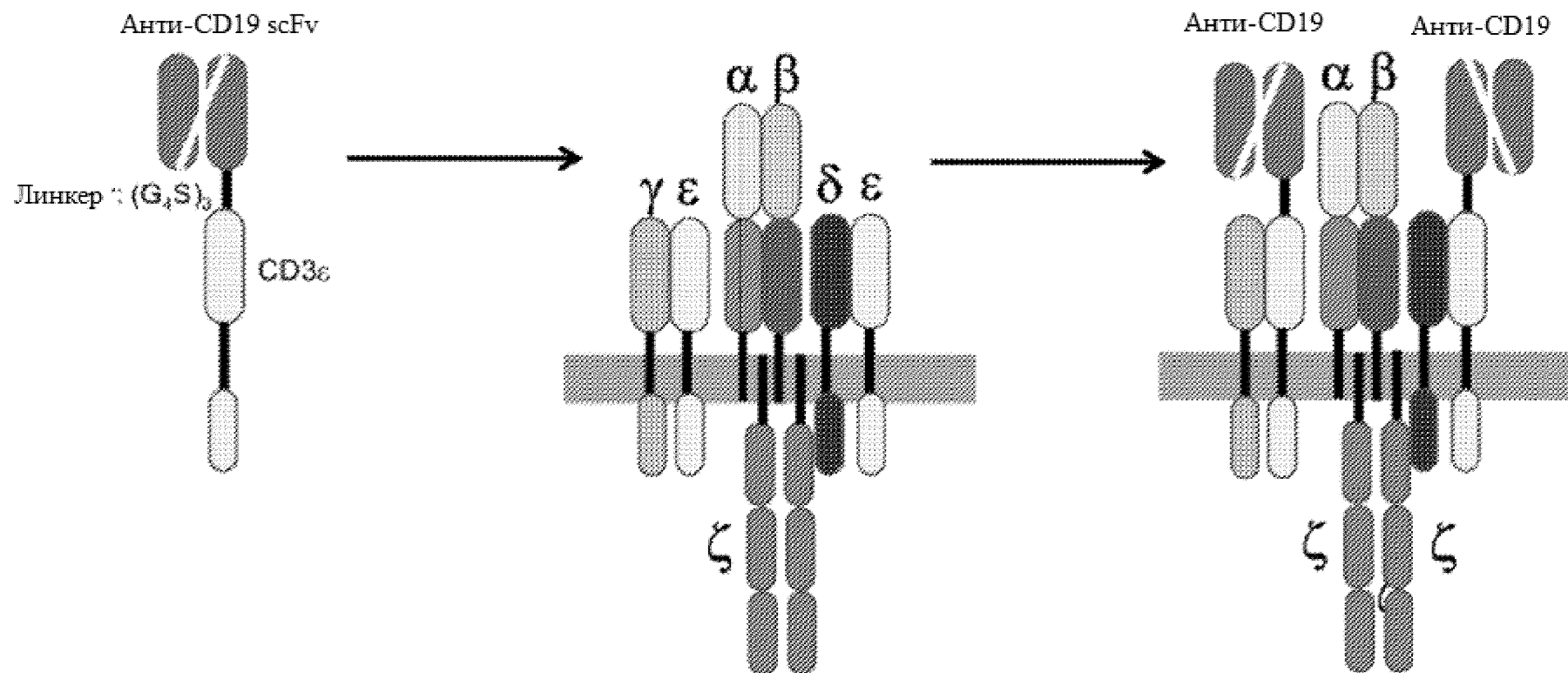
21. Способ по п. 20, характеризующийся тем, что рак представляет собой гематологический рак.

22. Способ по п. 21, характеризующийся тем, что гематологический рак выбран из группы, состоящей из острой В-клеточной лимфоидной лейкемии (B-ALL), острой Т-клеточной лимфоидной лейкемии (T-ALL), острой лимфобластной лейкемии (ALL); хронической миелогенной лейкемии (CML), хронической лимфоцитарной лейкемии (CLL); В-клеточной пролимфоцитарной лейкемии, новообразования бластных плазмацитоидных дендритных клеток, лимфомы Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лейкоза ворсистых клеток, мелкоклеточной фолликулярной лимфомы, крупноклеточной фолликулярной лимфомы, злокачественных лимфопролиферативных состояний, лимфомы MALT-типа, лимфомы из клеток мантийной зоны, лимфомы из клеток маргинальной зоны, множественной миеломы, миелодисплазии, миелодиспластического синдрома, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, новообразования плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемии Вальденстрема, предлейкоза и их комбинаций.

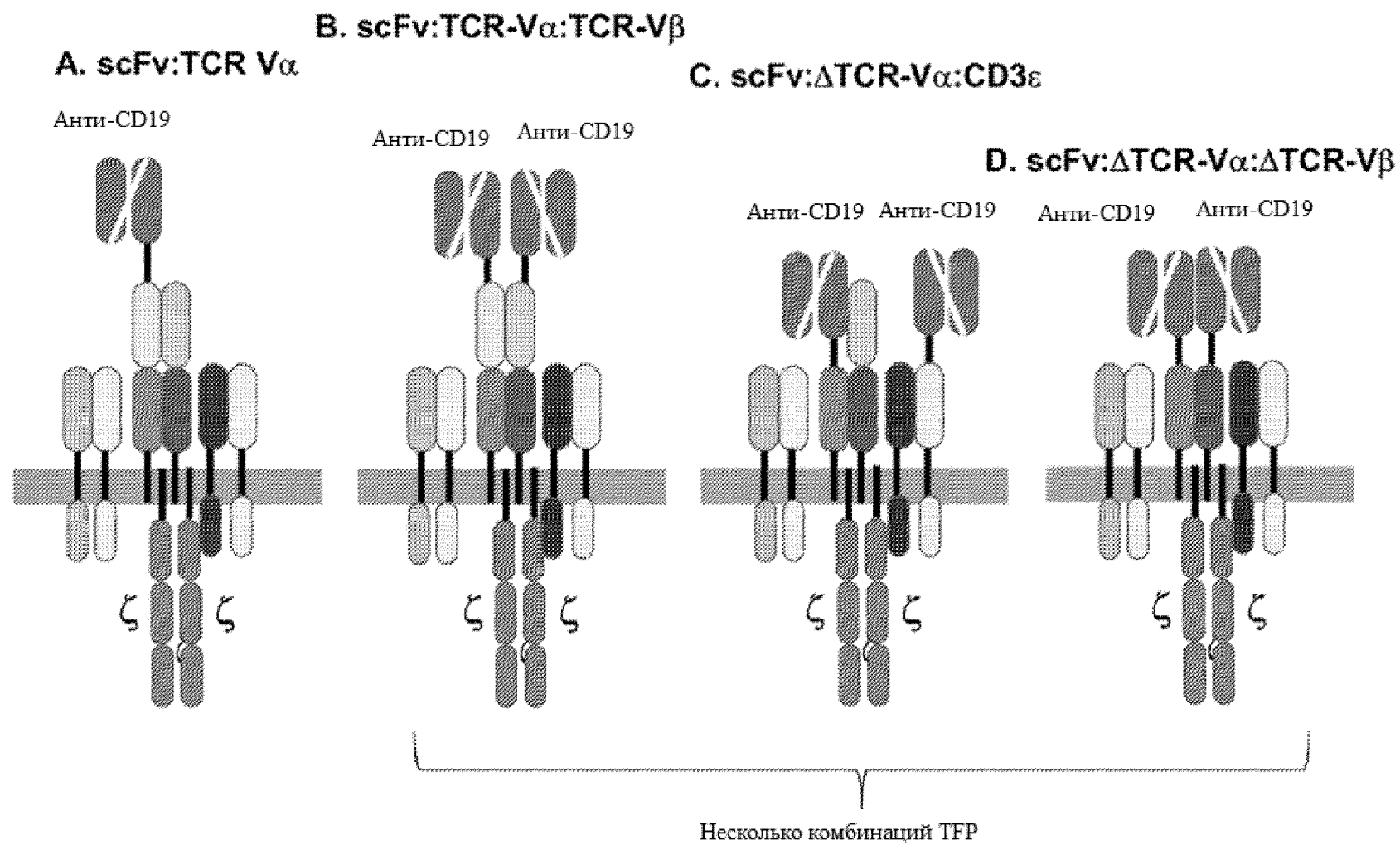
TFP: гибридный полипептид CD19-
связывающего scFv и CD3ε

Эндогенный TCR

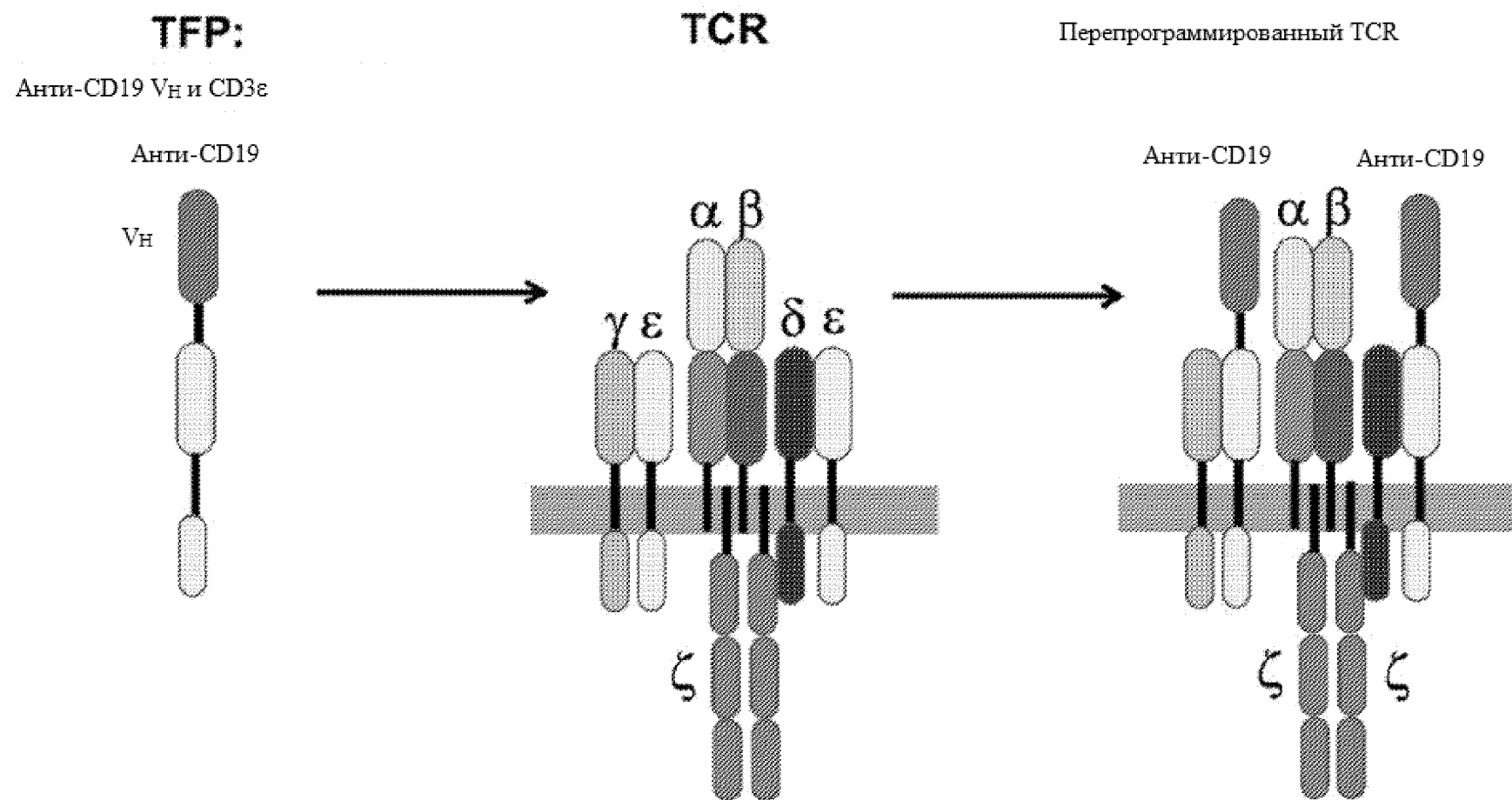
Перепрограммированный TCR



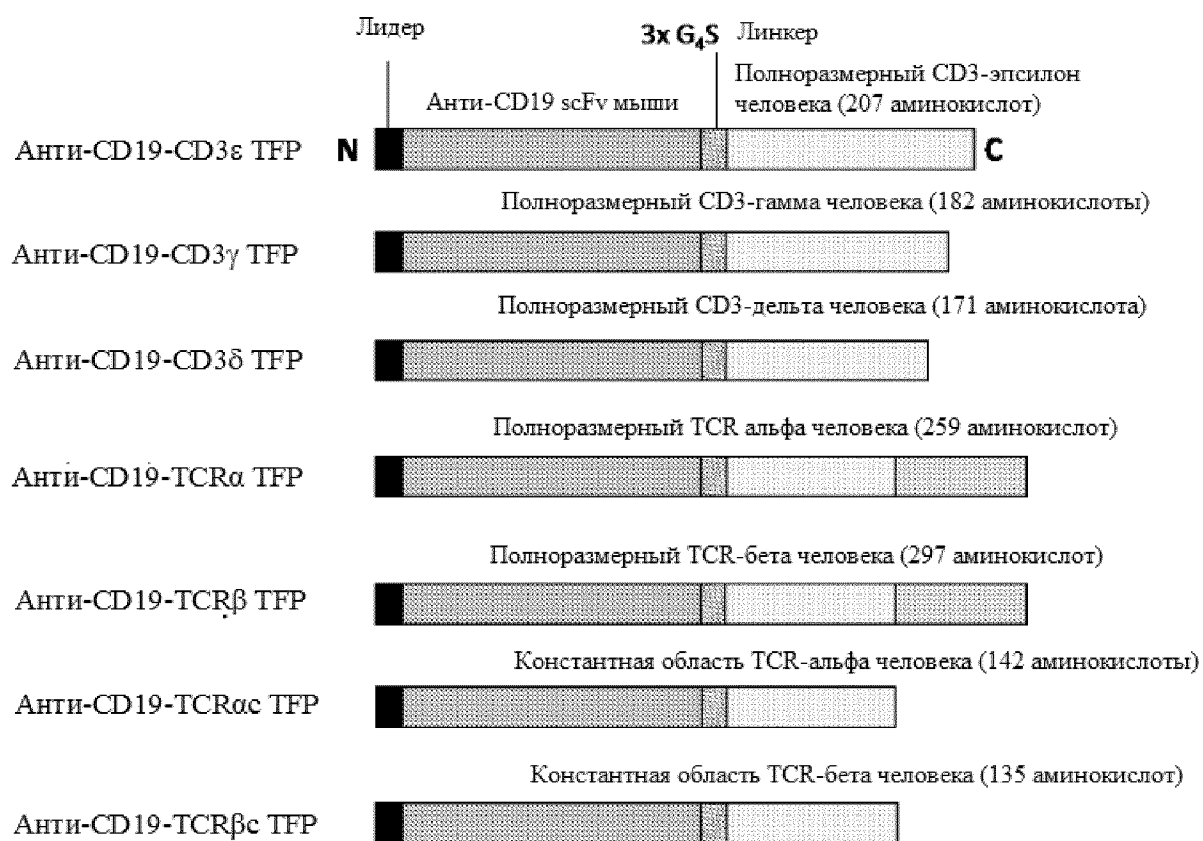
Фигура 1



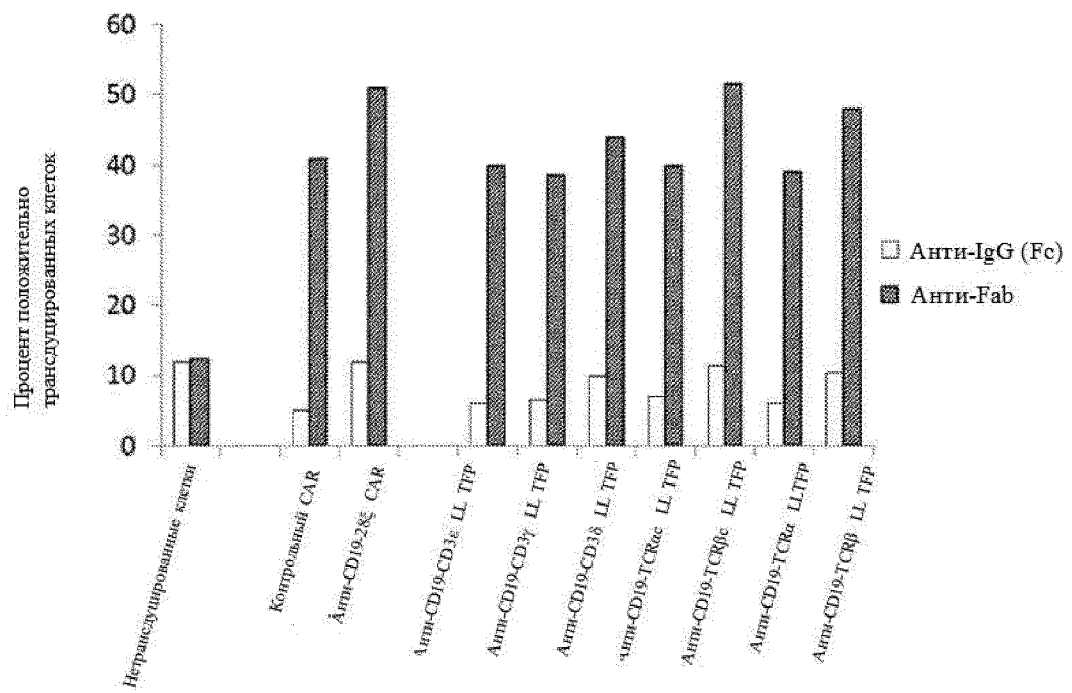
Фигура 2



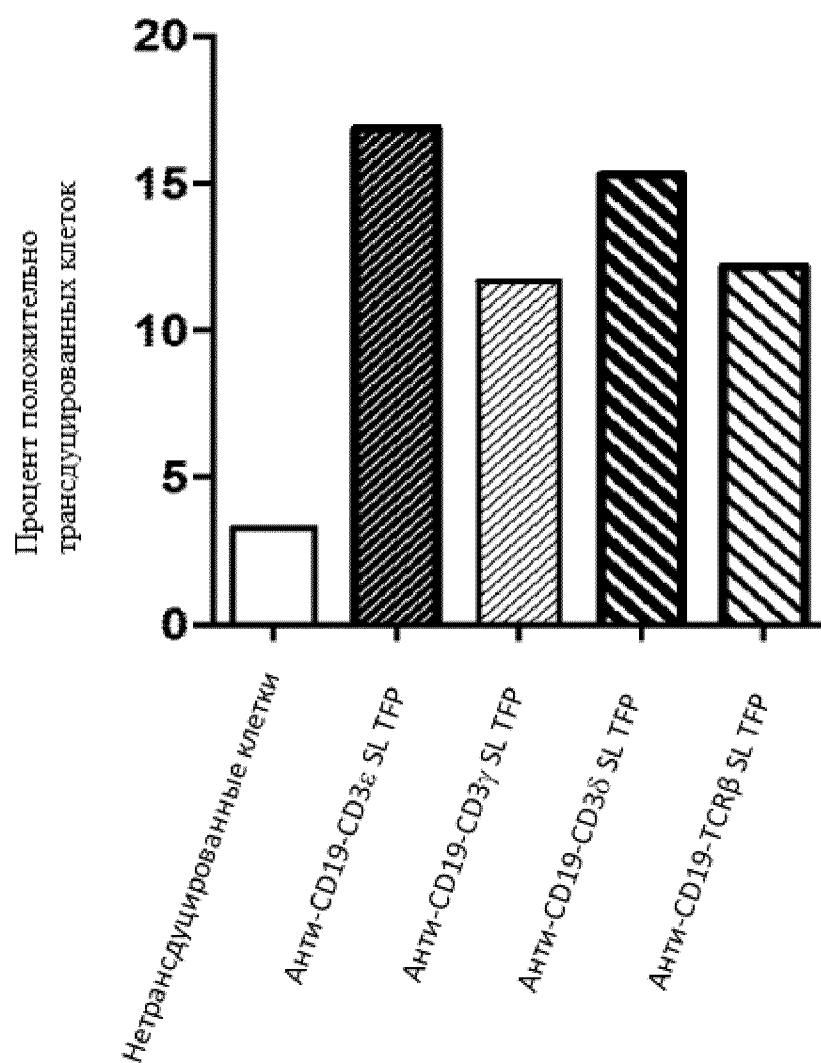
Фигура 3



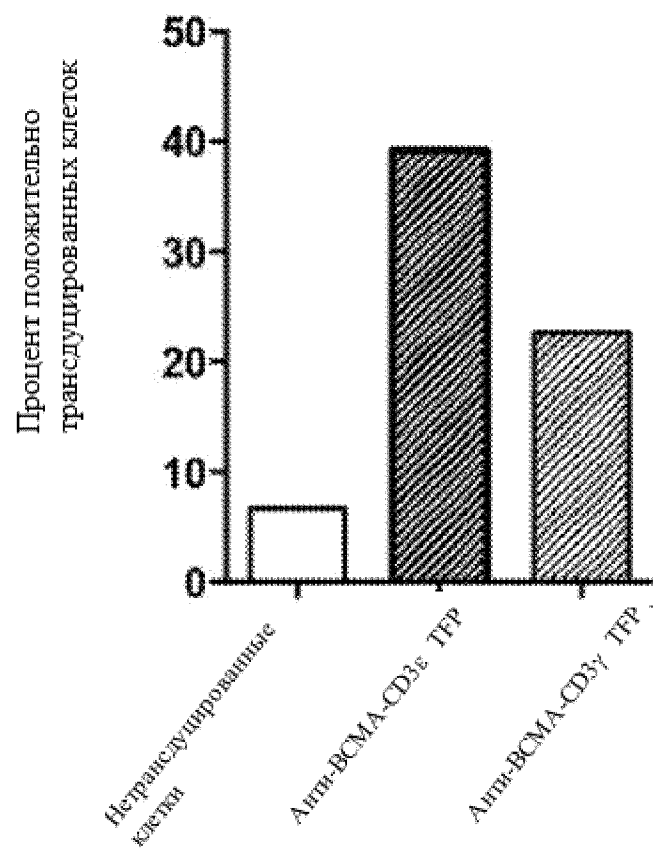
Фигура 4



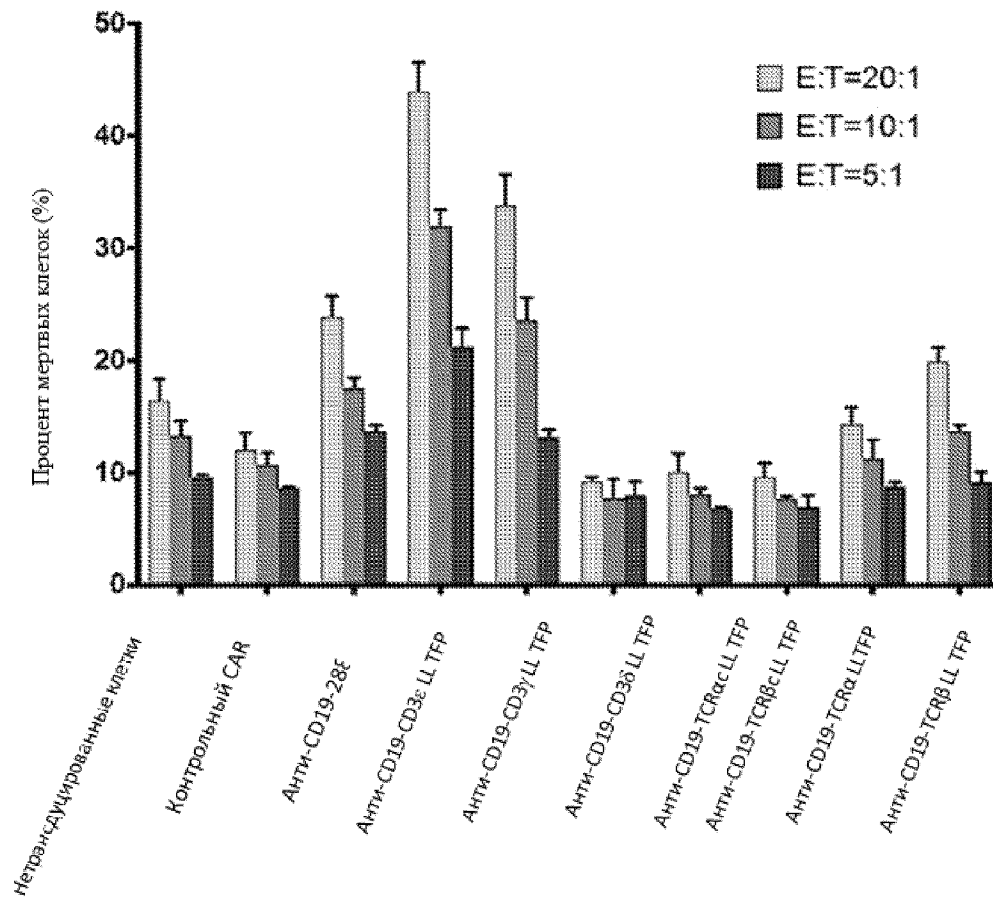
Фигура 5



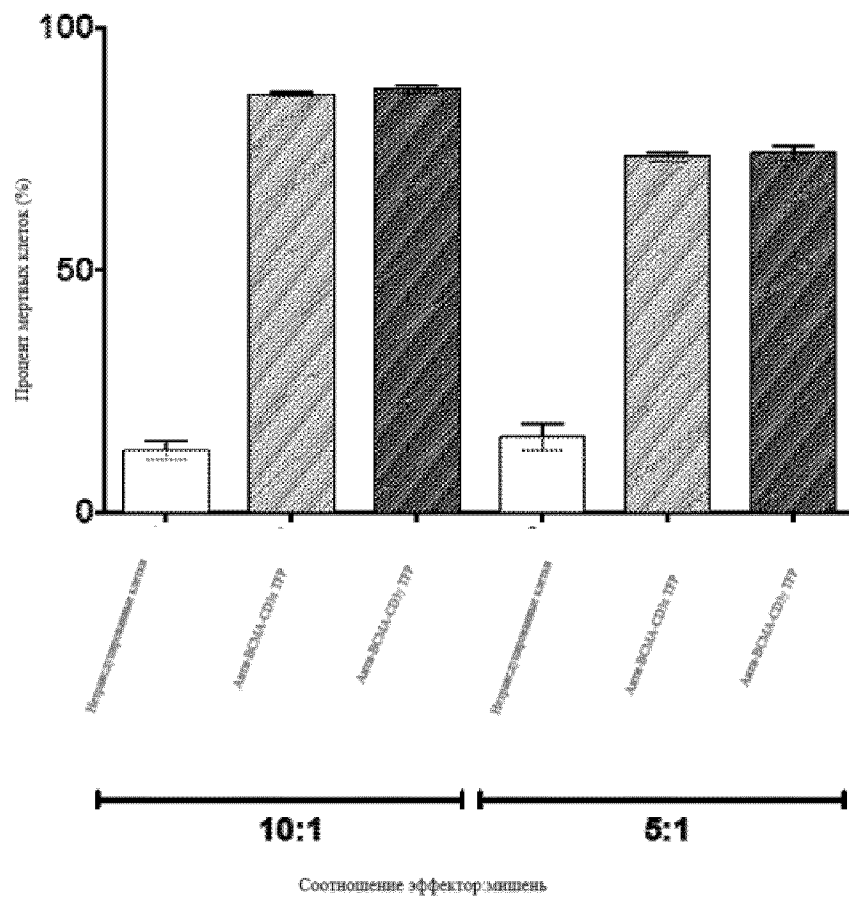
Фигура 6



Фигура 7

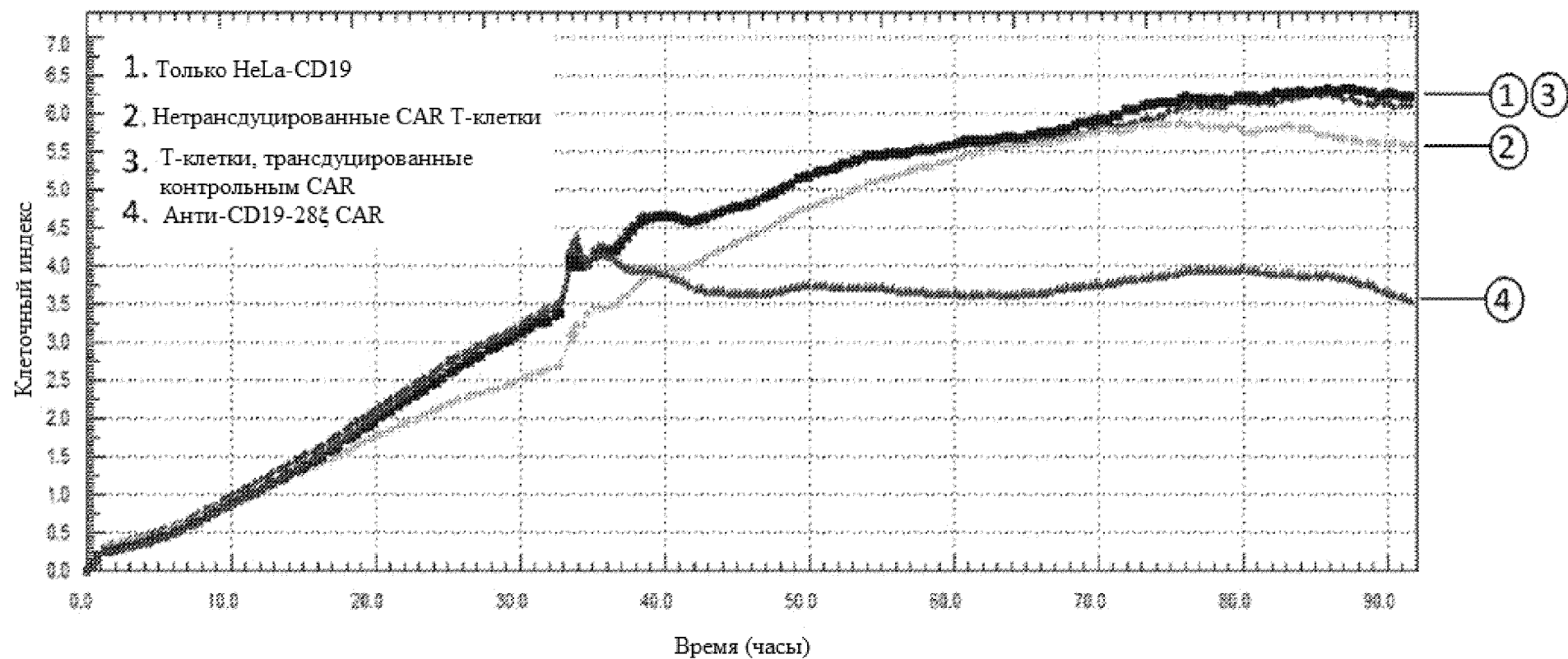


Фигура 8



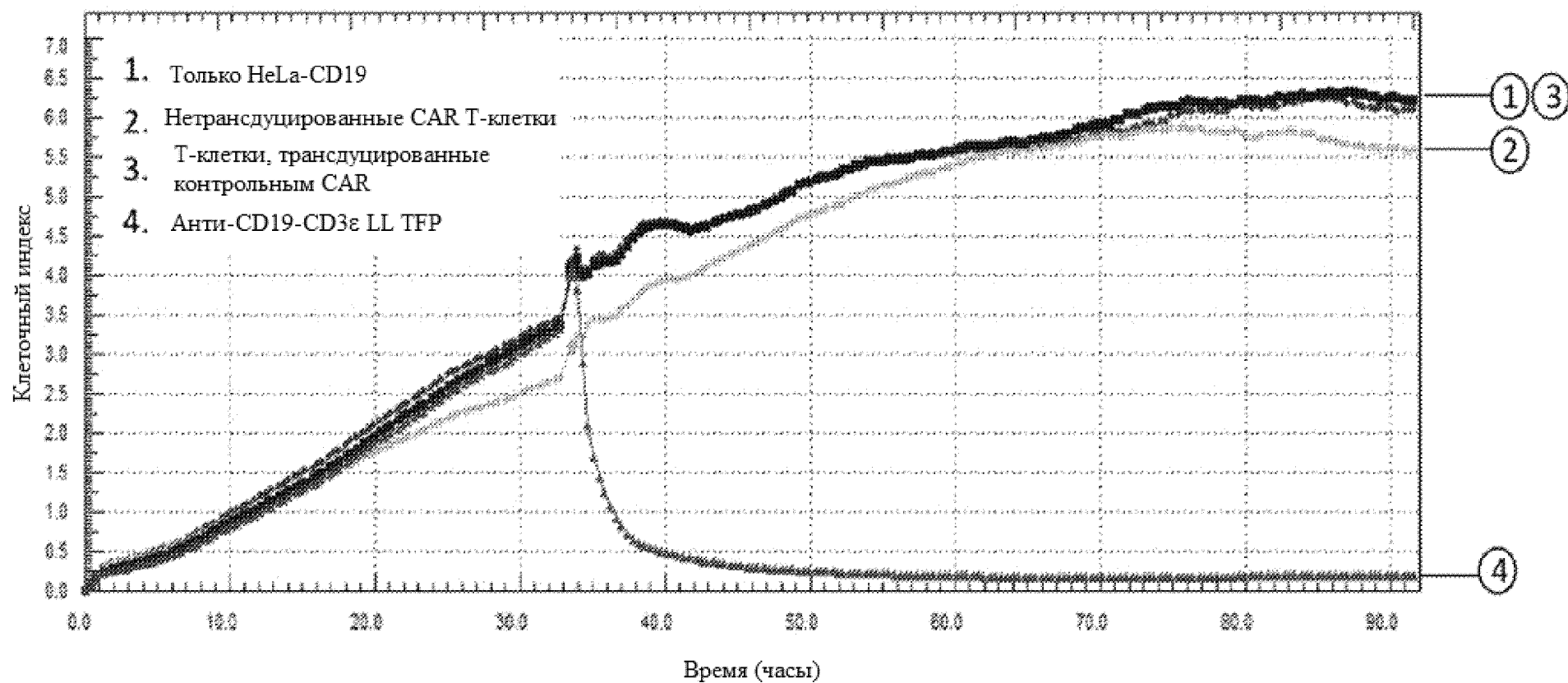
Фигура 9

Анти-CD19-28 ξ CAR



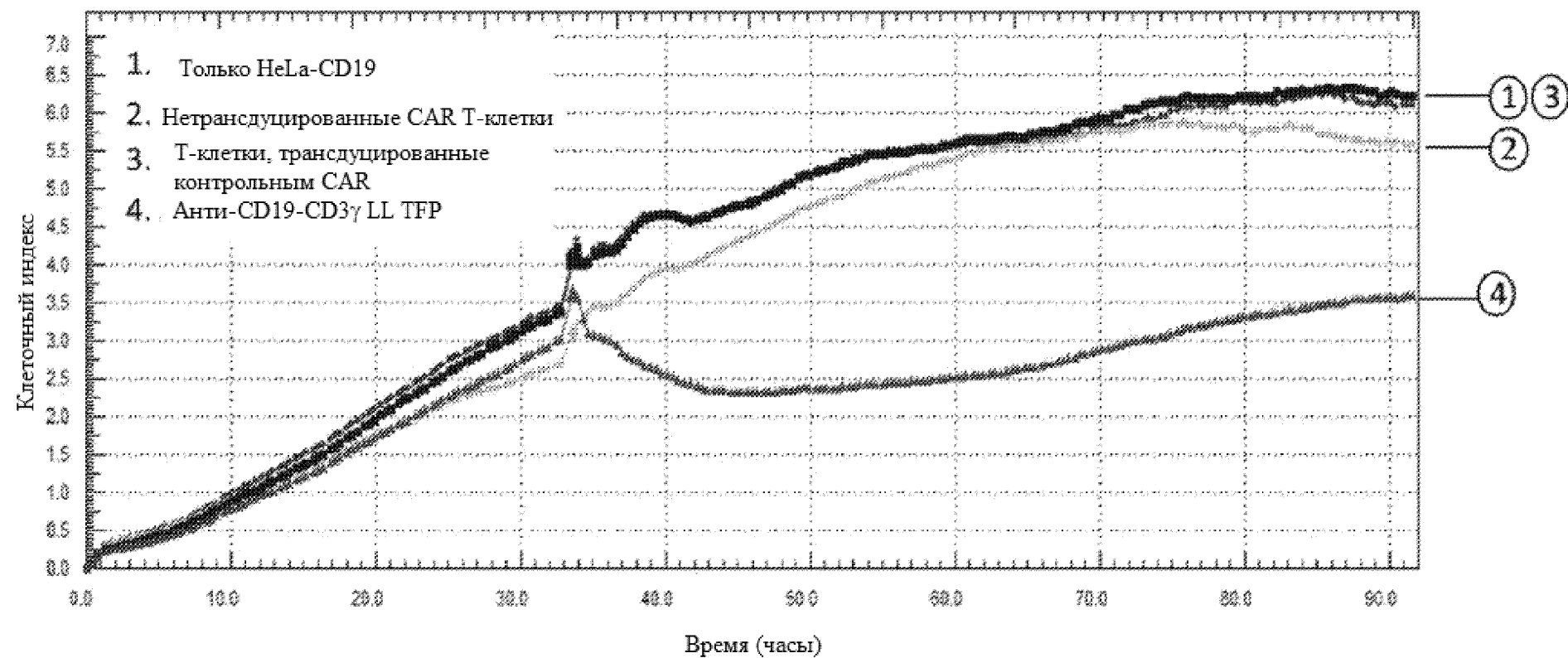
Фигура 10А

Анти-CD19-CD3ε LL TFP



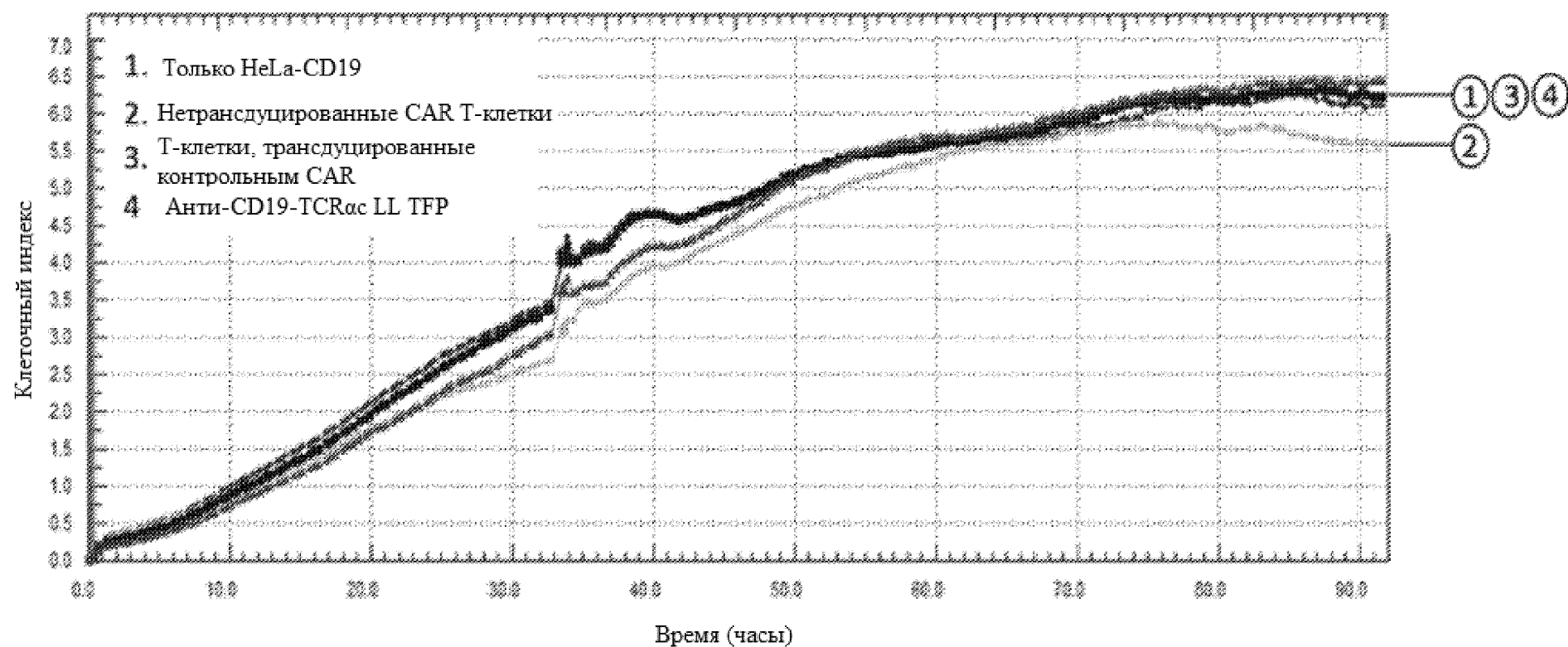
Фигура 10В

Анти-CD19-CD3 γ LL TFP



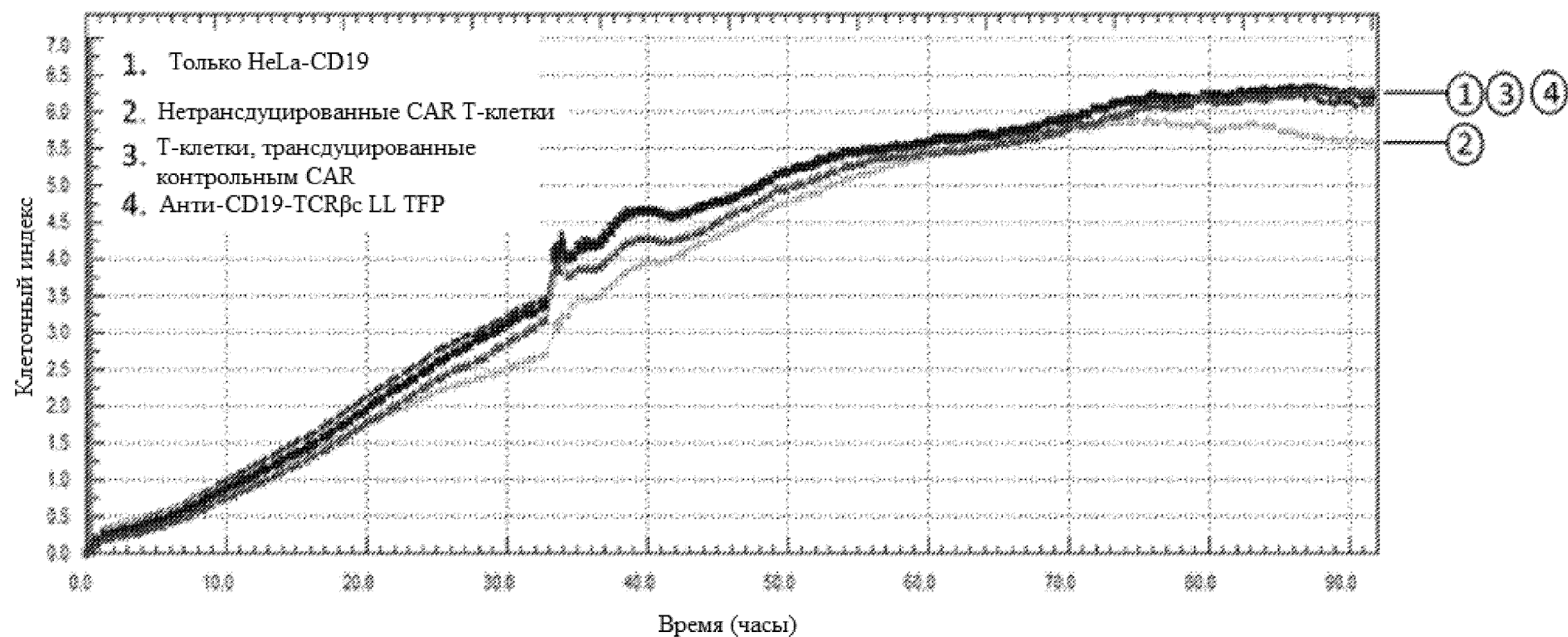
Фигура 10С

Анти-CD19-TCR α c LL TFP



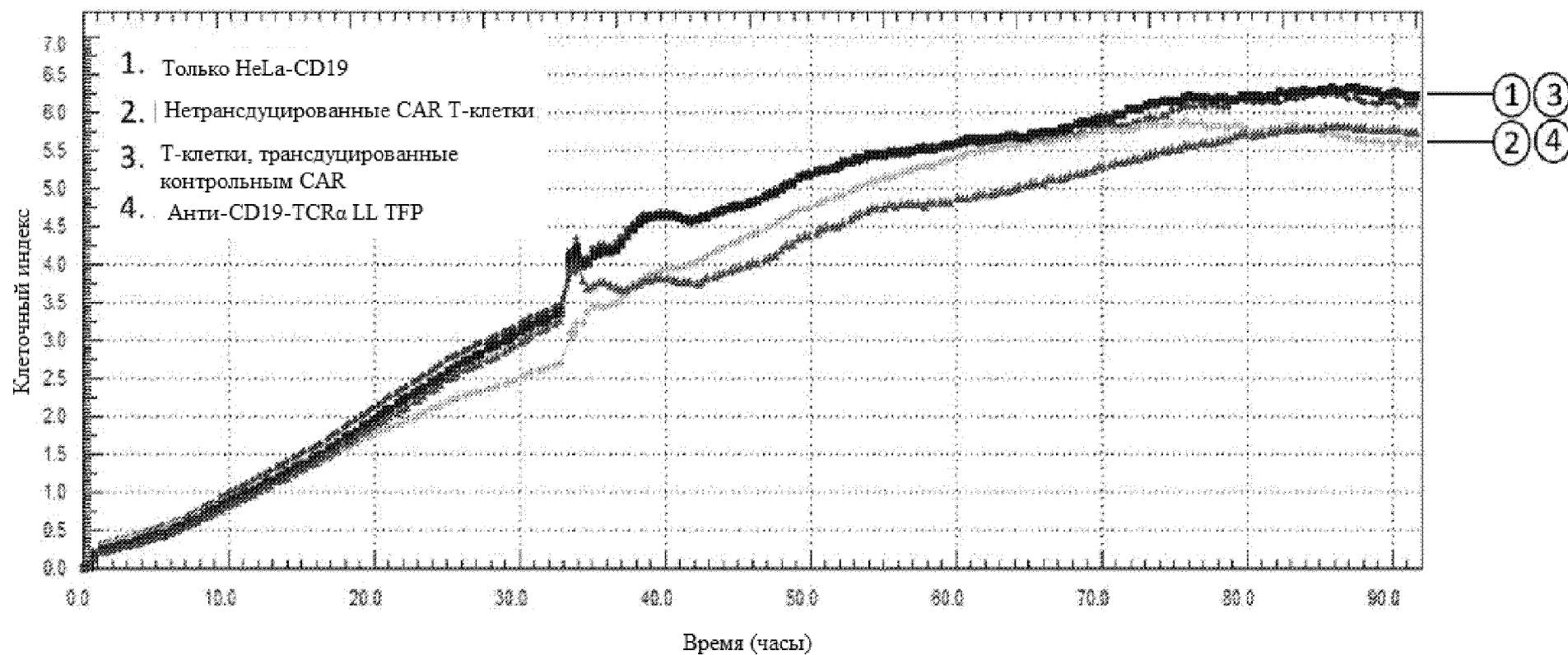
Фигура 10D

Анти-CD19-TCR β c LL TFP

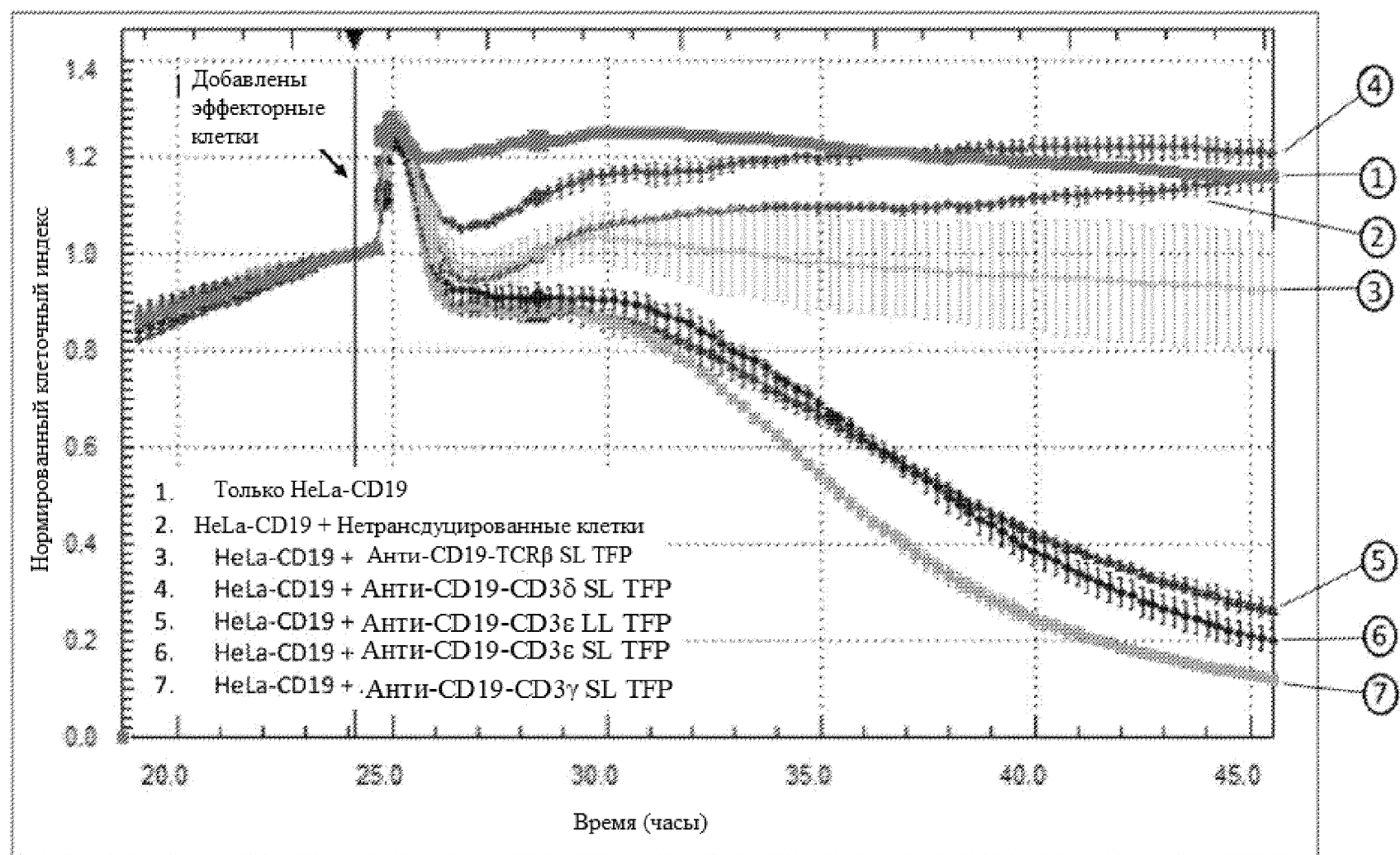


Фигура 10Е

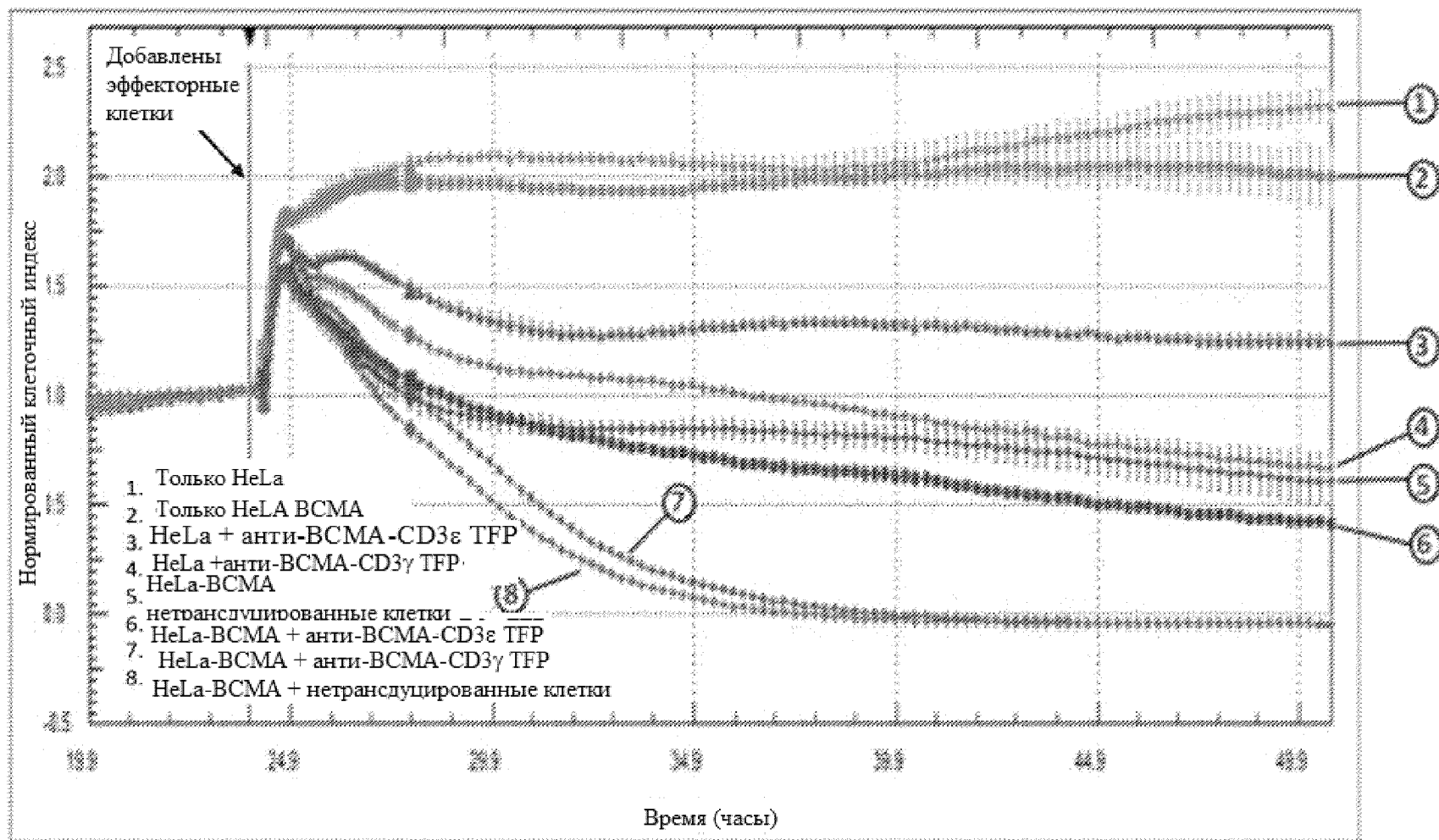
Анти-CD19-TCR α LL TFP



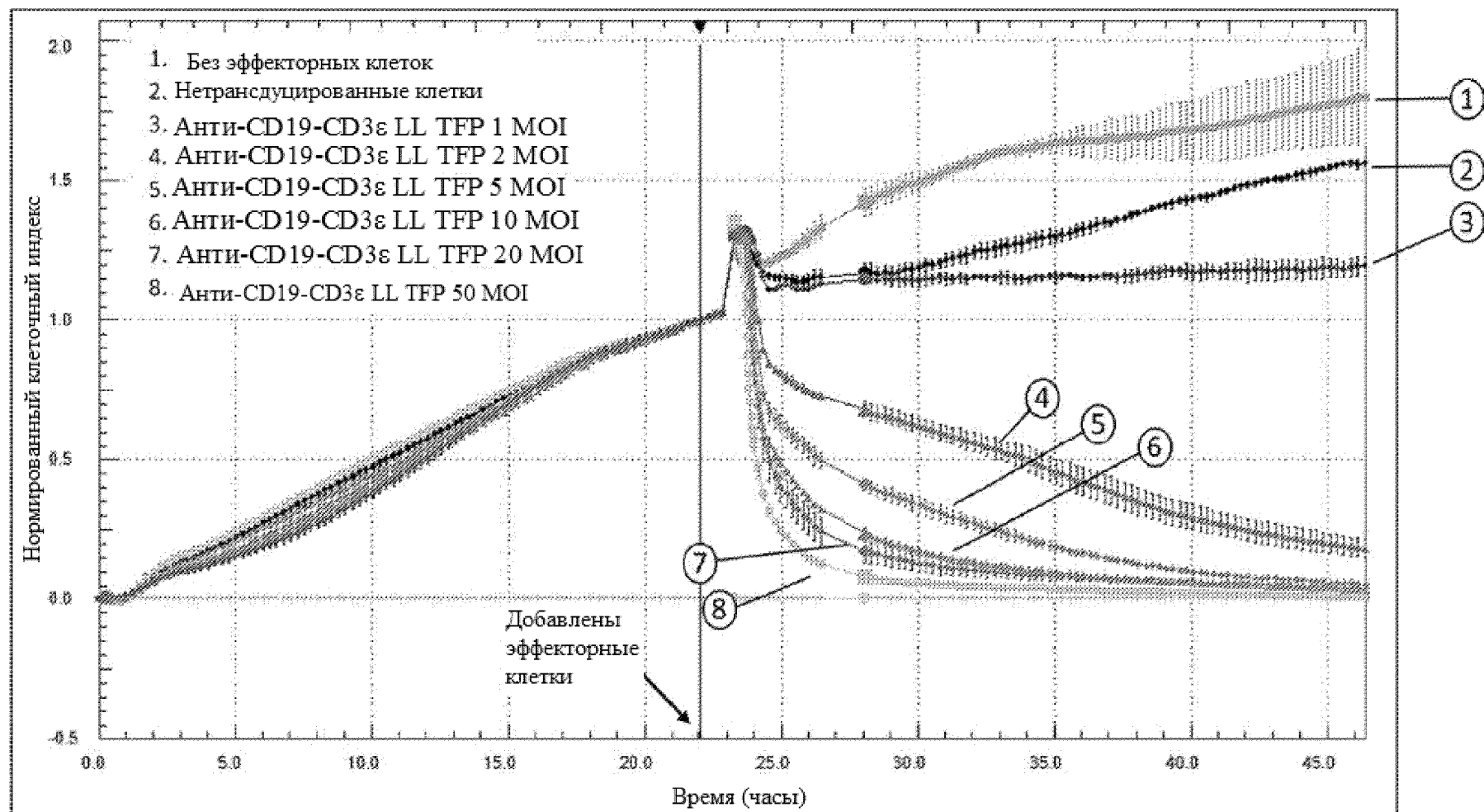
Фигура 10F



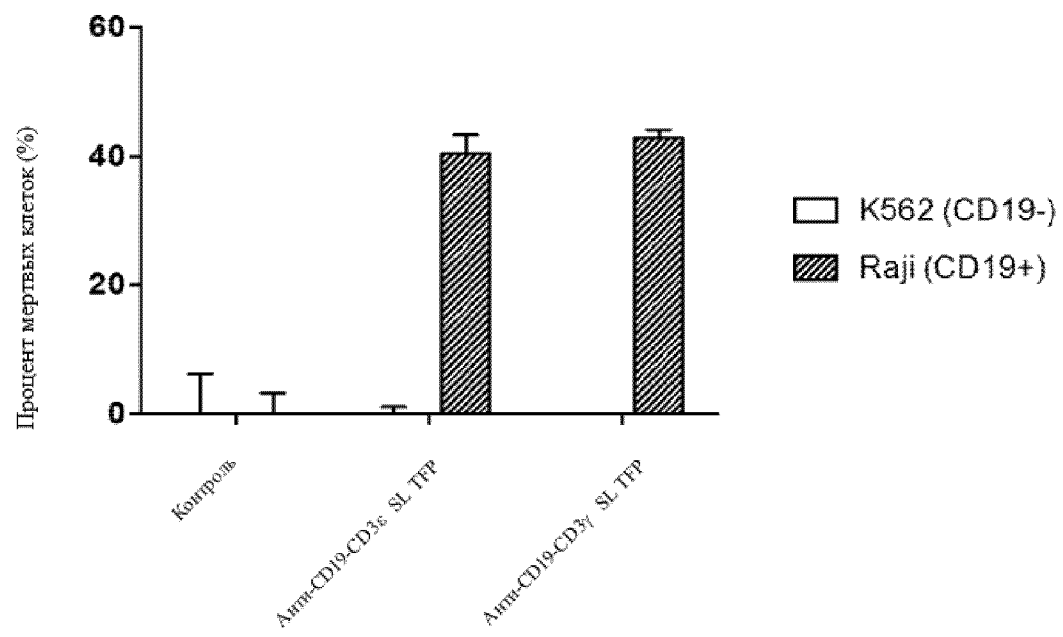
Фигура 11



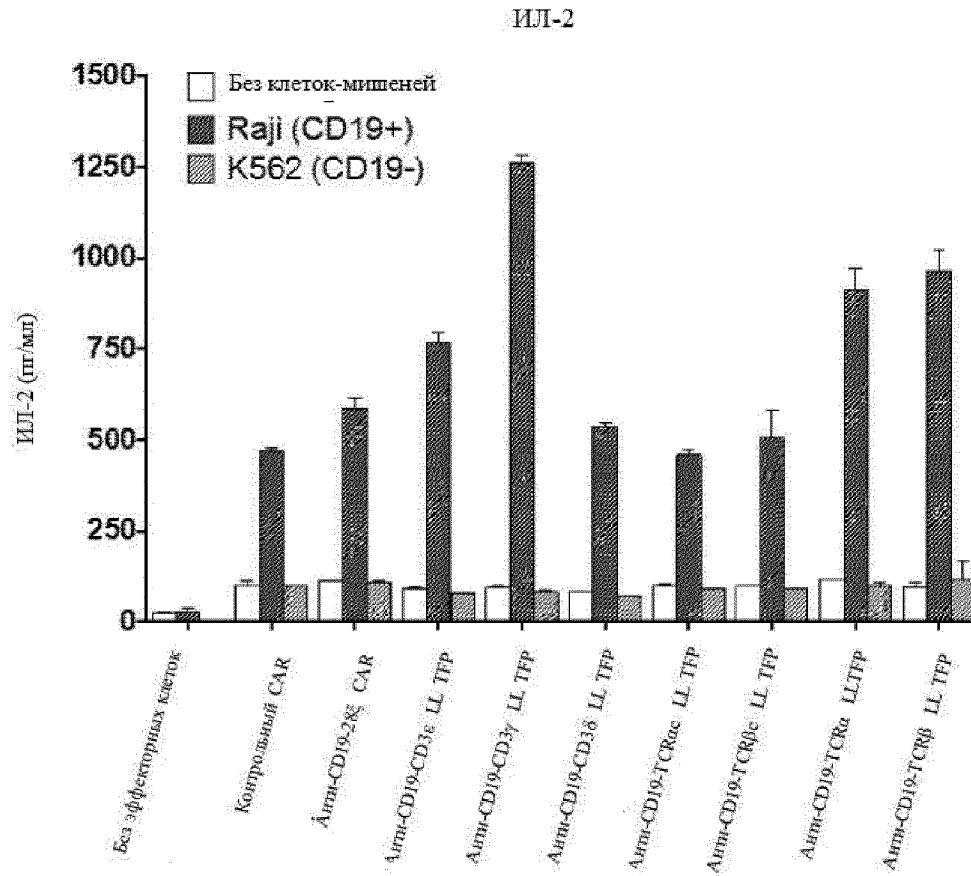
Фигура 12



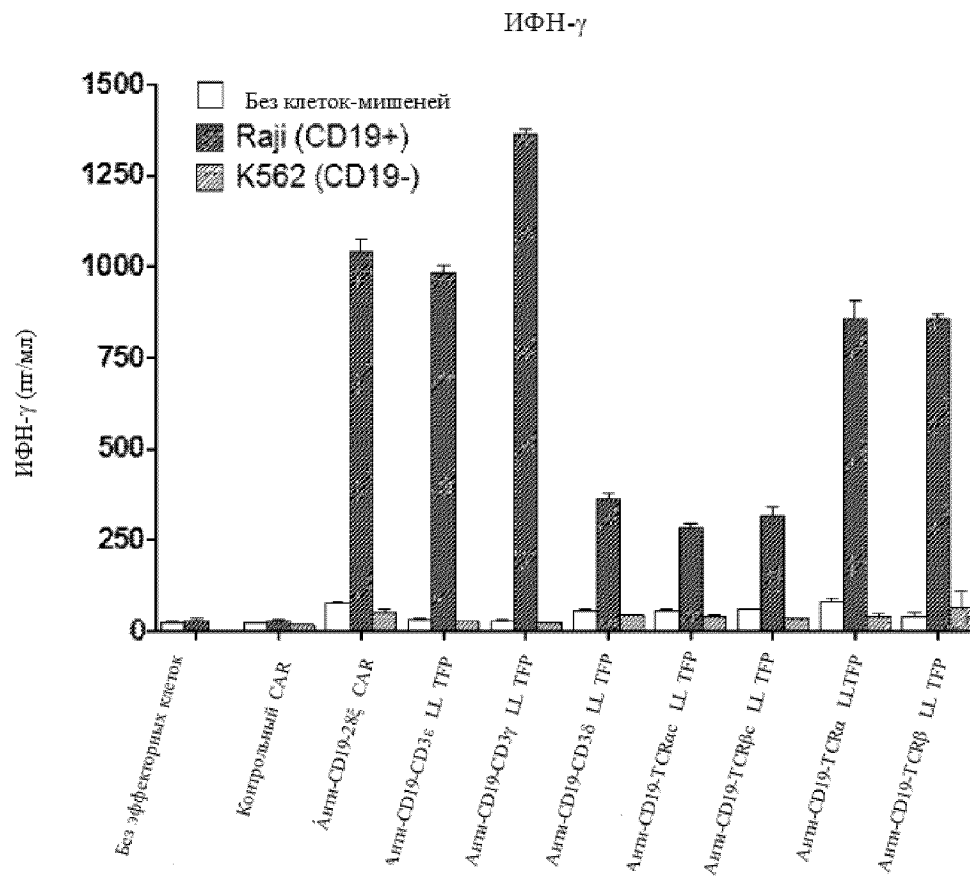
Фигура 13



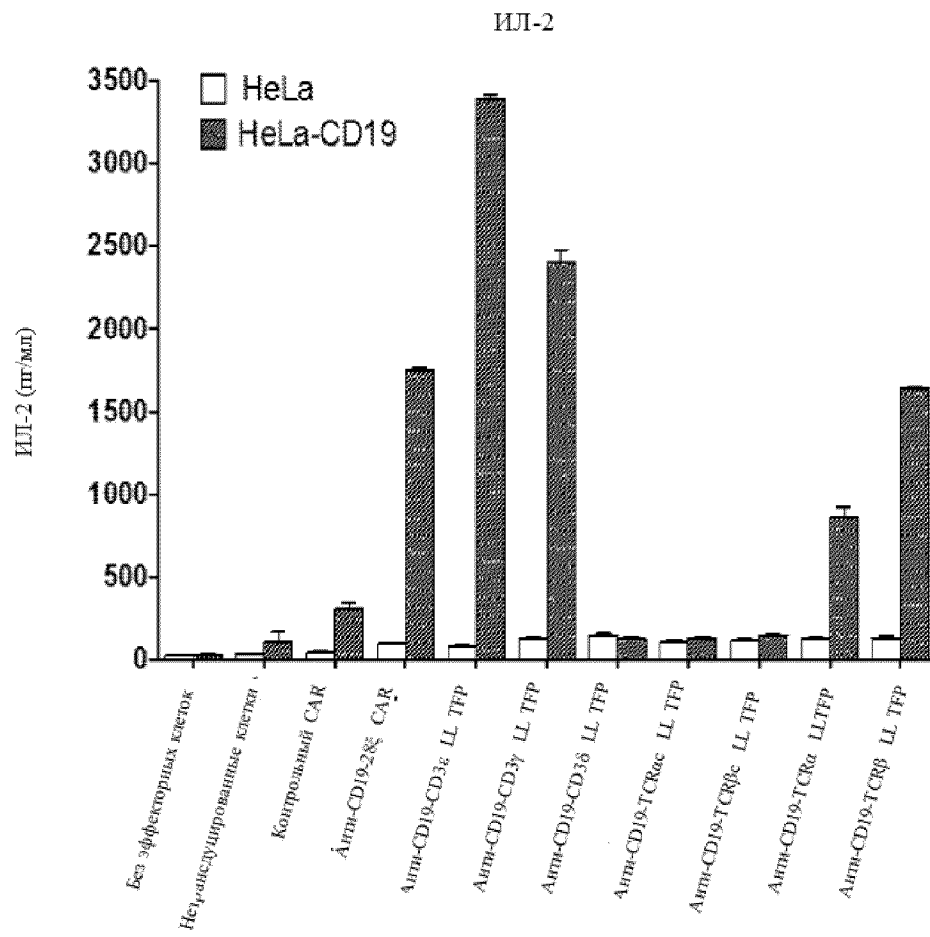
Фигура 14



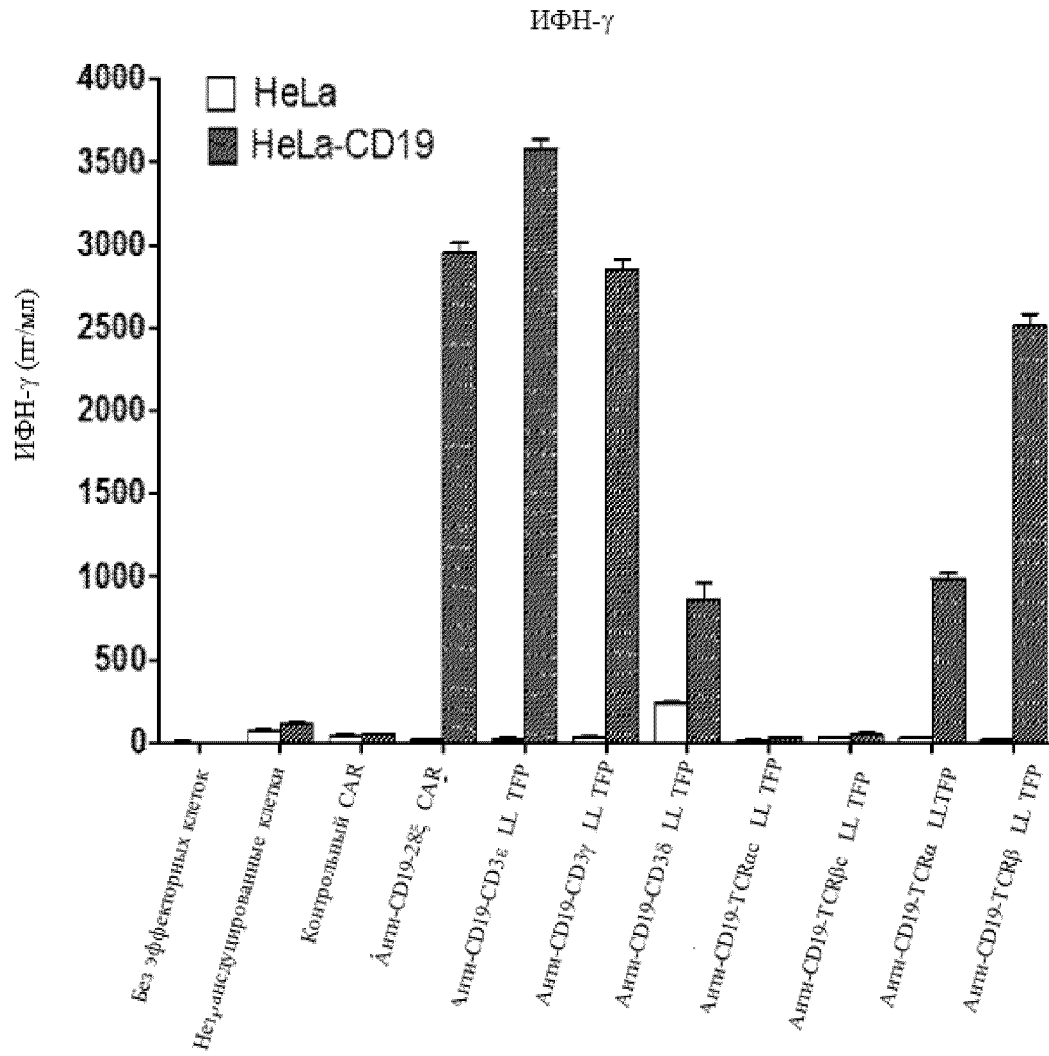
Фигура 15А



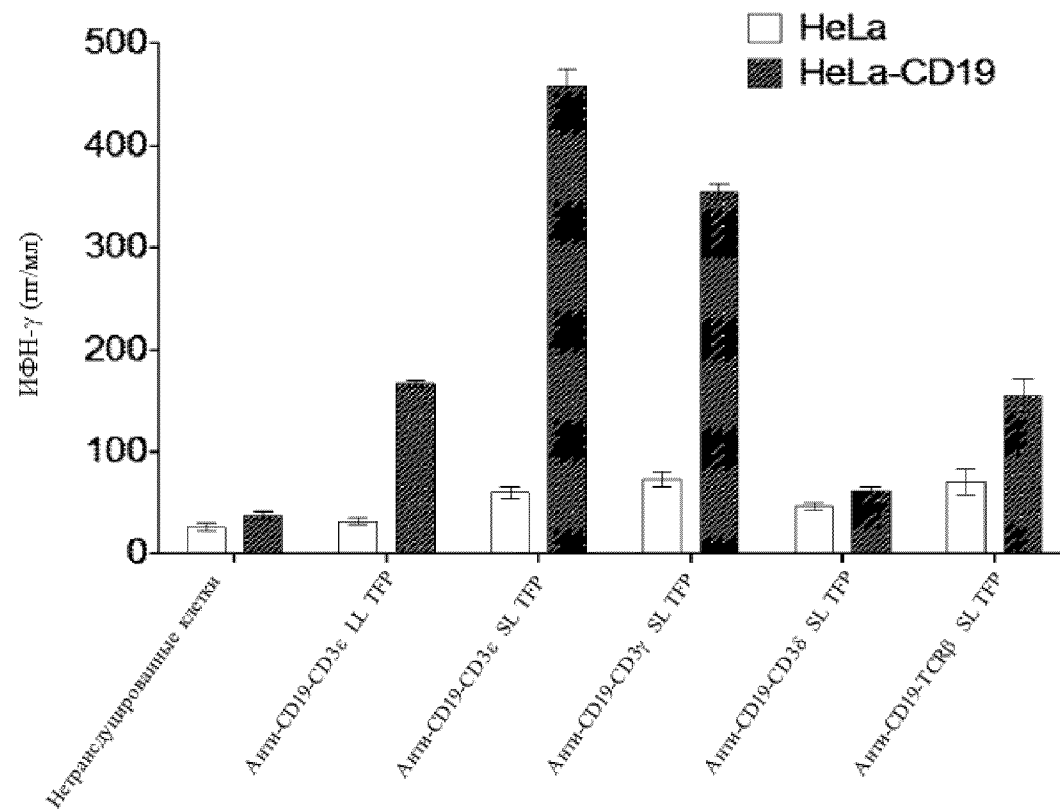
Фигура 15В



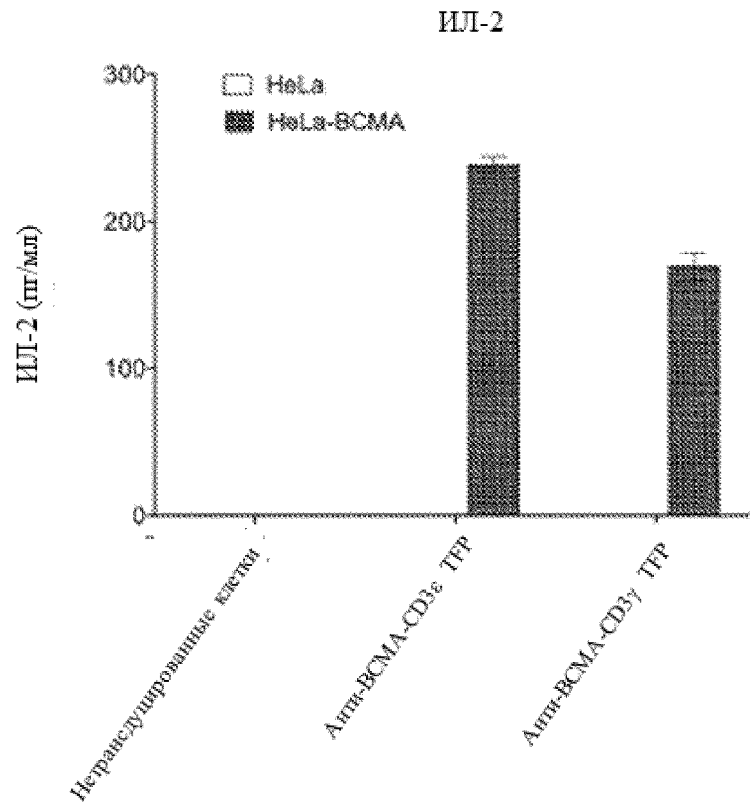
Фигура 15С



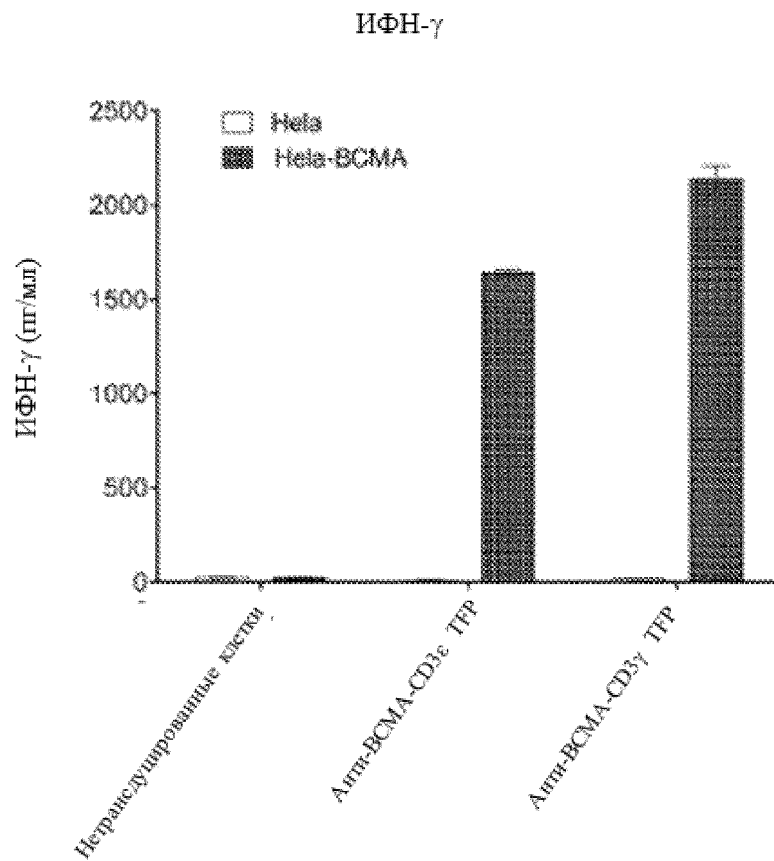
Фигура 15D



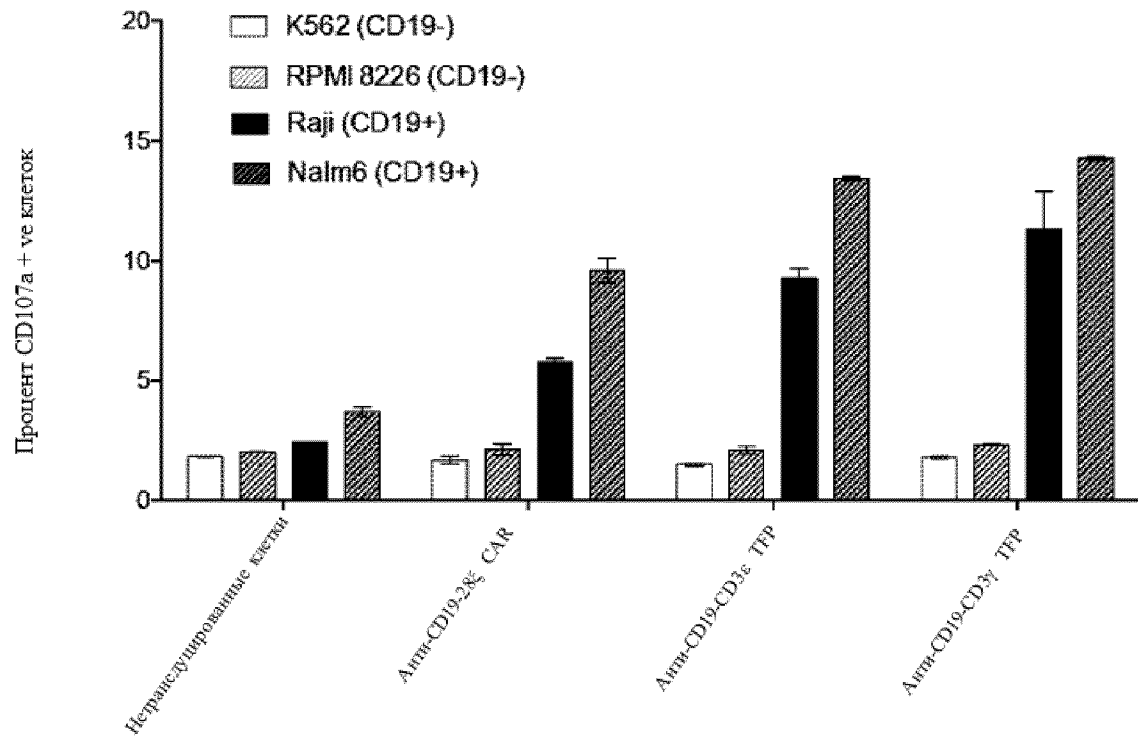
Фигура 16



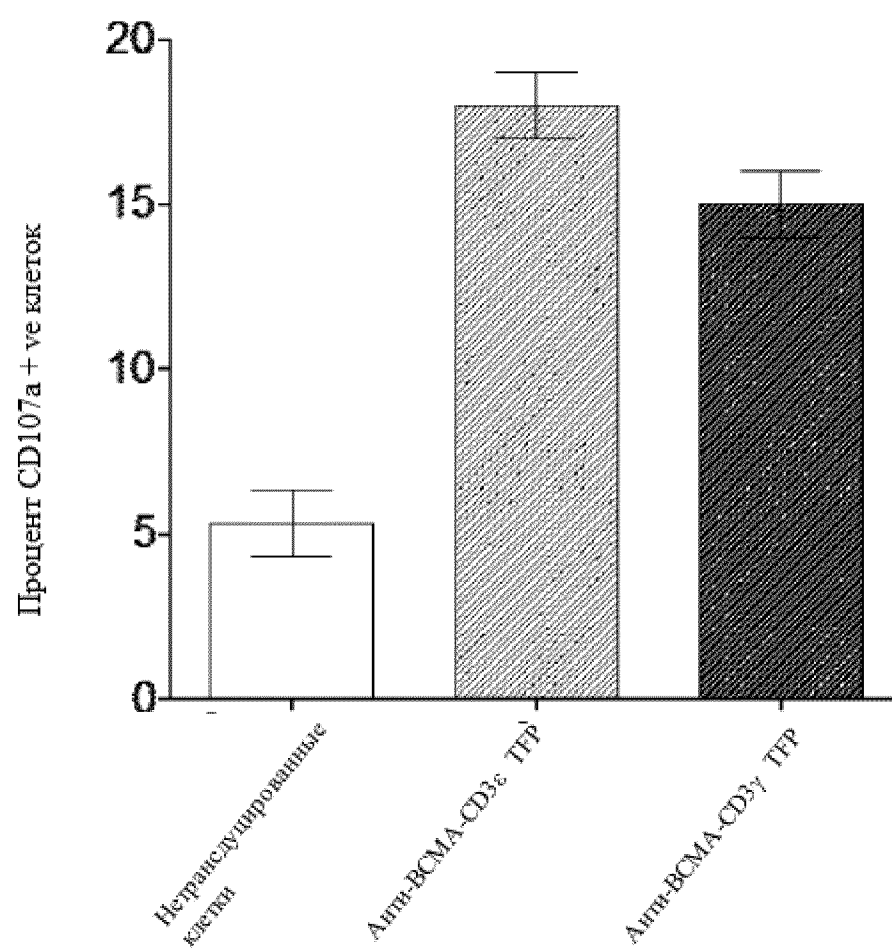
Фигура 17А



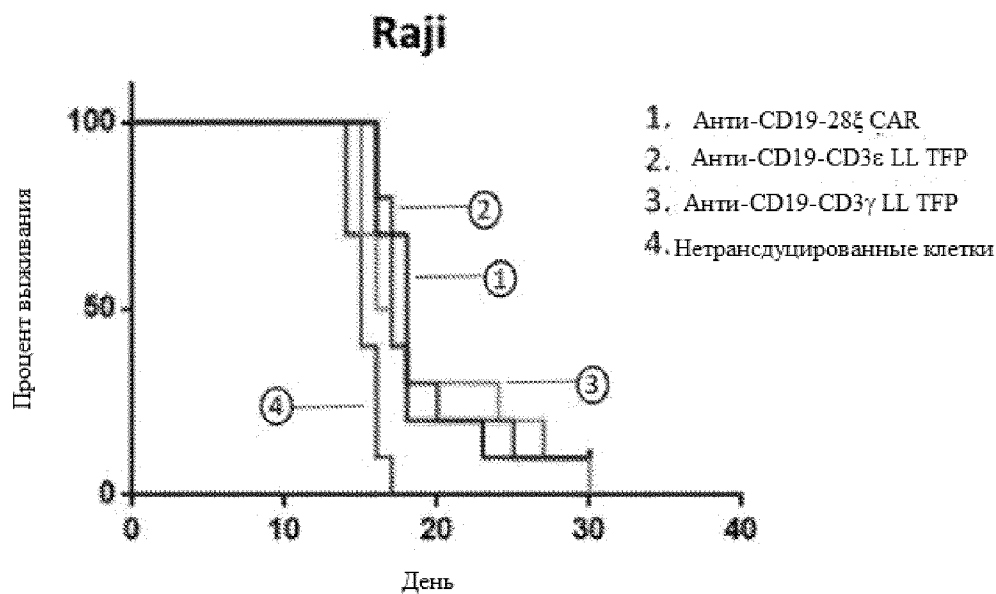
Фигура 17В



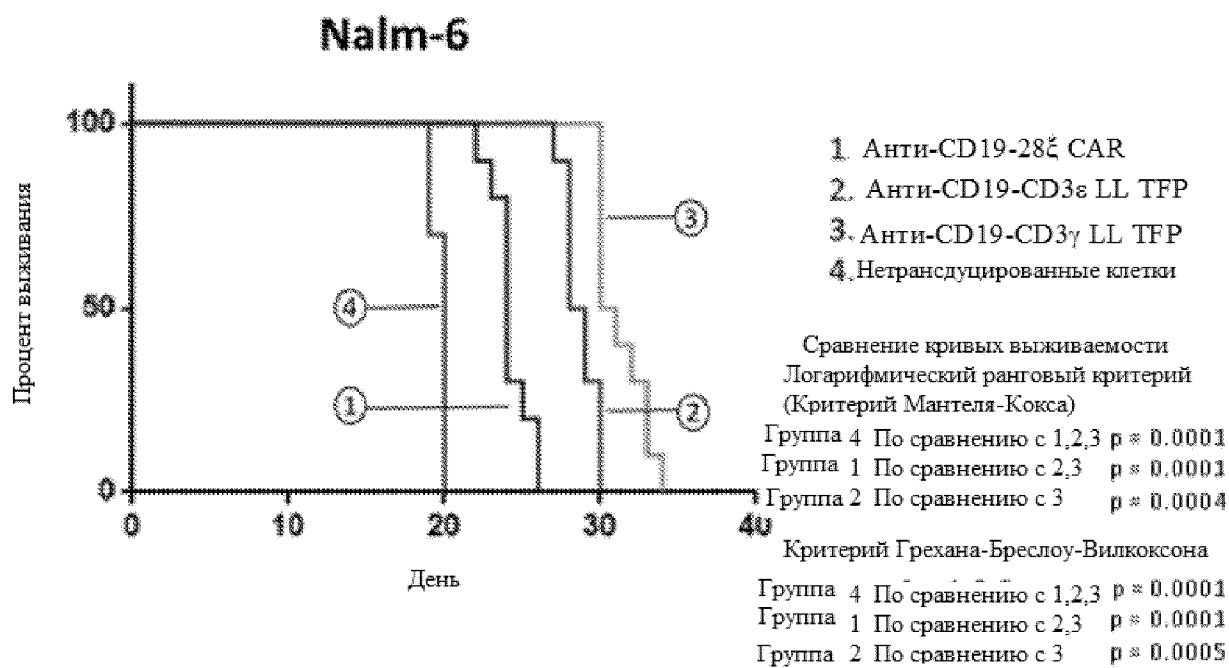
Фигура 18



Фигура 19



Фигура 20А



Фигура 20В