



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128717** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)**A61K 39/395** (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/735 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2019 10455	(72) Винахідник(и):	Штубенраух Кай-Гуннар (DE), Мьосснер Еккехард (CH), Кляйн Крістіан (CH), Даровські Діана (CH)
(22) Дата подання заявки:	26.03.2018	(73) Володілець (володільці):	Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzachertrasse 124, 4070 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	10.10.2024	(74) Представник:	Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	17163090.8	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2015/179833 A1, 26.11.2015 TILMAN SCHLOTHAUER ET AL. Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions. PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION. 29.08.2016. Vol. 29. No. 10. P. 457-466
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	27.03.2017		
(33) Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	12.05.2020, Бюл.№ 9		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	09.10.2024, Бюл.№ 41		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2018/057566, 26.03.2018		

(54) ПОЛІПШЕНІ АНТИГЕНЗВ'ЯЗУЮЧІ РЕЦЕПТОРИ

(57) Реферат:

Винахід стосується антигензв'язуючого рецептора, який включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, який включає антигензв'язуючий фрагмент, де антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з доменом мутованого (Fc) фрагмента, який кристалізується, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну заміну в порівнянні з немутованим вихідним Fc доменом, де мутований Fc домен включає амінокислотну мутацію P329G відповідно до системи нумерації EU, де антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, який включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, та де антигензв'язуючий фрагмент включає:

UA 128717 C2

- (i) варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає:
 - (а) 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RYWMN (SEQ ID NO: 1),
 - (б) CDR H2 з амінокислотною послідовністю EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 2) і
 - (в) CDR H3 з амінокислотною послідовністю PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3), а також
- (ii) варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає:
 - (г) 1-у ділянку легкого ланцюга (CDR L), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4),
 - (д) CDR L2 з амінокислотною послідовністю GTNKRAP (SEQ ID NO: 5) і
 - (е) CDR L3 з амінокислотною послідовністю ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

Галузь даного винаходу

Даний винахід в основному стосується антигензв'язуючих рецепторів, здатних специфічно зв'язуватися з мутованими Fc доменами, які характеризуються зниженим зв'язуванням з Fc рецептором, і Т-клітин, які експресують ці антигензв'язуючі рецептори. Більш конкретно, в даному винаході пропонуються Т-клітини, трансфіковані/трансдуковані антигензв'язуючим рецептором, які накопичуються при специфічному зв'язуванні/взаємодії з мутованим Fc доменом терапевтичних антитіл. Більш того, винахід стосується набору, який включає Т-клітини за даним винаходом і/або молекули нуклеїнової кислоти, вектори, які експресують антигензв'язуючі рецептори даного винаходу, і направлені до пухлини антитіло/антитіла, які включають мутований Fc домен. У винаході також пропонується продукування і застосування Т-клітин в способі лікування конкретних захворювань в поєднанні з пухлиноспецифічними антитілами, а також фармацевтичні композиції/лікарські засоби, що включають Т-клітини і/або терапевтичні антитіла, де Т-клітини призначені для введення в комбінації з терапевтичним/направленим до пухлини антитілом (антитілами), що включає мутований Fc домен зі зниженим зв'язуванням з Fc рецептором.

Передумови створення винаходу

Адаптивна Т-клітинна терапія (АКТ) є перспективним підходом до лікування з використанням пухлиноспецифічних Т-клітин [Rosenberg і Restifo, Science 348(6230), 62-68 (2015)]. При лікуванні методом АКТ можна використовувати природні пухлиноспецифічні Т-клітини або Т-клітини, яким надають специфічність методом генної інженерії з використанням химерних рецепторів антигену [Rosenberg і Restifo, Science 348(6230) (2015), 62-68]. Метод АКТ можна успішно використовувати для лікування та індукції ремісії у пацієнтів, які страждають навіть на прогресуючі та інші резистентні до лікування захворювання, такі як гострий ліфобластний лейкоз, неходжкінські лімфоми або меланоми [Dudley та ін., J Clin Oncol 26(32), 5233-5239 (2008), Grupp та ін., N Engl J Med 368 (16) (2013), 1509-1518; Kochenderfer та ін., J Clin Oncol. 33(6):540-549 (2015), doi: 10.1200/JCO.2014.56.2025. публ. 2014 серпень 25].

Однак, незважаючи на вражаючу клінічну ефективність, АКТ обмежена пов'язаними з лікуванням токсичними діями. Специфічність і спостережувані в результаті цільові і побічні дії рекомбінантних Т-клітин в ході АКТ зазвичай здійснюються за допомогою направлено до пухлини антигензв'язуючого фрагмента, включеного в химерний антигензв'язуючий рецептор (CAR). Неповна експресія пухлинного антигену або тимчасова відмінність рівнів експресії може призвести до тяжких побічних дій або навіть до переривання АКТ в зв'язку з непереносимою токсичністю лікування.

Крім того, доступність пухлиноспецифічних Т-клітин для ефективного лізису пухлинних клітин залежить від здатності рекомбінантних Т-клітин до довгострокового виживання і проліферації *in vivo*. З іншого боку, довгострокове виживання і проліферація Т-клітин *in vivo* може привести до небажаних довгострокових ефектів за рахунок стійкості неконтрольованої CAR-T-відповіді [Grupp та ін. N Engl J Med 368(16):1509-1518 (2013), Maude та ін. N Engl J Med 371(16):1507-1517 (2014)].

Один з підходів для зниження важких, пов'язаних з лікуванням токсичностей, і для поліпшення безпеки АКТ, полягає в обмеженні активації і проліферації CAR-T клітин за допомогою введення молекул-адаптерів в імунологічний синапс. Такі молекули-адаптери включають бімодулярне перемикання низькомолекулярних сполук, наприклад, як недавно описане перемикання фолат-FITC [Kim та ін. J Am Chem Soc; 137:2832-2835 (2015)]. Інший підхід включає штучно модифіковані антитіла, які включають мітку для контролю і направлення специфічності CAR-T клітин щодо пухлинних клітин-мішеней [Ma та ін. PNAS; 113(4):E450-458 (2016), Cao та ін. Angew Chem; 128:1-6 (2016), Rogers та ін. PNAS; 113(4):E459-468 (2016), Tamada та ін. Clin Cancer Res; 18(23):6436-6445 (2012)].

Однак існуючі підходи обмежені за рядом причин. Для імунологічних синапсів, що базуються на молекулярному перемиканні, потрібне введення додаткових елементів, які можуть викликати імунну відповідь або привести до неспецифічного побічного ефекту. Більш того, складність таких багатокомпонентних систем може обмежити ефективність і переносимість лікування. З іншого боку, введення структури мітки в існуючі терапевтичні моноклональні антитіла може впливати на ефективність і профіль безпеки таких конструктів.

Відповідно, існує потреба у поліпшенні направленої проти пухлини терапії, перш за все адаптивної Т-клітинної терапії, щоб задовольнити потреби онкологічних пацієнтів. Таким чином, все ще існує необхідність в розробці поліпшених засобів, здатних поліпшити безпеку і ефективність АКТ і виключити зазначені вище недоліки.

Короткий опис даного винаходу

Даний винахід в основному стосується антигензв'язуючих рецепторів, здатних специфічно

зв'язуватися з мутованими Fc доменами, які характеризуються зниженням зв'язуванням з Fc рецептором, і Т-клітин, які експресують ці антигензв'язуючі рецептори.

В одному об'єкті даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає заякорений трансмембранний домен, і позаклітинний домен, що включає антигензв'язуючий фрагмент, де антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим фрагментом (Fc) домену, який кристалізується, але не здатний зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну заміну в порівнянні з немутованим вихідним Fc доменом.

В одному варіанті зв'язування Fc рецептора з мутованим Fc доменом знижене в порівнянні зі зв'язуванням Fc рецептора з немутованим вихідним Fc доменом, перш за все, де Fc рецептор є Fc γ рецептором або неонатальним Fc рецептором (FcRn). В одному варіанті зв'язування Fc рецептора вимірюють методом поверхневого плазмонного резонансу (ППР) при 25°C.

В одному варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv, Fab, crossFab або scFab фрагмент. У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv. В іншому кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab або crossFab.

В одному варіанті здійснення даного винаходу заякорений трансмембранний домен являє собою трансмембранний домен, вибраний з групи, яка складається з CD8, CD3z, FCGR3A, NKG2D, CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 або DAP12 трансмембранного домену або їх фрагментів.

В одному варіанті заякорений трансмембранний домен являє собою трансмембранний домен CD8, перш за все, де заякорений трансмембранний домен включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11.

В одному варіанті здійснення даного винаходу антигензв'язуючий рецептор додатково включає принаймні один стимулюючий сигнальний домен і/або принаймні костимулюючий сигнальний домен. В одному варіанті здійснення даного винаходу принаймні один стимулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, яка складається з внутрішньоклітинного домену CD3z, FCGR3A і NKG2D або їх фрагментів. В одному варіанті здійснення даного винаходу принаймні один стимулюючий сигнальний домен являє собою внутрішньоклітинний домен CD3z, перш за все, де принаймні один стимулюючий сигнальний домен включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13. В одному варіанті здійснення даного винаходу принаймні один костимулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, яка складається з внутрішньоклітинного домену CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 і DAP12 або їх фрагментів. В одному варіанті здійснення даного винаходу принаймні один костимулюючий сигнальний домен являє собою внутрішньоклітинний домен CD28. В одному варіанті здійснення даного винаходу антигензв'язуючий рецептор включає один стимулюючий сигнальний домен, що включає внутрішньоклітинний домен CD3z або його фрагмент, і де антигензв'язуючий рецептор включає костимулюючий сигнальний домен, що включає внутрішньоклітинний домен CD28 або його фрагмент. В одному варіанті здійснення даного винаходу стимулюючий сигнальний домен включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13 і костимулюючий сигнальний домен включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12.

В одному варіанті здійснення даного винаходу позаклітинний домен приєднаний до заякореного трансмембранного домену, необов'язково через пептидний лінкер. В одному варіанті здійснення даного винаходу пептидний лінкер включає амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID NO:17). В одному варіанті здійснення даного винаходу заякорений трансмембранний домен приєднаний до косигнального домену або до сигнального домену, необов'язково через пептидний лінкер. В одному варіанті здійснення даного винаходу сигнальний і/або косигнальний домени з'єднані, необов'язково принаймні через один пептидний лінкер.

В одному варіанті здійснення даного винаходу антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv фрагмент, приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, необов'язково через пептидний лінкер.

В одному варіанті здійснення даного винаходу антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент або crossFab фрагмент, де Fab або crossFab фрагмент приєднаний через С-кінцевий залишок важкого ланцюга до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, необов'язково через пептидний лінкер.

В одному варіанті здійснення даного винаходу антигензв'язуючий рецептор включає один косигнальний домен, де косигнальний домен приєднаний через N-кінцевий залишок до С-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену. В одному варіанті здійснення даного винаходу антигензв'язуючий рецептор включає один стимулюючий сигнальний домен, де стимулюючий сигнальний домен приєднаний через N-кінцевий залишок до С-кінцевого

залишку костимулюючого сигнального домену.

В одному варіанті немутований Fc домен являє собою IgG1 або IgG4 Fc домен, перш за все IgG1 Fc домен людини. В одному варіанті мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну мутацію в положенні, вибраному з групи, яка складається з L234, L235, I253, H310, P331, P329 і/або H435 згідно EU нумерації, перш за все, де амінокислотною мутацією є L234A, L235A, I253A, N297A, H310A, P329G і/або H435A.

В одному варіанті мутований Fc домен включає принаймні одну мутацію в положенні, вибраному з групи, яка складається з L234, L235 і P329 згідно EU нумерації, перш за все амінокислотні мутації L234A, L235A і P329G ("PGLALA").

В одному варіанті мутований Fc домен включає амінокислотну мутацію P329G згідно EU нумерації, де зв'язування Fc γ рецептора з мутованим Fc доменом знижується в порівнянні зі зв'язуванням Fc γ рецептора з немутованим вихідним Fc доменом, перш за все, де Fc γ рецептор являє собою Fc γ RIIIa і/або Fc γ RIIa людини.

В одному варіанті мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну мутацію в положенні, вибраному з групи, яка складається з I253, H310 і H435 згідно EU нумерації, перш за все амінокислотні мутації I253A, H310A і H435A ("AAA"), де зв'язування FcRn з мутованим Fc доменом знижується в порівнянні зі зв'язуванням FcRn з немутованим вихідним Fc доменом.

В одному варіанті принаймні один антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим Fc доменом, де антигензв'язуючий фрагмент включає:

(i) варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, яка включає

(a) 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RYWMN (SEQ ID NO:1),

(б) CDR H2 з амінокислотною послідовністю EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO:2) і

(в) CDR H3 з амінокислотною послідовністю PYDYGAWFAS (SEQ ID NO:3), і

(ii) варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), яка включає

(г) 1-у ділянку легкого ланцюга (CDR L), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:4),

(д) CDR L2 з амінокислотною послідовністю GTNKRAP (SEQ ID NO:5) і

(е) CDR L3 з амінокислотною послідовністю ALWYSNHWV (SEQ ID NO:6).

В одному варіанті принаймні один антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим Fc доменом, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), яка включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з SEQ ID NO:8 і SEQ ID NO:32, і варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), яка включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO:9 і SEQ ID NO:33.

В одному варіанті здійснення даного винаходу антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH) SEQ ID NO:8 і варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) SEQ ID NO:9.

В одному варіанті принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv, який здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO:7 і SEQ ID NO:31. В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7.

В одному варіанті принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, який здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор включає

а) гібридний поліпептид важкого ланцюга, який принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентичний амінокислотній послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO:39 і SEQ ID NO:48, і

б) поліпептид легкого ланцюга, який принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентичний амінокислотній послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO:41 і SEQ ID NO:50.

В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор включає

а) гібридний поліпептид важкого ланцюга SEQ ID NO:39 і

б) поліпептид легкого ланцюга SEQ ID NO:41.

В одному варіанті принаймні один антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає амінокислотні мутації I253A, H310A і H435A ("AAA"), але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий фрагмент включає:

(i) варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, яка включає

(а) 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю SYGMS (SEQ ID NO:53),

(б) CDR H2 з амінокислотною послідовністю SSGGSY (SEQ ID NO:54) і

(в) CDR H3 з амінокислотною послідовністю LGMITTGYAMDY (SEQ ID NO:55), і

(ii) варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), яка включає

(г) 1-у ділянку легкого ланцюга (CDR L), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO:56),

(д) CDR L2 з амінокислотною послідовністю KVSNRFS (SEQ ID NO:57) і

(е) CDR L3 з амінокислотною послідовністю FQGSHPYPT (SEQ ID NO:58).

В одному варіанті принаймні один антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає амінокислотні мутації I253A, H310A і H435A ("AAA"), але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), яка включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 61, і варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), яка включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:62.

В одному варіанті принаймні один антигензв'язуючий фрагмент включає

а) варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга SEQ ID NO:61 і

б) варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга SEQ ID NO:62.

В одному варіанті принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv, який здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A ("AAA"), але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:59. В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:59.

В одному варіанті принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, який здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор включає

а) гібридний поліпептид важкого ланцюга, який принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентичний амінокислотній послідовності SEQ ID NO:39, і

б) поліпептид легкого ланцюга, який принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентичний амінокислотній послідовності SEQ ID NO:41.

В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор включає

а) гібридний поліпептид важкого ланцюга SEQ ID NO:39 і

б) поліпептид легкого ланцюга SEQ ID NO:41.

В одному варіанті пропонується виділений поліпептид, що кодує антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті. В одному варіанті пропонується виділений поліпептид, що кодує гібридний поліпептид важкого ланцюга або поліпептид легкого ланцюга антигензв'язуючого рецептора, як описано в даному контексті. В одному варіанті пропонується композиція, що кодує антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, що включає перший виділений поліпептид, що кодує гібридний поліпептид важкого ланцюга, і другий виділений поліпептид, що кодує поліпептид легкого ланцюга.

В одному варіанті пропонується поліпептид, кодований поліпептидом, як описано в даному контексті, або композицією, як описано в даному контексті.

В одному варіанті пропонується вектор, перш за все експресійний вектор, що включає поліпептид (поліпептиди), як описано в даному контексті.

В одному варіанті пропонується трансдукована Т-клітина, яка включає поліпептид (поліпептиди), як описано в даному контексті, або вектор, як описано в даному контексті. В одному варіанті пропонується трансдукована Т-клітина, здатна експресувати антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті. В одному варіанті пропонується трансдукована Т-

клітина, як описано в даному контексті, при цьому трансдуковану Т-клітину ко-трансдукують з Т-клітинним рецептором (TCR), здатним специфічно зв'язуватися з антигеном-мішенню.

В одному варіанті пропонується набір, що включає

5 (А) трансдуковану Т-клітину, здатну експресувати антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, і

(Б) антитіло, яке включає мутований Fc домен,

де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

В одному варіанті пропонується набір, що включає

10 (А) виділений поліонуклеотид, що кодує антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, і

(Б) антитіло, яке включає мутований Fc домен,

де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

15 В одному варіанті пропонується набір, що включає

(А) композицію або вектор, як описано в даному контексті, який кодує антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, і

(Б) антитіло, яке включає мутований Fc домен,

20 де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

В одному варіанті немутований вихідний Fc домен являє собою IgG1 або IgG4 Fc домен, перш за все IgG1 Fc домен людини. В одному варіанті пропонується мутований Fc домен, що включає принаймні одну амінокислотну мутацію в положенні, вибраному з групи, яка складається з L234, L235, I253, H310, P331, P329 і/або H435 згідно EU нумерації, перш за все,

25 де амінокислотною мутацією є L234A, L235A, I253A, N297A, H310A, P329G і/або H435A. В одному варіанті мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну мутацію в положенні, вибраному з групи, що складається з L234, L235 і P329 згідно EU нумерації, перш за все амінокислотні мутації L234A, L235A і P329G ("PGLALA"). В одному варіанті мутований Fc домен включає амінокислотну мутацію P329G згідно EU нумерації. В одному варіанті мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну мутацію в положенні, вибраному з групи, яка складається з I253, H310 і H435 згідно EU нумерації, перш за все амінокислотні мутації I253A, H310A і H435A ("AAA").

В одному варіанті антитіло, яке включає мутований Fc домен, здатний специфічно зв'язуватися з антигеном на поверхні пухлинної клітини, перш за все, де антиген вибирають з групи, що включає FAP, CEA, p95, BCMA, EpCAM, MSLN, MCSP, HER-1, HER-2, HER-3, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, FOLR1, Trop-2, CA-12-5, HLA-DR, MUC-1 (муцин), A33-антигену, PSMA, PSCA, рецептору трансферрину, TNC (тенасцин), CA-IX і/або з пептидом, приєднаним до молекули головного комплексу гістосумісності людини (MHC). В одному варіанті здійснення даного винаходу антитіло, яке включає мутований Fc домен, здатне специфічно

40 зв'язуватися з антигеном, вибраним з групи, яка складається з білка активації фібробластів (FAP), карциноембріонального антигену (CEA), мезотеліну (MSLN), CD20, рецептору 1 фолієвої кислоти (FOLR1) і тенасцину (TNC).

В одному варіанті пропонується набір, як описано в даному контексті, для застосування як лікарського засобу.

45 В одному варіанті пропонується антигензв'язуючий рецептор або трансдукована Т-клітина, як описано в даному контексті, для застосування як лікарського засобу, де трансдуковану Т-клітину, яка експресує антигензв'язуючий рецептор, вводять до, одночасно з ним або після введення антитіла, що включає мутований Fc домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

В одному варіанті пропонується набір, як описано в даному контексті, для застосування при лікуванні злоякісного захворювання. В одному варіанті пропонується антигензв'язуючий рецептор або трансдукована Т-клітина, як описано в даному контексті, для застосування при лікуванні злоякісного захворювання, де лікування включає введення трансдукованої Т-клітини, яка експресує антигензв'язуючий рецептор, до, одночасно з ним або після введення антитіла, що включає мутований Fc домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

60 В одному варіанті вказане злоякісне захворювання вибирають з раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і злоякісного захворювання крові.

В одному варіанті трансдуковану Т-клітину одержують з клітини, виділеної з організму суб'єкта, якого належить лікувати. В одному варіанті трансдуковану Т-клітину не одержують з клітини, виділеної з організму суб'єкта, якого необхідно лікувати.

В одному варіанті пропонується спосіб лікування захворювання у суб'єкта, що включає введення суб'єкту трансдукованої Т-клітини, здатної експресувати антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, і введення до, одночасно з ним або після введення трансдукованої Т-клітини, терапевтично ефективної кількості антитіла, що включає мутований Fc домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом. В одному варіанті Т-клітину додатково виділяють з організму суб'єкта і трансдуковану Т-клітину одержують за допомогою трансдукції виділеної Т-клітини з використанням полінуклеотиду, композиції або вектора, як описано в даному контексті. В одному варіанті Т-клітину трансдукують конструктором ретровірусного або лентівірусного вектора або конструктором невірусного вектора. В одному варіанті конструктором невірусного вектора є мінікільцевий вектор "спляча красуня".

В одному варіанті трансдуковану Т-клітину вводять суб'єкту внутрішньовенним вливанням. В одному варіанті до введення суб'єкту трансдукована Т-клітина контактує з антитілами анти-CD3 і/або анти-CD28. В одному варіанті до введення суб'єкту трансдукована Т-клітина контактує принаймні з одним цитокином, краще з інтерлейкіном-2 (IL-2), інтерлейкіном-7 (IL-7), інтерлейкіном-15 (IL-15) і/або з інтерлейкіном-21 (IL-21 або їх варіантами).

В одному варіанті захворюванням є злоякісне захворювання. В одному варіанті злоякісне захворювання вибирають з раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і злоякісного захворювання крові.

В одному варіанті пропонується спосіб індукції лізису клітини-мішені, що включає контактування клітини-мішені з трансдукованою Т-клітиною, здатною експресувати антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, в присутності антитіла, що включає мутований Fc домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

В одному варіанті клітиною-мішенню є пухлинна клітина. В одному варіанті клітина-мішень експресує антиген, вибраний з групи, яка складається з FAP, CEA, p95, BCMA, EpCAM, MSLN, MCSP, HER-1, HER-2, HER-3, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, FOLR1, Trop-2, CA-12-5, HLA-DR, MUC-1 (муцин), A33-антигену, PSMA, PSCA, рецептору трансферину, TNC (тенасцин) і CA-IX. В одному варіанті клітина-мішень експресує антиген, вибраний з групи, яка складається з карциномембранного антигену (CEA), мезотеліну (MSLN), CD20, рецептора 1 фолієвої кислоти (FOLR1) і тенасцину (TNC).

В одному варіанті полінуклеотиди або трансдуковану Т-клітину, як описано в даному контексті, використовують для одержання лікарського засобу. В одному варіанті лікарський засіб призначений для лікування злоякісного захворювання.

Короткий опис фігур

На фіг. 1 показана структура типових антигензв'язуючих рецепторів даного винаходу. На фіг. 1A показана структура формату анти-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD і формату анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD. Вказаний позаклітинний домен, що включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G. Антигензв'язуючий фрагмент складається з варіабельного важкого ланцюга і варіабельного легкого ланцюга. Обидва ланцюги з'єднані через лінкер (Gly₄Ser)₄. Лінкер (Gly₄Ser)₄, приєднаний до варіабельного легкого ланцюга, з'єднує домен, що розпізнає антиген з CD28 трансмембранним доменом (TM), який приєднаний до внутрішньоклітинного коstimулюючого сигнального домену (CDS) в складі CD28, який в свою чергу приєднаний до стимулюючого сигнального домену (SSD) в складі CD3z. На фіг. 1B показана структура форматів анти-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD і анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD. Вказаний позаклітинний домен, що включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G. Антигензв'язуючий фрагмент складається з важкого ланцюга Ig і легкого ланцюга Ig. Приєднаний до важкого ланцюга лінкер(Gly₄Ser)₄ з'єднує домен, що розпізнає антиген з CD28 трансмембранним доменом, який приєднаний до внутрішньоклітинного коstimулюючого сигнального домену в складі CD28, який в свою чергу приєднаний до стимулюючого сигнального домену в складі CD3z.

На фіг. 2 показано схематичне зображення, яке ілюструє модульну композицію типових експресійних конструктів, які кодуєть антигензв'язуючі рецептори даного винаходу. На фіг. 2A

показаний направлений до P392G формат scFab. На фіг. 2Б показаний направлений до P392G формат Fab.

На фіг. 3 показана типова молекула IgG1, яка несе мутацію P329G в Fc домені, яка розпізнається анти-P329G антигензв'язуючим рецептором даного винаходу.

На фіг. 4 показано схематичне зображення пухлиноасоційованого антигену (ТАА), приєднаного до IgG, який несе мутацію P329G. Це антитіло в свою чергу розпізнається Т-клітиною, що експресує анти-P329G антигензв'язуючий рецептор, при цьому Т-клітина активується.

На фіг. 5 показано схематичне зображення методу аналізу за репортерним геном Т-клітин Jurkat NFAT. ТАА, приєднаний до IgG, який несе мутацію P329G, можна розпізнавати з використанням анти-P329G антигензв'язуючого рецептора, експресованого Т-клітиною Jurkat NFAT. Таке розпізнавання призводить до активації клітини, яку можна детектувати за інтенсивністю люмінесценції (імп. /с).

На фіг. 6 показаний метод аналізу Т-клітин Jurkat NFAT за репортерним геном з використанням пухлинних клітин SUDHL4, які експресують CD20, як клітини-мішені. Використовували антитіло anti-CD20 IgG (GA101), що несе мутацію P329G, яке з одного боку розпізнає пухлиноасоційований антиген, а з іншого боку розпізнається антигензв'язуючими рецепторами за даним винаходом, які експресуються Т-клітинами Jurkat NFAT. На фіг. 6А відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, які експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини. На фіг. 6Б відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, які експресують anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини.

На фіг. 7 показаний метод аналізу Т-клітин Jurkat NFAT за репортерним геном з використанням CD20 пухлинних клітин як клітин-мішеней. Використовували антитіло anti-CD20 IgG (GA101), що несе мутацію P329G, яке розпізнає пухлиноасоційований антиген і розпізнається антигензв'язуючими рецепторами за даним винаходом, експресованими Т-клітинами Jurkat NFAT. На фіг. 7А єдиний клон 5 Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітин, а клітини WSUDLCL2 були використані як пухлинні клітини. На фіг. 7Б єдиний клон 2 Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини, а клітини WSUDLCL2 були використані як пухлинні клітини. На фіг. 7В єдиний клон 5 Т-клеток Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини, а клітини SUDHL4 були використані як пухлинні клітини. На фіг. 7Г єдиний клон 2 Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини.

На фіг. 8 показаний метод аналізу Т-клітин Jurkat NFAT за репортерним геном з використанням адгезивних пухлинних клітин NIH/3T3-huFAP cl 19, що експресують FAP, як клітини-мішені. Був використаний клон 4B9 антитіла anti-FAP IgG, що несе мутацію P329G, що розпізнає пухлиноасоційований антиген і розпізнається антигензв'язуючими рецепторами за даним винаходом, експресованими Т-клітинами Jurkat NFAT. Для контролю ізотипів був включений IgG DP47/vk3, що несе мутацію P329G. На фіг. 8А відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини. На фіг. 8Б відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини. На фіг. 8В відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини. На фіг. 8Г відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини.

На фіг. 9 показаний метод аналізу Т-клітин Jurkat NFAT за репортерним геном з використанням адгезивних пухлинних клітин MKN45, що експресують CEA, як клітин-мішеней. Був використаний або клон A5B7 анти-CEA IgG або клон T84 LCHA анти-CEA IgG, які обидва несуть мутацію P329G, і які розпізнають пухлиноасоційований антиген і розпізнаються антигензв'язуючими рецепторами за винаходом, експресованими Т-клітинами Jurkat NFAT. Далі для контролю ізотипів був включений IgG DP47/vk3, що несе мутацію P329G. На фіг. 9А і фіг. 9Б відсортований пул клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини. На фіг. 9В і фіг. 9Г відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини.

На фіг. 10 показаний метод аналізу Т-клітин Jurkat NFAT за репортерним геном з використанням адгезивних пухлинних клітин MKN45, що експресують CEA, як клітин-мішеней.

Був використаний або клон anti-CEA CH1A1A 98 99 або клон hMN14 IgG анти-CEA IgG, які обидва несуть мутацію P329G, і які розпізнають пухлиноасоційований антиген і розпізнаються антигензв'язуючими рецепторами за даним винаходом, експресованими Т-клітинами Jurkat NFAT. Далі для контролю ізотипів був включений IgG DP47/vk3, що несе мутацію P329G. На фіг. 10А і фіг. 10Б відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини. На фіг. 10В і фіг. 10Г відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини.

На фіг. 11 показаний метод аналізу Т-клітин Jurkat NFAT за репортерним геном з використанням адгезивних пухлинних клітин CT26TNC cl 19, що експресують TNC, як клітин-мішеней. Клон анти-TNC IgG A2B10, що несе мутацію P329G, був використаний як антитіло IgG, яке розпізнає пухлиноасоційований антиген і розпізнається антигензв'язуючими рецепторами за даним винаходом, експресованими Т-клітинами Jurkat NFAT. Далі для контролю ізотипів був включений IgG DP47/vk3, що несе мутацію P329G. На фіг. 11А і фіг. 11Б відсортований пул клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини. На фіг. 11В і фіг. 11Г відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини.

На фіг. 12А і фіг. 12Б показаний метод аналізу Т-клітин Jurkat NFAT за репортерним геном з використанням адгезивних пухлинних клітин CT26TNC cl 19, що експресують TNC, як клітин-мішеней. Клон анти-TNC IgG A2B10, що несе мутацію P329G, був використаний як антитіло IgG, яке розпізнає пухлиноасоційований антиген і розпізнається антигензв'язуючими рецепторами за даним винаходом, експресованими Т-клітинами Jurkat NFAT. Далі для контролю ізотипів був включений IgG DP47/vk3, що несе мутацію P329G. Відсортований пул клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини.

На фіг. 13 показаний метод аналізу Т-клітин Jurkat NFAT за репортерним геном з використанням CD20 пухлинних клітин як клітин-мішеней. Використовували або антитіло anti-CD20 IgG (GA101), що несе мутацію P329G і мутацію LALA, мутацію P329G і D265A, тільки мутацію LALA, або взагалі не несе мутацій, які можна використовувати для детекції пухлиноасоційованого антигену, і які розпізнаються антигензв'язуючими рецепторами за даним винаходом, експресованими Т-клітинами Jurkat NFAT. На фіг. 13А пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини, а клітини SUDHL4 були використані як пухлинні клітини. На фіг. 13Б пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини, а клітини SUDHL4 були використані як пухлинні клітини.

На фіг. 14 показаний метод аналізу Т-клітин Jurkat NFAT за репортерним геном з використанням CD20 пухлинних клітин як клітин-мішеней. Використовували або антитіло анти-CD20 IgG (GA101), що несе мутацію P329G і мутацію LALA, тільки мутацію P329G, тільки мутацію LALA або яке взагалі не несе мутацій, які можна використовувати для детектування пухлиноасоційованого антигену, і які розпізнаються антигензв'язуючими рецепторами за винаходом, експресованими Т-клітинами Jurkat NFAT. На фіг. 14А пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини, а клітини SUDHL4 були використані як пухлинні клітини. На фіг. 14Б пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують anti-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, був використаний як ефекторні клітини, а клітини SUDHL4 були використані як пухлинні клітини.

Детальний опис даного винаходу

Визначення

Використані в даному контексті терміни в основному являють собою стандартні терміни, використововані в рівні техніки, якщо інакше не визначено в наступному розділі опису винаходу.

Термін "активуючий Fc рецептор" означає Fc рецептор, який після взаємодії з Fc доменом антитіла випускає сигнали, які стимулюють клітину, що несе рецептор, для виконання ефекторних функцій. Активуючі Fc рецептори людини включають FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) і FcαRI (CD89).

Термін "антитілозалежна опосередкована клітинами цитотоксичність" (ADCC) означає імунний механізм, що призводить до лізису покритих антитілом клітин-мішеней під дією імунних ефекторних клітин. Клітини-мішені являють собою клітини, з якими специфічно зв'язуються антитіла або їх похідні, які містять Fc ділянку, в основному через N-кінцевий залишок білкової частини, в напрямку до Fc ділянки. Використаний в даному контексті термін "знижена ADCC" визначений або як зниження числа клітин-мішеней, які лізують в певний момент часу при певній

концентрації антитіла в середовищі, що оточує клітини-мішені, за механізмом ADCC, як визначено вище, і/або підвищення концентрації антитіла в середовищі, що оточує клітини-мішені, яке потрібне для здійснення лізису певного числа клітин-мішеней в певний момент часу за механізмом ADCC. Зниження ADCC визначають відносно ADCC, опосередкованої тим же

5 самим антитілом, яке продукується тим же самим типом клітин-хазяїна, з використанням стандартних методів продукування, очищення, переробки та зберігання (які відомі спеціалістам в даній галузі техніки), але яке не піддавалося мутації. Наприклад, зниження ADCC, опосередковане антитілом, що включає в своєму Fc домені амінокислотну мутацію, яка знижує ADCC, визначають щодо ADCC, опосередкованої тим же самим антитілом, що не містить

10 зазначену амінокислотну мутацію в Fc домені. Придатні методи визначення ADCC відомі в даній галузі техніки [див., наприклад, заявку PCT WO 2006/082515 або заявку PCT WO 2012/130831].

Термін "ефективна кількість" агента (наприклад, антитіло) означає кількість, яка потрібна для здійснення фізіологічної зміни в клітині або тканині, в які його вводять.

15 Термін "афінність" означає силу сумарних нековалентних взаємодій між однією ділянкою зв'язування молекули (наприклад, рецептор) і його зв'язуючим партнером (наприклад, ліганд). Якщо не вказано інше, використаний в даному контексті термін "зв'язуюча афінність" означає характерну зв'язуючу афінність, яка відображає взаємодію 1:1 між членами пари, що зв'язується (наприклад, антигензв'язуючий фрагмент і антиген, або рецептор і його ліганд). Афінність

20 молекули X щодо її партнера Y в основному можна представити у вигляді константи дисоціації (K_D), яка дорівнює співвідношенню константи швидкості дисоціації і константи швидкості асоціації (K_{off} і K_{on} , відповідно). Таким чином, значення еквівалентних афінностей можуть включати різні константи швидкостей, за умови, що співвідношення констант швидкостей залишається однаковим. Афінність можна визначити добре відомими методами, описаними в

25 даній галузі техніки, включаючи методи, описані в даному контексті. Кращим методом визначення афінності є поверхневий плазмонний резонанс (ППР), а краща температура вимірювання становить 25°.

Термін "амінокислота" стосується природних чи синтетичних амінокислот, а також аналогів амінокислот і міметиків амінокислот, які проявляють функцію способом, аналогічним до

30 природних амінокислот. Природними амінокислотами є амінокислоти, які кодуються генетичним кодом, і такі амінокислоти, які були пізніше модифіковані, наприклад, гідроксипролін, γ -карбоксиглютамат і О-фосфосерин. Аналогами амінокислот є сполуки, які мають основну хімічну структуру, однакову з природними амінокислотами, тобто у яких присутній атом α вуглецю, зв'язаний з воднем, карбоксильною групою і R групою, наприклад, гомосерин,

35 норлейцин, сульфоксид метіоніну, метилсульфоній метіоніну. Такі аналоги містять модифіковані R групи (наприклад, норлейцин) або модифікований пептидний ланцюг, але зберігають основну хімічну структуру, як і природна амінокислота. Амінокислотними міметиками є хімічні сполуки, що мають структуру, яка відрізняється від основної хімічної структури амінокислот, але виявляють функцію, аналогічну до природних амінокислот. Амінокислоти, зазначені в даному

40 контексті, можна позначати або за допомогою широко відомого трьохбуквенного коду, або за допомогою однобуквенного коду, рекомендованого Комісією з біохімічної номенклатури IUPAC-IUB.

Термін "амінокислотна мутація", використаний в даному контексті, включає заміни, делеції, вставки і модифікації амінокислот. Можна виконати будь-яку комбінацію заміни, делеції, вставки

45 і модифікації амінокислоти, щоб одержати кінцевий конструкт, який забезпечує прояв кінцевим конструктом необхідних характеристик, наприклад, знижене зв'язування з Fc рецептором. Делеції і вставки амінокислотної послідовності включають делеції і вставки аміно- і/або карбокси-кінцевих амінокислот. Конкретними амінокислотними мутаціями є амінокислотні заміни. З метою зміни, наприклад, зв'язуючих характеристик Fc ділянки, перш за все кращими є заміни неконсервативних амінокислот, тобто заміна однієї амінокислоти на іншу амінокислоту з

50 різними структурними і/або хімічними властивостями. Амінокислотні заміни включають заміну на неприродні амінокислоти або на похідні однієї з двадцяти стандартних природних амінокислот (наприклад, 4-гідроксипролін, 3-метилгістидин, орнітин, гомосерин, 5-гідроксилізін). Амінокислотні мутації можна одержати з використанням генетичних або хімічних методів, відомих в даній галузі техніки. Генетичні методи можуть включати сайт-направлений мутагенез, ПЛР, синтез генів і т.п. Вважають, що також можуть бути використані методи зміни бічної групи амінокислотного ланцюга з використанням відмінних від генної інженерії методик, таких як хімічна модифікація. Для позначення аналогічної мутації можна використовувати різні позначення. Наприклад, заміщення проліну в положенні 329 в Fc домені на гліцин можна

60 позначити як 329G, G329, P329G, або Pro329Gly.

Термін "антитіло" в даному контексті використовується в самому широкому сенсі і включає різні структури антитіл, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, моноклональні антитіла, поліклональні антитіла і фрагменти антитіл, за умови, що вони проявляють необхідну антигензв'язуючу активність. Відповідно, в контексті даного винаходу термін антитіло стосується повнорозмірних молекул імуноглобуліну, а також частин таких молекул імуноглобуліну. Більш того, термін стосується, як описано в даному контексті, модифікованих і/або змінених молекул антитіла, перш за все мутованих молекул антитіла. Термін також стосується одержаних рекомбінантним або синтетичним методом / синтезованих антитіл. У контексті даного винаходу термін антитіло використовується як взаємозамінний з терміном імуноглобулін.

Термін "фрагмент антитіла" означає молекулу, що відрізняється від інтактного антитіла, що включає частину інтактного антитіла, яка зв'язується з антигеном, з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіла включають, проте, не обмежуючись тільки ними, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, діатіла, лінійні антитіла, одноланцюгові антитіла (наприклад, scFv), і антитіла, які містять один домен. Див. огляд, в якому описані визначені фрагменти антитіл [Hudson та ін., Nat. Med., 9, сс. 129-134 (2003)]. Огляд scFv фрагментів наведений, наприклад, в статті Plücker, в [книзі The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, т. 113, Rosenberg and Moore вид., Springer-Verlag, New York, сс. 269-315 (1994)], див. також [заявку WO 93/16185 і патенти US № 5571894 і US № 5587458]. Діатіла являють собою фрагменти антитіл з двома антигензв'язуючими ділянками, які можуть бути бівалентними або біспецифічними. Див., наприклад, [патент EP 404097, заявку WO 1993/01161, статті Hudson та ін., Nat. Med., 9, сс. 129-134 (2003) і Hollinger та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, сс. 6444-6448 (1993)]. Тритіла і тетратіла [описані в статті Hudson та ін., Nat. Med., 9, сс. 129-134 (2003)]. Антитіла з одним доменом є фрагментами антитіл, що включають весь варіабельний домен важкого ланцюга або частину варіабельного домена важкого ланцюга або весь варіабельний домен легкого ланцюга або частину варіабельного домена легкого ланцюга антитіла [Domantis, Inc., Waltham, MA, див., наприклад, патент US 6248516 B1]. Фрагменти антитіл можна одержати різними методами, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, розщеплення протеолітичними ферментами інтактного антитіла, а також продукування рекомбінантними клітинами-хазіяїна (наприклад, E. coli або фаг), як описано в даному контексті.

Термін "антигензв'язуюча молекула", використана в даному контексті в найширшому сенсі, означає молекулу, яка специфічно зв'язується з антигенною детермінантою. Приклади антигензв'язуючих молекул включають імуноглобуліни і їх похідні, наприклад, їх фрагменти, а також антигензв'язуючі рецептори і їх похідні.

Як використано в даному контексті, термін "антигензв'язуючий фрагмент" означає поліпептидну молекулу, яка специфічно зв'язується з антигенною детермінантою. В одному варіанті антигензв'язуючий фрагмент здатний направляти всю структурну одиницю, до якої він приєднаний (наприклад, імуноглобулін або антигензв'язуючий рецептор), до ділянки-мішені, наприклад, до специфічного типу пухлинної клітини або до пухлинної стромы, що несе антигенну детермінанту, або до імуноглобуліну, що зв'язується з антигенною детермінантою на пухлинній клітині. В іншому варіанті антигензв'язуючий фрагмент здатний активувати передачу сигналу через його антиген-мішень, наприклад, передача сигналу, що активується після зв'язування антигенної детермінанти з антигензв'язуючим рецептором на Т-клітині. У контексті даного винаходу антигензв'язуючі фрагменти можуть бути включені до складу антитіл і їх фрагментів, а також до складу антигензв'язуючих рецепторів і їх фрагментів, як буде додатково визначено в даному контексті. Антигензв'язуючі фрагменти включають антигензв'язуючий домен, який включає варіабельну ділянку важкого ланцюга імуноглобуліну і варіабельну ділянку легкого ланцюга імуноглобуліну. У деяких варіантах антигензв'язуючі фрагменти можуть включати консервативні ділянки імуноглобуліну, як буде додатково визначено в даному контексті і відомо в рівні техніки. Придатні консервативні ділянки важкого ланцюга включають будь-який з п'яти ізотипів: α, δ, ε, γ або μ. Придатні консервативні ділянки легкого ланцюга включають будь-який з двох ізотипів: κ і λ.

У контексті даного винаходу термін "антигензв'язуючий рецептор" стосується антигензв'язуючої молекули, яка включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, що включає принаймні один антигензв'язуючий фрагмент. Антигензв'язуючий рецептор можна одержати з поліпептидних частин з різних джерел. Відповідно, слід також розуміти, що цей термін можна визначити, як "гібридний білок" і/або "химерний білок". Зазвичай, гібридні білки є білками, які конструюють при з'єднанні двох або більше генів (або краще кДНК), які початково кодують окремі білки. Трансляція цього гібридного гена (або гібридної кДНК) призводить до утворення одного поліпептиду, краще з функціональними властивостями, характерними для кожного з цих вихідних білків. Рекомбінантні гібридні білки конструюють

штучно з використанням технології рекомбінантних ДНК для застосування в біологічних дослідженнях або при одержанні медичних препаратів. Більш докладний опис антигензв'язуючих рецепторів даного винаходу представлений нижче в даному контексті. У контексті даного винаходу CAR (химерний антигенний рецептор) є антигензв'язуючим рецептором, що включає позаклітинну частину, яка включає антигензв'язуючий фрагмент, приєднаний через спейсерну послідовність до заякореного трансмембранного домену, який сам по собі приєднаний до внутрішньоклітинних сигнальних доменів CD3z і CD28.

Термін "антигензв'язуючий сайт" стосується сайту, тобто одного або більше амінокислотних залишків у складі антигензв'язуючої молекули, які забезпечують взаємодію з антигеном. Наприклад, антигензв'язуючий сайт антитіла або антигензв'язуючого рецептора включає амінокислотні залишки з ділянок (CDR), які визначають комплементарність. Молекула природного імуноглобуліну зазвичай містить два антигензв'язуючих сайти, а молекула Fab або scFv зазвичай містить один антигензв'язуючий сайт.

Термін "антигензв'язуючий домен" означає частину антитіла або антигензв'язуючого рецептора, що включає ділянку, яка специфічно зв'язується з частиною або інтактним антигеном і є комплементарною частині антигену або інтактному антигену. Антигензв'язуючий домен може містити, наприклад, один або більше варіабельних доменів імуноглобуліну (також називаються варіабельні ділянки). Більш детально, антигензв'язуючий домен включає варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) імуноглобуліну і варіабельний домен важкого ланцюга (VH) імуноглобуліну.

Термін "варіабельна ділянка" або "варіабельний домен" означає домен важкого або легкого ланцюга імуноглобуліну, які беруть участь у зв'язуванні з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга і легкого ланцюга (VH і VL, відповідно) природного антитіла зазвичай характеризуються однаковими структурами, при цьому кожен домен включає 4 консервативні каркасні ділянки (FR) і 3 гіперваріабельні ділянки (HVR). Див., [наприклад, Kindt та ін., Kuby Immunology, 6^е вид., Freeman W.H. and Co., с. 91 (2007)]. Для додання антигензв'язуючої специфічності може бути достатньо одного VH або VL домена.

Термін "АТД", використаний в даному контексті, стосується "заякореного трансмембранного домену", який має поліпептидний "тяж", здатний інтегруватися в клітинну мембрану (мембрани). АТМ можна приєднувати до додаткових позаклітинних і/або внутрішньоклітинних поліпептидних доменів, причому ці позаклітинні і/або внутрішньоклітинні поліпептидні домени рівним чином будуть включені в клітинну мембрану. В контексті антигензв'язуючих рецепторів даного винаходу АТМ забезпечує приєднання до мембрани і утримання в мембрані антигензв'язуючого рецептора даного винаходу. Антигензв'язуючі рецептори даного винаходу включають принаймні один АТМ і позаклітинний домен, що включає антигензв'язуючий фрагмент. Крім того, АТМ можна приєднувати до додаткових внутрішньоклітинних сигнальних доменів.

Термін "зв'язування", використаний в контексті антигензв'язуючих рецепторів даного винаходу, визначає зв'язування (взаємодію) "взаємодіючого з антигеном сайту" і антигену один з одним. Термін "взаємодіючий з антигеном сайт" визначає, щодо антигензв'язуючих рецепторів даного винаходу, поліпептидний мотив, який характеризується здатністю специфічно взаємодіяти з певним антигеном або специфічною групою антигенів (наприклад, мутовані Fc домени). Відповідно, слід розуміти, що вказане зв'язування / взаємодію можна визначити, як "специфічне розпізнавання". Термін "специфічне розпізнавання", відповідно до даного винаходу, означає, що антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно взаємодіяти і/або зв'язуватися з модифікованою молекулою, як визначено в даному контексті, але не розпізнає немодифіковану молекулу. Антигензв'язуючий фрагмент в складі антигензв'язуючого рецептора може розпізнавати різні епітопи, взаємодіяти і/або зв'язуватися з ними на одній і тій же молекулі. Цей термін стосується специфічності антигензв'язуючого рецептора, тобто його здатності розрізняти певні ділянки модифікованої молекули, тобто в мутованому Fc домені, як визначено в даному контексті. Специфічна взаємодія взаємодіючого з антигеном сайту з його специфічним антигеном може привести до ініціації сигналу, наприклад, за рахунок індукції зміни конформації поліпептиду, що включає антиген, олігомеризації поліпептиду, що включає антиген, олігомеризації антигензв'язуючого рецептора і т.п. Таким чином специфічний мотив в амінокислотній послідовності взаємодіючого з антигеном сайту і антиген зв'язуються один з одним за рахунок їх первинної, вторинної або третинної структури, а також за рахунок вторинних модифікацій зазначеної структури. Відповідно термін "зв'язування" стосується не тільки лінійного епітопу, але також може стосуватися конформаційного епітопу, структурного епітопу або переривчастого епітопу, який складається з двох ділянок молекул-мішеней або їх частин. У контексті даного винаходу конформаційний епітоп визначається двома або більше

окремими амінокислотними послідовностями, розділеними в первинній послідовності, які зближуються на поверхні молекули, коли поліпептид згортається в природний білок [Sela, Science 166 1365 (1969) i Laver, Cell 61, 553-536 (1990)]. Більш того, термін "зв'язування" використовується в даному контексті взаємозамінно з терміном "взаємодія". Здатність антигензв'язуючого фрагмента (наприклад, Fab або scFv домену) в складі антигензв'язуючого рецептора або антитіла зв'язуватися зі специфічною антигенною детермінантою-мішенню, можна оцінювати методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) або іншими методами, відомими спеціалісту в даній галузі техніки, наприклад, метод поверхневого плазмонного резонансу (ППР) (аналіз проводять в системі BIAcore) [Liljeblad та ін., Glyco J 17, 323-329 (2000)], і традиційних методів аналізу зв'язування [Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)]. В одному варіанті ступінь зв'язування антигензв'язуючого фрагмента з неспорідненим білком становить менше приблизно 10 % зв'язування антигензв'язуючого фрагмента з антигеном-мішенню за результатами вимірювання, перш за все методом ППР. У деяких варіантах антигензв'язуючий фрагмент, який зв'язується з антигеном-мішенню, характеризується константою дисоціації (K_D) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М). Термін "специфічне зв'язування", використаний відповідно до даного винаходу, означає, що молекули даного винаходу не виявляють або в основному не виявляють перехресну реактивність з (полі)пептидами з аналогічними структурами, тобто з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор за даним винаходом здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом. Відповідно антигензв'язуючий рецептор за даним винаходом специфічно зв'язується/взаємодіє з мутованим Fc доменом. Перехресну реактивність панелі досліджуваних конструктів можна визначати, наприклад, при оцінці зв'язування панелі антигензв'язуючих фрагментів в стандартних умовах [див. наприклад, Harlow i Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988) and Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1999)] зв'язування з досліджуваним мутованим Fc доменом, а також з вихідним немутованим Fc доменом. Тільки такі конструкти (тобто Fab фрагменти, scFv і т.п.), які зв'язуються з досліджуваним мутованим Fc доменом, але не зв'язуються або в основному не зв'язуються з немутованим вихідним Fc доменом, розглядаються як специфічні щодо вихідного мутованого Fc домена, і такі конструкти вибирають для подальших досліджень відповідно до способу, описаного в даному контексті. Ці методи можуть включати, поряд з іншими, дослідження зв'язування, блокування або конкурентного зв'язування з використанням структурно і/або функціонально близьких Fc доменів. Дослідження зв'язування також включає аналіз сортування клітин з активованою флуоресценцією (FACS), ППР (наприклад, з використанням біосенсорів BIAcore®), аналітичне ультрацентрифугування, ізотермічну титраційну калориметрію, флуоресцентну анізотропію, флуоресцентну спектроскопію або використання ліганда з радіоактивною міткою.

Термін "CDR", використаний в даному контексті, стосується "ділянки, що визначає комплементарність", яка добре відома в рівні техніки. CDR означають частини імуноглобулінів або антигензв'язуючих рецепторів, які визначають специфічність зазначених молекул і здійснюють контактування зі специфічним лігандом. CDR являють собою найбільш варіабельну частину молекули і вносять вклад в антигензв'язуючу різноманітність цих молекул. Існують три ділянки CDR: CDR1, CDR2 і CDR3 в кожному V домені. CDR-H являє собою CDR ділянку варіабельного важкого ланцюга, а CDR-L являє собою CDR ділянку варіабельної ділянки легкого ланцюга. VH означає варіабельний важкий ланцюг, а VL означає варіабельний легкий ланцюг. Ділянки CDR в ділянці Ig можна визначити, як описано у "Кабата" [Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5-те вид. NIH Publication №. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services (1991), Chothia J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)) або "Chothia" (Nature 342, 877-883 (1989)).

Термін "CD3z" стосується зета-ланцюга CD3 глікопротеїну T-клітинної поверхні, також відомий як "зета-ланцюг T-клітинного рецептора T3" і "CD247".

Термін "химерний рецептор антигену" або "химерний рецептор" або "CAR" стосується антигензв'язуючого рецептора, який представляє собою позаклітинну частину антигензв'язуючого фрагмента (наприклад, однопанцюговий домен антитіла), з'єднану через послідовність спейсера з внутрішньоклітинними сигнальними доменами в складі CD3z і CD28. У винаході додатково пропонуються антигензв'язуючі рецептори, причому антигензв'язуючим фрагментом є Fab або crossFab фрагмент. Термін "CAR" слід розуміти в найширшому сенсі, тобто цей термін включає антигензв'язуючі рецептори, що представляють собою позаклітинну частину, що включає антигензв'язуючий фрагмент, з'єднаний з CD3z і його фрагментом і з CD28 і його фрагментом необов'язково через один або декілька пептидних лінкерів.

Термін "клас" антитіла або імуноглобуліну означає тип консервативного домену або консервативної ділянки, характерний для важкого ланцюга антитіла. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і деякі з них можуть бути додатково підрозділені на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ і IgA₂. Консервативні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються α, δ, ε, γ і μ, відповідно.

Термін "кроссоверна Fab молекула" (також називається "crossFab" або "кроссоверний Fab фрагмент") означає Fab молекулу, в якій або варіабельні ділянки, або консервативні ділянки важкого і легкого ланцюгів Fab замінені один на одного, тобто crossFab фрагмент включає пептидний ланцюг, що складається з варіабельної ділянки легкого ланцюга і консервативної ділянки важкого ланцюга, і пептидний ланцюг, що складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга і консервативної ділянки легкого ланцюга. Для ясності, в crossFab фрагменті, де варіабельні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab замінені один на одного, причому пептидний ланцюг, що включає консервативну ділянку важкого ланцюга, в даному контексті називається важким ланцюгом кроссоверної Fab молекули. І навпаки, в crossFab фрагменті, де консервативні ділянки легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab замінені один на одного, причому пептидний ланцюг, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, в даному контексті називається важким ланцюгом кроссоверної Fab молекули. Відповідно crossFab фрагмент включає важкий або легкий ланцюг, що складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга і консервативної ділянки легкого ланцюга (VH-CL), і важкий або легкий ланцюг, що складається з варіабельної ділянки легкого ланцюга і консервативної ділянки важкого ланцюга (VL-CH1). І навпаки, термін "стандартна Fab" молекула означає Fab молекулу в її природному форматі, тобто яка включає важкий ланцюг, що складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга і консервативної ділянки важкого ланцюга (VH-CH1), і легкий ланцюг, що складається з варіабельної ділянки легкого ланцюга і консервативної ділянки легкого ланцюга (VL-CL).

Термін "CSD", використаний в даному контексті, означає костимулюючий сигнальний домен.

Термін "ефекторні функції" означає біологічні функції, які пов'язані з Fc ділянкою антитіла, і які змінюються в залежності від ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають: зв'язування C1q і залежну від комплементу цитотоксичність (CDC), зв'язування Fc рецептора, антитілозалежну опосередковану клітинами цитотоксичність (ADCC), антитілозалежний клітинний фагоцитоз (ADCP), секрецію цитокінів, опосередковане імунним комплексом захоплення антигену антиген-презентуючими клітинами, регуляцію зі зниженням активності рецепторів клітинної поверхні (наприклад, рецептор В-клітин) і активацію В-клітин.

Використані в даному контексті терміни "генно-інженерний, створений методом генної інженерії, сконструйований" включають будь-які дії на пептидний ланцюг або пост-трансляційні модифікації природного або рекомбінантного поліпептиду або його фрагмента. "Конструювання" включає модифікації амінокислотної послідовності, профілю глікозилювання або бічної групи індивідуальних амінокислот, а також комбінації таких підходів.

Термін "експресійна касета" стосується полінуклеотиду, одержаного рекомбінантним або синтетичним методом, з наборами специфічних елементів нуклеїнових кислот, які дозволяють здійснювати транскрипцію конкретної нуклеїнової кислоти в клітині-мішені. Рекомбінантну експресійну касету можна включити в плазмиду, хромосому, мітохондріальну ДНК, пластидну ДНК, вірус або фрагмент нуклеїнової кислоти. Зазвичай частина рекомбінантної експресійної касети експресійного вектора включає, поряд з іншими послідовностями, послідовність нуклеїнової кислоти, призначеної для транскрипції, і промотор. У деяких варіантах експресійна касета даного винаходу включає полінуклеотидні послідовності, які кодують антигензв'язуючі молекули даного винаходу або їх фрагменти.

Термін "Fab молекула" означає білок, що складається з VH і CH1 домену важкого ланцюга ("Fab важкий ланцюг") і VL і CL домену легкого ланцюга ("Fab легкий ланцюг") антигензв'язуючої молекули.

Термін "Fc домен" або "Fc ділянка", використаний в даному контексті, означає С-кінцеву ділянку важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить принаймні частину консервативної ділянки. Термін включає природні послідовності Fc ділянок і варіанти послідовностей Fc ділянок. Хоча межі Fc ділянки важкого ланцюга IgG можуть в незначній мірі змінюватися, зазвичай Fc ділянка важкого ланцюга IgG людини розташована від Cys226, або від Pro230, до С-кінцевого залишку важкого ланцюга. Однак С-кінцевий лізин (Lys447) Fc ділянки може як бути присутнім, так і бути відсутнім. Якщо в даному контексті не зазначено інше, нумерація амінокислотних залишків в Fc ділянці або в консервативній ділянці представлена відповідно до системи EU нумерації, яку називають також EU індексом, як описано в статті [Kabat та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5e вид., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

(1991)]. Термін "субодиниця Fc домена", використаний в даному контексті, означає один з двох поліпептидів, які формують димерний Fc домен, тобто поліпептид, що включає C-кінцеві консервативні ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну, здатні до стабільної самоасоціації. Наприклад, субодиниця Fc домена IgG включає консервативні домени IgG CH2 і IgG CH3.

Термін "каркасна ділянка" або "FR" означає залишки варіабельного домену, які відрізняються від залишків гіперваріабельної ділянки (HVR). Ділянка FR варіабельного домену в основному складається з чотирьох FR доменів: FR1, FR2, FR3 і FR4. Відповідно, послідовності HVR і FR в основному присутні в наступній послідовності в VH (або VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Термін "повнорозмірне антитіло" означає антитіло, яке складається з двох "важких ланцюгів повнорозмірного антитіла" і двох "легких ланцюгів повнорозмірного антитіла". "Важкий ланцюг повнорозмірного антитіла" являє собою поліпептид, до складу якого, в напрямку від N-кінцевого залишку до C-кінцевого залишку, варіабельний домен важкого ланцюга антитіла (VH), консервативний домен 1 важкого ланцюга антитіла (CH1), шарнірну ділянку антитіла (HR), консервативний домен 2 важкого ланцюга антитіла (CH2) і консервативний домен 3 важкого ланцюга антитіла (CH3), скорочено VH-CH1-HR-CH2-CH3, і не обов'язково консервативний домен 4 (CH4) важкого ланцюга антитіла в випадку антитіла підкласу IgE. Краще "важкий ланцюг повнорозмірного антитіла" являє собою поліпептид, до складу якого, в напрямку від N-кінцевого до C-кінцевого залишку, VH, CH1, HR, CH2 і CH3. "Легкий ланцюг повнорозмірного антитіла" являє собою поліпептид, до складу якого, в напрямку від N-кінцевого до C-кінцевого залишку, варіабельний домен легкого ланцюга антитіла (VL) і консервативний домен легкого ланцюга антитіла (CL), скорочено VL-CL. Консервативний домен легкого ланцюга антитіла (CL) може являти собою ізотип κ (каппа) або λ (лямбда). Два ланцюга повнорозмірного антитіла пов'язані один з одним через міжпептидні дисульфідні зв'язки між CL доменом і CH1 доменом і між шарнірними ділянками важких ланцюгів повнорозмірного антитіла. Приклади типових повнорозмірних антитіл являють собою природні антитіла, такі як IgG (наприклад, IgG1 і IgG2), IgM, IgA, IgD і IgE). Повнорозмірні антитіла, використані відповідно до винаходу, можуть бути одержані з одного виду, наприклад, людини, або вони можуть бути одержані у вигляді химерних або гуманізованих антитіл. У деяких варіантах повнорозмірні антитіла, використані відповідно до винаходу, тобто терапевтичне антитіло, яке включає мутований Fc домен, включають два антигензв'язуючих сайти, кожен з яких сформований з пари VH і VL, і які обидва специфічно зв'язуються з одним і тим же антигеном. В іншому варіанті повнорозмірні антитіла, використані відповідно до винаходу, включають два антигензв'язуючих сайти, кожен з яких сформований з пари VH і VL, де два антигензв'язуючих сайти зв'язуються з різними антигенами, наприклад, де антитіла є біспецифічними. C-кінцевий залишок важкого або легкого ланцюга зазначеного повнорозмірного антитіла означає останній амінокислотний залишок в C-кінцевому фрагменті зазначеного важкого або легкого ланцюга.

Термін "з'єднаний" означає, що компоненти (наприклад, Fab і трансмембранний домен) з'єднані пептидними зв'язками або безпосередньо, або через один або більше пептидних лінкерів.

Терміни "клітина хазяїна", "лінія клітини хазяїна" і "культура клітини хазяїна" використовують як взаємозамінні і вони означають клітини, в які включена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини хазяїна включають "трансформанти" і "трансформовані клітини", які включають первинні трансформовані клітини і їх потомство без урахування числа пересівань. Потомство може бути не повністю ідентичним вихідній клітині за вмістом нуклеїнових кислот і може містити мутації. В обсяг винаходу включено мутантне потомство, яке проявляє ту ж саму функцію або біологічну активність за даними скринінгу або селекції для вихідної трансформованої клітини. Клітина хазяїна являє собою будь-який тип клітинної системи, яку можна використовувати для одержання антитіла, що використовується відповідно до даного винаходу. Клітини хазяїна включають, перераховуючи тільки деякі з них, культивовані клітини, наприклад, культивовані клітини ссавців, такі як клітини CHO, клітини BHK, клітини NS0, клітини SP2/0, мієломні клітини YO, мієломні клітини миші P3 $\times$ 63, клітини PER, клітини PER.C6 або гібридомні клітини, дріжджові клітини, клітини комах і клітини рослин, але також і клітини, включені в трансгенну тварину, трансгенну рослину або культивовану рослину або тканину тварини.

Термін "гіперваріабельна ділянка" або "HVR", використаний в даному контексті, означає кожен з ділянок варіабельного домену антитіла, яка характеризується гіперваріабельністю послідовності і/або формує структурно визначені петлі ("гіперваріабельні петлі"). В основному природні чотирихланцюгові антитіла включають шість HVR, три в VH домені (H1, H2, H3) і три в VL домені (L1, L2, L3). Ділянки HVR в основному включають амінокислотні залишки з

гіперваріабельних петель і/або з визначаючих комплементарність ділянок (CDR), причому останні характеризуються найбільшою варіабельністю послідовностей і/або беруть участь в розпізнаванні антигену. За винятком CDR1 в домені VH, ділянки CDR в основному включають амінокислотні залишки, які формують гіперваріабельні петлі. Ділянки HVR також називають "ділянками, які визначають комплементарність" (CDR), і ці терміни використовуються в даному контексті взаємозамінно з посиланням на частини варіабельної ділянки, які формують антигензв'язуючі ділянки. Ця конкретна ділянка описана в статтях [Kabat та ін., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) і Chothia та ін., J Mol Biol 196:901-917 (1987)], де визначення включають перекривання або підкласи амінокислотних залишків при порівнянні один з одним. Проте, застосування кожного визначення щодо CDR антитіла і/або антигензв'язуючого рецептора або їх варіантів знаходиться в межах обсягу терміна, визначеного і використаного в даному контексті. Відповідні амінокислотні залишки, які включені в послідовності CDR, як визначено в кожному з цитованих вище документів, перераховані нижче в таблиці 1 для порівняння. Точні положення кожного із залишків, які визначають конкретну ділянку CDR, змінюються в залежності від послідовності і розміру CDR. Спеціалісти в даній галузі техніки можуть легко встановити, які залишки включають конкретну ділянку CDR в даній амінокислотній послідовності варіабельної ділянки антитіла.

Таблиця 1

Визначення CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹В таблиці 1 нумерація всіх визначень CDR представлена відповідно до системи нумерації, визначеної в статті Kabat та ін. (див. нижче).

²Скорочення "AbM" з малою буквою "b", використане в таблиці 1, означає ділянки CDR, як визначено за допомогою програмного забезпечення для моделювання структури антитіл Oxford Molecular's "AbM".

В статті Kabat та ін. також визначено систему нумерації для послідовностей варіабельної ділянки, яку можна застосовувати для будь-якого антитіла. Спеціаліст у даній галузі техніки може однозначно застосовувати цю систему "нумерації Кабата" до будь-якої послідовності варіабельної ділянки без будь-яких експериментальних даних, які не стосуються самої послідовності. Термін "нумерація Кабата", використаний в даному контексті, означає систему нумерації, встановлену в статті [Kabat та ін., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983)]. Якщо не вказано інше, всі номери положень певних амінокислотних залишків у варіабельній ділянці антитіла представлені відповідно до системи нумерації Кабата. Поліпептидні послідовності в переліку послідовностей не пронумеровані відповідно до системи нумерації Кабата. Однак спеціалісту в даній галузі техніки виявляється очевидним перетворити нумерацію послідовностей в переліку послідовностей відповідно до системи нумерації Кабата.

Терміни "індивідуум" або "суб'єкт" означають ссавця. Ссавці включають, але не обмежуючись тільки ними, домашніх тварин (наприклад, велика рогата худоба, вівці, собаки, коти і коні), приматів (наприклад, людина і примати, що не стосуються людини, такі як нелюдиноподібні мавпи), кроликів і гризунів (наприклад, миші та щури). Перш за все, індивідуумом або суб'єктом є людина.

Термін "виділена молекула нуклеїнової кислоти" або "виділений" полінуклеотид означає молекулу нуклеїнової кислоти, ДНК або РНК, які були видалені зі свого природного навколишнього середовища. Наприклад, рекомбінантний кодуєчий поліпептид полінуклеотид, що міститься в векторі, означає виділений для цілей даного винаходу. Інші приклади виділеного полінуклеотиду включають рекомбінантні полінуклеотиди, підтримувані в гетерологічних клітинах хазяїна або очищені (частково або в істотному ступені очищені) полінуклеотиди в розчині. Виділений полінуклеотид включає молекулу полінуклеотиду, що міститься в клітинах,

які зазвичай містять молекулу полінуклеотиду, але молекула полінуклеотиду присутня поза хромосомою або розташована в хромосомі, але в положенні, яке відрізняється від природного розташування в хромосомі. Виділені молекули РНК включають *in vivo* або *in vitro* транскрипти РНК даного винаходу, а також позитивні і негативні форми ланцюгів, і дволанцюгові форми.

5 Виділені полінуклеотиди або нуклеїнові кислоти даного винаходу додатково включають зазначені молекули, одержані синтетичним методом. Крім того, полінуклеотид або нуклеїнова кислота можуть являти собою або можуть включати регуляторний елемент, такий як промотор, ділянка зв'язування рибосоми або термінатор транскрипції.

Нуклеїнова кислота або полінуклеотид з нуклеотидною послідовністю, яка в порівнянні з еталонною полінуклеотидною послідовністю даного винаходу "ідентична", наприклад, принаймні на 95 %, означає, що нуклеотидна послідовність ідентична еталонній послідовності за винятком того, що полінуклеотидна послідовність може включати аж до п'яти точкових мутацій на кожні 100 нуклеотидів еталонної нуклеотидної послідовності. Іншими словами, щоб одержати полінуклеотид з нуклеотидною послідовністю, яка в порівнянні з еталонною нуклеотидною послідовністю ідентична принаймні на 95 %, і в якій можна видалити або замінити на інший нуклеотид аж до 5 % нуклеотидів в еталонній послідовності, або аж до 5 % нуклеотидів від загального числа нуклеотидів в еталонній послідовності можна вставити в еталонну послідовність. Ці зміни еталонної послідовності можна проводити в 5'- або 3'-кінцевих положеннях еталонної нуклеотидної послідовності або в будь-якому положенні між цими кінцевими положеннями, розподілені або індивідуально серед залишків в еталонній послідовності, або в одній або більше сусідніх груп в еталонній послідовності. На практиці ідентичність будь-якої конкретної нуклеотидної послідовності в порівнянні з нуклеотидною послідовністю даного винаходу, яка становить принаймні 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, можна визначати стандартним методом з використанням відомих комп'ютерних програм, таких як програми, описані вище для поліпептидів (наприклад, ALIGN-2).

Термін "виділений поліпептид" або його варіант або похідна означає, що він перебуває не в своєму природному середовищі. Не вимагається конкретний рівень очищення. Наприклад, виділений поліпептид можна видалити з його нативного або природного навколишнього середовища. Вважається, що одержані рекомбінантним методом поліпептиди і білки, експресовані в клітинах хазяїна, виділені для цілей винаходу у вигляді природних або рекомбінантних поліпептидів, які були розділені, фракціоновані або частково очищені будь-яким придатним методом.

"Ідентичність амінокислотної послідовності у відсотках (%)" щодо еталонної поліпептидної послідовності визначають як процентний вміст амінокислотних залишків в послідовності-кандидаті, які ідентичні амінокислотним залишкам в еталонній поліпептидній послідовності після вирівнювання послідовностей і при необхідності включення гепів для забезпечення максимальної ідентичності послідовностей у відсотках і без урахування будь-яких консервативних замін як частини ідентичності послідовностей. Вирівнювання з метою визначення ідентичності амінокислотних послідовностей в% можна здійснювати різними способами, відомими в даній галузі техніки, наприклад, з використанням загальнодоступного комп'ютерного програмного забезпечення, такого як програмне забезпечення BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Спеціалісти в даній галузі техніки можуть визначити відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, які потрібні для досягнення максимального вирівнювання вздовж всієї довжини порівнюваних послідовностей.

45 Однак відповідно до даного винаходу значення ідентичності амінокислотних послідовностей в % визначають з використанням комп'ютерної програми для порівняння послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма для порівняння послідовностей ALIGN-2 створена фірмою Genentech Inc., і користувач може знайти вихідний код в документації користувачів [U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, де він зареєстрований під номером U.S. Copyright Registration № TXU510087]. Програма ALIGN-2 є загальнодоступною на фірмі Genentech, Inc., South San Francisco, Каліфорнія, або її можна скопіювати за вихідним кодом. Програму ALIGN-2 можна також скопіювати для використання в операційній системі UNIX, включаючи керуючу програму UNIX V4.0D. Всі параметри порівняння послідовностей встановлені в програмі ALIGN-2 і не змінюються. У випадках, коли для порівняння амінокислотних послідовностей використовують програму ALIGN-2, ідентичність даної амінокислотної послідовності А в % з даною амінокислотною послідовністю В (яку в іншому варіанті можна назвати як дана амінокислотна послідовність А, яка має або включає певну ідентичність амінокислотної послідовності в% в порівнянні з даною амінокислотною послідовністю В) розраховують за формулою:

100×частинне X/Y

де X означає число амінокислотних залишків, розрахованих як ідентичні збіги при порівнянні послідовностей A і B у програмі ALIGN-2, і де Y означає загальне число амінокислотних залишків в послідовності B . Слід розуміти, що якщо довжина амінокислотної послідовності A не дорівнює довжині амінокислотної послідовності B , то ідентичність в % при порівнянні A з B не дорівнює ідентичності амінокислотної послідовності в % при порівнянні B з A . Якщо спеціально не вказано інше, всі значення ідентичності амінокислотних послідовностей в %, використані в даному контексті, одержані, як описано в попередньому абзаці з використанням комп'ютерної програми ALIGN-2.

Термін "молекула нуклеїнової кислоти" означає послідовність основ, що включає пуринові і піримідинові основи, які становлять послідовність полінуклеотиду, причому зазначені основи представляють первинну структуру молекули нуклеїнової кислоти. В даному контексті термін молекула нуклеїнової кислоти включає ДНК, кДНК, геномну ДНК, РНК, синтетичні форми ДНК і змішані полімери, що включають дві або більше цих молекул. Крім того, термін молекула нуклеїнової кислоти включає як смислові, так і антисмислові ланцюги. Більш того описана в даному контексті молекула нуклеїнової кислоти може містити природні нуклеотидні основи або їх похідні, як видається очевидним спеціалістам в даній галузі техніки.

Термін "вкладиш в упаковці" означає інструкції, які зазвичай містяться в комерційних упаковках терапевтичних продуктів, які містять інформацію про показання, застосування, дозування, введення, комбіновану терапію, протипоказання і/або попередження щодо застосування таких терапевтичних продуктів.

Термін "фармацевтична композиція" означає препарат, який у зазначеній формі забезпечує біологічну активність активного інгредієнта, що міститься в цьому препараті і виявляє ефективність, і який не містить ніяких додаткових компонентів, що мають неприйнятну токсичність щодо організму суб'єкта, якому вводять цей препарат. Фармацевтична композиція зазвичай містить один або більше фармацевтично прийнятних носіїв.

"Фармацевтично прийнятний носій" означає інгредієнт у фармацевтичній композиції, який не є активним інгредієнтом і який не виявляє токсичну дію на суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає, але не обмежуючись тільки ними, буферну речовину, ексципієнт, стабілізатор або консервант.

Використаний в даному контексті термін "поліпептид" означає молекулу, яка складається з мономерів (амінокислот), з'єднаних в лінійний ланцюг амідними зв'язками (відомими також як пептидні зв'язки). Термін "поліпептид" означає будь-який ланцюг з двох або більше амінокислот і не означає конкретну довжину продукту. Таким чином, в визначення "поліпептид" включені пептиди, дипептиди, олігопептиди, білок, амінокислотний ланцюг або будь-який інший термін, використаний для позначення ланцюга з двох або більше амінокислот, і термін "поліпептид" можна використовувати замість будь-якого із зазначених термінів або взаємозамінно з ними. Термін "поліпептид" можна також використовувати для позначення продуктів пост-експресійних модифікацій поліпептиду, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, глікозилювання, ацетилювання, фосфорилування, амидування, модифікацію з використанням відомих захисних/блокуючих груп, протеолітичне розщеплення або модифікацію з використанням відомих неприродних амінокислот. Поліпептид можна одержати з природного біологічного джерела або одержати рекомбінантною технологією, але не обов'язково транслювати з зазначеної послідовності нуклеїнової кислоти. Поліпептид можна одержати будь-яким чином, включаючи хімічний синтез. Розмір поліпептиду даного винаходу може становити від приблизно 3 або більше, 5 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 25 або більше, 50 або більше, 75 або більше, 100 або більше, 200 або більше, 500 або більше, 1000 або більше, 2000 або більше амінокислот. Поліпептиди можуть характеризуватися певною тривимірною структурою, хоча необов'язково вони можуть характеризуватися такою структурою. Поліпептиди з певною тривимірною структурою позначають як згорнуті, а поліпептиди, що не характеризуються певною тривимірною структурою, але можуть бути присутніми в безлічі різних конформацій, позначають як розгорнуті.

Термін "полінуклеотид" означає виділену молекулу нуклеїнової кислоти або конструкта, наприклад, матричну РНК (мРНК), РНК вірусного походження або плазмідну ДНК (пДНК). Полінуклеотид може включати стандартний фосфодієфірний зв'язок або нестандартний зв'язок (наприклад, амідний зв'язок, такий як виявлений в пептид-нуклеїнових кислотах (ПНК)). Термін "молекула нуклеїнової кислоти" означає будь-який один або більше сегментів нуклеїнової кислоти, наприклад, фрагменти ДНК або РНК, присутні в полінуклеотиді.

"Знижене зв'язування", наприклад, знижене зв'язування з Fc рецептором, означає зменшення афінності відносно відповідної взаємодії з даними, наприклад, ППР. Для ясності, вказаний термін включає також зниження афінності до нуля (або нижче межі виявлення

аналітичного методу), тобто до повної відсутності взаємодії. Навпаки, "підвищене зв'язування" означає збільшення зв'язуючої афінності щодо відповідної взаємодії.

Термін "регуляторна послідовність" означає послідовності ДНК, які необхідні для впливу на експресію кодуючих послідовностей, з якими вони лігуються. Природа таких контролюючих послідовностей відрізняється в залежності від організму хазяїна. У прокаріотів, контрольні послідовності в основному включають промотор, сайт зв'язування рибосоми і термінатори. У еукаріотів контрольні послідовності в основному включають промотори, термінатори і в деяких випадках енхансери, трансактиватори або фактори транскрипції. Термін "контрольна послідовність" включає як мінімум всі компоненти, присутність яких необхідна для експресії, і може включати додаткові корисні компоненти.

Використаний в даному контексті термін "одноланцюговий" стосується молекули, яка містить амінокислотні мономери, зв'язані в лінійний ланцюг пептидними зв'язками. В окремих випадках один з антигензв'язуючих залишків є scFv фрагментом, тобто VH доменом і VL доменом, з'єднаними через пептидний лінкер. В окремих випадках один з антигензв'язуючих фрагментів є одноланцюговою Fab молекулою, тобто Fab молекулою, де легкий ланцюг Fab і важкий ланцюг Fab з'єднані пептидним лінкером, при цьому утворюється один пептидний ланцюг. В такому конкретному варіанті в одноланцюговій Fab молекулі С-кінцевий амінокислотний залишок легкого ланцюга Fab приєднаний до N-кінцевого амінокислотного залишку важкого ланцюга Fab.

Термін "SSD", використаний в даному контексті, стосується стимулюючого сигнального домену.

Використаний в даному контексті термін "лікування" (і його граматичні варіанти, такі як "лікувальний" або "терапія") означають клінічне втручання з метою змінити природний хід захворювання у індивідуума, що потребує лікування, яке можна здійснювати або для профілактики, або в ході клінічної патології. Необхідні дії лікування включають, але не обмежуються тільки ними, профілактику виникнення або рецидиву захворювання, зниження інтенсивності симптомів, зниження будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, профілактику метастазування, зниження швидкості прогресування захворювання, пом'якшення або полегшення патологічного стану, а також ремісію або покращений прогноз. У деяких варіантах експресовані клітиною антигензв'язуючі рецептори даного винаходу використовують спільно з терапевтичними антитілами, що включають мутований Fc домен, для уповільнення розвитку захворювання або для уповільнення прогресування захворювання.

Термін "антигенна детермінанта-мішень" є синонімом термінів "антиген-мішень", "епітоп-мішень" і "клітинний антиген-мішень", і стосується ділянки (наприклад, безперервна (лінійна) послідовність амінокислотних залишків або конформаційна конфігурація, утворена з різних ділянок не-сусідніх (нелінійних) амінокислотних залишків) в поліпептидній макромолекулі, з якою пов'язується антитіло, при цьому формується комплекс антигензв'язуючого фрагмента і антигену. Придатні антигенні детермінанти можна знайти, наприклад, на поверхні пухлинних клітин, на поверхні інфікованих вірусом клітин, на поверхні інших уражених захворюванням клітин, на поверхні імунних клітин, у вигляді вільних структур в сироватці крові і/або у позаклітинному матриці (ECM). Білки, визначені в даному контексті як антигени (наприклад, CD20, CEA, FAP, TNC), можуть перебувати в будь-якій природній формі білків з будь-якого джерела хребетних, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, людина) і гризуни (наприклад, миші та щури), якщо не вказано інше. У конкретному варіанті антигеном-мішенню є білок людини. Якщо в даному контексті згадується певний білок-мішень, то термін включає "повнорозмірний" непроцесований білок-мішень, а також будь-яку форму білка-мішені, яка утворюється в результаті процесингу в клітині-мішені. Термін також включає природні варіанти білка-мішені, наприклад варіанти після сплайсингу або алельні варіанти. Типові білки-мішені людини, використані як антигени, включають, але не обмежуються тільки ними, CD20, CEA, FAP, TNC, MSLN, FolR1, HER1 і HER2. Здатність антигензв'язуючого рецептора зв'язуватися зі специфічною антигенною детермінантою-мішенню можна виміряти методом твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА) або іншими методами, відомими спеціалісту в даній галузі техніки, наприклад, методом поверхневого плазмонного резонансу (ППР) (аналіз проводять в системі BIAcore) [Liljeblad та ін., Glyco J 17, 323-329 (2000)], і традиційними методами аналізу зв'язування [Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)]. В одному варіанті ступінь зв'язування антитіла з неспорідненим білком становить менше приблизно 10 % зв'язування антитіла з антигеном-мішенню за результатами вимірювання, наприклад, методом ППР. У деяких варіантах антитіло, яке зв'язується з антигеном-мішенню, характеризується афінною константою дисоціації (K_D) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13}

М).

"Антитіла, які містять мутований Fc домен" даного винаходу, тобто терапевтичні антитіла, можуть містити один, два, три або більше зв'язуючих доменів і можуть бути моноспецифічними, диспецифічними або мультиспецифічними. Антитіла можуть бути одержані у вигляді повнорозмірних антитіл з одного виду, наприклад, людини, або вони можуть бути одержані у вигляді химерних або гуманізованих антитіл. У випадку антитіл, які містять більше двох антигензв'язуючих доменів, деякі зв'язуючі домени можуть бути ідентичними і/або характеризуватися однаковою специфічністю.

Використаний в даному контексті термін "активація Т-клітин" означає одну або більше відповідних клітинних реакцій Т лімфоцита, перш за все цитотоксичного Т лімфоцита, вибраних з проліферації, диференціації, секреції цитокінів, вивільнення цитотоксичних ефекторних сполук, цитотоксичної активності та експресії маркерів активації. Антигензв'язуючі рецептори даного винаходу здатні індукувати активацію Т-клітин. Придатні методи аналізу активації Т-клітин відомі в даній галузі техніки і описані в даному контексті.

Відповідно до даного винаходу, термін "Т-клітинний рецептор" або "TCR" відомі в рівні техніки. Перш за все використаний в даному контексті термін "Т-клітинний рецептор" стосується будь-якого Т-клітинного рецептора, який відповідає трьом наступним критеріям: (i) пухлинна специфічність, (ii) розпізнавання (більшості) пухлинних клітин, що означає, що антиген або мішень повинні експресуватися в (більшості) пухлинних клітинах і (iii) TCR відповідає HLA-типу суб'єктів, які потребують такого лікування. В даному контексті придатні Т-клітинні рецептори, які відповідають зазначеним вище трьом критеріям, відомі в рівні техніки, такі як рецептори, які розпізнають NY-ESO-1 [див. інформацію про послідовність, наприклад, в PCT/GB2005/001924] і/або HER2neu [див. інформацію про послідовність в WO-A1 2011/0280894].

Термін "терапевтично ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичної композиції, означає кількість, що проявляє ефективність в дозуваннях і протягом періодів часу, коли досягається необхідний лікувальний або профілактичний результат. Терапевтично ефективна кількість агента, наприклад, усуває, знижує, уповільнює розвиток, зводить до мінімуму або запобігає негативні дії захворювання.

Термін "вектор" або "експресійний вектор" є синонімом терміна "експресійний конструкт" і означає молекулу ДНК, яку використовують для включення і прямої експресії специфічного гену, з яким вона функціонально зв'язана в клітині-мішені. Термін включає вектор у вигляді самореplikуючої структури нуклеїнової кислоти, а також вектор, включений в геном клітини хазяїна, в яку він включений. Експресійний вектор даного винаходу включає касету експресії. Експресійні вектори дозволяють здійснювати транскрипцію великих кількостей стабільної мРНК. При попаданні експресійного вектора всередину клітини-мішені рибонуклеїнова кислота або білок, які кодується геном, продукуються в ході клітинної транскрипції і/або з використанням трансляційного комплексу. В одному варіанті експресійний вектор даного винаходу включає касету експресії, яка включає полінуклеотидні послідовності, що коднують антигензв'язуючі рецептори даного винаходу або їх фрагменти.

Антигензв'язуючі рецептори, здатні специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом (доменами)

Даний винахід стосується антигензв'язуючих рецепторів, здатних специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом антитіла, тобто терапевтичним антитілом, яке направлено зв'язується з пухлинною клітиною. Перш за все, даний винахід стосується антигензв'язуючих рецепторів, які включають позаклітинний домен, що містить, принаймні, один антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з вихідним немутуваним Fc доменом. У кращих варіантах мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну заміну в порівнянні з немутуваним вихідним Fc доменом, де зв'язування Fc рецептора з мутованим Fc доменом знижене в порівнянні зі зв'язуванням Fc рецептора з немутуваним Fc доменом. У конкретних варіантах даний винахід стосується антигензв'язуючих рецепторів, які включають позаклітинний домен, що включає принаймні один антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент не здатний специфічно зв'язуватися з вихідним немутуваним Fc доменом, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну заміну, яку вибирають з групи, що складається з L234, L235, I253, H310, P331, P329 і H435, перш за все, де амінокислотною мутацією є L234A, L235A, I253A, N297A, H310A, P329G і/або H435A, в порівнянні з немутуваним вихідним Fc доменом, де зв'язування Fc рецептора з мутованим Fc доменом знижено в порівнянні зі зв'язуванням Fc рецептора з немутуваним Fc доменом. В одному кращому варіанті амінокислотною мутацією є P329G, де зв'язування з Fc рецептором знижене за даними ППР при 25 °C. В іншому кращому варіанті

амінокислотними мутаціями є I253A, H310A і H435A, де зв'язування з неонатальним Fc рецептором (FcRn) знижене за даними ППР при 25 °C.

Даний винахід також стосується трансдукції Т-клітин, таких як CD8+Т-клітини, CD4+Т-клітини, CD3+Т-клітини, γδ Т-клітини або природні Т-клітини-кілери (NK), краще CD8+Т-клітини, з використанням антигензв'язуючого рецептора, як описано в даному контексті, і їх цільовому накопиченню, наприклад, в пухлині за допомогою антитіла, наприклад, терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен. В одному варіанті антитіло здатне специфічно зв'язуватися з пухлиноспецифічним антигеном, який присутній на поверхні природної пухлинної клітини.

У прикладених прикладах як підтвердження концепції винаходу сконструйований антигензв'язуючий рецептор, що включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен даного винаходу pETR17096 (SEQ ID NO: 7, що кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 19), здатний специфічно зв'язуватися з терапевтичним антитілом (являє собою анти-CD20 антитіло, яке включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 112, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 113), які включають мутацію P329G. Трансдуковані Т-клітини (Т-клітини Jurkat NFAT), які експресують білок анти-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO: 7, що кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 19), можуть істотно активуватися при спільній інкубації з анти-CD20 антитілом, що включає мутацію P329G в складі Fc домена, і CD20 позитивними пухлинними клітинами. Для підтвердження концепції винаходу автори винаходу також пропонують безліч форматів антигензв'язуючого рецептора, здатного специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатного специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

Обробка пухлинних клітин комбінацією антитіла, направленої проти пухлинного антигену, де антитіло включає мутацію P329G, і трансдукованими Т-клітинами, які експресують білок анти-P329G-Fab-ds-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO: 44 (ДНК) і 39, 41 (білок)), неочікувано приводить до суттєвої активації трансдукованої Т-клітини в порівнянні з трансдукованими Т-клітинами, які експресують анти-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (SEQ ID NO: 19 (ДНК) і 7 (білок)) гібридний білок (див., наприклад, фіг. 6 і 8-11).

Відповідно, неочікувано і непередбачувано було виявлено, що Т-клітини, краще CD8+Т-клітини, які трансдуковані антигензв'язуючим рецептором даного винаходу, можна специфічно стимулювати з використанням пухлиноспецифічного антитіла, що включає мутований Fc домен, і накопичувати з використанням пухлиноспецифічного антитіла, яке виступає як елемент зв'язування з пухлинною клітиною. Таким чином, в даному винаході несподівано і непередбачувано було встановлено, що об'єднання пухлиноспецифічного антитіла, тобто терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, з Т-клітинами, трансдукованими антигензв'язуючим рецептором, який включає/складається з позаклітинного домену, що включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, приводить до специфічної активації Т-клітин і подальшого лізису пухлинної клітини. Зазначений підхід характеризується значними перевагами в плані безпеки в порівнянні з традиційними підходами, які базуються на застосуванні Т-клітин, оскільки Т-клітина буде інертною за відсутності антитіла, що містить мутований Fc домен, і їх наявність можна контролювати, вибираючи формат молекули антитіла (тобто використовувати низькомолекулярні молекули з більш коротким періодом напіврозпаду і навпаки). Відповідно, у винаході пропонується багатофункціональна терапевтична платформа, де антитіла типу IgG використовуються для маркування або введення мітки в пухлинні клітини з метою формування сигналу для цільової активації Т-клітини, і де дія трансдукованих Т-клітин специфічно направлена на пухлинні клітини за рахунок забезпечення специфічності мутованого Fc домена антитіла типу IgG. Після зв'язування з мутованим Fc доменом антитіла на поверхні пухлинної клітини, трансдукована Т-клітина, як описано в даному контексті, активується і потім відбувається лізис. Платформа є універсальною і специфічною, що дозволяє використовувати різноманітні (існуючі або знову розроблені) антитіла-мішені або спільно застосовувати декілька антитіл з різною специфічністю до антигену, але які містять одну і ту ж мутацію в Fc домені. Ступінь активації Т-клітин можна додатково відрегулювати за рахунок коригування дози спільно застосовуваного терапевтичного антитіла або за рахунок використання антитіл з різною специфічністю або різних форматів антитіл. Трансдуковані Т-клітини за винаходом є інертними в випадку застосування без антитіла-мішені, яке містить мутований Fc домен, оскільки мутації в Fc домені, як описано в даному контексті, не зустрічаються в природних або немутантних імунoglobulinaх. Відповідно, в одному варіанті мутований Fc домен не виявляється в природних імунoglobulinaх дикого типу.

Відповідно, даний винахід стосується антигензв'язуючого рецептора, який включає

позаклітинний домен, що включає принаймні один антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент не здатний специфічно зв'язуватися з вихідним немутованим Fc доменом, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну мутацію в порівнянні з немутованим вихідним Fc доменом, причому зв'язування Fc рецептора з мутованим Fc доменом і/або ефекторна функція, індуковані мутованим Fc доменом, знижені в порівнянні зі зв'язуванням Fc рецептора і/або ефекторною функцією, індукованими немутованим Fc доменом. При лікуванні раку, перш за все, бажано використовувати терапевтичні антитіла зі зниженою ефекторною функцією, оскільки ефекторна функція може призводити до серйозних побічних ефектів у ході протипухлинного лікування на основі антитіл, як додатково описано в даному контексті.

У даному винаході антигензв'язуючий рецептор включає позаклітинний домен, який не виявляється в природних Т-клітинах або на їх поверхні. Таким чином, антигензв'язуючий рецептор здатний забезпечити задану специфічність зв'язування з клітинами, які експресують антигензв'язуючий рецептор за винаходом. Клітини, наприклад, Т-клітини, трансдуковані антигензв'язуючим рецептором (рецепторами) за даним винаходом здатні специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не з вихідним немутованим Fc доменом. Специфічність забезпечується антигензв'язуючим фрагментом позаклітинного домену антигензв'язуючого рецептора, при цьому зазначені антигензв'язуючі фрагменти вважаються специфічними щодо мутованого Fc домена, як описано в даному контексті. Даний винахід і, як пояснюється в даному описі, антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, зв'язується/взаємодіє з мутованим Fc доменом, але не з вихідним немутованим Fc доменом.

Антигензв'язуючі фрагменти

В ілюстративному варіанті даного винаходу як доказ концепції, пропонуються антигензв'язуючі рецептори, що включають заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, який містить, принаймні, один антигензв'язуючий фрагмент, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну заміну в порівнянні з немутованим вихідним Fc доменом.

У визначеному варіанті, принаймні, один з антигензв'язуючих фрагментів являє собою стандартний Fab фрагмент, тобто Fab молекулу, що складається з легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab. У визначеному варіанті, принаймні, один з антигензв'язуючих фрагментів являє собою crossFab фрагмент, тобто Fab молекулу, що складається з легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab, де або варіабельні ділянки, або консервативні ділянки важкого і легкого ланцюгів Fab замінені один на одного. У деяких варіантах принаймні один з антигензв'язуючих фрагментів являє собою scFv фрагмент. В такому конкретному варіанті в scFv фрагменті С-кінцевий амінокислотний залишок варіабельної ділянки (VH) важкого ланцюга приєднаний до N-кінцевого амінокислотного залишку варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) в молекулі scFv, необов'язково через пептидний лінкер. У деяких варіантах принаймні один з антигензв'язуючих фрагментів являє собою одноланцюгову Fab молекулу, тобто Fab молекулу, де легкий ланцюг Fab і важкий ланцюг Fab з'єднані пептидним лінкером, при цьому утворюється один пептидний ланцюг. В такому конкретному варіанті в одноланцюговій Fab молекулі С-кінцевий амінокислотний залишок легкого ланцюга Fab приєднаний до N-кінцевого амінокислотного залишку важкого ланцюга Fab, необов'язково через пептидний лінкер.

Відповідно, в даному винаході антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну заміну в порівнянні з немутованим вихідним Fc доменом.

Антигензв'язуючі фрагменти, здатні специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, можна одержати методом імунізації, наприклад, методами імунізації ссавців. Зазначені методи відомі в даній галузі техніки і описані, наприклад, в статті [Burns, Methods in Molecular Biology, 295:1-12 (2005)]. В іншому варіанті антигензв'язуючі фрагменти винаходу можуть бути виділені шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек для антитіл з необхідною активністю або активностями. Способи скринінгу комбінаторних бібліотек описані в літературі, наприклад, у статті [Lerner та ін., Nature Reviews, 16: 498-508 (2016)]. Наприклад, в даній галузі техніки відомо безліч способів створення бібліотек фагового дисплея і скринінгу таких бібліотек для антигензв'язуючих фрагментів, що мають необхідні характеристики зв'язування. Зазначені способи описані, наприклад, в [статтях Frenzel та ін., mAbs, 8: 1177-1194 (2016), Bazan та ін.,

Human Vaccines and Immunotherapeutics, 8: 1817-1828 (2012) та Zhao та ін., Critical Reviews in Biotechnology 36: 276-289 (2016), а також в статті Hoogenboom та ін., Methods in Molecular Biology, 178: 1-37 (O'Brien та ін., вид. Human Press, Totowa, NJ, 2001), і додатково описані, наприклад, в статтях McCafferty та ін., Nature, 348: 552-554, Clackson та ін., Nature, 352: 624-628 (1991), Marks та ін., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1992) і Marks та Bradbury, Methods in Molecular Biology, 248: 161-175 (Lo, вид. Human Press, Totowa, NJ, 2003), Sidhu та ін., J. Mol. Biol., 338(2): 299-310 (2004), Lee та ін., J. Mol. Biol., 340(5): 1073-1093 (2004), Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(34): 12467-12472 (2004) і Lee та ін., J. Immunol. Methods, 284(1-2): 119-132 (2004)]. У деяких способах фагового дисплея репертуари генів VH та VL окремо клонують за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і довільним чином рекомбінують в фагових бібліотеках, і потім проводять їх скринінг для антигензв'язуючого фага, згідно з [описом Winter та ін., Annual Review of Immunology, 12: 433-455 (1994)]. Як правило, фаги відтворюють фрагменти антитіл або у вигляді одноланцюгових Fv (scFv) фрагментів, або у вигляді Fab фрагментів. Бібліотеки з імунізованих джерел надають високоафінні антигензв'язуючі фрагменти щодо імуногену без необхідності конструювання гібридом. В іншому варіанті можна клонувати наївний репертуар (наприклад, людини), щоб забезпечити єдине джерело антигензв'язуючих фрагментів до широкого діапазону "чужорідних", а також "власних" антигенів без будь-якої імунізації, як [описано в статті Griffiths та ін., EMBO Journal, 12: 725-734 (1993)]. Нарешті, наївні бібліотеки також можна одержати синтетичним методом з використанням клонування сегментів неперегрупованого V-гена зі стовбурових клітин, а також з використанням ПЛР-праймерів, що містять випадкову послідовність, з тим, щоб кодувати високоваріабельні CDR3 ділянки та здійснити перегруповання *in vitro*, як описано в [статті Hoogenboom і Winterin, Journal of Molecular Biology, 227: 381-388 (1992)]. Фагові бібліотеки антитіл людини описані, наприклад, в [патентах US 5750373, US 7985840, US 7785903 та US 8679490, а також патентах US 2005/0079574, US 2007/0117126, US 2007/0237764, US 2007/0292936 і US 2009/0002360]. Додаткові приклади способів скринінгу комбінаторних бібліотек для антитіл з необхідною активністю або активностями, відомі в даній галузі техніки, включають рибосомальні і мРНК дисплеї, а також способи селекції антитіл на бактеріальних дисплеях, дисплеях клітин ссавців, клітин комах або дріжджових клітин. Методи дисплея на поверхні дріжджових клітин описані, наприклад, в [статтях Scholler та ін., Methods in Molecular Biology, 503: 135-156 (2012) і Cherf та ін., Methods in Molecular biology, 1319: 155-175 (2015), а також в статті Zhao та ін., Methods in Molecular Biology, 889: 73-84 (2012). Методи рибосомального дисплея описані, наприклад, в статтях He та ін., Nucleic Acids Research, 25: 5132-5134 (1997) і Hanes та ін., PNAS, 94: 4937-4942 (1997)].

У даному винаході пропонуються антигензв'язуючі рецептори, що включають, принаймні, один антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом. Відповідно, трансдуковані клітини, тобто Т-клітини, які експресують антигензв'язуючий рецептор за винаходом, здатні специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом антитіла, тобто терапевтичним антитілом. Fc домен надає антитілам, тобто терапевтичним антитілам сприятливі фармакокінетичні властивості, включаючи тривалий період напіврозпаду в сироватці крові, що сприяє гарному накопиченню в тканині-мішені і сприятливому коефіцієнту розподілу в тканині і крові. У той же час, однак, він може приводити до небажаної направленої взаємодії терапевтичних антитіл з клітинами, які експресують рецептори Fc фрагмента, а не до зв'язування з кращими антигенпрезентуючими клітинами. Більш того, коактивація сигнальних шляхів Fc рецептора може приводити до вивільнення цитокінів, що може приводити до надмірної активації рецепторів цитокінів та серйозних побічних ефектів при системному введенні терапевтичних антитіл. Активація презентуючих Fc рецептор імунних клітин, відмінних від Т-клітин, може приводити навіть до зниження ефективності терапевтичних антитіл в результаті можливого руйнування імунних клітин. Відповідно, терапевтичні антитіла, відомі в даній галузі техніки, сконструйовані або мутовані таким чином, щоб проявляти знижену зв'язуючу афінність щодо Fc рецептора і/або знижену ефекторну функцію в порівнянні, наприклад, з нативним Fc доменом IgG₁. Антигензв'язуючі рецептори даного винаходу можна використовувати для направленої дії ефекторних клітин, наприклад, Т-клітин, що експресують антигензв'язуючі рецептори даного винаходу *in vitro* і/або *in vivo* на клітини-мішені, тобто пухлинні клітини, які марковані антитілом, здатним специфічно зв'язуватися з клітинами-мішенями, де антитіло включає сконструйований і/або мутований Fc домен, як описано в даному контексті.

В ілюстративному варіанті даного винаходу як підтвердження концепції пропонуються антигензв'язуючі рецептори, здатні специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає амінокислотну мутацію R329G, а також ефекторні клітини, які експресують зазначені

антигензв'язуючі рецептори. Мутація P329G знижує рівень зв'язування з Fc γ рецепторами і асоційовану з ними ефекторну функцію. Відповідно, мутований Fc домен, що включає мутацію P329G, характеризується зниженою зв'язуючою афінністю щодо Fc γ рецепторів або її відсутністю в порівнянні з немутованим Fc доменом. В іншому ілюстративному варіанті даного винаходу як підтвердження концепції пропонуються антигензв'язуючі рецептори, здатні специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що містить амінокислотні заміни I253A, H310A і H435A ("AAA"). Мутації AAA практично повністю пригнічують зв'язування з FcRn.

Однак в даній галузі техніки широко використовуються антитіла, які характеризуються зниженим, підвищеним або зменшеним рівнем зв'язування з Fc рецепторами (FcR) і/або ефекторної функції, що містять мутований Fc домен. Відповідно, в даному контексті пропонуються антигензв'язуючі рецептори, здатні специфічно зв'язуватися з антитілами, що включають мутований Fc домен, і зазначені антитіла в даному контексті також називаються антитіла-мішені. Відповідно, в одному варіанті здійснення даного винаходу антигензв'язуючий рецептор за винаходом здатний специфічно зв'язуватися з антитілом-мішенню, що включає мутований Fc домен, і що характеризується зменшеною зв'язуючою афінністю з Fc рецептором і/або зниженою ефекторною функцією. Антитіла-мішені, що характеризуються зниженою ефекторною функцією, включають такі Fc домени, які містять одну або більше мутацій в положенні амінокислот 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 [див. патент US 6737056]. Такі мутовані Fc включають мутовані Fc з мутаціями в двох або більше положеннях амінокислот 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так званий "DANA" мутований Fc, в якому амінокислотні залишки в положенні 265 і 297 замінені на аланін [див. патент US 7332581]. Певні варіанти антитіл, які характеризуються підвищеним або зменшеним зв'язуванням з рецепторами FcR, описані в літературі [див., наприклад, патент US 6737056, заявку WO 2004/056312 і статтю Shields та ін., J. Biol. Chem., 9(2): 6591-6604 (2001)]. У деяких варіантах пропонується антигензв'язуючий рецептор, здатний специфічно зв'язуватися з варіантом антитіла, яке включає Fc домен, що містить одну або більше амінокислотних мутацій, що поліпшують ADCC, наприклад, Fc ділянку, яка включає мутації в положеннях 298, 333 і/або 334 (EU система нумерації амінокислотних залишків). У деяких варіантах варіант антитіла-мішені включає Fc ділянку, яка містить одну або більше амінокислотних мутацій, які знижують або зменшують зв'язування з FcRn, наприклад, Fc ділянку, яка включає мутації в положеннях 253 і/або 310 і/або 435 (EU система нумерації амінокислотних залишків). У деяких варіантах варіант антитіла-мішені включає Fc ділянку, яка містить амінокислотні мутації в положеннях 253, 310 і 435. В одному варіанті Fc ділянка, одержана з Fc ділянки IgG₁ людини, включає мутації I253A, H310A і H435A, див., наприклад, [статтю Grevys A. та ін., J. Immunol., 194, 5497-5508 (2015)].

У деяких варіантах, пропонується антигензв'язуючий рецептор, здатний специфічно зв'язуватися з варіантом антитіла, що включає Fc ділянку, яка містить одну або більше амінокислотних мутацій, які знижують або зменшують зв'язування з FcRn, наприклад, Fc ділянку, яка включає одну мутацію в одному з положень 310 і/або 433 і/або 436 (EU система нумерації амінокислотних залишків). У деяких варіантах варіант антитіла-мішені включає Fc ділянку, яка містить амінокислотні мутації в положеннях 310, 433 і 436. В одному варіанті Fc ділянка, одержана з Fc ділянки IgG₁ людини, включає мутації H310A, H433A і Y436A. У деяких варіантах варіант антитіла-мішені включає Fc ділянку, яка містить одну або більше амінокислотних мутацій, які посилюють зв'язування з FcRn, наприклад, Fc ділянка, яка містить мутації в положеннях 252 і/або 254 і/або 256 (EU система нумерації амінокислотних залишків). У деяких варіантах варіант антитіла-мішені включає Fc ділянку, яка містить амінокислотні мутації в положеннях 252, 254 і 256. В одному варіанті Fc ділянка, одержана з Fc ділянки IgG₁ людини, включає мутації M252Y, S254T і T256E. У деяких варіантах пропонується антигензв'язуючий рецептор, здатний специфічно зв'язуватися з варіантом антитіла, що включає Fc ділянку, яка містить амінокислотні мутації, які зменшують зв'язування з Fc γ R, наприклад, Fc ділянку, що містить мутації в положеннях 234, 235 і 329 (EU система нумерації амінокислотних залишків). В одному варіанті мутації являють собою мутації L234A і L235A (LALA). У деяких варіантах Fc ділянка варіанту антитіла-мішені, одержана з Fc ділянки IgG₁ людини, додатково включає мутацію D265A і/або P329G. В одному варіанті Fc ділянка, одержана з Fc ділянки IgG₁ людини, включає мутацію P329G ("PG"). В іншому варіанті Fc ділянка, одержана з Fc ділянки IgG₁ людини, включає мутації I253A, H310A і H435A ("AAA").

В одному варіанті антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що складається з першої та другої субодиниць, здатних до стабільної асоціації. В одному варіанті Fc домен являє собою Fc домен IgG, конкретно Fc домен IgG₁ або IgG₄. В одному варіанті Fc домен являє собою Fc домен людини. В одному варіанті мутований Fc домен проявляє знижену зв'язуючу афінність щодо Fc рецептора і/або знижену ефекторну

функцію, в порівнянні з нативним Fc доменом IgG₁. В одному варіанті здійснення даного винаходу Fc домен включає одну або більше амінокислотних мутацій, які знижують зв'язування з Fc рецептором і/або ефекторну функцію.

В одному кращому варіанті одна або більше амінокислотних мутацій розташовані в одному або більше положень, вибраних з групи L234, L235 і P329 (відповідно до системи нумерації Кабата). В одному конкретному варіанті кожна субодиниця Fc домена включає три амінокислотних мутації, які знижують зв'язування з активуючим Fc рецептором і/або ефекторну функцію, де зазначені амінокислотні мутації включають L234A, L235A і P329G. В одному конкретному варіанті Fc рецептором є Fcγ рецептор. В одному варіанті ефекторна функція являє собою антитілозалежну опосередковану клітинами цитотоксичність (ADCC).

У конкретному варіанті мутований Fc домен включає мутацію P329G. Відповідно, мутований Fc домен, що включає мутацію P329G, характеризується зниженою зв'язуючою афінністю щодо Fcγ рецепторів або її відсутністю в порівнянні з немутованим Fc доменом. В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає, принаймні, одну:

(а) 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RYWMN (SEQ ID NO: 1),

(б) CDR H2 з амінокислотною послідовністю EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 2) і

(в) CDR H3 з амінокислотною послідовністю PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3).

В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає, принаймні, один:

(г) легкий ланцюг 1 (CDR L) з амінокислотною послідовністю RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4),

(д) CDR L2 з амінокислотною послідовністю GTNKRAP (SEQ ID NO: 5) і

(е) CDR L3 з амінокислотною послідовністю ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

В одному варіанті здійснення даного винаходу позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає принаймні одну ділянку, яка визначає комплементарність важкого ланцюга (CDR), що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3, і, принаймні, одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи, що включає послідовність SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6.

В одному варіанті здійснення даного винаходу позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає ділянки, які визначають комплементарність важкого ланцюга (CDR) з послідовністю SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3, і CDR легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6.

В одному кращому варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає:

(а) 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H) яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RYWMN (SEQ ID NO: 1),

(б) CDR H2 з амінокислотною послідовністю EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 2),

(в) CDR H3 з амінокислотною послідовністю PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3),

і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає:

(г) легкий ланцюг 1 (CDR L) з амінокислотною послідовністю RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4),

(д) CDR L2 з амінокислотною послідовністю GTNKRAP (SEQ ID NO: 5) і

(е) CDR L3 з амінокислотною послідовністю ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3, і, принаймні, одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи, що включає послідовність SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6.

97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 32, і варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 33.

5 В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 32, і варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 33.

10 В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 32, і варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33.

15 В одному кращому варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, і варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9.

20 В одному варіанті здійснення даного винаходу, принаймні, один антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv, Fab, crossFab або scFab фрагмент. В одному варіанті здійснення даного винаходу позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент.

25 У кращому варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де Fab фрагмент включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 40 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 41.

30 В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv фрагмент, який є поліпептидом, що складається з варіабельного домену важкого ланцюга (VH), варіабельного домену легкого ланцюга (VL) і лінкера, де зазначені варіабельні домени і вказаний лінкер характеризуються однією з наступних конфігурацій в напрямку від N-кінцевого залишку до C-кінцевого залишку: а) VH-лінкер-VL або б) VL-лінкер-VH. У кращому варіанті scFv фрагмент характеризується конфігурацією VH-лінкер-VL.

35 В кращому варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де scFv фрагмент включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10.

40 В альтернативному конкретному варіанті здійснення даного винаходу мутований Fc домен включає мутації I253A, H310A і H435A ("AAA"). Мутації AAA знижують рівень зв'язування з неонатальним Fc рецептором (FcRn). Відповідно, мутований Fc домен, що включає мутації AAA, характеризується зниженою зв'язуючою афінністю щодо FcRn або її відсутністю в порівнянні з немутованим Fc доменом.

45 Відповідно, в одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає, принаймні, одну:

50 (а) 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю SYGMS (SEQ ID NO: 53),

(б) CDR H2 з амінокислотною послідовністю SSGGSY (SEQ ID NO: 54) і

(в) CDR H3 з амінокислотною послідовністю LGMITTGYAMDY (SEQ ID NO: 55).

55 В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає, принаймні, один:

(г) легкий ланцюг 1 (CDR L) з амінокислотною послідовністю RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO: 56),

60 (д) CDR L2 з амінокислотною послідовністю KVSNRFS (SEQ ID NO: 57) і

(е) CDR L3 з амінокислотною послідовністю FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 58).

В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий фрагмент включає принаймні одну ділянку, яка визначає комплементарність важкого ланцюга (CDR), що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 і SEQ ID NO: 55, і, принаймні, одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи, яка включає послідовності SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 і SEQ ID NO: 58.

В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає ділянки, які визначають комплементарність важкого ланцюга (CDR) з послідовністю SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 і SEQ ID NO: 55, і CDR легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 і SEQ ID NO: 58.

У кращому варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає:

(а) 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю SYGMS (SEQ ID NO: 53),

(б) CDR H2 з амінокислотною послідовністю SSGGSY (SEQ ID NO: 54),

(в) CDR H3 з амінокислотною послідовністю LGMITTGYAMDY (SEQ ID NO: 55), і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає:

(г) легкий ланцюг 1 (CDR L) з амінокислотною послідовністю RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO: 56),

(д) CDR L2 з амінокислотною послідовністю KVSNRFS (SEQ ID NO: 57) і

(е) CDR L3 з амінокислотною послідовністю FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 58).

В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 61 і варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з SEQ ID NO: 62.

В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 61, і варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62.

В одному варіанті здійснення даного винаходу, принаймні, один антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv, Fab, crossFab або scFab фрагмент. В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де принаймні антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент. У конкретному варіанті здійснення даного винаходу позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де Fab фрагмент включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 64 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 65.

В одному варіанті позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv фрагмент. У конкретному варіанті здійснення даного винаходу позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де scFv фрагмент включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 60.

В інших варіантах здійснення даного винаходу антигензв'язуючий фрагмент в складі позаклітинного домена являє собою одноланцюговий Fab фрагмент або scFab фрагмент.

Fab і scFab фрагменти стабілізуються природним дисульфідним зв'язком між CL доменом і

CH1 доменом. Антигензв'язуючі фрагменти, що включають варіабельний домен важкого ланцюга (VH) і варіабельний домен легкого ланцюга (VL), такі як Fab, crossFab, scFv і scFab фрагменти, як описано в даному контексті, можна додатково стабілізувати за рахунок введення міжланцюгових дисульфідних містків між VH і VL доменами. Відповідно, в одному варіанті Fab фрагмент (фрагменти), crossFab фрагмент (фрагменти), scFv фрагмент (фрагменти) і/або scFab фрагмент (фрагменти) в складі антигензв'язуючих рецепторів даного винаходу можна додатково стабілізувати за рахунок формування міжланцюгових дисульфідних зв'язків за допомогою введення залишків цистеїну (наприклад, в положення 44 варіабельної ділянки важкого ланцюга і в положення 100 варіабельної ділянки легкого ланцюга відповідно до системи нумерації Кабата). У прикладених прикладах і на фігурах такі стабілізовані антигензв'язуючі фрагменти позначаються терміном "ds".

Заякорений трансмембранний домен

У даному винаході заякорений трансмембранний домен антигензв'язуючих рецепторів даного винаходу може характеризуватися відсутністю сайту розщеплення протеазами ссавців. У даному винаході термін "протеази" означає протеолітичні ферменти, які здатні гідролізувати амінокислотну послідовність трансмембранного домену, що включає сайт розщеплення протеазою. Термін "протеази" включає як ендопептидази, так і екзопептидази. У даному винаході будь-який заякорений трансмембранний домен трансмембранного білка, визначений, серед інших, в CD-номенклатурі, можна використовувати для одержання антигензв'язуючих рецепторів за даним винаходом, які активують Т-клітини, краще CD8+Т-клітини, після зв'язування з мутованим Fc доменом, як описано в даному контексті.

Відповідно, в даному винаході заякорений трансмембранний домен може включати частину трансмембранного домену щура / миші або краще людини. Прикладом такого заякореного трансмембранного домену є трансмембранний домен CD28, наприклад, який характеризується амінокислотною послідовністю, як описано в даному контексті послідовністю SEQ ID NO: 11 (яка кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 24). У даному винаході трансмембранний домен антигензв'язуючого рецептора даного винаходу може включати / складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 11 (яка кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 24).

В ілюстративному варіанті даного винаходу як підтвердження концепції пропонується антигензв'язуючий рецептор, який включає антигензв'язуючий фрагмент, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10 (яка кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 22), і фрагмент/частина поліпептиду CD28 (номер доступу в базі даних Uniprot для CD28 людини P10747 (номер версії 173, версія послідовності 1)), як описано в даному контексті послідовністю SEQ ID NO: 71 (яка кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 70). В іншому варіанті будь-який білок, який містить трансмембранний домен, визначений, серед інших, в CD-номенклатурі, можна використовувати як заякорений трансмембранний домен білкового антигензв'язуючого рецептора за даним винаходом. Як описано вище, представлений в даному контексті антигензв'язуючий рецептор може включати заякорений трансмембранний домен CD28, який розташований в положеннях амінокислотних залишків 153-179, 154-179, 155-179, 156-179, 157-179, 158-179, 159-179, 160-179, 161-179, 162-179, 163-179, 164-179, 165-179, 166-179, 167-179, 168-179, 169-179, 170-179, 171-179, 172-179, 173-179, 174-179, 175-179, 176-179, 177-179 або 178-179 повнорозмірного білка CD28 людини з послідовністю SEQ ID NO: 71 (яка кодується кДНК з послідовністю ID NO: 70). Відповідно, в даному винаході заякорений трансмембранний домен може включати або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 11 (яка кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 24).

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, що включає Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий рецептор включає:

(а) важкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 64, приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену з послідовністю SEQ ID NO: 11, необов'язково через пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17, і

(б) легкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65.

В одному варіанті пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, що включає Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий рецептор включає:

(а) важкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність, вибраний з SEQ ID NO: 40 і

SEQ ID NO: 49, приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену з послідовністю SEQ ID NO: 11, необов'язково через пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17, і

5 (б) легкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 41 і SEQ ID NO: 50.

В одному варіанті пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, що включає Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий рецептор включає:

10 (а) важкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40, приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену з послідовністю SEQ ID NO: 11, необов'язково через пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17, і

(б) легкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41.

15 В одному кращому варіанті пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, що включає Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий рецептор включає:

20 (а) важкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49, приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену з послідовністю SEQ ID NO: 11, необов'язково через пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17, і

(б) легкий ланцюг, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50.

25 В одному варіанті пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, що включає scFv фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 60, приєднану через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену з послідовністю SEQ ID NO: 11, необов'язково через пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17.

30 В одному варіанті пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, що включає scFv фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 10 і SEQ ID NO: 34, приєднану через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену з послідовністю SEQ ID NO: 11, необов'язково через пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17.

40 В одному кращому варіанті пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, що включає scFv фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, приєднану через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену з послідовністю SEQ ID NO: 11, необов'язково через пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17.

45 В одному варіанті пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, що включає scFab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де scFv фрагмент включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34, приєднану через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену з послідовністю SEQ ID NO: 11, необов'язково через пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17.

Стимулюючий сигнальний домен (SSD) і костимулюючий сигнальний домен (CSD)

50 Краще антигензв'язуючий рецептор даного винаходу включає принаймні один стимулюючий сигнальний домен і/або, принаймні, один костимулюючий сигнальний домен. Відповідно, представлений в даному контексті антигензв'язуючий рецептор краще включає стимулюючий сигнальний домен, який забезпечує активацію Т-клітини. Представлений в даному контексті антигензв'язуючий рецептор може включати стимулюючий сигнальний домен, який являє собою фрагмент / частину поліпептиду CD3z щура / миші або людини (номер доступу в базі даних Uniprot для CD3z людини P20963 (номер версії 177, номер послідовності 2, номер доступу в базі

даних Uniprot для CD3z щура / миші P24161 (первинний цитований номер доступу) або Q9D3G3 (вторинний цитований номер доступу), номер версії 143, номер послідовності 1)), Fcgr3A (номер доступу в базі даних Uniprot для FCGR3A людини P08637 (номер версії 178, номер послідовності 2)) або NKG2D (номер доступу в базі даних Uniprot для NKG2D людини P26718 (номер версії 151, номер послідовності 1), номер доступу в базі даних Uniprot для NKG2D щура / миші O54709 (номер версії 132, номер послідовності 2))).

Таким чином, стимулюючий сигнальний домен, який міститься в представленому в даному контексті антигензв'язуючому рецепторі, може являти собою фрагмент / частину поліпептиду повнорозмірного CD3z, Fcgr3A або NKG2D. Амінокислотні послідовності повнорозмірного CD3z або NKG2D щура / миші, як описано в даному контексті, є послідовностями SEQ ID NO: 96 (CD3z), SEQ ID NO: 100 (Fcgr3A) або SEQ ID NO: 104 (NKG2D) (послідовності щура / миші кодуються послідовностями ДНК SEQ ID NO: 97 (CD3z), SEQ ID NO: 101 (FCGR3A) або SEQ ID NO: 105 (NKG2D). Амінокислотні послідовності повнорозмірних CD3z, Fcgr3A або NKG2D людини, як описано в даному контексті, є послідовностями SEQ ID NO: 94 (CD3z), SEQ ID NO: 98 (FCGR3A) або SEQ ID NO: 102 (NKG2D) (послідовності людини кодуються послідовностями ДНК SEQ ID NO: 95 (CD3z), SEQ ID NO: 99 (FCGR3A) або SEQ ID NO: 103 (NKG2D)). Антигензв'язуючий рецептор за винаходом може включати фрагменти CD3z, Fcgr3A або NKG2D як стимулюючий домен, за умови, що вони містять, принаймні, один сигнальний домен. Краще будь-яка частина / фрагмент CD3z, Fcgr3A або NKG2D придатні для використання як стимулюючого домену за умови, що вони містять, принаймні, один сигнальний мотив. Однак більш краще антигензв'язуючий рецептор за винаходом включає поліпептиди людини. Таким чином, більш краще представлений в даному контексті антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотні послідовності, як описано в даному контексті, з послідовностями SEQ ID NO: 94 (CD3z), SEQ ID NO: 98 (FCGR3A) або SEQ ID NO: 102 (NKG2D) (послідовності людини кодуються послідовностями ДНК SEQ ID NO: 95 (CD3z), SEQ ID NO: 99 (FCGR3A) або SEQ ID NO: 103 (NKG2D)). Наприклад, фрагмент/частина поліпептиду CD3z людини, яка може міститися в антигензв'язуючому рецепторі даного винаходу, може включати або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 13 (що кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 26). Відповідно, в одному варіанті антигензв'язуючий рецептор включає послідовність SEQ ID NO: 13, або послідовність, яка містить від 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 або 30 заміन, делецій або вставок у порівнянні з послідовністю SEQ ID NO: 13, і який характеризується стимулюючою сигнальною активністю. Конкретні конфігурації антигензв'язуючих рецепторів, що включають стимулюючий сигнальний домен (SSD), представлені нижче в даному контексті, а також в прикладах і на фігурах. Стимулюючу сигнальну активність можна визначити, наприклад, із підвищення рівня вивільнення цитокінів, оціненого методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) (IL-2, IFN γ , TNF α), підвищеної проліферативної активності (визначають по збільшенню числа клітин) або підвищеної літичної активності, яка визначається методами аналізу за вивільненням LDH.

Крім того, представлений в даному контексті антигензв'язуючий рецептор краще включає принаймні один костимулюючий сигнальний домен, який забезпечує додаткову активацію Т-клітини. Представлений в даному контексті антигензв'язуючий рецептор може включати костимулюючий сигнальний домен, який являє собою фрагмент/частину поліпептиду CD28 щура / миші або людини (номер доступу в базі даних Uniprot для CD28 людини P10747 (номер версії 173, номер послідовності 1), номер доступу в базі даних Uniprot для CD28 щура / миші P31041 (номер версії 134, номер послідовності 2)), CD137 (номер доступу в базі даних Uniprot для CD137 людини Q07011 (номер версії 145, номер послідовності 1), номер доступу в базі даних Uniprot для CD137 щура / миші P20334 (номер версії 139, номер послідовності 1)), OX40 (номер доступу в базі даних Uniprot для OX40 людини P23510 (номер версії 138, номер послідовності 1), номер доступу в базі даних Uniprot для OX40 щура / миші P43488 (номер версії 119, номер послідовності 1)), ICOS (номер доступу в базі даних Uniprot для ICOS людини Q9Y6W8 (номер версії 126, номер послідовності 1)), номер доступу в базі даних Uniprot для ICOS щура / миші Q9WV40 (первинний цитований номер доступу) або Q9JL17 (вторинний цитований номер доступу), номер версії 102, версія послідовності 2)), CD27 (номер доступу в базі даних Uniprot для CD27 людини P26842 (номер версії 160, номер послідовності 2), номер доступу в базі даних Uniprot для CD27 щура / миші P41272 (номер версії 137, версія послідовності 1)), 4-1-BB (номер доступу в базі даних Uniprot для 4-1-BB щура / миші P20334 (номер версії 140, версія послідовності 1), номер доступу в базі даних Uniprot для 4-1-BB людини Q07011 (номер версії 146, версія послідовності)), DAP10 (номер доступу в базі даних Uniprot для DAP10 людини Q9UBJ5 (номер версії 25, номер послідовності 1), номер доступу в базі даних Uniprot для DAP10 щура / миші Q9QUJ0 (первинний цитований номер доступу) або

Q9R1E7 (вторинний цитований номер доступу), номер версії 101, номер послідовності 1)) або DAP12 (номер доступу в базі даних Uniprot для DAP12 людини O43914 (номер версії 146, номер послідовності 1), номер доступу в базі даних Uniprot для DAP12 щура / миші O054885 (первинний цитований номер доступу) або Q9R1E7 (вторинний цитований номер доступу),
 5 номер версії 123, номер послідовності 1). У деяких варіантах здійснення даного винаходу антигензв'язуючий рецептор за винаходом може включати один або більше, тобто 1, 2, 3, 4, 5, 6 або 7 описаних в даному контексті коstimулюючих сигнальних доменів. Відповідно, в даному винаході антигензв'язуючий рецептор за винаходом може включати, як перший коstimулюючий сигнальний домен, фрагмент / частину поліпептиду CD28 щура / миші або краще людини, а
 10 другий коstimулюючий сигнальний домен вибирають з групи, яка складається з CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 і DAP12 щура / миші або краще людини, або їх фрагментів. Краще антигензв'язуючий рецептор за винаходом включає коstimулюючий сигнальний домен, одержаний з організму людини. Таким чином, більш краще коstimулюючий сигнальний домен (домени), який включений в антигензв'язуючий рецептор за винаходом, включає або
 15 складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 12 (що кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 25).

Таким чином, коstimулюючий сигнальний домен, який необов'язково включений в представлений в даному контексті антигензв'язуючий рецептор, являє собою фрагмент / частину повнорозмірного поліпептиду CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 або DAP12.
 20 Амінокислотні послідовності повнорозмірних CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, CD27, DAP10 або DAP12 щура / миші представлені в послідовностях SEQ ID NO: 69 (CD27), SEQ ID NO: 73 (CD28), SEQ ID NO: 77 (CD137), SEQ ID NO: 81 (OX40), SEQ ID NO: 85 (ICOS), SEQ ID NO: 89 (DAP10) або SEQ ID NO: 93 (DAP12) (поліпептиди щура / миші кодуються послідовностями ДНК, представленими в послідовностях SEQ ID NO: 68 (CD27), SEQ ID NO: 72 (CD28), SEQ ID NO: 76 (CD137), SEQ ID NO: 80 (OX40), SEQ ID NO: 84 (ICOS), SEQ ID NO: 88 (DAP10) або SEQ ID NO: 92 (DAP12)). Однак, так як в даному винаході послідовності поліпептидів людини є кращими, коstimулюючий сигнальний домен, який необов'язково включений в представлений в даному
 25 контексті антигензв'язуючий білковий рецептор, являє собою фрагмент / частину повнорозмірного CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 або DAP12 людини. Амінокислотні послідовності повнорозмірного CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 або DAP12 людини в даному контексті представлені в послідовностях SEQ ID NO: 67 (CD27), SEQ ID NO: 71 (CD28), SEQ ID NO: 75 (CD137), SEQ ID NO: 79 (OX40), SEQ ID NO: 83 (ICOS), SEQ ID NO: 87 (DAP10) або SEQ ID NO: 91 (DAP12) (поліпептиди людини кодуються послідовностями ДНК, представленими в послідовностях SEQ ID NO: 66 (CD27), SEQ ID NO: 70 (CD28), SEQ ID NO: 74 (CD137), SEQ ID NO: 78 (OX40), SEQ ID NO: 82 (ICOS), SEQ ID NO: 86 (DAP10) або SEQ ID NO: 90 (DAP12)).

В одному кращому варіанті, антигензв'язуючий рецептор включає CD28 або його фрагмент як коstimулюючий сигнальний домену. Представлений в даному контексті антигензв'язуючий рецептор може включати фрагмент CD28 як коstimулюючий сигнальний домен, за умови, що
 40 він включає принаймні один сигнальний домен CD28. Краще будь-яка частина / фрагмент CD28 придатні для використання як частина антигензв'язуючого рецептора за винаходом за умови, що вони містять, принаймні, один з сигнальних мотивів CD28. Наприклад, поліпептид CD28, який включений в антигензв'язуючий білковий рецептор даного винаходу, може включати або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 12 (що кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 25). Згідно з даним винаходом, внутрішньоклітинний домен CD28, який проявляє активність коstimулюючого сигнального домену, може включати послідовність (послідовності) з внутрішньоклітинного домену поліпептиду CD28, YNMN (SEQ ID NO: 106) і/або PYAP (SEQ ID NO: 107). Краще антигензв'язуючий рецептор за винаходом включає поліпептиди, які одержують з організму людини. Наприклад, фрагмент / частина поліпептиду CD28 людини, який
 50 може бути включений в антигензв'язуючий рецептор за винаходом, може включати або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 12 (що кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 25). Відповідно, в даному винаході антигензв'язуючий рецептор включає послідовність SEQ ID NO: 12, або послідовність, яка містить від 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 замінів, делецій або вставок у порівнянні з послідовністю SEQ ID NO: 12, і який характеризується
 55 коstimулюючою сигнальною активністю. Конкретні конфігурації антигензв'язуючих рецепторів, що включають коstimулюючий сигнальний домен (CSD), представлені нижче в даному контексті, а також в прикладах і на фігурах. Коstimулюючу сигнальну активність можна визначити, наприклад, із підвищення рівня вивільнення цитокінів, за даними методу твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА) (IL-2, IFN γ , TNF α), підвищеної проліферативної
 60 активності (по збільшенню числа клітин) або підвищеної літичної активності, за даними методу

оцінки рівня вивільнення LDH.

У варіанті здійснення даного винаходу, як описано вище, коstimулюючий сигнальний домен антигензв'язуючого рецептора можна одержати з гена CD28 людини (номер доступу в базі даних Uniprot P10747 (номер версії 173, версія послідовності 1)) і проявляє CD28 активність, тобто продукування цитокінів, проліферацію і літичну активність трансдукованої клітини, як описано в даному контексті, наприклад, трансдукованої Т-клітини. Активність CD28 можна оцінити за рівнем вивільнення цитокінів методом ІФА або методом проточної цитометрії, визначаючи рівень цитокінів, таких як гамма-інтерферон (IFN- γ) або інтерлейкін 2 (IL-2), за рівнем проліферації Т-клітин, оціненим, наприклад, за рівнем маркера проліферації ki67, числу клітин, за даними методу проточної цитометрії, або рівнем літичної активності, за даними вимірювання імпедансу клітин-мішеней в режимі реального часу (з використанням аналізатора ICELLigence, як описано, наприклад, в [статтях Thakur та ін., Biosens Bioelectron., 35(1), 503-506 (2012), Krutzik та ін., Methods Mol Biol., 699, 179-202 (2011), Ekkens та ін., Infect Immun., 75(5), 2291-2296 (2007), Ge та ін., Proc Natl Acad Sci U S A., 99(5), 2983-2988 (2002), Düwell та ін., Cell Death Differ., 21(12), 1825-1837 (2014), Erratum, Cell Death Differ., 21(12), 161 (2014)]].

Костимулюючі сигнальні домени PYAP (AA 208-211 в послідовності SEQ ID NO: 107 і YMNМ (AA 191-194 в послідовності SEQ ID NO: 106) виявляють хорошу дію на функцію поліпептиду CD28 і функціональні ефекти, описані вище. Амінокислотна послідовність YMNМ домену представлена в послідовності SEQ ID NO: 106, амінокислотна послідовність PYAP домену представлена в послідовності SEQ ID NO: 107. Відповідно, в антигензв'язуючому рецепторі даного винаходу поліпептид CD28 краще включає послідовність з внутрішньоклітинного домену поліпептиду CD28 з послідовностями YMNМ (SEQ ID NO: 106) і/або PYAP (SEQ ID NO: 107). У даному винаході внутрішньоклітинний домен поліпептиду CD28 з послідовностями YMNМ (SEQ ID NO: 106) і/або PYAP (SEQ ID NO: 107), проявляє CD28 активність, тобто продукування цитокінів, проліферацію і літичну активність трансдукованої клітини, як описано в даному контексті, наприклад, трансдукованої Т-клітини. Відповідно, в даному винаході коstimулюючий сигнальний домен антигензв'язуючих рецепторів даного винаходу, характеризується амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 12 (людини) (кодовану послідовністю ДНК SEQ ID NO: 25). Однак в антигензв'язуючому рецепторі даного винаходу один або обидва зазначених домени можуть являти собою мутовані домени, такі як FMNM (SEQ ID NO: 108) і/або AYAA (SEQ ID NO: 109), відповідно. Будь-яка із зазначених мутацій знижує здатність трансдукованої клітини, що містить антигензв'язуючий рецептор, вивільняти цитокіни, не впливаючи на її проліферацію, і перевага полягає в підвищенні життєздатності та, отже, терапевтичній ефективності трансдукованих клітин. Або, іншими словами, зазначена нефункціональна мутація краще підвищує стійкість клітин, які трансдуковані за допомогою представленого в даному контексті антигензв'язуючого рецептора, *in vivo*. Однак зазначені сигнальні мотиви можуть бути присутніми у будь-якому сайті внутрішньоклітинного домену антигензв'язуючого рецептора, представленого в даному контексті.

Лінкер і сигнальні пептиди

Представлений в даному контексті антигензв'язуючий рецептор, крім того, може включати принаймні один лінкер (або "спейсер"). Лінкер зазвичай являє собою пептид, що включає до 20 амінокислотних залишків. Відповідно, в даному винаході лінкер може включати 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 амінокислотних залишків. Наприклад, представлений в даному контексті антигензв'язуючий рецептор може включати лінкер між позаклітинним доменом, що включає принаймні один антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, заякореним трансмембранним доменом, коstimулюючим сигнальним доменом і/або стимулюючим сигнальним доменом. Перевага зазначених лінкерів полягає в тому, що вони підвищують ймовірність того, що різні поліпептиди антигензв'язуючого рецептора (тобто позаклітинний домен, що включає принаймні один антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, заякорений трансмембранний домен, коstimулюючий сигнальний домен і/або стимулюючий сигнальний домен) незалежно згортаються в певну структуру і характеризуються очікуваною дією. Таким чином, в даному винаході позаклітинний домен, що включає принаймні один антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, заякорений трансмембранний домен, який не містить сайт розщеплення протеазами ссавців, коstimулюючий сигнальний домен і стимулюючий сигнальний домен, може бути включений в одноланцюговий поліфункціональний поліпептид. Одноланцюговий гібридний конструкт, наприклад, може складатися з поліпептиду (поліпептидів), що включає позаклітинний домен (домени), що містить, принаймні, один антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, заякорений трансмембранний домен (домени),

костимулюючий сигнальний домен (домени) і / або стимулюючий сигнальний домен (домени). В інших варіантах антигензв'язуючий рецептор включає антигензв'язуючий фрагмент, який не є однокланцевим гібридним конструктором, тобто антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab або crossFab фрагмент. У таких варіантах антигензв'язуючий рецептор не є однокланцевим гібридним конструктором, що включає тільки один поліпептидний ланцюг. Краще такі конструктори включатимуть однокланцевий гібридний поліпептид важкого ланцюга, з'єднаний з легким ланцюгом імуноглобуліну, як описано в даному контексті, наприклад, гібридний поліпептид важкого ланцюга включає важкий ланцюг (ланцюги) імуноглобуліну, заякорений трансмембранний домен (домени), костимулюючий сигнальний домен (домени) і/або стимулюючий сигнальний домен (домени) і з'єднаний з легким ланцюгом (ланцюгами) імуноглобуліну. Відповідно, антигензв'язуючий фрагмент, заякорений трансмембранний домен, костимулюючий сигнальний домен і стимулюючий сигнальний домен можуть бути з'єднані з використанням одного або більше однакових або різних пептидних лінкерів, як описано в даному контексті. Наприклад, в представленому в даному контексті антигензв'язуючому рецепторі лінкер між позаклітинним доменом, що включає принаймні один антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, і заякореним трансмембранним доменом може включати амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17 або складатися з неї. Відповідно, заякорений трансмембранний домен, костимулюючий сигнальний домен і/або стимулюючий домен можуть бути з'єднані один з одним через пептидні лінкери або в іншому варіанті домени з'єднані безпосередньо один з одним.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антигензв'язуючий фрагмент, що міститься в позаклітинному домені, являє собою однокланцевий варіабельний фрагмент (scFv), який є гібридним білком варіабельних ділянок важкого (VH) і легкого (VL) ланцюгів антитіла, з'єднаний з коротким пептидним лінкером, який містить від 10 до приблизно 25 амінокислотних залишків. Лінкер зазвичай збагачений залишками гліцину, що забезпечує гнучкість, а також серином або треоніном для поліпшення розчинності, і може з'єднувати N-кінцевий залишок VH з C-кінцевим залишком VL або навпаки. Наприклад, в представленому в даному контексті антигензв'язуючому рецепторі лінкер може характеризуватися амінокисотною послідовністю SEQ ID NO: 16. scFv антигензв'язуючий фрагмент, як описано в даному контексті, зберігає специфічність вихідного антитіла, незважаючи на видалення консервативних ділянок і введення лінкера. scFv антитіла описані, наприклад, в [статті Houston J.S., *Methods in Enzymol.*, 203, 46-96 (1991)].

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антигензв'язуючий фрагмент, включений в позаклітинний домен, являє собою однокланцевий Fab або scFab фрагмент, який є поліпептидом, що складається з варіабельного домену важкого ланцюга (VH), консервативного домену 1 (CH1) антитіла, варіабельного домену легкого ланцюга (VL) антитіла, консервативного домену легкого ланцюга (CL) антитіла і лінкера, де зазначені домени антитіла і вказаний лінкер розташовані в одному з наступних порядків в напрямку від N-кінцевого залишку до C-кінцевого залишку: а) VH-CH1-лінкер-VL-CL, б) VL-CL-лінкер-VH-CH1, в) VH-CL-лінкер-VL-CH1 або г) VL-CH1-лінкер-VH-CL, і, де зазначений лінкер являє собою поліпептид, що включає принаймні 30 амінокислотних залишків, краще від 32 до 50 амінокислотних залишків. Зазначені однокланцеві Fab фрагменти стабілізують з використанням природного дисульфідного зв'язку між CL доменом і CH1 доменом.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу антигензв'язуючий фрагмент, що міститься в позаклітинному домені, являє собою кроссоверний однокланцевий Fab фрагмент, який є поліпептидом, що складається з варіабельного домену важкого ланцюга (VH) антитіла, консервативного домену 1 (CH1) антитіла, варіабельного домену легкого ланцюга (VL) антитіла, консервативного домену легкого ланцюга (CL) антитіла і лінкера, де зазначені домени антитіла і вказаний лінкер розташовані в одному з наступних порядків в напрямку від N-кінцевого залишку до C-кінцевого залишку: а) VH-CL-лінкер-VL-CH1 і б) VL-CH1-лінкер-VH-CL, де VH і VL разом утворюють антигензв'язуючий сайт, який специфічно зв'язується з антигеном, і де зазначений лінкер являє собою поліпептид, що містить принаймні 30 амінокислотних залишків.

Представлений в даному контексті антигензв'язуючий рецептор або його частини можуть включати сигнальний пептид. Такий сигнальний пептид забезпечує доставку білка на поверхню мембрани Т-клітини. Наприклад, в представленому в даному контексті антигензв'язуючому рецепторі сигнальний пептид може характеризуватися амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 110 (що кодується послідовністю ДНК SEQ ID NO: 111).

Активуючі Т-клітини антигензв'язуючі рецептори, здатні специфічно зв'язуватися з мутованими Fc доменами

Компоненти антигензв'язуючих рецепторів, як описано в даному контексті, можуть бути

з'єднані один з одним в різних конфігураціях для одержання активуючих Т-клітини антигензв'язуючих рецепторів.

У деяких варіантах антигензв'язуючий рецептор включає позаклітинний домен, що складається з варіабельного домену важкого ланцюга (VH) і варіабельного домену легкого ланцюга (VL), з'єднаних з заякореним трансмембранним доменом. У деяких варіантах VH домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку VL домену, необов'язково через пептидний лінкер. В інших варіантах антигензв'язуючий рецептор додатково включає стимулюючий сигнальний домен і/або костимулюючий сигнальний домен. В такому конкретному варіанті антигензв'язуючий рецептор в основному складається з VH домену та VL домену, заякореного трансмембранного домену і необов'язково стимулюючого сигнального домену, з'єднаних через один або більше пептидних лінкерів, де VH домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку домену VL, і VL домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, де заякорений трансмембранний домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку стимулюючого сигнального домену. Необов'язково антигензв'язуючий рецептор додатково включає костимулюючий сигнальний домен. В одному такому конкретному варіанті антигензв'язуючий рецептор в основному складається з VH домену і VL домену, заякореного трансмембранного домену, стимулюючого сигнального домену та костимулюючого сигнального домену, з'єднаних через один або більше пептидних лінкерів, де VH домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку VL домену, і VL домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, де заякорений трансмембранний домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку стимулюючого сигнального домену, де стимулюючий сигнальний домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку костимулюючого сигнального домену. В іншому варіанті костимулюючий сигнальний домен з'єднаний з заякореним трансмембранним доменом, а не зі стимулюючим сигнальним доменом. У кращому варіанті антигензв'язуючий рецептор в основному складається з VH домену і VL домену, заякореного трансмембранного домену, костимулюючого сигнального домену і стимулюючого сигнального домену, з'єднаних через один або більше пептидних лінкерів, де VH домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку VL домену, і VL домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, де заякорений трансмембранний домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку костимулюючого сигнального домену, де костимулюючий сигнальний домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку стимулюючого сигнального домену.

У кращих варіантах один із зв'язуючих фрагментів являє собою Fab фрагмент або crossFab фрагмент. В одному кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент приєднаний через С-кінцевий залишок важкого ланцюга Fab або crossFab до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, необов'язково через пептидний лінкер. В іншому варіанті, антигензв'язуючий фрагмент приєднаний через С-кінцевий залишок легкого ланцюга Fab або crossFab до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, необов'язково через пептидний лінкер. В інших варіантах антигензв'язуючий рецептор додатково включає стимулюючий сигнальний домен і/або костимулюючий сигнальний домен. В такому конкретному варіанті антигензв'язуючий рецептор в основному складається з Fab або crossFab фрагмента, заякореного трансмембранного домену і необов'язково стимулюючого сигнального домену, з'єднаних через один або більше пептидних лінкерів, де Fab або crossFab фрагмент приєднаний через С-кінцевий залишок важкого або легкого ланцюга до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, де заякорений трансмембранний домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку стимулюючого сигнального домену. Краще антигензв'язуючий рецептор додатково включає костимулюючий сигнальний домен. В одному із зазначених варіантів антигензв'язуючий рецептор в основному складається з Fab або crossFab фрагменту, заякореного трансмембранного домену, стимулюючого сигнального домену і костимулюючого сигнального домену, з'єднаних через один або більше пептидних лінкерів, де Fab або crossFab фрагмент приєднаний через С-кінцевий залишок важкого або легкого ланцюга до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, де стимулюючий сигнальний домен приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку костимулюючого сигнального домену. У кращому варіанті костимулюючий сигнальний домен з'єднаний з заякореним трансмембранним доменом замість стимулюючого сигнального домену. У більш кращому варіанті антигензв'язуючий рецептор в основному складається з Fab або crossFab фрагменту, заякореного трансмембранного домену, костимулюючого сигнального домену і стимулюючого сигнального домену, де Fab або crossFab фрагмент приєднаний через С-

кінцевий залишок важкого ланцюга до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену через пептидний лінкер, де заякорений трансмембранний домен приєднаний через C-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку коstimулюючого сигнального домену, де коstimулюючий сигнальний домен приєднаний через C-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку коstimулюючого сигнального домену.

Антигензв'язуючий фрагмент, заякорений трансмембранний домен і коstimулюючий сигнальний і/або коstimулюючий сигнальний домен з'єднані один з одним безпосередньо або через один або більше пептидних лінкерів, що включають один або більше амінокислотних залишків, зазвичай приблизно 2-20 амінокислотних залишків. Пептидні лінкери відомі в даній галузі техніки і описані в даному контексті. Придатні неімуногенні пептидні лінкери включають, наприклад, $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ або $G_4(SG_4)_n$ пептидні лінкери, де "n" в основному означає число від 1 до 10, зазвичай від 2 до 4. Кращим пептидним лінкером для з'єднання антигензв'язуючого фрагмента і заякореного трансмембранного фрагмента є лінкер GGGGS (G_4S), що характеризується послідовністю SEQ ID NO 17. Прикладом пептидного лінкера, придатного для з'єднання варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) і варіабельної ділянки легкого ланцюга є лінкер GGGSGGGSGGGSGGGGS (G_4S)₄, що характеризується послідовністю SEQ ID NO 16.

Лінкери можуть додатково містити шарнірну ділянку (частину) імуноглобуліну. Краще, якщо антигензв'язуючий фрагмент приєднаний до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, він може бути приєднаний через шарнірну ділянку імуноглобуліну або її частину, з використанням додаткового пептидного лінкера або без нього.

Як описано в даному контексті, антигензв'язуючі рецептори даного винаходу включають позаклітинний домен, що містить, принаймні, один антигензв'язуючий фрагмент. Антигензв'язуючий рецептор з одним антигензв'язуючим фрагментом, здатним специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені, є придатним і кращим насамперед у випадках, коли потрібна висока експресія антигензв'язуючого рецептора. У таких випадках присутність більш одного антигензв'язуючого фрагмента, специфічного щодо антигену клітини-мішені, може обмежити ефективність експресії антигензв'язуючого рецептора. Однак, в інших випадках, вигідно використовувати антигензв'язуючий рецептор, що містить два або більше антигензв'язуючих фрагмента, специфічних щодо антигену клітини-мішені, наприклад, для оптимізації впливу, направлено до сайту-мішені, або для забезпечення зшивання антигенів клітини-мішені.

В одному конкретному варіанті антигензв'язуючий рецептор включає один антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, краще Fc доменом IgG₁, що містить мутацію P329G. В одному варіанті антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, являє собою scFv, Fab або crossFab.

В одному варіанті антигензв'язуючий фрагмент приєднаний через C-кінцевий залишок scFv фрагмента або через C-кінцевий залишок важкого ланцюга Fab або crossFab до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, необов'язково через пептидний лінкер. В одному варіанті пептидний лінкер включає амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID NO: 16). В одному варіанті заякорений трансмембранний домен являє собою трансмембранний домен, який вибирають з групи, що складається з трансмембранного домену CD8, CD3z, FCGR3A, NKG2D, CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 або DAP12 або його фрагмента. У кращому варіанті заякореним трансмембранним доменом є трансмембранний домен CD28 або його фрагмент. У конкретному варіанті заякорений трансмембранний домен включає або складається з амінокислотної послідовності FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 11). В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор додатково включає коstimулюючий сигнальний домен (CSD). В одному варіанті заякорений трансмембранний домен антигензв'язуючого рецептора приєднаний через C-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку коstimулюючого сигнального домену. В одному варіанті коstimулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, що складається з внутрішньоклітинного домену CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 і DAP12 або їх фрагментів, як описано вище в даному контексті. У кращому варіанті коstimулюючий сигнальний домен є внутрішньоклітинний домен CD28 або його фрагмент. У конкретному варіанті коstimулюючий сигнальний домен включає або складається з послідовності RSKRSRLHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 12). В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор додатково включає коstimулюючий сигнальний домен. В одному варіанті коstimулюючий сигнальний домен антигензв'язуючого рецептора приєднаний через C-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку коstimулюючого сигнального домену. В одному варіанті, принаймні, один коstimулюючий сигнальний домен

індивідуально вибирають з групи, що складається з внутрішньоклітинного домену CD3z, FCGR3A і NKG2D або їх фрагментів. У кращому варіанті костимулюючий сигнальний домен являє собою внутрішньоклітинний домен CD3z або його фрагмент. У конкретному варіанті костимулюючий сигнальний домен включає або складається з послідовності

5 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 13).

В одному варіанті здійснення даного винаходу антигензв'язуючий рецептор приєднаний до репортерного білку, перш за все до GFP або його посиленіх аналогів. В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку eGFP (посилений зелений флуоресцентний білок), необов'язково через пептидний лінкер, як описано в даному контексті. У кращому варіанті пептидний лінкер являє собою пептид

10 GEGRGSLTTCGDVEENPGP (T2A), представлений в послідовності SEQ ID NO: 18.

У конкретному варіанті антигензв'язуючий рецептор включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, який містить, принаймні, один антигензв'язуючий фрагмент, де

15 принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де мутований Fc домен включає мутацію P329G. Мутація P329G знижує зв'язування з рецептором Fcγ. В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор за винаходом включає заякорений трансмембранний домен (ATD), костимулюючий сигнальний домен (CSD)

20 і стимулюючий сигнальний домен (SSD). В одному із зазначених варіантів антигензв'язуючий рецептор характеризується конфігурацією scFv-ATD-CSD-SSD. У кращому варіанті антигензв'язуючий рецептор характеризується конфігурацією scFv-G4S-ATD-CSD-SSD, де G4S являє собою лінкер, що включає послідовність GGGGS SEQ ID NO: 17. Репортерний білок необов'язково приєднаний до С-кінцевого залишку антигензв'язуючого рецептора,

25 необов'язково через пептидний лінкер.

У конкретному варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає принаймні одну ділянку, яка визначає комплементарність важкого ланцюга (CDR), яку вибирають з групи, що складається з послідовності

30 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3, і, принаймні, одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи, яка включає послідовності SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RYWMN (SEQ ID NO: 1), CDR H2 з амінокислотною послідовністю EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 2), CDR H3 з амінокислотною послідовністю

35 PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3), 1-у ділянку легкого ланцюга (CDR L) яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4), CDR L2 з амінокислотною послідовністю GTNKRAP (SEQ ID NO: 5) і CDR L3 з амінокислотною послідовністю ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

40

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до С-кінцевого залишку:

(i) антигензв'язуючий фрагмент, який являє собою scFv фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де scFv фрагмент включає

45 варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що містить 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR) яка визначає комплементарність з послідовністю SEQ ID NO: 1, CDR 2 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 2, CDR 3 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку (VH) легкого ланцюга, що містить CDR 1 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 4, CDR 2 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 5 і CDR 3 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 6,

50

(ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,

(iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,

(iii) костимулюючий сигнальний домен, краще костимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і

55

(iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13.

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до С-кінцевого залишку:

(i) антигензв'язуючий фрагмент, який являє собою молекулу scFv, здатну специфічно

60

зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де scFv включає варіабельний домен важкого ланцюга (VH), вибраний з послідовності SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 32, і варіабельний домен легкого ланцюга (VL), вибраний з послідовності SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 33,

- 5 (ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,
- (iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,
- (iii) костимулюючий сигнальний домен, краще костимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і
- 10 (iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13.

У кращому варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до C-кінцевого залишку:

- 15 (i) антигензв'язуючий фрагмент, який являє собою молекулу scFv, здатну специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де scFv включає варіабельний домен важкого ланцюга (VH) з послідовністю SEQ ID NO: 8, і варіабельний домен легкого ланцюга (VL) з послідовністю SEQ ID NO: 9,
- (ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,
- (iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,
- 20 (iii) костимулюючий сигнальний домен, краще костимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і
- (iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13.

- 25 У кращому варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до C-кінцевого залишку:

- (i) антигензв'язуючий фрагмент, який являє собою молекулу scFv, здатну специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де scFv включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10 або SEQ ID NO: 34,
- 30 (ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,
- (iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,
- (iii) костимулюючий сигнальний домен, краще костимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і
- 35 (iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13.

- У конкретному варіанті антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на
- 40 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 31.

У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31

- 45 У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент. В одному варіанті антигензв'язуючий фрагмент приєднаний через C-кінцевий амінокислотний залишок важкого ланцюга Fab до N-кінцевого амінокислотного залишку заякореного трансмембранного домену. В одному варіанті заякорений трансмембранний домен являє собою трансмембранний домен, який вибирають з групи, що складається з трансмембранного домену CD8, CD3z, FCGR3A, NKG2D, CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 або DAP12 або його
- 50 фрагмента. У кращому варіанті заякореним трансмембранним доменом є CD28 трансмембранний домен або його фрагмент. У конкретному варіанті заякореним трансмембранним доменом є послідовність FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 11). В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор додатково включає костимулюючий сигнальний домен (CSD). В одному варіанті заякорений трансмембранний домен антигензв'язуючого рецептора приєднаний через C-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку костимулюючого сигнального домену. В одному варіанті костимулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, що складається з внутрішньоклітинного домену CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 і DAP12 або їх фрагментів, як описано вище в даному контексті. У
- 55 кращому варіанті костимулюючий сигнальний домен являє собою внутрішньоклітинний домен
- 60 CD28 або його фрагмент. У конкретному варіанті костимулюючий сигнальний домен включає

або складається з послідовності RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 12). В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор додатково включає стимулюючий сигнальний домен. В одному варіанті костимулюючий сигнальний домен антигензв'язуючого рецептора приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку стимулюючого сигнального домену. В одному варіанті, принаймні, один стимулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, що складається з внутрішньоклітинного домену CD3z, FCGR3A і NKG2D або їх фрагментів. У кращому варіанті костимулюючий сигнальний домен являє собою внутрішньоклітинний домен CD3z або його фрагмент. У конкретному варіанті костимулюючий сигнальний домен включає або складається з послідовності

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKPNQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 13).

В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор приєднаний до репортерного білку, перш за все до GFP або його посиленням аналогам. В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку eGFP (посилений зелений флуоресцентний білок), необов'язково через пептидний лінкер, як описано в даному контексті. У кращому варіанті пептидний лінкер є послідовність GEGRGSLLTCGDVEENPGP (T2A) SEQ ID NO: 18.

У конкретному варіанті антигензв'язуючий рецептор включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, який містить, принаймні, один антигензв'язуючий фрагмент, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим Fc доменом, де мутований Fc домен включає мутацію P329G, де мутація P329G знижує зв'язування з Fc γ рецептором. В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор за винаходом включає заякорений трансмембранний домен (ATD), костимулюючий сигнальний домен (CSD) і стимулюючий сигнальний домен (SSD). В одному із зазначених варіантів антигензв'язуючий рецептор характеризується конфігурацією Fab-ATD-CSD-SSD. У кращому варіанті антигензв'язуючий рецептор характеризується конфігурацією Fab-G μ S-ATD-CSD-SSD, де G μ S являє собою лінкер, що включає послідовність GGGGS SEQ ID NO: 17. Репортерний білок необов'язково приєднаний до С-кінцевого залишку антигензв'язуючого рецептора, необов'язково через пептидний лінкер.

У конкретному варіанті антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, що включає принаймні одну ділянку, яка визначає комплементарність важкого ланцюга (CDR), яку вибирають з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3, а також принаймні одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи, що включає послідовності SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий фрагмент включає 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотою послідовністю RYWMN (SEQ ID NO: 1), CDR H2 з амінокислотою послідовністю EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 2), CDR H3 з амінокислотою послідовністю PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3), 1-у ділянку легкого ланцюга (CDR L), яка визначає комплементарність з амінокислотою послідовністю RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4), CDR L2 з амінокислотою послідовністю GTNKRAP (SEQ ID NO: 5) і CDR L3 з амінокислотою послідовністю ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до С-кінцевого залишку:

(i) антигензв'язуючий фрагмент, який являє собою молекулу Fab, здатну специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, що містить 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR), яка визначає комплементарність з послідовністю SEQ ID NO: 1, CDR 2 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 2, CDR 3 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 3, CDR 1 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 4, CDR 2 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 5 і CDR 3 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 6,

(ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,

(iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,

(iii) костимулюючий сигнальний домен, краще костимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і

(iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю

SEQ ID NO: 13.

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає:

а) гібридний поліпептид важкого ланцюга, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до С-кінцевого залишку:

(i) важкий ланцюг, який включає 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR), яка визначає комплементарність з послідовністю SEQ ID NO: 1, CDR 2 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 2, CDR 3 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 3,

(ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,

(iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,

(iii) коstimулюючий сигнальний домен, краще коstimулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і

(iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13, а також

б) легкий ланцюг, що включає CDR 1 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 4, CDR 2 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 5 та CDR 3 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 6.

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, включаючий:

а) гібридний поліпептид важкого ланцюга, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до С-кінцевого залишку:

(i) варіабельний домен важкого ланцюга (VH) з послідовністю SEQ ID NO: 8,

(ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,

(iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,

(iii) коstimулюючий сигнальний домен, краще коstimулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і

(iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13, а також

б) варіабельний домен легкого ланцюга (VL) з послідовністю SEQ ID NO: 9.

В одному варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, що містить важкий ланцюг, що включає або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 40 або SEQ ID NO: 49, і легкий ланцюг, що включає або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 41 або SEQ ID NO: 50. У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, що містить важкий ланцюг, що включає або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 40, а також легкий ланцюг, що включає або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 41.

У конкретному варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий рецептор включає: гібридний поліпептид важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, яку вибирають з групи, яка включає послідовність SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 48, а також поліпептид легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, яку вибирають з групи, що включає послідовність SEQ ID NO: 41 і SEQ ID NO: 50.

У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, де антигензв'язуючий рецептор включає: гібридний поліпептид важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39, а також поліпептид легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41.

В іншому варіанті антигензв'язуючий рецептор включає один антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, краще Fc доменом IgG₁, що включає мутації I253A, H310A і H435A ("AAA"), в одному варіанті антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутуваним вихідним Fc доменом, являє собою scFv, Fab або crossFab.

В одному варіанті антигензв'язуючий фрагмент приєднаний через С-кінцевий залишок scFv фрагмента або через С-кінцевий залишок важкого ланцюга Fab або crossFab до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, необов'язково через пептидний лінкер. В

одному варіанті здійснення даного винаходу пептидний лінкер включає амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID NO: 16). В одному варіанті заякорений трансмембранний домен являє собою трансмембранний домен, який вибирають з групи, що складається з трансмембранного домену CD8, CD3z, FCGR3A, NKG2D, CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 або DAP12 або його фрагмента. У кращому варіанті заякорений трансмембранний домен являє собою CD28 трансмембранний домен або його фрагмент. У конкретному варіанті заякорений трансмембранний домен включає або складається з амінокислотної послідовності FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 11). В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор додатково включає костимулюючий сигнальний домен (CSD). В одному варіанті заякорений трансмембранний домен антигензв'язуючого рецептора приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку костимулюючого сигнального домену. В одному варіанті костимулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, що складається з внутрішньоклітинного домену CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 і DAP12 або їх фрагментів, як описано вище в даному контексті. У кращому варіанті костимулюючий сигнальний домен являє собою внутрішньоклітинний домен CD28 або його фрагмент. У конкретному варіанті костимулюючий сигнальний домен включає або складається з послідовності RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 12). В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор додатково включає стимулюючий сигнальний домен. В одному варіанті костимулюючий сигнальний домен антигензв'язуючого рецептора приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку стимулюючого сигнального домену. В одному варіанті, принаймні, один стимулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, що складається з внутрішньоклітинного домену CD3z, FCGR3A і NKG2D або їх фрагментів. У кращому варіанті костимулюючий сигнальний домен являє собою внутрішньоклітинний домен CD3z або його фрагмент. У конкретному варіанті костимулюючий сигнальний домен включає або складається з послідовності RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 13).

В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор приєднаний до репортерного білку, перш за все до GFP або його посиленіх аналогів. В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку eGFP (посилений зелений флуоресцентний білок), необов'язково через пептидний лінкер, як описано в даному контексті. У кращому варіанті пептидний лінкер являє собою послідовність GEGRGSLLTCGDVEENPGP (T2A) SEQ ID NO: 18.

У конкретному варіанті антигензв'язуючий рецептор включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, який містить, принаймні, один антигензв'язуючий фрагмент, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де мутований Fc домен включає мутації I253A, H310A і H435A. Мутації I253A, H310A і H435A знижують зв'язування з FcRn рецептором. В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор за даним винаходом включає заякорений трансмембранний домен (ATD), костимулюючий сигнальний домен (CSD) і стимулюючий сигнальний домен (SSD). В одному із зазначених варіантів антигензв'язуючий рецептор характеризується конфігурацією scFv-ATD-CSD-SSD. У кращому варіанті антигензв'язуючий рецептор характеризується конфігурацією scFv-G4S-ATD-CSD-SSD, де G4S являє собою лінкер, що включає послідовність GGGGS SEQ ID NO: 17. Репортерний білок необов'язково приєднаний до С-кінцевого залишку антигензв'язуючого рецептора, необов'язково через пептидний лінкер.

У конкретному варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий фрагмент включає принаймні одну ділянку, яка визначає комплементарність важкого ланцюга (CDR), яку вибирають з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 і SEQ ID NO: 55, а також принаймні одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи, що включає послідовність SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58.

У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий фрагмент включає 1-у ділянку (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю SYGMS (SEQ ID NO: 53), CDR H2 з амінокислотною послідовністю SSGGSY (SEQ ID NO: 54), CDR H3 з амінокислотною послідовністю LGMITTGYAMDY (SEQ ID NO: 55), 1-у ділянку легкого ланцюга (CDR L) яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO: 56), CDR L2 з амінокислотною послідовністю KVSNRFS (SEQ ID NO: 57) і CDR L3 з амінокислотною

послідовністю FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 58).

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до C-кінцевого залишку:

(i) антигензв'язуючий фрагмент, який представляє собою scFv фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де scFv фрагмент включає варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що містить 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR), яка визначає комплементарність з послідовністю SEQ ID NO: 53, CDR 2 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 54, CDR 3 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 55, а також варіабельну ділянку (VH) легкого ланцюга, що містить CDR 1 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 56, CDR 2 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 57 і CDR 3 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 58,

(ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,

(iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,

(iii) костимулюючий сигнальний домен, краще костимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і

(iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13.

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до C-кінцевого залишку:

(i) антигензв'язуючий фрагмент, який являє собою молекулу scFv, здатну специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де scFv включає варіабельний домен важкого ланцюга (VH) з послідовністю SEQ ID NO: 61, і варіабельний домен легкого ланцюга (VL) з послідовністю SEQ ID NO: 62,

(ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,

(iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,

(iii) костимулюючий сигнальний домен, краще костимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і

(iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13.

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до C-кінцевого залишку:

(i) антигензв'язуючий фрагмент, який являє собою молекулу scFv, здатну специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де scFv включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 60,

(ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,

(iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,

(iii) костимулюючий сигнальний домен, краще костимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і

(iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13.

У конкретному варіанті антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 59.

У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 595.

У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент. В одному варіанті антигензв'язуючий фрагмент приєднаний через C-кінцевий амінокислотний залишок важкого ланцюга Fab до N-кінцевого амінокислотного залишку заякореного трансмембранного домену. В одному варіанті заякорений трансмембранний домен являє собою трансмембранний домен, який вибирають з групи, що складається з трансмембранного домену CD8, CD3z, FCGR3A, NKG2D, CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 або DAP12 або його фрагмента. У кращому варіанті заякореним трансмембранним доменом є CD28 трансмембранний домен або його фрагмент. У конкретному варіанті заякореним трансмембранним доменом є послідовність FWVLVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 11). В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор додатково включає костимулюючий

сигнальний домен (CSD). В одному варіанті заякорений трансмембранний домен антигензв'язуючого рецептора приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку костимулюючого сигнального домену. В одному варіанті костимулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, що складається з внутрішньоклітинного домена CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 і DAP12 або їх фрагментів, як описано вище в даному контексті. У кращому варіанті костимулюючий сигнальний домен являє собою внутрішньоклітинний домен CD28 або його фрагмент. У конкретному варіанті костимулюючий сигнальний домен включає або складається з послідовності RSKRSRLHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 12). В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор додатково включає стимулюючий сигнальний домен. В одному варіанті костимулюючий сигнальний домен антигензв'язуючого рецептора приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку стимулюючого сигнального домену. В одному варіанті, принаймні, один стимулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, що складається з внутрішньоклітинного домену CD3z, FCGR3A і NKG2D або їх фрагментів. У кращому варіанті костимулюючий сигнальний домен являє собою внутрішньоклітинний домен CD3z або його фрагмент. У конкретному варіанті костимулюючий сигнальний домен включає або складається з послідовності RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 13).

В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор приєднаний до репортерного білку, перш за все до GFP або його посиленних аналогів. В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку eGFP (посилений зелений флуоресцентний білок), необов'язково через пептидний лінкер, як описано в даному контексті. У кращому варіанті пептидний лінкер являє собою послідовність GEGRGSLLTCGDVEENPGP (T2A) SEQ ID NO: 18.

У конкретному варіанті антигензв'язуючий рецептор включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, який містить, принаймні, один антигензв'язуючий фрагмент, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де мутований Fc домен включає мутації I253A, H310A і H435A, де мутації I253A, H310A і H435A знижують зв'язування з FcRn рецептором. В одному варіанті антигензв'язуючий рецептор за даним винаходом включає заякорений трансмембранний домен (ATD), костимулюючий сигнальний домен (CSD) і стимулюючий сигнальний домен (SSD). В одному із зазначених варіантів антигензв'язуючий рецептор характеризується конфігурацією Fab-ATD-CSD-SSD. У кращому варіанті антигензв'язуючий рецептор характеризується конфігурацією Fab-G4S-ATD-CSD-SSD, де G4S являє собою лінкер, що включає послідовність GGGGS SEQ ID NO: 17. Репортерний білок необов'язково приєднаний до С-кінцевого залишку антигензв'язуючого рецептора, необов'язково через пептидний лінкер.

У конкретному варіанті антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, що включає принаймні одну ділянку важкого ланцюга (CDR), яка визначає комплементарність, яку вибирають з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 і SEQ ID NO: 55, а також принаймні одну CDR легкого ланцюга, яку вибирають з групи, яка включає послідовність SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58.

У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий фрагмент включає 1-у ділянку (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотою послідовністю SYGMS (SEQ ID NO: 53), CDR H2 з амінокислотою послідовністю SSGGSY (SEQ ID NO: 54), CDR H3 з амінокислотою послідовністю LGMITTGYAMDY (SEQ ID NO: 55), 1-у ділянку легкого ланцюга (CDR L), яка визначає комплементарність з амінокислотою послідовністю RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO: 56), CDR L2 з амінокислотою послідовністю KVSNRFS (SEQ ID NO: 57) і CDR L3 з амінокислотою послідовністю FQGSHPYPT (SEQ ID NO: 58).

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до С-кінцевого залишку:

(і) антигензв'язуючий фрагмент, який являє собою молекулу Fab, здатну специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, що містить 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR) яка визначає комплементарність з послідовністю SEQ ID NO: 53, CDR 2 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 54, CDR 3 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 55, CDR 1 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 56, CDR 2

легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 57 і CDR 3 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 58,

(ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,

5 (iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,

(iii) костимулюючий сигнальний домен, краще костимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і

(iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13.

10 В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає:

а) гібридний поліпептид важкого ланцюга, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до C-кінцевого залишку:

15 (i) важкий ланцюг, що включає 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR), яка визначає комплементарність з послідовністю SEQ ID NO: 53, CDR 2 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 54, CDR 3 важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 55,

(ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,

(iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,

20 (iii) костимулюючий сигнальний домен, краще костимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і

(iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13, а також

25 б) легкий ланцюг, що включає CDR 1 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 56, CDR 2 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 57 і CDR 3 легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 58.

В одному варіанті здійснення даного винаходу пропонується антигензв'язуючий рецептор, що включає:

30 а) гібридний поліпептид важкого ланцюга, що включає в напрямку від N-кінцевого залишку до C-кінцевого залишку:

(i) варіабельний домен важкого ланцюга (VH) з послідовністю SEQ ID NO: 61,

(ii) пептидний лінкер, краще пептидний лінкер з послідовністю SEQ ID NO: 17,

(iii) заякорений трансмембранний домен, краще заякорений трансмембранний домен з послідовністю SEQ ID NO: 11,

35 (iii) костимулюючий сигнальний домен, краще костимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 12, і

(iv) стимулюючий сигнальний домен, краще стимулюючий сигнальний домен з послідовністю SEQ ID NO: 13, а також

б) варіабельний домен легкого ланцюга (VL) з послідовністю SEQ ID NO: 62.

40 В одному конкретному варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, який містить важкий ланцюг, що включає або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 64, і легкий ланцюг, що включає або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 65.

45 У конкретному варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий рецептор включає гібридний поліпептид важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 63, і поліпептид легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 65.

50 У кращому варіанті антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A, де антигензв'язуючий рецептор включає гібридний поліпептид важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 63, і поліпептид легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65.

55 У деяких інших варіантах антигензв'язуючий рецептор за винаходом, поліпептид Fab легкого ланцюга і гібридний поліпептид Fab важкого ланцюга з'єднані один з одним, не обов'язково через пептидний лінкер. З'єднання Fab важкого і легкого ланцюгів може поліпшити об'єднання Fab важкого і легкого ланцюгів, а також знизити число плазмід, необхідних для експресії деяких антигензв'язуючих рецепторів за винаходом. Альтернативним підходом зниження числа

плазмід, необхідних для експресії антигензв'язуючого рецептора, є використання внутрішнього сайту зв'язування рибосоми, щоб забезпечити експресію конструктів як важкого, так і легкого ланцюга з однієї і тієї ж плазмиди, як показано, наприклад, на фіг. 2.

У деяких варіантах антигензв'язуючий рецептор включає поліпептид, де С-кінцевий залишок варіабельної ділянки легкого ланцюга Fab антигензв'язуючого фрагмента зв'язаний пептидним зв'язком з консервативною ділянкою важкого ланцюга Fab антигензв'язуючого фрагмента (тобто антигензв'язуючий фрагмент включає важкий ланцюг crossFab, де варіабельна ділянка важкого ланцюга замінена варіабельною ділянкою легкого ланцюга), С-кінцевий залишок якої в свою чергу пов'язаний пептидним зв'язком з заякореним трансмембранним доменом (VL₍₁₎-CH1₍₁₎-ATD). У деяких варіантах антигензв'язуючий рецептор додатково включає поліпептид, де С-кінцевий залишок варіабельної ділянки важкого ланцюга Fab першого антигензв'язуючого фрагмента зв'язаний пептидним зв'язком з консервативною ділянкою легкого ланцюга Fab першого антигензв'язуючого фрагмента (VH₍₁₎-CL₍₁₎). У деяких варіантах поліпептиди ковалентно зв'язані, наприклад, з допомогою дисульфідного зв'язку. В інших варіантах антигензв'язуючий рецептор включає поліпептид, де С-кінцевий залишок варіабельної ділянки важкого ланцюга Fab антигензв'язуючого фрагмента зв'язаний пептидним зв'язком з консервативною ділянкою легкого ланцюга Fab антигензв'язуючого фрагмента (тобто антигензв'язуючий фрагмент включає важкий ланцюг crossFab, де консервативна ділянка важкого ланцюга замінена консервативною ділянкою легкого ланцюга), С-кінцевий залишок якої в свою чергу зв'язаний пептидним зв'язком з заякореним трансмембранним доменом (VH₍₁₎-CL₍₁₎-ATD). У деяких варіантах антигензв'язуючий рецептор додатково включає поліпептид, де С-кінцевий залишок варіабельної ділянки легкого ланцюга Fab антигензв'язуючого фрагмента зв'язаний пептидним зв'язком з консервативною ділянкою важкого ланцюга Fab антигензв'язуючого фрагмента (VL₍₁₎-CH1₍₁₎). У деяких варіантах поліпептиди ковалентно зв'язані, наприклад, за допомогою дисульфідного зв'язку.

Відповідно до будь-якого з вищевказаних варіантів компоненти антигензв'язуючого рецептора (наприклад, VH і VL, антигензв'язуючий фрагмент, заякорений трансмембранний домен, костимулюючий сигнальний домен, стимулюючий сигнальний домен) можуть бути з'єднані один з одним безпосередньо або через різні лінкери, перш за все пептидні лінкери, які містять один або більше амінокислотних залишків, зазвичай приблизно 2-20 амінокислотних залишків, як описано в даному контексті або відомо в даній галузі техніки. Придатні неімуногенні пептидні лінкери включають, наприклад, (G₄S)_n, (SG₄)_n, (G₄S)_n або G₄(SG₄)_n пептидні лінкери, де n в основному означає число від 1 до 10, краще від 1 до 4.

Типові активуючі Т-клітини антигензв'язуючі рецептори

У доданих ілюстративних прикладах і на фіг. 1А як підтвердження концепції винаходу пропонується сконструйований антигензв'язуючий рецептор "анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17096" (SEQ ID NO: 7), який включає один стабілізований scFv антигензв'язуючий фрагмент, який зв'язується / направлений проти антитіла / взаємодіє з антитілом, що включає мутацію P329G в складі Fc домена. Конструкт додатково включає CD28 трансмембранний домен, фрагмент CD28 як костимулюючий сигнальний домен і фрагмент CD3z як стимулюючий сигнальний домен. Послідовності (амінокислотні і кДНК) антитіло-зв'язуючої молекули, "анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17096" представлені в таблицях 2 і 3.

Більш того, як представлено на фіг. 1Б, як додаткове підтвердження концепції винаходу сконструйований антигензв'язуючий рецептор "анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17100" (SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41), який включає один стабілізований антигензв'язуючий Fab фрагмент, який зв'язується / направлений проти антитіла / взаємодіє з антитілом, що включає мутації P329G в складі Fc домена. Конструкт додатково включає CD28 трансмембранний домен, фрагмент CD28 як костимулюючий сигнальний домен і фрагмент CD3z як стимулюючий сигнальний домен. Послідовності (амінокислотні і кДНК) антигензв'язуючого рецептора, "анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17100" представлені в таблицях 4 і 5.

Як ще одне підтвердження концепції винаходу сконструйований антигензв'язуючий рецептор, "анти-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17594" (SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50), який включає один антигензв'язуючий Fab фрагмент, який зв'язується / направлений проти антитіла / взаємодіє з антитілом, що включає мутацію P329G в складі Fc домена. Конструкт додатково включає CD28 трансмембранний домен, фрагмент CD28 як костимулюючий сигнальний домен і фрагмент CD3z як стимулюючий сигнальний домен. Послідовності (амінокислотні і кДНК) антигензв'язуючого рецептора "анти-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD pETR17594" представлені в таблицях 6 і 7.

Як додаткове підтвердження концепції даного винаходу сконструйований антигензв'язуючий рецептор, "анти-AAA scFv" (SEQ ID NO: 59), який включає один антигензв'язуючий scFv фрагмент, який зв'язується / направлений проти антитіла / взаємодіє з антитілом, що включає мутації I253A, H310A і H435 в складі Fc домена. Конструкт додатково включає CD28 трансмембранний домен, фрагмент CD28 як костимулюючий сигнальний домен і фрагмент CD3z як стимулюючий сигнальний домен. Послідовності (амінокислотні і кДНК) антитіло-зв'язуючої молекули, "анти-AAA scFv" представлені в таблицях 8 і 9.

Як додаткове підтвердження концепції винаходу сконструйований антигензв'язуючий рецептор, "анти-AAA Fab" (SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65), який включає один антигензв'язуючий Fab фрагмент, який зв'язується / направлений проти антитіла / взаємодіє з антитілом, що включає мутації I253A, H310A і H435A в складі Fc домена. Конструкт додатково включає CD28 трансмембранний домен, фрагмент CD28 як костимулюючий сигнальний домен і фрагмент CD3z як стимулюючий сигнальний домен. Послідовності (амінокислотні і кДНК) антитіло-зв'язуючої молекули, "анти-AAA scFv" представлені в таблицях 10 і 11.

У винаході також пропонується молекула (молекули) нуклеїнової кислоти, кодуєючої антигензв'язуючі рецептори за винаходом, як описано в даному контексті. Даний винахід також стосується молекули (молекул) нуклеїнової кислоти, кодуєючої антигензв'язуючі рецептори за винаходом, а також наборів, що включають молекулу (молекули) нуклеїнової кислоти даного винаходу, як додатково описано в даному контексті.

Набори

В іншому об'єкті даного винаходу пропонуються набори, що включають або складаються з нуклеїнової кислоти, що кодує антигензв'язуючий рецептор за винаходом, і/або клітин, краще Т-клітин, трансдукованих антигензв'язуючими рецепторами за винаходом, і які необов'язково включають антитіло / антитіла, що включають мутований Fc домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом.

Відповідно, пропонується набір, що включає:

(А) трансдуковану Т-клітину, здатну експресувати антигензв'язуючий рецептор за винаходом, і

(Б) антитіло, яке включає мутований Fc домен,

де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

Також пропонується набір, що включає:

(А) виділений полінуклеотид і/або вектор, який кодує антигензв'язуючий рецептор за винаходом, і

(Б) антитіло, яке включає мутований Fc домен,

де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

В даному контексті набори винаходу можуть включати трансдуковані Т-клітини, виділені полінуклеотиди і/або вектори і одне або більше антитіл, які включають мутований Fc домен. У конкретних варіантах антитіло являє собою терапевтичне антитіло, наприклад, пухлиноспецифічне антитіло. Пухлиноспецифічні антигени відомі в даній галузі техніки і описані в даному контексті. У даному винаході антитіло вводять до, одночасно з введенням або після введення трансдукованої Т-клітини, яка експресує антигензв'язуючий рецептор за винаходом. Набори даного винаходу включають трансдуковані Т-клітини або полінуклеотиди/вектори для одержання трансдукованих Т-клітин. В даному контексті трансдуковані Т-клітини є універсальними Т-клітинами оскільки вони не є специфічними щодо певної пухлини, але можуть бути направлені до будь-якої пухлини в залежності від терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен. В даному контексті пропонуються приклади антитіл, що включають мутований Fc домен, однак, у представлені в даному контексті набори можна включати будь-яке антитіло, що включає мутований Fc домен, як описано в даному контексті. У конкретних варіантах мутований Fc домен антитіл проявляє знижену зв'язуючу афінність щодо Fc рецептора і/або знижену ефекторну функцію, в порівнянні з нативним Fc доменом IgG₁. В одному із зазначених варіантів мутований Fc домен (або антитіло, що включає вказаний мутований Fc домен) характеризується зв'язуючою афінністю щодо Fc рецептора на рівні менше 50 %, краще менше 20 %, більш краще менше 10 % і ще більш краще менше 5 %, в порівнянні з нативним Fc доменом IgG₁ (або антитілом, яке включає нативний Fc домен IgG₁), і/або ефекторною функцією на рівні менше 50 %, краще менше 20 %, ще краще менше 10 % і ще більш краще менше 5 %, в порівнянні з нативним Fc доменом IgG₁ (або антитілом, що включає нативний Fc домен IgG₁). В одному варіанті мутований Fc домен (або антитіло, що включає вказаний мутований Fc домен) практично не зв'язується з Fc рецептором і/або не

індукує ефекторну функцію. У конкретному варіанті здійснення даного винаходу Fc рецептором є Fc γ рецептор. В одному варіанті здійснення даного винаходу Fc рецептором є Fc рецептор людини. В одному варіанті здійснення даного винаходу Fc рецептором є активуючий Fc рецептор. У конкретному варіанті Fc рецептором є активуючий Fc γ рецептор людини, більш конкретно Fc γ RIIIa, Fc γ RI або Fc γ RIIa людини, ще більш конкретно Fc γ RIIIa людини. В одному варіанті здійснення даного винаходу ефекторна функція являє собою одну або більше функцій, вибраних з групи, що включає CDC, ADCC, ADCP і секрецію цитокінів. У конкретному варіанті здійснення даного винаходу ефекторною функцією є ADCC. В одному варіанті здійснення даного винаходу мутований Fc домен характеризується істотно зміненою зв'язуючою афінністю щодо неонатального Fc рецептора (FcRn), в порівнянні із зв'язуючою афінністю нативного Fc домена IgG₁. В одному варіанті здійснення даного винаходу антитіло, яке включає мутований Fc домен, характеризується зв'язуючою афінністю щодо Fc рецептора на рівні менше 20 %, краще менше 10 %, більш краще менше 5 % зв'язуючої афінності антитіла, що включає несконструйований Fc домен. У конкретному варіанті здійснення даного винаходу Fc рецептором є Fc γ рецептор. У деяких варіантах Fc рецептором є Fc рецептор людини. У деяких варіантах Fc рецептором є активуючий Fc рецептор. У конкретному варіанті Fc рецептором є активуючий Fc γ рецептор людини, більш конкретно Fc γ RIIIa, Fc γ RI або Fc γ RIIa людини, ще більш конкретно Fc γ RIIIa людини. Краще, зв'язування з кожним із зазначених рецепторів знижується. У деяких варіантах зв'язуюча афінність щодо компонента комплексу, наприклад, зв'язуюча афінність щодо C1q також знижується.

У деяких варіантах в Fc домен антитіла вводили мутації для зниження ефекторної функції в порівнянні з немутованим Fc доменом. Знижена ефекторна функція може включати, але не обмежуватись тільки ними, одну або декілька з наступних функцій: знижена комплементзалежна цитотоксичність (CDC), знижена антитілозалежна обумовлена клітинами цитотоксичність (ADCC), знижений антитілозалежний клітинний фагоцитоз (ADCP), знижена секреція цитокінів, зниження опосередкованого імунним комплексом захоплення антигену антигенпрезентуючими клітинами, знижене зв'язування з NK клітинами, знижене зв'язування з макрофагами, зниження зв'язування з моноцитами, зниження зв'язування з поліморфно-ядерними клітинами, зниження прямої передачі сигналів, які індукують апоптоз, зниження зшивання антитіл, пов'язаних з мішенню, зниження дозрівання дендритних клітин або зниження примірування Т-клітин. В одному варіанті зниженою ефекторною функцією є одна або більше функцій, вибраних з групи, що включає знижену CDC, знижену ADCC, знижену ADCP і зниження секреції цитокінів. У конкретному варіанті зниженою ефекторною функцією є знижена ADCC. В одному варіанті зниження ADCC становить менше 20 % від рівня ADCC, індукованої несконструйованим Fc доменом (або антитілом, що містить несконструйований Fc).

В одному варіанті здійснення даного винаходу амінокислотна мутація, яка знижує зв'язуючу афінність Fc домена з Fc рецептором і/або ефекторну функцію, являє собою амінокислотну заміну. В одному варіанті здійснення даного винаходу Fc домен включає амінокислотну заміну, розташовану в положенні, вибраному з групи E233, L234, L235, N297, P331 і P329. У більш конкретному варіанті Fc домен включає амінокислотну заміну, розташовану в положенні, вибраному з групи L234, L235 і P329. У деяких варіантах Fc домен включає амінокислотні заміни L234A і L235A. В одному із зазначених варіантів Fc домен являє собою Fc домен IgG₁, насамперед Fc домен IgG₁ людини. В одному варіанті здійснення даного винаходу Fc домен включає амінокислотну заміну в положенні P329. У більш конкретному варіанті амінокислотна заміна являє собою заміну P329A або P329G, насамперед P329G. В одному варіанті здійснення даного винаходу Fc домен включає амінокислотну заміну в положенні P329 і додаткову амінокислотну заміну в положенні, вибраному з E233, L234, L235, N297 і P331. У більш конкретному варіанті додаткова амінокислотна заміна являє собою заміну E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D або P331S. У конкретних варіантах Fc домен включає амінокислотні заміни в положеннях P329, L234 і L235. В одному варіанті здійснення даного винаходу Fc домен включає амінокислотні мутації L234A, L235A і P329G ("P329G LALA"). В одному із зазначених варіантів Fc домен являє собою Fc домен IgG₁, насамперед Fc домен IgG₁ людини. Комбінація амінокислотних заміни "P329G LALA" практично повністю пригнічує зв'язування Fc γ рецептора (а також комплексу) з Fc доменом IgG₁ людини, як описано в заявці PCT WO 2012/130831, яка включена в повному обсязі в даний опис як посилання. У заявці WO 2012/130831 також описані способи одержання зазначених мутованих Fc доменів і способи визначення їх властивостей, таких як зв'язування з Fc рецептором або ефекторні функції.

У конкретному варіанті здійснення даного винаходу Fc домен, що характеризується зниженою зв'язуючою афінністю щодо Fc рецептора і/або зниженою ефекторною функцією, в порівнянні з нативним Fc доменом IgG₁, являє собою Fc домен IgG₁ людини, що містить

амінокислотні мутації L234A, L235A і необов'язково P329G, або Fc домен IgG₄ людини, що містить амінокислотні заміни S228P, L235E і необов'язково P329G.

У деяких варіантах проводили де-N-глікозилування Fc домену. В одному із зазначених варіантів Fc домен включає амінокислотну мутацію в положенні N297, перш за все амінокислотну мутацію, що забезпечує заміну аспарагіну на аланін (N297A) або на аспарагінову кислоту (N297D).

Крім Fc доменів, описаних вище, а також в заявці [WO 2012/130831], Fc домени, які характеризуються зниженими рівнем зв'язування з Fc рецептором і/або ефекторною функцією, також включають такі Fc домени, які включають одну або більше мутацій в положенні 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 (див. патент US 6737056). Зазначені мутовані Fc включають мутовані Fc з мутаціями в двох або більше положеннях амінокислот 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так званий "DANA" мутований Fc, в якому амінокислотні залишки в положенні 265 і 297 замінені на аланін [див. патент US 7332581].

Мутовані Fc домени можна одержати за рахунок делеції, заміни, вставки або модифікації амінокислот з використанням генно-інженерних або хімічних способів, відомих спеціалісту в даній галузі техніки. Генно-інженерні способи можуть включати сайт-направлений мутагенез кодувальної послідовності ДНК, ПЛР, синтез генів тощо. Правильні нуклеотидні зміни можна підтвердити, наприклад, секвенуванням.

Зв'язування з Fc рецепторами можна легко визначити, наприклад, методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА), або поверхневого плазмонного резонансу (ППР) з використанням стандартного устаткування, такого як установка BIAcore (фірми GE Healthcare), з використанням Fc рецепторів, які можна одержати методом рекомбінантної експресії. В іншому варіанті, зв'язуючу афінність Fc доменів або біспецифічних зв'язуючих активуючий клітини антиген сполук, що містять Fc домен для Fc рецепторів, можна оцінити з використанням відомих клітинних ліній для експресії конкретних Fc рецепторів, таких як NK клітини людини, які експресують FcγIIIa рецептор.

Ефекторну функцію Fc домену або антитіла, що містить Fc домен, можна оцінити методами, відовими в даній галузі техніки. Інші приклади аналізів *in vitro* для оцінки активності ADCC досліджуваної сполуки описані в [патенті US 5500362, статті Hellstrom Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7059-7063 (1986) і статті Hellstrom та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1499-1502 (1985), патенті US 5821337, статті Bruggemann та ін., J. Exp. Med., 166, 1351-1361 (1987)]. В іншому варіанті можна використовувати методи нерадіоактивного аналізу (див., наприклад, нерадіоактивний аналіз цитотоксичності ACT1™ для проточної цитометрії [фірми CellTechnology, Inc. Mountain View, CA] і нерадіоактивний аналіз цитотоксичності CytoTox 96® (фірми Promega, Madison, WI)). Придатні ефекторні клітини для зазначених аналізів включають моноклеарні клітини периферичної крові (PBMС) і природні клітини-кілери (NK клітини). В іншому варіанті або додатково ADCC активність досліджуваної сполуки можна оцінити *in vivo*, наприклад, на моделі тварин, такий як модель, описана в [статті Clynes та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 652-656 (1998)].

У деяких варіантах зменшується зв'язування Fc домена з компонентом комплементу, перш за все з C1q. Відповідно, у деяких варіантах, де Fc домен сконструйований таким чином, щоб знизити ефекторну функцію, зазначена знижена ефекторна функція включає зниження CDC. Для оцінки здатності антитіла зв'язуватися з C1q і, отже, проявляти активність CDC, можна проводити аналіз зв'язування C1q, див., наприклад, ІФА аналіз для оцінки зв'язування C1q і C3с, описаний в заявках [WO 2006/029879 і WO 2005/100402]. Для оцінки активації комплементу можна проводити аналіз CDC [див., наприклад, статті Gazzano-Santoro та ін., J. Immunol. Methods, 202, 163 (1996), Cragg та ін., Blood, 101, 1045-1052 (2003) і Cragg і Glennie, Blood, 103, 2738-2743 (2004)].

В одному варіанті знижується зв'язуюча афінність з неонатальним Fc рецептором (FcRn). У конкретних варіантах мутований Fc домен даного винаходу проявляє знижену зв'язуючу афінність щодо FcRn рецептора, в порівнянні з нативним Fc доменом IgG₁. В одному із зазначених варіантів Fc домен (або антитіло, що включає вказаний Fc домен) характеризується зв'язуючою афінністю щодо неонатального Fc рецептора на рівні менше 50 %, краще менше 20 %, більш краще менше 10 % і ще більш краще менше 5 %, в порівнянні з нативним Fc доменом IgG₁ (або антитілом, що включає нативний Fc домен IgG₁), і/або ефекторною функцією на рівні менш 50 %, краще менше 20 %, більш краще менше 10 % і ще більш краще менше 5 %, в порівнянні з нативним Fc доменом IgG₁ (або антитілом, що включає нативний Fc домен IgG₁). В одному варіанті мутований Fc домен (або антитіло, що включає вказаний мутований Fc домен) в основному не зв'язується з неонатальним Fc рецептором. У конкретному варіанті Fc рецептором є FcRn рецептор. В одному варіанті Fc рецептором є FcRn рецептор людини. У

конкретних варіантах Fc домен включає амінокислотні заміни в положеннях I253, H310 і H435. У більш конкретному варіанті Fc домен включає амінокислотні мутації I253A, H310A і H435A ("AAA"). В одному із зазначених варіантів Fc домен являє собою Fc домен IgG₁, насамперед Fc домен IgG₁ людини. Комбінація амінокислотних замін "AAA" практично повністю пригнічує зв'язування FcRn рецептора з Fc доменом IgG₁ людини.

У конкретному варіанті антитіло, яке включає мутований Fc домен, здатне специфічно зв'язуватися з CD20 і включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 112, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 113. В одному варіанті антитіло, яке включає мутований Fc домен, здатне специфічно зв'язуватися з FAP і включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 114, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 115. В одному варіанті антитіло, яке включає мутований Fc домен, здатне специфічно зв'язуватися з CEA і включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 116, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 117, важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 118, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 119, важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 120, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 121, або важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 122, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 123. В інших варіантах антитіло, яке включає мутований Fc домен, здатне специфічно зв'язуватися з тенасцином (TNC) і включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 124, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 125.

В іншому варіанті антитіло, яке включає мутований Fc домен, являє собою біспецифічне антитіло, наприклад, біспецифічне антитіло, яке активує Т-клітину. В одному із зазначених варіантів біспецифічне антитіло включає перший зв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мішенню, що активує Т-клітину, краще CD3, і другий зв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з пухлинним антигеном, як описано в даному контексті.

В одному варіанті антитіло, яке включає мутований Fc домен, є біспецифічним і здатне специфічно зв'язуватися з Her2, де біспецифічне антитіло включає перший важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 126, перший легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 127, другий важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 128, і другий легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 129.

В ілюстративному варіанті здійснення даного винаходу як підтвердження концепції винаходу пропонується набір, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7 ("анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD" (кодовану послідовністю ДНК SEQ ID NO: 19)), в комбінації з антитілом, що включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 112, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 113. В іншому варіанті набір може включати амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31 ("анти-P329G-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD" (кодовану послідовністю ДНК SEQ ID NO: 35)), в комбінації з антитілом, що включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 112, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 113. Крім того, в даному винаході набір може включати амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39 ("анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD" (кодовану послідовністю ДНК SEQ ID NO: 44)) в комбінації з антитілом, що включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 112, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 113. В іншому варіанті набір може включати амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48 ("анти-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD" (кодовану послідовністю ДНК SEQ ID NO: 51)), в комбінації з антитілом, що включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 112, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 113. В іншому варіанті набір може включати амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 59 ("анти-AAA-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD"), в комбінації з антитілом, що включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 112, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 113. Крім того, в даному винаході набір може включати амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 63 ("анти-AAA-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD") в комбінації з антитілом, що включає важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 112, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 113. Крім того, в даному винаході набір може включати принаймні одне антитіло, яке включає важкий ланцюг і легкий ланцюг, які вибирають з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 112 і SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114 і SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 і SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118 і SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120 і SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122 і SEQ ID NO: 123, а також SEQ ID NO: 124 і SEQ ID NO: 125. Крім того, в даному винаході набір може включати біспецифічне антитіло, краще біспецифічне антитіло, що включає перший важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 128, перший легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 129, і другий важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 130, і другий легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 131.

Більш того, частини набору винаходу можуть бути упаковані індивідуально у флакони або пляшечки або у вигляді комбінації в контейнери або багато контейнерну упаковку. В іншому

варіанті набір даного винаходу може включати інкубаційну систему для інкубації клітин в (закритому) контейнері, де клітини пацієнта, краще Т-клітини, як описано в даному контексті, можна трансдукувати антигензв'язуючим рецептором (рецепторами) за винаходом і інкубувати в умовах, згідно з правилами GMP (правила виробництва і контролю якості лікарських засобів, як описано в інструкціях про правила виробництва і контролю якості лікарських засобів, опублікованих Європейською комісією на інтернет-ресурсі http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/index_en.htm). Більш того, набір згідно з даним винаходом включає систему для інкубації клітин в (закритих) контейнерах, де виділені / одержані Т-клітини пацієнтів можна трансдукувати антигензв'язуючим рецептором (рецепторами) за винаходом і інкубувати в умовах, рекомендованих в GMP. Більш того, в даному винаході набір може також включати вектор, що кодує антигензв'язуючий рецептор (рецептори), як описано в даному контексті. Набір за винаходом можна ефективно використовувати, серед іншого, для здійснення способу за винаходом і можна використовувати в різних галузях, як описано в даному контексті, наприклад, як науково-дослідницькі засоби або медичні засоби. Набори краще одержують за стандартними методиками, які відомі спеціалісту в даній галузі техніки.

В даному контексті клітини, одержані від пацієнта, краще Т-клітини, можна трансдукувати антигензв'язуючим рецептором за винаходом, здатним специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, як описано в даному контексті, з використанням набору, як описано вище. Позаклітинний домен, що включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, відсутній в Т-клітинах або на їх поверхні. Відповідно, клітини, одержані від пацієнта, трансдуковані з використанням наборів за винаходом, набувають здатність специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом антитіла, наприклад, терапевтичного антитіла, і здатність індукувати пригнічення / лізис клітин-мішеней в результаті взаємодії з терапевтичним антитілом, що включає мутований Fc домен, де терапевтичне антитіло здатне зв'язуватися з природним пухлиноспецифічним антигеном (який ендогенно експресується) на поверхні пухлинних клітин. Зв'язування позаклітинного домену антигензв'язуючого рецептора, як описано в даному контексті, активує вказану Т-клітину і забезпечує її фізичне контактування з пухлинною клітиною через терапевтичне антитіло, яке включає мутований Fc домен. Нетрансдуковані або ендогенні Т-клітини (наприклад, CD8+Т-клітини) не здатні зв'язуватися з мутованим Fc доменом терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен. Трансдуковані Т-клітини, які експресують антигензв'язуючий рецептор, що включає позаклітинний домен, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, не взаємодіють з терапевтичним антитілом, яке не містить мутації в складі Fc домена, як описано в даному контексті. Відповідно, Т-клітини, які експресують антигензв'язуючий рецептор за винаходом, здатні лізувати клітини-мішені *in vivo* і/або *in vitro* в присутності антитіла, що містить мутації в складі Fc домена, як описано в даному контексті. Відповідні клітини-мішені включають клітини, які експресують поверхневу молекулу, тобто природний пухлиноспецифічний антиген, розташований на поверхні природних пухлинних клітин, який розпізнається, принаймні, одним, краще двома, доменами зв'язування терапевтичного антитіла, як описано в даному контексті. Зазначені поверхневі молекули описані нижче в даному контексті.

Лізис клітини-мішені можна детектувати методами, відомими в даній галузі техніки. Відповідно, зазначені методи включають, серед іншого, аналізи фізіологічних параметрів *in vitro*. Такі аналізи фізіологічних параметрів дозволяють контролювати загибель клітин, наприклад, за оцінкою цілісності клітинної мембрани (наприклад, аналіз на основі FACS з використанням йодиду пропідію, аналіз проникності мембрани з використанням трипанового синього, фотометричний аналіз вивільнення міченого ферменту (LDH), радіометричний аналіз вивільнення ⁵¹Cr, флуориметричний аналіз вивільнення європію і аналіз вивільнення CalceinAM). Додаткові аналізи включають моніторинг життєздатності клітин, наприклад, за допомогою фотометричних аналізів MTT, XTT, WST-1 і alamarBlue, радіометричного аналізу включення 3H-Thd, клоногенного аналізу активності ділення клітин і флуориметричного аналізу мітохондріального трансмембранного градієнта з використанням родамину-123. Додатково можна контролювати рівень апоптозу, наприклад, за допомогою аналізу на основі FACS впливу фосфатидилсерину, TUNEL-тесту на основі ІФА, аналізу активності каспази (фотометричний, флуориметричний або на основі ІФА) або аналізу зміни морфології клітин (стиснення клітини, пузиріння мембрани).

Трансдуковані Т-клітини, здатні експресувати антигензв'язуючі рецептори за винаходом

В іншому об'єкті даного винаходу пропонуються трансдуковані Т-клітини, здатні експресувати антигензв'язуючий рецептор даного винаходу. Антигензв'язуючі рецептори, як описано в даному контексті, являють собою молекули, які в природних умовах не містяться в Т-

клітинах і/або на їх поверхні, і які не експресуються (ендогенно) в нормальних (нетрансдукованих) Т-клітинах або на їх поверхні. Таким чином, антигензв'язуючий рецептор за винаходом штучно вводиться в Т-клітини і/або на їх поверхню. У даному винаході зазначені Т-клітини, краще CD8+Т-клітини, можна виділити/одержати від суб'єкта, що потребує лікування, як описано в даному контексті. Відповідно, антигензв'язуючі рецептори, як описано в даному контексті, які штучно вводяться і потім презентуються в зазначених Т-клітинах і/або на їх поверхні, містять домени, що включають один або більше антигензв'язуючих фрагментів, які є доступними (*in vitro* або *in vivo*) для імуноглобулінів (Ig-похідні), краще для антитіл, краще для Fc домена антитіл. У даному винаході зазначені штучно введені молекули презентуються в зазначених Т-клітинах і/або на їх поверхні після (ретровірусної або лентівірусної) трансдукції, як описано нижче в даному контексті. Відповідно, після трансдукції Т-клітини даного винаходу можна активувати імуноглобулінами, краще (терапевтичними) антитілами, які включають специфічні мутації в складі Fc домена, як описано в даному контексті.

У даному винаході також пропонуються трансдуковані Т-клітини, які експресують антигензв'язуючий рецептор, який кодується молекулою (молекулами) нуклеїнової кислоти, що кодує антигензв'язуючий рецептор даного винаходу. Відповідно, в даному винаході трансдукована клітина може включати молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує антигензв'язуючий рецептор даного винаходу або вектор даного винаходу, який експресує антигензв'язуючий рецептор даного винаходу.

У даному винаході термін "трансдукована Т-клітина" включає генетично модифіковану Т-клітину (тобто Т-клітину, в яку навмисно введена молекула нуклеїнової кислоти). Представлена в даному контексті трансдукована Т-клітина може включати вектор даного винаходу. Краще, представлена в даному контексті трансдукована Т-клітина включає молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує антигензв'язуючий рецептор даного винаходу, і/або вектор даного винаходу. Трансдукована Т-клітина за винаходом може являти собою Т-клітину, яка тимчасово або стабільно експресує чужорідну ДНК (тобто молекулу нуклеїнової кислоти, яка була введена в Т-клітину). Перш за все, молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує антигензв'язуючий рецептор за винаходом, можна стабільно інтегрувати в геном Т-клітини в ході ретровірусної або лентівірусної трансдукції. При використанні трансфекції мРНК молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує антигензв'язуючий рецептор даного винаходу, можна експресувати тимчасово. Краще, представлена в даному контексті трансдукована Т-клітина генетично модифікована за рахунок введення молекули нуклеїнової кислоти в Т-клітину з використанням вірусного вектора (наприклад, ретровірусного вектора або лентівірусного вектора). Відповідно, експресія антигензв'язуючих рецепторів може бути конститутивною, і позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора можна виявити на поверхні клітини. Зазначений позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора може включати повнорозмірний позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора, як описано в даному контексті, але також і його частину. Необхідним мінімальним розміром є антигензв'язуючий сайт антигензв'язуючого фрагмента в антигензв'язуючому рецепторі.

Експресія також може бути умовною або індукцибельною у випадку, коли антигензв'язуючий рецептор введений в Т-клітини під контролем індукцибельного або репресованого промотора. Прикладами зазначених індукцибельних або репресованих промоторів може бути транскрипційна система, яка містить промотор гена алкогольдегідрогенази I (*alcA*) і трансактиваторний білок *AlcR*. Різні сільськогосподарські склади на основі спирту використовуються для контролю експресії досліджуваного гена, зв'язаного з *alcA* промотором. Більш того, чутливі до тетрацикліну промоторні системи можуть проявляти функцію або для активації, або для пригнічення експресії генів в присутності тетрацикліну. Деякі елементи системи включають білок-репресор тетрацикліну (*TetR*), послідовність оператора тетрацикліну (*tetO*) і гібридний білок-трансактиватор тетрацикліну (*tTA*), який представляє собою гібрид *TetR* і активуючої послідовності білка 16 (*VP16*) вірусу простого герпесу. Крім того, можна використовувати стероїд-чутливі промотори, промотори, що регулюються металом, або промотори, які пов'язані з білками, пов'язаними з патогенезом (*PR*).

Залежно від використовуваної системи експресія може бути конститутивною або конституціональною. Антигензв'язуючі рецептори даного винаходу можуть експресуватися на поверхні трансдукованих Т-клітин, представлених в даному контексті. Позаклітинну частину антигензв'язуючого рецептора (тобто позаклітинний домен антигензв'язуючого рецептора) можна детектувати на поверхні клітини, в той час як внутрішньоклітинна частина (тобто коstimулюючий сигнальний домен (домени) і стимулюючий сигнальний домен) не детектується на поверхні клітини. Виявлення позаклітинного домену антигензв'язуючого рецептора можна здійснювати з використанням антитіла, яке специфічно зв'язується із зазначеним позаклітинним

доменом, або з використанням мутованого Fc-домену, який здатний зв'язуватися з позаклітинним доменом. Позаклітинний домен можна виявляти з використанням зазначених антитіл або Fc-доменів методом проточної цитометрії або мікроскопії.

Трансдуковані клітини даного винаходу можуть являти собою будь-які імунні клітини. Зазначені клітини включають, але не обмежуючись тільки ними, В-клітини, Т-клітини, природні клітини-кілери (NK клітини), природні Т-клітини-кілери (NK), γδ Т-клітини, лімфоїдні клітини вродженого імунітету, макрофаги, моноцити, дендритні клітини або нейтрофіли. Краще, зазначена імунна клітина являє собою лімфоцит, краще NK або Т-клітини. Зазначені Т-клітини включають CD4 Т-клітини і CD8 Т-клітини. Введення антигензв'язуючого рецептора даного винаходу на поверхню лейкоциту забезпечує розвиток клітинної цитотоксичності щодо клітини-мішені в поєднанні з терапевтичним антитілом, що включає мутований Fc домен, незалежно від вихідної лінії клітини. Цитотоксичність буде спостерігатися незалежно від того, який стимулюючий сигнальний домен або костимулюючий сигнальний домен вибраний для антигензв'язуючого рецептора, і не залежить від екзогенного джерела додаткових цитокінів. Відповідно, трансдукована клітина даного винаходу може являти собою, наприклад, CD4+Т-клітину, CD8 + -Т-клітину, γδ Т-клітину, природну Т-клітину-кілер (NK), природну клітину-кілер (NK), лейкоцит, пухлино-інфільтруючий лімфоцит (TIL), мієлоїдну клітину або мезенхімальну стовбурову клітину. Краще, представлена в даному контексті трансдукована клітина являє собою Т-клітину (наприклад, аутологічну Т-клітину), більш краще трансдукована клітина являє собою CD8+Т-клітину. Відповідно, в контексті даного винаходу, трансдукована клітина являє собою CD8+Т-клітину. Крім того, в контексті даного винаходу, трансдукована клітина являє собою аутологічну Т-клітину. Відповідно, в контексті даного винаходу трансдукована клітина краще являє собою аутологічну CD8+Т-клітину. Крім використання аутологічних клітин (наприклад, Т-клітин), виділених з організму суб'єкта, в даному винаході також пропонується використання алогенних клітин. Відповідно, в даному винаході трансдукована клітина може також являти собою алогенну клітину, таку як алогенна CD8+Т-клітина. Використання алогенних клітин базується на тому факті, що клітини, краще Т-клітини, можуть розпізнавати специфічний епітоп антигену, презентований чужорідними антиген-презентуючими клітинами (APC), за умови, що APC експресують молекулу МНС класу I або II класу, до якої клітинна популяція проявляє специфічну реакцію, тобто популяція Т-клітин обмежена, поряд з епітопом антигену, що розпізнається Т-клітинами. Таким чином, термін "алогенна" означає клітини неспорідненого походження, одержані з неспорідненого індивідуума / суб'єкта-донора, що являє собою лейкоцитарний антиген людини (HLA), сумісний з індивідуумом / суб'єктом, які потребують такого лікування, наприклад, антигензв'язуючий рецептор, який експресується трансдукованою клітиною, як описано в даному контексті. Аутологічні клітини являють собою клітини, які виділяють / одержують, як описано вище в даному контексті, з організму суб'єкта, що потребує лікування трансдукованою клітиною, як описано в даному контексті.

Трансдуковану клітину за винаходом можна котрансдукувати іншими молекулами нуклеїнової кислоти, наприклад, молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує рецептор Т-клітини.

У даному винаході пропонується також спосіб одержання трансдукованої Т-клітини, що експресує антигензв'язуючий рецептор за винаходом, що включає стадії трансдукції Т-клітини вектором даного винаходу, культивування трансдукованої Т-клітини в умовах, що забезпечують експресію антигензв'язуючого рецептора в зазначеній трансдукованій клітині або на її поверхні, і виділення зазначеної трансдукованої Т-клітини.

У контексті даного винаходу, трансдуковану клітину даного винаходу краще одержують у такий спосіб: клітини (наприклад, Т-клітини, краще CD8+Т-клітини) виділяють / одержують від суб'єкта (краще пацієнти - люди). Методи виділення / одержання клітин (наприклад, Т-клітин, краще CD8+Т-клітин) від пацієнтів або від донорів добре відомі в даній галузі техніки і в контексті даного винаходу клітини (наприклад, Т-клітини, краще CD8+Т-клітини) від пацієнтів або від донорів можна виділяти при заборі крові або зразка кісткового мозку. Після виділення / одержання клітин в складі зразка тканини пацієнта, клітини (наприклад, Т-клітини) відокремлюють від інших інгредієнтів зразка. Відомо декілька методів виділення клітин (наприклад, Т-клітин) із зразка, які включають, але не обмежуючись тільки ними, наприклад, лейкоферез для одержання клітин зі зразка периферичної крові пацієнта або донора, виділення / одержання клітин з використанням системи FACSsort, відділення життєздатних клітин від мертвих клітин в свіжих біопсійних зразках, що містять життєздатні клітини, вручну або з використанням мікроманіпулятора [див., наприклад, статті Dudley, Immunother., 26, 332-342 (2003), Robbins, Clin. Oncol., 29, 917-924 (2011) або Leisegang, J. Mol. Med., 86, 573-658 (2008)]. Виділені/одержані Т-клітини, краще CD8+Т-клітини, згодом культивують і розмножують з використанням анти-CD3 антитіла, з використанням анти-CD3 і анти-CD28 моноклональних

антитіл і/або з використанням анти-CD3 антитіла, анти-CD28 антитіла і інтерлейкіну-2 (IL-2) [див., наприклад, статті Dudley, *Immunother.*, 26, 332-342 (2003) або Dudley, *Clin. Oncol.*, 26, 5233-5239 (2008)].

На наступній стадії клітини (наприклад, Т-клітини) штучним способом / генетично модифікують / трансдукують методами, відомими в даній галузі техніки [див., наприклад, статтю Lemoine, *J. Gene Med.*, 6, 374-386 (2004)]. Методи трансдукції клітин (наприклад, Т-клітин) відомі в даній галузі техніки, і вони включають, але не обмежуючись тільки ними, в випадку якщо здійснюють трансдукцію нуклеїновою кислотою або рекомбінантною нуклеїновою кислотою, наприклад, електропорацію, кальцій-фосфатний метод, метод з використанням катіонних ліпідів або ліпосомний метод. Трансдукцію нуклеїновою кислотою можна здійснити стандартним і високоефективним методом з використанням комерційних реагентів для трансфекції, наприклад, ліпофектаміну [випускається фірмою Invitrogene, номер за каталогом 11668027]. У випадку, коли використовується вектор, трансдукцію вектором можна здійснити аналогічним методом, як описано вище для нуклеїнової кислоти, за умови, що вектор являє собою плазмідний вектор (тобто вектор, який не є вірусним вектором). У контексті даного винаходу способи трансдукції клітин (наприклад, Т-клітин) включають ретровірусну або лентівірусну трансдукцію Т-клітин, трансфекцію невірусними векторами (наприклад, мінікільцевий вектор "спляча красуня"), а також трансфекцію мРНК. "Трансфекція мРНК" являє собою метод, добре відомий спеціалістам в даній галузі, для тимчасової експресії досліджуваного білка, в даному контексті антигензв'язуючого рецептора даного винаходу, в клітині, яка підлягає трансдукції. Короткий опис методу: клітини можна обробити методом електропорації з використанням мРНК, яка кодує антигензв'язуючий рецептор даного винаходу, з використанням системи електропорації (такої як, наприклад, система Gene Pulser, фірми Bio-Rad), потім клітини культивують відповідно до стандартного протоколу культивування клітин (наприклад, Т-клітин), як описано вище [див. статтю Zhao та ін., *Mol. Ther.*, 13(1) 151-159 (2006)]. Трансдукована клітина за винаходом являє собою Т-клітину, найбільш краще CD8 + Т-клітину, і її одержують лентівірусною або найкраще ретровірусною трансдукцією Т-клітини.

В даному контексті ретровірусними векторами, придатними для трансдукції Т-клітин, є вектори, відомі в даній галузі техніки, такі як SAMEN CMV/SRa [Clay та ін., *J. Immunol.*, 163, 507-513 (1999)], LZRS-id3-IHRES (Heemskerk та ін., *J. Exp. Med.*, 186, 1597-1602 (1997)), FeLV (Neil та ін., *Nature*, 308, 814-820 (1984)), SAX (Kantoff та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6563-6567 (1986)), pDOL (Desiderio, *J. Exp. Med.*, 167, 372-388 (1988)), N2 (Kasid та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 473-477 (1990)), LNL6 (Tiberghien та ін., *Blood*, 84, 1333-1341 (1994)), pZipNEO (Chen та ін., *J. Immunol.*, 153, 3630-3638 (1994)), LASN (Mullen та ін., *Hum. Gene Ther.*, 7, 1123-1129 (1996)), pG1XsNa (Taylor та ін., *J. Exp. Med.*, 184, 2031-2036 (1996)), LCNX (Sun та ін., *Hum. Gene Ther.*, 8, 1041-1048 (1997)), SFG (Gallardo та ін., *Blood*, 90 (1997) і LXSN (Sun та ін., *Hum. Gene Ther.*, 8, 1041-1048 (1997)), SFG (Gallardo та ін., *Blood* 90, 952-957 (1997)), HMB-Hb-Hu (Vieillard та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 11595-11600 (1997)), pMV7 (Cochlovius та ін., *Cancer Immunol. Immunother.*, 46, 61-66 (1998)), pSTITCH (Weitjens та ін., *Gene Ther.*, 5, 1195-1203 (1998)), pLZR (Yang та ін., *Hum. Gene Ther.*, 10, 123-132 (1999)), pBAG (Wu та ін., *Hum. Gene Ther.*, 10, 977-982 (1999)), rKat.43.267bn (Gilham та ін., *J. Immunother.*, 25, 139-151 (2002)), pLGSN (Engels та ін., *Hum. Gene Ther.*, 14, 1155-1168 (2003)), pMP71 (Engels та ін., *Hum. Gene Ther.*, 14, 1155-1168 (2003)), pGCSAM (Morgan та ін., *J. Immunol.*, 171, 3287-3295 (2003)), pMSGV (Zhao та ін., *J. Immunol.*, 174, 4415-4423 (2005)) або pMX (de Witte та ін., *J. Immunol.*, 181, 5128-5136 (2008)). У даному винаході лентівірусним вектором, придатним для трансдукції клітин (наприклад, Т-клітин) є, наприклад, лентівірусний вектор PL-SIN [Hotta та ін., *Nat. Methods.*, 6(5), 370-376 (2009)], p156RRL-sinPPT-CMV-GFP-PRE/NheI (Campeau та ін., *PLoS One*, 4(8), e6529 (2009)), pCMVR8.74 (Addgene, номер за каталогом №.: 22036), FUGW (Lois та ін., *Science*, 295, (5556), 868-872 (2002)), pLVX-EF1 (Addgene, номер за каталогом №.: 64368), pLVE (Brunker та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 111(9), E798-806 (2014)), pCDH1-MCS1-EF1 (Hu та ін., *Mol Cancer Res.*, 7(11), 1756-1770 (2009)), pSLIK (Wang та ін., *Nat. Cell. Biol.*, 16(4), 345-356 (2014)), pLJM1 (Solomon та ін., *Nat. Genet.*, 45(12), 1428-1430 (2013)), pLX302 (Kang та ін., *Sci. Signal.*, 6(287), rs13 (2013)), pHR-IG (Xie та ін., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 33(12), 1875-1885 (2013)), pRRLSIN (номер по каталогу No.: 62053), pLS (Miyoshi та ін., *J. Virol.*, 72(10), 8150-8157 (1998)), pLL3.7 (Lazebnik та ін., *J. Biol. Chem.*, 283(7), 11078-11082 (2008)), FRIG (Raissi та ін., *Mol. Cell Neurosci.*, 57, 23-32 (2013)), pWPT (Ritz-Laser та ін., *Diabetologia.*, 46(6), 810-821 (2003)), pBOB (Marr та ін., *J. Mol. Neurosci.*, 22(1-2), 5-11 (2004)) або pLEX (Addgene, номер за каталогом №.: 27976).

Трансдуковані Т-клітина / Т-клітини даного винаходу краще вирощують в контрольованих умовах поза природним середовищем. Перш за все, термін "культивування" означає, що клітини

(наприклад, трансдукована клітина (клітини) за винаходом), які одержані з багатоклітинних еукаріот (краще від пацієнтів - людей), вирощують *in vitro*. Культивування клітин - це лабораторний метод вирощування життєздатних клітин, які відділяються від вихідного джерела тканини. В даному контексті трансдуковані клітини даного винаходу культивують в умовах, що забезпечують експресію антигензв'язуючого рецептора даного винаходу в зазначених трансдукованих клітинах або на їх поверхні. Умови, що забезпечують експресію або трансгени (тобто антигензв'язуючий рецептор даного винаходу) є загальновідомими в даній галузі техніки і включають, наприклад, використання агоністичних анти-CD3- і анти-CD28 антитіл і додавання цитокінів, таких як інтерлейкін 2 (IL-2), інтерлейкін 7 (IL-7), інтерлейкін 12 (IL-12) і/або інтерлейкін 15 (IL-15). Після експресії антигензв'язуючого рецептора даного винаходу в культивованій трансдукованій клітині (наприклад, CD8+T-клітині) трансдуковану клітину виділяють (тобто реекстрагують) з культури (тобто з культурального середовища).

Відповідно, у винаході також пропонується трансдукована клітина, краще T-клітина, перш за все CD8+T-клітина, яка експресує антигензв'язуючий рецептор, який кодується молекулою нуклеїнової кислоти даного винаходу, одержаної способом даного винаходу.

Молекули нуклеїнової кислоти

В іншому об'єкті даного винаходу пропонуються нуклеїнові кислоти і вектори, що кодують один або декілька антигензв'язуючих рецепторів даного винаходу. Приклади молекул нуклеїнових кислот, що кодують антигензв'язуючі рецептори даного винаходу, включають молекули з послідовностями SEQ ID NO: 19, 30, 35, 38, 44, 47, 51 і 52. Молекули нуклеїнових кислот винаходу можуть знаходитися під контролем регуляторних послідовностей. Наприклад, можна використовувати промотори, енансери транскрипції і/або послідовності, які забезпечують індукцію експресії антигензв'язуючого рецептора за винаходом. У даному винаході молекули нуклеїнових кислот експресуються під контролем конститутивного або індукцибельного промотора. Придатними промоторами є, наприклад, промотор [CMV (Qin та ін., PLoS One, 5(5), e10611 (2010)), промотор UBC (Qin та ін., PLoS One, 5(5), e10611 (2010)), PGK (Qin та ін., PLoS One, 5(5), e10611 (2010)), промотор EF1A (Qin та ін., PLoS One, 5(5), e10611 (2010)), промотор CAGG (Qin та ін., PLoS One, 5(5), e10611 (2010)), промотор SV40 (Qin та ін., PLoS One, 5(5), e10611 (2010)), промотор COPIA (Qin та ін., PLoS One, 5(5), e10611 (2010)), промотор ACT5C (Qin та ін., PLoS One, 5(5), e10611 (2010)), промотор TRE (Qin та ін., PLoS One, 5(5), e10611 (2010)), промотор Oct3/4 (Chang та ін., Molecular Therapy, 9, S367-S367 (2004) (doi: 10.1016/j.ymthe.2004.06.904))] або промотор Nanog [Wu та ін., Cell Res., 15(5), 317-324 (2005)]. Отже, даний винахід також стосується вектору (векторів), що включає нуклеїнову кислоту (нуклеїнові кислоти), описані в даному винаході. Термін вектор, використаний в даному контексті, включає кільцеву або лінійну молекулу нуклеїнової кислоти, яка може автономно реплікуватися в клітині-хазяїна (тобто в трансдукованій клітині), в яку вона була введена. Спеціалістам в галузі молекулярної біології відомо безліч придатних векторів, вибір яких залежить від необхідної функції, і включає плазмиди, косміди, віруси, бактеріофаги та інші стандартні вектори, що використовуються в генній інженерії. Методи, які добре відомі спеціалістам в даній галузі, можна використовувати для конструювання різних плазмід і векторів, див., наприклад, методи, [описані в роботі Sambrook та ін. (loc cit.) і Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), (1994)]. В іншому варіанті полінуклеотиди і вектори за винаходом можна перетворювати в ліпосоми для доставки в клітини-мішені. Нижче більш докладно обговорюється використання вектора для клонування для виділення індивідуальних послідовностей ДНК. Відповідні послідовності можна переносити в вектори експресії, де необхідна експресія конкретного поліпептиду. Типові вектори для клонування включають pBluescript SK, pGEM, pUC9, pBR322, pGA18 і pGBT9. Типові вектори експресії включають pTRE, pCAL-n-EK, pESP-1, pOP13CAT.

У винаході також пропонується вектор (вектори), що включає молекулу (молекули) нуклеїнової кислоти, яка представляє собою регуляторну послідовність, функціонально зв'язану з вказаною молекулою (молекулами) нуклеїнової кислоти, що кодує антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті. У даному винаході вектор може бути поліцистронним. Такі регуляторні послідовності (елементи контролю) відомі спеціалісту в даній галузі техніки і можуть включати промотор, сплайс-касету, кодон ініціації трансляції та сайт трансляції та інтеграції для вбудовування вставки в вектор (вектори). У контексті даного винаходу зазначена молекула (молекули) нуклеїнової кислоти функціонально пов'язана із зазначеними послідовностями, що контролюють експресію, що забезпечує експресію в еукаріотичних або прокаріотичних клітинах. Передбачається, що зазначений вектор (вектори) являє собою вектор (вектори) експресії, який включає молекулу (молекули) нуклеїнової кислоти, що кодує антигензв'язуючий рецептор, як визначено в даному контексті. Термін "функціонально

зв'язаний" означає суміжне розташування, при якому взаємодія описаних компонентів дозволяє їм функціонувати належним чином. Контролююча послідовність, функціонально зв'язана з кодуючою послідовністю, лігвана таким чином, що експресія кодуючої послідовності досягається в умовах, порівнянних з контролюючою послідовністю. У випадку якщо контролююча послідовність є промотором, для спеціаліста, очевидно, що краще використовувати двохланцюгову нуклеїнову кислоту.

У даному винаході вказаний вектор (вектори) є вектором (векторами) експресії. Вектор експресії являє собою конструкт, який можна використовувати для трансформації вибраної клітини і забезпечувати експресію кодуючої послідовності в вибраній клітині. Вектор (вектори) експресії може бути, наприклад, клонуючим вектором (векторами), бінарним вектором (векторами) або інтегруючим вектором (векторами). Експресія включає транскрипцію молекули нуклеїнової кислоти, яка краще транскрибується в мРНК. Регуляторні елементи, що забезпечують експресію в прокаріотичних і/або еукаріотичних клітинах, добре відомі спеціалістам в даній галузі техніки. У випадку еукаріотичних клітин вони зазвичай містять промотори, що забезпечують ініціацію транскрипції, і необов'язково сигнали полі-А, що забезпечують термінацію транскрипції і стабілізацію транскрипту. Можливі регуляторні елементи, які забезпечують експресію в прокаріотичних клітинах-хазіяна, включають, наприклад, PL, lac, trp або tac промотор для *E. coli*, а прикладами регуляторних елементів, які забезпечують експресію в клітині-хазіяна, є промотори AOX1 або GAL1 для дріжджів або промотори CMV, SV40, RSV (вірус саркоми Рауса), CMV-енхансер, SV40-енхансер або інтрон глобіну для клітин ссавців і клітин інших тварин.

Крім елементів, які відповідають за ініціацію транскрипції, такі регуляторні елементи можуть також включати сигнали термінації - транскрипції, такі як сайт SV40-полі-А або сайт tk-полі-А, розташовані за послідовністю полінуклеотиду. Більш того, в залежності від використовуваної системи експресії, до послідовності, що кодує зазначеної послідовності нуклеїнової кислоти можуть бути додані лідерні послідовності, які кодують сигнальні пептиди, добре відомі в галузі техніки, здатні направляти поліпептид в клітинний простір або його секрецію в середовище, див., також, наприклад, додані приклади.

Лідерна послідовність (послідовності) утворює (утворюють) відповідну фазу з трансльованими, ініціюючими і термінуючими послідовностями і краще, з лідерною послідовністю, здатною спрямовувати секрецію трансльованого білка або його частини в периплазматичний простір або позаклітинне середовище. Необов'язково, гетерологічна послідовність може кодувати антигензв'язуючий рецептор з N-кінцевим сигнальним пептидом, що додає бажані характеристики, наприклад, для стабілізації або полегшення очищення експресованого рекомбінантного продукту, див. вище. В даному контексті в даній галузі техніки відомі придатні експресійні вектори, такі як експресійний вектор кДНК Okayama-Berg pcDV1 (фірми Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (фірми In-vitro gene), pEF-DHFR, pEF-ADA або pEF-neo [див. статтю Raum та ін., Cancer Immunol Immunother, 50, 141-150 (2001)] або pSPORT1 (фірми GIBCO BRL)].

У контексті даного винаходу послідовності, які контролюють експресію, являють собою системи еукаріотичних промоторів в векторах, здатних трансформувати або трансфектувати еукаріотичні клітини, однак можна застосовувати і контролюючі послідовності для прокаріотичних клітин. Після введення вектора в відповідну клітину, її підтримують в умовах, придатних для високого рівня експресії нуклеотидних послідовностей. Додаткові регуляторні елементи можуть включати енхансери транскрипції і трансляції. Краще, описані вище вектори за винаходом включають селективний маркер і/або маркер для підрахунку трансформантів. Селективні маркерні гени, які надають стійкість до антиметаболітів, як основу для селекції, і придатні для відбору трансформованих клітин і, наприклад, тканин рослин і рослин, добре відомі спеціалістам в даній галузі і включають, наприклад, ген dhfr, який надає стійкість до метотрексату [див. статтю Reiss, Plant Physiol., (Life Sci. Adv.) 13, 143-149 (1994)], npt, який надає стійкість до аміноглікозидів, таких як неоміцин, канаміцин і пароміцин [див. статтю Herrera-Estrella, EMBO J., 2, 987-995 (1983)] і hygR, який надає стійкість до гігроміцину [див. статтю Marsh, Gene, 32, 481-485 (1984)]. Описані додаткові селективні гени, а саме trpB, який дозволяє клітинам використовувати індол замість триптофану, hisD, який дозволяє клітинам використовувати гістидин замість гістидину [див. статтю Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8047 (1988)], манозо-6-фосфат-ізомераза, яка дозволяє клітинам використовувати манозу [див. заявку WO 94/20627] і ODC (орнітиндекарбоксилаза), яка надає резистентність до інгібітору орнітиндекарбоксилази, 2-(дифторметил)-DL-орнітину, DFMO [див. роботу McConlogue, Current Communications in Molecular Biology, видавництво Cold Spring Harbor Laboratory (1987)] або деаміназа з *Aspergillus terreus*, яка надає резистентність до бластицидину S [див. статтю

Tamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 2336-2338 (1995)].

Придатні маркери для підрахунку трансформантів також відомі спеціалістам в даній галузі техніки, і вони є комерційними продуктами. Краще зазначений маркер являє собою ген, що кодує люциферазу [див. статті Giacomini, *Pl. Sci.*, 116, 59-72 (1996), Scikantha, *J. Bact.*, 178, 121 (1996)], зелений флуоресцентний білок [див. статтю Gerdes, *FEBS Lett.*, 389, 44-47 (1996)] або β -глюкуронідазу [див. статтю Jefferson, *EMBO J.*, 6, 3901-3907 (1987)]. Зазначений варіант особливо корисний для простого і швидкого скринінгу клітин, тканин і організмів, які містять вказаний вектор.

Як описано вище, зазначену молекулу (молекули) нуклеїнової кислоти можна використовувати окремо або, як частину вектора (векторів) для експресії антигензв'язуючих рецепторів за винаходом в клітинах, наприклад, для адаптивної Т-клітинної терапії, але також для цілей генної терапії. Нуклеїнові кислоти або вектор (вектори), що містять послідовність (послідовності) ДНК, що кодує будь-який один з описаних в даному контексті антигензв'язуючих рецепторів, вводяться в клітини, які в свою чергу продукують досліджуваний поліпептид. Генна терапія, яка базується на введенні терапевтичних генів в клітини методами *ex-vivo* або *in-vivo*, є одним з найбільш важливих застосувань перенесення генів. Придатні вектори, методи або системи доставки генів для методів або систем доставки генів для генної терапії *in-vitro* або *in-vivo* описані в літературі і відомі спеціалістам в даній галузі техніки, див., наприклад, [статті Giordano, *Nature Medicine*, 2, 534-539 (1996), Schaper, *Circ. Res.*, 79, 911-919 (1996), Anderson, *Science*, 256, 808-813 (1992), Verma, *Nature*, 389, 239 (1994), Isner, *Lancet*, 348, 370-374 (1996), Muhlhauser, *Circ. Res.*, 77, 1077-1086 (1995), Onodera, *Blood*, 91, 30-36 (1998), Verma, *Gene Ther.*, 5, 692-699 (1998), Nabel, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 811, 289-292 (1997), Verzeletti, *Hum. Gene Ther.*, 9, 2243-2251 (1998), Wang, *Nature Medicine*, 2, 714-716 (1996), заявки WO 94/29469, WO 97/00957, патенти US 5580859, US 5589466 або статтю Schaper, *Current Opinion in Biotechnology*, 7, 635-640 (1996)]. Вказану молекулу (молекули) нуклеїнової кислоти і вектор (вектори) можна сконструювати для прямого введення в клітину або введення в клітину за допомогою ліпосом або вірусних векторів (наприклад, аденовірусних, ретровірусних). У контексті даного винаходу, зазначена клітина являє собою Т-клітини, такі як CD8+Т-клітини, CD4+Т-клітини, CD3+Т-клітини, $\gamma\delta$ Т-клітини або природні Т-клітини-кіллери (NK), краще CD8+Т-клітини.

Відповідно до вищевикладеного, даний винахід стосується способів одержання векторів, перш за все, плазмід, космід і бактеріофагів, зазвичай використовуваних в генній інженерії, які включають молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність поліпептиду антигензв'язуючого рецептора, як описано в даному контексті. У контексті даного винаходу, вказаний вектор являє собою вектор експресії і/або перенесення гена або направлений вектор. Для доставки зазначених полінуклеотидів або векторів в популяції клітин-мішеней можна використовувати вектори експресії, одержані на основі вірусів, таких як ретровіруси, вірус вісповакцини, аденоасоційований вірус, вірус герпесу або вірус папіломи великої рогатої худоби.

Методи, добре відомі спеціалістам в даній галузі, можна використовувати для конструювання рекомбінантного вектора (векторів), див., наприклад, методики, описані в роботах Sambrook та ін. [loc cit.], Ausubel (1989, loc cit.) або в інших стандартних інструкціях. В іншому варіанті, зазначені молекули нуклеїнової кислоти і вектори можна вбудовувати в ліпосоми для доставки в клітини-мішені. Вектори, що містять молекули нуклеїнової кислоти даного винаходу, можна переносити в клітини-хазяїна за допомогою добре відомих способів, які змінюються в залежності від типу клітини-хазяїна. Наприклад, трансфекцію за допомогою хлориду кальцію часто використовують для прокаріотичних клітин, тоді як обробку фосфатом кальцію або електропорацію можна використовувати для інших клітин-хазяїна, див. Sambrook, вище. Зазначеним вектором, серед інших, може бути pEF-DHFR, pEF-ADA або pEF-neo. Вектори pEF-DHFR, pEF-ADA і pEF-neo описані в літературі, наприклад, в [статтях Mack та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7021-7025 (1995) і Raum та ін., *Cancer Immunol. Immunother.*, 50, 141-150 (2001)].

У винаході пропонується також Т-клітина, трансформована або трансфетована вектором, як описано в даному контексті. Зазначену Т-клітину можна одержати при введенні в Т-клітину або її клітину-попередник принаймні одного з описаних вище векторів або принаймні однієї з описаних вище молекул нуклеїнової кислоти. Присутність принаймні одного зазначеного вектора або принаймні однієї молекули нуклеїнової кислоти в Т-клітині може опосередковувати експресію гена, що кодує описаний вище антигензв'язуючий рецептор, що включає позаклітинний домен, що включає антигензв'язуючий фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом. Вектор даного винаходу може бути поліцистронним.

Описану молекулу (молекули) нуклеїнової кислоти або вектор (вектори), які вводять в Т-клітину або її клітину-попередник, можна або інтегрувати в геном клітини, або підтримувати його поза хромосомою.

Пухлиноспецифічні антигени

Як описано вище (Ig-похідний) домен (домени) описаного в даному контексті антитіла, що включає мутований Fc домен, може включати сайт взаємодії з антигеном, специфічний щодо молекули клітинної поверхні, тобто відносно пухлиноспецифічного антигену, який розташований на поверхні природної пухлинної клітини. У контексті даного винаходу, зазначені антитіла забезпечують фізичне контактування трансдукованих Т-клітин, як описано в даному контексті, які включають антигензв'язуючий рецептор за винаходом, і пухлинної клітини, при цьому трансдукована Т-клітина активується. Активація трансдукованих Т-клітин даного винаходу може привести до лізису пухлинної клітини, як описано в даному контексті.

Приклади онкомаркерів, розташованих на поверхні природних пухлинних клітин, наводяться нижче і включають, але не обмежуючись тільки ними, FAP (білок активації фібробластів), CEA (карциноембріональний антиген), p95 (p95HER2), BCMA (В-клітинний антиген дозрівання), EpCAM (молекула адгезії епітеліальних клітин), MSLN (мезотелін), MCSP (асоційований з меланою хондроїтинсульфат-протеоглікан), HER-1 (епідермальний фактор росту 1 людини), HER-2 (епідермальний фактор росту 2 людини), HER-3 (епідермальний фактор росту 3 людини), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, рецептор 1 фолієвої кислоти (FOLR1), поверхневий антиген-2 трофобластів людини (Trop-2), пухлинний антиген 12-5 (CA-12-5), лейкоцитарний антиген людини - зв'язаний з D-антигеном (HLA-DR), MUC-1 (муцин-1), A33-антиген, PSMA (простатичний специфічний мембранний антиген), FMS-подібну тирозинкіназу 3 (FLT-3), PSMA (простат-специфічний мембранний антиген), PSCA (антиген стовбурових клітин передміхурової залози), рецептор трансферину, TNC (тенасцин), карбоангідразу IX (CA-IX), і/або пептиди, зв'язані з молекулою головного комплексу гістосумісності людини (MHC).

Відповідно, в даному винаході антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, зв'язується з мутованим Fc доменом антитіла, тобто терапевтичним антитілом, здатним специфічно зв'язуватися з антигеном / маркером, розташованим на поверхні природних пухлинних клітин, який вибирають з групи, що складається з FAP (білок активації фібробластів), CEA (карциноембріональний антиген), p95 (p95HER2), BCMA (В-клітинний антиген дозрівання), EpCAM (молекула адгезії епітеліальних клітин), MSLN (мезотелін), MCSP (асоційований з меланою хондроїтинсульфат-протеоглікан), HER-1 (епідермальний фактор росту 1 людини), HER-2 (епідермальний фактор росту 2 людини), HER-3 (епідермальний фактор росту 3 людини), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, рецептора 1 фолієвої кислоти (FOLR1), поверхневого антигену-2 трофобластів людини (Trop-2), пухлинного антигена 12-5 (CA-12-5), лейкоцитарного антигену людини - зв'язаного з D-антигеном (HLA-DR), MUC-1 (муцин-1), A33-антигену, PSMA (простат-специфічний мембранний антиген), FMS-подібної тирозинкінази 3 (FLT-3), PSMA (простат-специфічний мембранний антиген), PSCA (антиген стовбурових клітин передміхурової залози), рецептора трансферину, TNC (тенасцин), карбоангідрازی IX (CA-IX), і/або пептидів, зв'язаних з молекулою головного комплексу гістосумісності людини (MHC).

Послідовність (послідовності) елементів антигенів (людини), таких як A33-антиген, BCMA (В-клітинний антиген дозрівання), пухлинний антиген 12-5 (CA-12-5), карбоангідразу IX (CA-IX), CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CEA (карциноембріональний антиген), EpCAM (молекула адгезії епітеліальних клітин), FAP (білок активації фібробластів), FMS-подібна тирозинкіназа 3 (FLT-3), рецептор 1 фолієвої кислоти (FOLR1), HER-1 (епідермальний фактор росту 1 людини), HER-2 (епідермальний фактор росту 2 людини), HER-3 (епідермальний фактор росту 3 людини), лейкоцитарний антиген людини - зв'язаний з D-антигеном DR (HLA-DR), MSLN (мезотелін), MCSP (асоційований з меланою хондроїтинсульфат-протеоглікан), MUC-1 (муцин-1), PSMA (простат-специфічний мембранний антиген), PSCA (антиген стовбурових клітин передміхурової залози), p95 (p95HER2), рецептор трансферину, TNC (тенасцин), поверхневий антиген-2 трофобластів людини (Trop-2), доступні в базі даних UniProtKB/Swiss-Prot і можуть бути одержані на інтернет-ресурсі [<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=reviewed%3Ayes>]. Зазначені (білкові) послідовності також можуть стосуватися до анотованих модифікованих послідовностей. У даному винаході також пропонуються методики і методи, де використовуються гомологічні послідовності, а також генетичні алельні варіанти і т.п. точних послідовностей, описаних в даному контексті. Краще в даному контексті використовуються зазначені варіанти і подібні точні послідовності. Краще зазначеними варіантами є генетичні варіанти. Спеціаліст у даній галузі може легко визначити відповідну кодуючу ділянку зазначених (білкових) послідовностей в зазначених записах баз даних, які також можуть включати запис, що стосується геномної ДНК, а також мРНК/кДНК.

Послідовність (послідовності) FAP (білок активації фібробластів) (людини) можна одержати з запису Q12884 (версія запису 168, версія послідовності 5) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) CEA (карциноембріональний антиген) (людини) можна одержати з запису P06731 (версія запису 171, версія послідовності 3) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) EpCAM (молекула адгезії епітеліальних клітин) (людини) можна одержати з запису P16422 (версія запису 117, версія послідовності 2) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) MSLN (мезотелін) (людини) можна одержати з запису Q13421 (номер версії 132, версія послідовності 2) бази даних UniProt, послідовність (послідовності) FMS- подібної тирозинкінази 3 (FLT-3) (людини) можна одержати з запису P36888 (первинний цитований номер доступу) бази даних Swiss-Prot або Q13414 (вторинний цитований номер доступу), версія 165, версія послідовності 2, послідовність MCSP (асоційований з меланою хондроїтинсульфат-протеоглікан) (людини) можна одержати з запису Q6UVK1 (номер версії 118, версія послідовності 2) бази даних UniProt, послідовність (послідовності) рецептора 1 фолієвої кислоти (FOLR1) (людини) можна одержати з номера запису P15328 (первинний цитований номер доступу) бази даних UniProt або Q53EW2 (вторинний цитований номер доступу), версія 153, версія послідовності 3, послідовність (послідовності) поверхневого антигена-2 трофобластів (Trop-2) (людини) можна одержати з номера запису P09758 (первинний цитований номер доступу) бази даних UniProt або Q15658 (вторинний цитований номер доступу), версія 172, версія послідовності 3, послідовність (послідовності) PSCA (антиген стовбурових клітин передміхурової залози) (людини) можна одержати з запису Q43653 (первинний цитований номер доступу) бази даних UniProt або Q6UW92 (вторинний цитований номер доступу), версія 134, версія послідовності 1, послідовність (послідовності) HER-1 (епідермальний фактор росту) (людини) можна одержати з запису P00533 (версія запису 177, версія послідовності 2) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) HER-2 (рецептор тирозинпротеїнкінази erbB-2) (людини) можна одержати з запису P04626 (версія запису 161, версія послідовності 1) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) HER-3 (рецептор тирозинпротеїнкінази erbB-3) (людини) можна одержати з запису P21860 (версія запису 140, версія послідовності 1) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) CD20 (В-лімфоцитарний антиген CD20) (людини) можна одержати з запису P11836 (версія запису 117, версія послідовності 1) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) CD22 (В-лімфоцитарний антиген CD22) (людини) можна одержати з запису P20273 (версія запису 135, версія послідовності 2) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) CD33 (В-лімфоцитарний антиген CD33) (людини) можна одержати з запису P20138 (версія запису 129, версія послідовності 2) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) CA-12-5 (муцин 16) (людини) можна одержати з запису Q8WXI7 (версія запису 66, версія послідовності 2) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) HLA-DR (людини) можна одержати з запису Q29900 (версія запису 59, версія послідовності 1) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) MUC-1 (муцин-1) (людини) можна одержати з запису P15941 (версія запису 135, версія послідовності 3) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) A33 (антиген A33 клітинної поверхні) (людини) можна одержати з запису Q99795 (версія запису 104, версія послідовності 1) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) PSMA (глутаматкарбоксипептидаза 2) (людини) можна одержати з запису Q04609 (версія запису 133, версія послідовності 1) бази даних Swiss-Prot, послідовність (послідовності) рецептора трансферину (людини) можна одержати з запису Q9UP52 (версія запису 99, версія послідовності 1) і P02786 (версія запису 152, версія послідовності 2) бази даних Swiss-Prot, послідовність TNC (тенасцин) (людини) можна одержати з запису P24821 (версія запису 141, версія послідовності 3) бази даних Swiss-Prot або послідовність (послідовності) CA-IX (карбоангідраза IX) (людини) можна одержати з запису Q16790 (версія запису 115, версія послідовності 2) бази даних Swiss-Prot.

50 Терапевтичне застосування і способи лікування

Молекули або конструкти (тобто антигензв'язуючі рецептори, трансдуковані Т-клітини і набори), запропоновані в даному контексті, насамперед придатні для застосування в медичних установах, краще для лікування злоякісного захворювання. Наприклад, пухлину можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини, що експресує антигензв'язуючий рецептор за винаходом, в поєднанні з терапевтичним антитілом, специфічним до пухлинної клітини і що містить мутований Fc домен. Відповідно, у деяких варіантах антигензв'язуючий рецептор, трансдукована Т-клітина або набір використовуються для лікування злоякісного захворювання, перш за все, де злоякісне захворювання вибирають з раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і раку крові.

60 Пухлиноспецифічність лікування забезпечується терапевтичним антитілом, що містить

мутований Fc домен, де антитіло вводять до, одночасно з введенням або після введення трансдукованої Т-клітини, що експресує антигензв'язуючий рецептор за винаходом. В даному контексті, трансдуковані Т-клітини є універсальними Т-клітинами, оскільки вони не є специфічними щодо певної пухлини, але їх можна направляти до будь-якої пухлини в залежності від терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен даного винаходу.

В даному контексті злоякісне захворювання може являти собою рак/карциному епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження або рак крові. У даному винаході рак / карциному вибирають з групи, що складається з раку шлунково-кишкового тракту, раку підшлункової залози, холангіоцеллюлярного раку, раку легенів, раку молочної залози, раку яєчників, раку шкіри, раку ротової порожнини, раку шлунка, раку шийки матки, В- і Т-клітинної лімфоми, мієлоїдної лейкемії, раку яєчників, лейкозу, лімфолейкозу, назофарингеальної карциноми, раку ободової кишки, раку передміхурової залози, нирково-клітинного раку, раку голови і шиї, раку шкіри (меланома), раку сечостатевої системи, наприклад, раку яєчок, раку яєчників, ендотеліального раку, раку шийки матки та раку нирок, раку жовчної протоки, раку стравоходу, раку слинних залоз і раку щитовидної залози або інших пухлиноподібних захворювань, таких як гематологічні пухлини, гліоми, саркоми або остеосаркоми.

Наприклад, пухлиноподібні захворювання і/або лімфоми можна лікувати за допомогою конкретного конструктору, направленного проти зазначеного медичного показання (показань). Показання для трансдукованої Т-клітини за винаходом в поєднанні з терапевтичним антитілом, що містить мутований Fc домен, визначаються специфічністю терапевтичного антитіла до пухлинного антигену. Наприклад, рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, холангіоцеллюлярний рак, рак легенів, рак молочної залози, рак яєчників, рак шкіри і/або рак ротової порожнини можна лікувати з використанням антитіла, яке включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти ЕрСАРМ (людини) (як пухлиноспецифічний антиген, який розташований на поверхні природної пухлинної клітини).

Рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, холангіоцеллюлярний рак, рак легенів, рак молочної залози, рак яєчників, рак шкіри і/або рак ротової порожнини можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу яка вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти HER1, краще HER1 людини. Більш того, рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, холангіоцеллюлярний рак, рак легенів, рак молочної залози, рак яєчників, рак шкіри, гліобластому і/або рак ротової порожнини можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти МСРР, краще МСРР людини. Рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, холангіоцеллюлярний рак, рак легенів, рак молочної залози, рак яєчників, рак шкіри, гліобластому і/або рак ротової порожнини можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти FOLR1, краще FOLR1 людини. Рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, холангіоцеллюлярний рак, рак легенів, рак молочної залози, рак яєчників, рак шкіри, гліобластому і/або рак ротової порожнини можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти Тгор-2, краще Тгор-2 людини. Рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, холангіоцеллюлярний рак, рак легенів, рак молочної залози, рак яєчників, рак шкіри, гліобластому і/або рак ротової порожнини можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти РРРР, краще РРРР людини. Рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, холангіоцеллюлярний рак, рак легенів, рак молочної залози, рак яєчників, рак шкіри, гліобластому і/або рак ротової порожнини можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти EGFRvIII, краще EGFRvIII людини. Рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, холангіоцеллюлярний рак, рак легенів, рак молочної залози, рак яєчників, рак шкіри, гліобластому і/або рак ротової порожнини можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти MSLN, краще MSLN людини. Рак шлунка, рак молочної залози і/або рак шийки матки можна

лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти HER2, краще HER2 людини. Рак шлунка і/або рак легенів можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти HER3, краще HER3 людини. В-клітинну лімфому і/або Т-клітинну лімфому можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти CD20, краще CD20 людини. В-клітинну лімфому і/або Т-клітинну лімфому можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти CD22, краще CD22 людини. Мієлоїдний лейкоз можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти CD33, краще CD33 людини. Рак яєчників, рак легенів, рак молочної залози і/або рак шлунково-кишкового тракту можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти CA12-5, краще CA12-5 людини. Рак шлунково-кишкового тракту, лейкоз і/або назофарингеальну карциному можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти HLA-DR, краще HLA-DR людини. Рак ободової кишки, рак молочної залози, рак яєчників, рак легенів і/або рак підшлункової залози можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти MUC-1, краще MUC-1 людини. Рак ободової кишки можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти A33, краще A33 людини. Рак передміхурової залози можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти PSMA, краще PSMA людини. Рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, холангіоцелюлярний рак, рак легенів, рак молочної залози, рак яєчників, рак шкіри і / або рак ротової порожнини можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти рецептора трансферину, краще рецептора трансферину людини. Рак підшлункової залози, рак легенів і/або рак молочної залози можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти рецептора трансферину, краще рецептора трансферину людини. Рак нирок можна лікувати з використанням трансдукованої Т-клітини даного винаходу, що вводиться до, одночасно з введенням або після введення терапевтичного антитіла, що включає мутований Fc домен, де антитіло направлене проти CA-IX, краще CA-IX людини.

Відповідно, у винаході також пропонується спосіб лікування захворювання, злоякісного захворювання, такого як рак епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і/або рак крові. У контексті даного винаходу, зазначеним суб'єктом є людина.

У даному винаході конкретний спосіб лікування захворювання включає стадії:

- (а) виділення Т-клітин, краще CD8+Т-клітин, з організму суб'єкта,
- (б) трансдукція зазначених виділених Т-клітин, краще CD8+Т-клітин, антигензв'язуючим рецептором, як описано в даному контексті, і
- (в) введення трансдукованих Т-клітин, краще CD8+Т-клітин, зазначеному суб'єкту.

У контексті даного винаходу зазначені трансдуковані Т-клітини, краще CD8+Т-клітини, і/або терапевтичне антитіло/антитіла вводять вказаному суб'єкту спільно з використанням внутрішньовенного вливання.

Крім того, в даному винаході пропонується спосіб лікування захворювання, що включає стадії:

- (а) виділення Т-клітин, краще CD8+Т-клітин, з організму суб'єкта,
- (б) трансдукція зазначених виділених Т-клітин, краще CD8+Т-клітин, антигензв'язуючим

рецептором, як описано в даному контексті,

(в) необов'язково котрансдукція зазначених виділених Т-клітин, краще CD8+Т-клітин, рецептором Т-клітини,

(г) розмноження Т-клітин, краще CD8+Т-клітин, в присутності анти-CD3 і анти-CD28 антитіл і

5 (д) введення трансдукованих Т-клітин, краще CD8+Т-клітин, зазначеному суб'єкту.

Зазначену вище стадію (г) (стосується стадії розмноження Т-клітин, таких як TIL, в присутності анти-CD3 і/або анти-CD28 антитіл) можна також проводити в присутності (стимулюючих) цитокінів, таких як інтерлейкін-2 і/або інтерлейкін-15 (IL-15). У контексті даного винаходу вказану стадію (г) (стосується стадії розмноження Т-клітин, таких як TIL, в присутності

10 анти-CD3 і/або анти-CD28 антитіл) можна також проводити в присутності інтерлейкіну-12 (IL-12), інтерлейкіну-7 (IL-7) і/або інтерлейкіну-21 (IL-21).

Спосіб лікування додатково включає введення антитіла, що використовується відповідно до даного винаходу. Зазначене антитіло можна вводити до, одночасно з введенням або після введення трансдукованих Т-клітин. У даному винаході введення трансдукованих Т-клітин можна здійснювати з використанням внутрішньовенного впливання. У даному винаході трансдуковані Т-клітини виділені/одержані з організму суб'єкта, що потребує лікування.

Композиції

Більш того, в даному винаході пропонуються композиції (лікарські засоби), що включають молекулу (молекули) антитіла з мутованим Fc доменом (доменами), трансдуковану Т-клітину (клітини), яка включає антигензв'язуючий рецептор за винаходом, молекулу (молекули) нуклеїнової кислоти і вектор (вектори), що кодують антигензв'язуючі рецептори даного винаходу, і/або набори, які включають одну або більше зазначених композицій. У контексті даного винаходу композиція являє собою фармацевтичну композицію, яка додатково включає необов'язково придатні складі носія, стабілізаторів і/або ексципієнтів. Відповідно, в даному

25 винаході пропонується фармацевтична композиція (лікарський засіб), яка включає молекулу антитіла, що включає мутований Fc домен, як описано в даному контексті, яку вводять в комбінації з трансдукованою Т-клітиною, що включає антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, і/або композицію, яка включає вказану трансдуковану Т-клітину, де зазначену молекулу антитіла вводять до, одночасно з введенням або після введення трансдукованих Т-клітин, що включають антигензв'язуючий рецептор за винаходом.

Відповідно до даного винаходу термін "фармацевтична композиція" означає композицію для введення пацієнту, краще людині. Більш того, в даному винаході зазначений пацієнт страждає на захворювання, де зазначене захворювання являє собою злоякісне захворювання, перш за все онкозахворювання/карциному епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження або рак крові. У даному винаході онкозахворювання / карциноми вибирають з групи, що складається з раку шлунково-кишкового тракту, раку підшлункової залози, холангіоцеллюлярного раку, раку легень, раку молочної залози, раку яєчників, раку шкіри, раку ротової порожнини, раку шлунка, раку шийки матки, В- і Т-клітинної лімфоми, мієлоїдного лейкозу, раку яєчників, лейкозу, лімфолейкозу, назофарингеальної карциноми, раку ободової кишки, раку передміхурової залози, нирково-клітинного раку, раку голови і шиї, раку шкіри (меланома), пухлини сечостатевої системи, наприклад, рак яєчок, ендотеліальний рак, рак шийки матки і рак нирок, рак жовчного протоку, рак стравоходу, рак слинних залоз і рак щитовидної залози, або з інших пухлиноподібних захворювань, таких як гематологічні пухлини, гліоми, саркоми або остеосаркоми.

У кращому варіанті фармацевтична композиція / лікарський засіб включає антитіло і/або трансдуковану Т-клітину, як описано в даному контексті, для парентерального, черезшкірного, внутрішньопросвітнього, внутрішньоартеріального, внутрішньовенного, внутрішньооболонкового введення або для ін'єкції безпосередньо в тканину або пухлину. У даному винаході композиція / лікарський засіб включає антитіло, яке включає мутований Fc домен, як описано в даному

50 контексті, яке вводять до, одночасно з введенням або після введення трансдукованих Т-клітин, що включають антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті. У даному винаході фармацевтичну композицію / лікарський засіб, що включають антитіло, як описано в даному контексті, вводять в комбінації з композицією / лікарським засобом, що включають трансдуковані Т-клітини, що включають антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному

55 контексті, де зазначені Т-клітини одержані з організму суб'єкта, що потребує такого лікування.

Використання терміна "в комбінації" не обмежує порядок, в якому суб'єкту слід вводити компоненти, передбачені курсом лікування. Відповідно, фармацевтична композиція / лікарський засіб, описаний в даному контексті, стосується введення антитіла, як описано вище в даному контексті, яке вводять до, одночасно з введенням або після введення трансдукованих Т-клітин, що включають антигензв'язуючий рецептор за винаходом. Термін "в комбінації", використаний в

60

даному контексті, також не обмежує час між введенням антитіла, як описано вище в даному контексті, і трансдукованих Т-клітин, що містять антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті. Таким чином, в випадку, коли два компонента не вводять одночасно / в комбінації, інтервал між введеннями може становити 1 хв, 5 хв, 15 хв, 30 хв, 45 хв, 1 год., 2 год., 4 год., 6 год., 12 год., 24 год., 48 год. або 72 год. або будь-який придатний часовий інтервал, легко визначається спеціалістом в даній галузі техніки, і/або як описано в даному контексті.

У даному винаході термін "в комбінації" також включає випадок, коли антитіло, як описано в даному контексті, і трансдуковані Т-клітини, що включають антигензв'язуючий рецептор за винаходом, попередньо інкубують у вигляді суміші перед введенням суб'єкту. Таким чином, два компонента можна попередньо інкубувати перед введенням, наприклад, протягом 1 хв, 5 хв, 10 хв, 15 хв, 30 хв, 45 хв або 1 год. або протягом будь-якого придатного інтервалу часу, який легко може визначити спеціаліст у даній галузі. В іншому кращому варіанті здійснення даного винаходу пропонується курс лікування, коли антитіло, як описано в даному контексті, і трансдуковані Т-клітини, що включають антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, вводять одночасно / в комбінації. У контексті даного винаходу, антитіло, як описано в даному контексті, можна вводити після введення трансдукованих Т-клітин, що включають антигензв'язуючий рецептор.

Крім того, термін "в комбінації", який використовується в даному документі, не обмежує заявлені курси лікування тільки введенням антитіла, як описано в даному контексті, і трансдукованих Т-клітин, краще CD8 + Т-клітин, які включають антигензв'язуючий рецептор за винаходом, безпосередньо один за одним (тобто спочатку вводять один з двох компонентів, а потім (через деякий проміжок часу) вводять інший компонент, але при цьому не вводять інший лікарський засіб і/або не проводять будь-який інший курс лікування в ці проміжки часу. Таким чином, дані курси лікування також включають роздільне введення молекули антитіла, як описано в даному контексті, і трансдукованих Т-клітин, краще CD8 + Т-клітин, що включають антигензв'язуючий рецептор за винаходом, де введення розділені одним або декількома курсами лікування, необхідними і/або придатними для лікування або профілактики захворювання або його симптому. Приклади таких проміжних курсів лікування включають, але не обмежуючись тільки ними, введення знеболюючих препаратів, введення хіміотерапевтичних препаратів, хірургічне втручання для лікування захворювання або його симптому. Відповідно, курси лікування, як описано в даному контексті, включають введення антитіла, як описано в даному контексті, і трансдукованих Т-клітин, краще CD8 + Т-клітин, які включають антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, в поєднанні ні з одним, з одним або більше курсами лікування, придатними для лікування або профілактики захворювання або його симптому, як описано в даному контексті або відомо з даної галузі техніки.

Зокрема, передбачається, що зазначену фармацевтичну композицію (композиції) / лікарський засіб (засоби) слід вводити пацієнту з використанням впливання або ін'єкції. У даному винаході трансдуковані Т-клітини, що включають антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, слід вводити з використанням впливання або ін'єкції. Введення придатних композицій / лікарських засобів можна здійснювати різними способами, тобто з використанням внутрішньовенного, внутрішньочеревного, підшкірного, внутрішньом'язового, місцевого або внутрішньошкірного введення.

Фармацевтична композиція / лікарський засіб за винаходом може також містити фармацевтично прийнятний носій. Приклади придатних фармацевтичних носіїв добре відомі в даній галузі техніки і включають фосфатно-сольові буферні розчини, воду, емульсії, такі як емульсії типу масло / вода, різні типи змочуючих агентів, стерильні розчини і т.д. Композиції, які містять такі носії, можна одержувати з використанням добре відомих стандартних способів. Зазначені фармацевтичні композиції можна вводити суб'єкту в придатній дозі. Режим дозування визначають лікарі в залежності від клінічних факторів. Як відомо в медицині, дозування для будь-якого пацієнта залежать від безлічі факторів, включаючи масу пацієнта, площу поверхні тіла, вік, конкретну сполуку, призначену для введення, стать, час і шлях введення, загальний стан здоров'я, а також необхідність одночасного введення інших лікарських засобів. Як правило, курс лікування може являти собою звичайне введення фармацевтичної композиції в діапазоні від 1 мкг до 5 г одиниць на добу. Однак, більш краще дозування при безперервному впливанні може перебувати в діапазоні від 0,01 мкг до 2 мг, краще від 0,01 мкг до 1 мг, більш краще від 0,01 мкг до 100 мкг, ще більш краще від 0,01 мкг до 50 мкг і найбільш краще від 0,01 мкг до 10 мкг одиниць на кілограм маси тіла на годину. Найбільш бажані дозування вказані нижче в даному контексті. Позитивну динаміку можна контролювати за періодичної оцінки. Дозування може змінюватися, проте краще дозування для внутрішньовенного введення ДНК становить приблизно від 10^6 до 10^{12} копій молекули ДНК.

Композиції винаходу можна вводити місцевим або системним методом. Введення як правило здійснюють парентерально, наприклад, внутрішньовенно, трансдуковані Т-клітини також можна вводити безпосередньо в ділянку-мішень, наприклад, катетером через артерію в область ділянки. Склади для парентерального введення включають стерильні водні або неводні розчини, суспензії і емульсії. Прикладами неводних розчинників є пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинні масла, такі як оливкова олія, і ін'єкційні органічні складні ефіри, такі як етилолеат. Водні носії включають воду, спиртові / водні розчини, емульсії або суспензії, включаючи сольові і буферні розчини. Розчинники для парентерального введення включають розчин хлориду натрію, розчин декстрази в розчині Рінгера, розчин декстрази в розчині натрію хлориду, розчин Рінгера-лактат або нелеткі масла. Розчинники для внутрішньовенного введення включають розчини для заповнення дефіциту рідини і поживних речовин, розчини для заповнення дефіциту електролітів (наприклад, на основі розчину глюкози в розчині Рінгера) і т.п. Можуть також бути присутніми консерванти або інші добавки, наприклад, такі як протимікробні агенти, антиоксиданти, хелатуючі агенти, інертні гази і т.п. Крім того, фармацевтична композиція за винаходом може містити білкові носії, наприклад, сироватковий альбумін або імуноглобулін, краще людського походження. Передбачається, що крім білкових конструктів антитіла або молекул нуклеїнової кислоти або векторів (описаних в даному винаході), що кодують їх, і/або клітин, фармацевтична композиція за винаходом може містити інші біологічно активні агенти, в залежності від передбачуваного застосування фармацевтичної композиції. Такі агенти можуть являти собою лікарські засоби, що діють на шлунково-кишковий тракт, лікарські засоби, що діють як цитостатики, лікарські засоби, що попереджають гіперурикемію, лікарські засоби, що інгібують імунні реакції (наприклад, кортикостероїди), лікарські засоби, що діють на систему кровообігу, і/або агенти, такі як костимулюючі Т-клітинні молекули або цитокіни, відомі в даній галузі техніки.

Можливими показаннями до застосування композиції (композицій) / лікарського засобу (засобів) за даним винаходом є злоякісні захворювання, такі як рак епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і рак крові, перш за все злоякісні захворювання епітеліального походження / карциноми, такі як рак молочної залози, рак ободової кишки, рак передміхурової залози, рак голови та шиї, рак шкіри (меланома), пухлини сечостатевої системи, наприклад, рак яєчників, рак яєчок, ендотеліальний рак, рак шийки матки і рак нирок, рак легенів, рак шлунка, рак жовчного протоку, рак стравоходу, рак слинних залоз і рак щитовидної залози або інші пухлиноподібні захворювання, такі як гематологічні пухлини, гліоми, саркоми або остеосаркоми.

У винаході також пропонуються протоколи спільного введення з іншими сполуками, наприклад, молекулами, здатними забезпечити активуючий сигнал для ефекторних клітин імунної системи, клітинної проліферації або стимуляції клітин. Зазначені молекули можуть, наприклад, забезпечувати додатковий первинний активуючий сигнал для Т-клітин (наприклад, являти собою додаткові костимулюючі молекули: молекули сімейства B7, Oх40L, 4.1 BBL, CD40L, анти-CTLA-4, анти-PD-1) або являти собою додатковий інтерлейкін з суперсімейства цитокінів (наприклад, IL-2).

Композиція даного винаходу, описана вище, може також являти собою діагностичну композицію, яка необов'язково додатково включає засоби і способи детекції.

Відповідно, у кращих варіантах, пропонуються набір, антигензв'язуючі рецептори або трансдукована Т-клітина, як описано в даному контексті, для використання як лікарського засобу. Даний винахід пропонує антигензв'язуючий рецептор за винаходом для застосування як лікарського засобу, де одне або декілька антитіл, що включають мутований Fc домен, як описано в даному контексті, вводять до, одночасно з введенням або після введення трансдукованих Т-клітин, краще CD8+Т-клітин, що включають і/або що експресують антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті, і де зазначені Т-клітини, краще CD8+Т-клітини, одержані від суб'єкта, що потребує лікування. Вказаний лікарський засіб можна використовувати в способі лікування злоякісних захворювань, перш за все раку / карцином епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження або раку крові. У даному винаході рак / карциному вибирають з групи, що складається з раку шлунково-кишкового тракту, раку підшлункової залози, холангіоцеллюлярного раку, раку легенів, раку молочної залози, раку яєчників, раку шкіри, раку ротової порожнини, раку шлунка, раку шийки матки, В - і Т-клітинної лімфоми, мієлоїдної лейкемії, раку яєчників, лейкозу, лімфолейкозу, назофарингеальної карциноми, раку ободової кишки, раку передміхурової залози, нирково-клітинного раку, раку голови і шиї, раку шкіри (меланоми), пухлин сечостатевої системи, наприклад, раку яєчок, раку яєчників, ендотеліального раку, раку шийки матки та раку нирок, раку жовчної протоки, раку стравоходу, раку слинних залоз і раку щитовидної залози або інших пухлиноподібних

захворювань, таких як гематологічні пухлини, гліоми, саркоми або остеосаркоми.

Більш того, в контексті даного винаходу антитіло, як описано в даному контексті, що включає мутований Fc домен, зв'язується з пухлиноспецифічним антигеном, розташованим на поверхні природної пухлинної клітини, де зазначену молекулу антитіла вводять до, одночасно з введенням або після введення трансдукованих Т-клітин, краще CD8+Т-клітин із зазначеного організму суб'єкта, що включають антигензв'язуючий рецептор, як описано в даному контексті. У даному винаході рак / карциному вибирають з групи, що складається з раку шлунково-кишкового тракту, раку підшлункової залози, холангіоцеллюлярного раку, раку легенів, раку молочної залози, раку яєчників, раку шкіри, раку ротової порожнини, раку шлунка, раку шийки матки, В- і Т- клітинної лімфоми, мієлоїдної лейкемії, раку яєчників, лейкозу, лімфолейкозу, назофарингеальної карциноми, раку ободової кишки, раку передміхурової залози, нирково-клітинного раку, раку голови і шиї, раку шкіри (меланоми), пухлин сечостатевої системи, наприклад, раку яєчок, раку яєчників, ендотеліального раку, раку шийки матки та раку нирок, раку жовчної протоки, раку стравоходу, раку слинних залоз і раку щитовидної залози або інших пухлиноподібних захворювань, таких як гематологічні пухлини, гліоми, саркоми або остеосаркоми.

Більш того, в даному винаході молекула або конструктор (тобто молекула антитіла, описана в даному контексті), що включають один або два зв'язуючі домени направлених до пухлинного антигену / зв'язуються / взаємодіють з ним, краще з пухлинним антигеном людини (як пухлиноспецифічний антиген, розташований на поверхні природної пухлинної клітини), і що включають мутований Fc домен, де описані в даному контексті позаклітинні домени антигензв'язуючого рецептора даного винаходу направлені до мутованого Fc домену / зв'язуються / взаємодіють з ним, пропонуються для лікування раку шлунково-кишкового тракту, раку підшлункової залози, холангіоцеллюлярного раку, раку легенів, раку молочної залози, раку яєчників, раку шкіри і/або раку ротової порожнини. Таким чином, в контексті даного винаходу молекула антитіла, що включає два зв'язуючих домени, які направлені до пухлинного антигену / зв'язуються / взаємодіють з ним, краще з пухлинним антигеном людини, і включає мутований Fc домен, де описані в даному контексті позаклітинні домени антигензв'язуючого рецептора направлені до мутованого Fc домену / зв'язуються / взаємодіють з ним, пропонується для застосування при лікуванні раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і раку крові.

В одному варіанті пропонується: (i) антитіло, яке включає два домени зв'язування, які направлені до пухлинного антигену / зв'язуються / взаємодіють з ним, краще з пухлинним антигеном людини, і мутований Fc домен, та (ii) антигензв'язуючий рецептор даного винаходу, який направлений до мутованого Fc домену / зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку шлунково-кишкового тракту, раку підшлункової залози, холангіоцеллюлярного раку, раку легенів, раку молочної залози, раку яєчників, раку шкіри і / або раку ротової порожнини.

В одному варіанті пропонується: (i) антитіло, що включає один або два зв'язуючих домени проти HER1, краще HER1 людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку шлунково-кишкового тракту, раку підшлункової залози, холангіоцеллюлярного раку, раку легенів, раку молочної залози, раку яєчників, раку шкіри і/або раку ротової порожнини.

В одному варіанті пропонується: (i) антитіло, що включає один або два зв'язуючих домени проти HER2, краще HER2 людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку шлунка, раку молочної залози і/або раку шийки матки.

В одному варіанті пропонується: (i) антитіло, що включає один або два зв'язуючих домени проти HER3, краще HER3 людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку шлунка і/або раку легенів.

В одному варіанті пропонується: (i) антитіло, що включає один або два зв'язуючих домени проти CEA, краще CEA людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і раку крові.

В одному варіанті пропонується: (i) антитіло, що включає один або два зв'язуючих домени проти p95, краще p95 людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для

карциноми.

В одному варіанті пропонується: (i) антитіло, що включає один або два зв'язуючих домену проти MUC-1, краще MUC-1 людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку ободової кишки, раку молочної залози, раку яєчників, раку легенів і/або раку підшлункової залози.

В одному варіанті пропонується: (i) молекула антитіла, що включає один або два зв'язуючих домену проти A33, краще A33 людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку ободової кишки.

В одному варіанті пропонується: (i) антитіло, що включає один або два зв'язуючих домену проти PSMA, краще PSMA людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку передміхурової залози.

В одному варіанті пропонується: (i) молекула антитіла, що включає один або два зв'язуючих домену проти PSCA, краще PSCA людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і раку крові.

В одному варіанті пропонується: (i) молекула антитіла, що включає один або два зв'язуючих домену проти рецептора трансферрину, краще рецептора трансферрину людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і раку крові.

В одному варіанті пропонується: (i) антитіло, що включає один або два зв'язуючих домену проти тенасцину, краще тенасцину людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і раку крові.

В одному варіанті пропонується: (i) молекула антитіла, що включає один або два зв'язуючих домену проти CA-IX, краще XA-IX людини, і мутований Fc домен, і (ii) антигензв'язуючий рецептор за винаходом, який направлений до мутованого Fc домену/зв'язується / взаємодіє з ним, для застосування при лікуванні раку нирок.

Типові варіанти здійснення даного винаходу

1. Антигензв'язуючий рецептор, що включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, що включає антигензв'язуючий фрагмент, де антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з таким, що кристалізується (Fc) доменом мутованого фрагмента, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну заміну в порівнянні з немутованим вихідним Fc доменом.

2. Антигензв'язуючий рецептор за варіантом 1, де зв'язування Fc рецептора з мутованим Fc доменом знижене в порівнянні зі зв'язуванням Fc рецептора з немутованим вихідним Fc доменом, перш за все, де Fc рецептором є Fc γ рецептор або неонатальний Fc рецептор (FcRn).

3. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1 або 2, де зв'язування з Fc рецептором оцінюють методом ППР при 25 °C.

4. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-3, де антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv, Fab, crossFab або scFab.

5. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-4, де заякорений трансмембранний домен являє собою трансмембранний домен, який вибирають з групи, що складається з трансмембранного домену CD8, CD3z, FCGR3A, NKG2D, CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 або DAP12 або його фрагмента.

6. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-5, де заякореним трансмембранним доменом є CD28 трансмембранний домен, перш за все, де заякорений трансмембранний домен включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11.

7. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1 – 6, який додатково включає принаймні один стимулюючий сигнальний домен і/або принаймні один костимулюючий сигнальний домен.

8. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-7, де принаймні один стимулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, що складається з внутрішньоклітинного домену CD3z, FCGR3A і NKG2D або їх фрагментів.

9. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-8, де принаймні один стимулюючий сигнальний домен являє собою внутрішньоклітинний домен CD3z або його фрагмент, перш за все, де принаймні один стимулюючий сигнальний домен включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13.

5 10. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-9, де принаймні один костимулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, що складається з внутрішньоклітинного домену CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 і DAP12, або їх фрагментів.

10 11. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-10, де принаймні один костимулюючий сигнальний домен являє собою CD28 внутрішньоклітинний домен або його фрагмент, перш за все, де принаймні один костимулюючий сигнальний домен включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

15 12. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-11, де антигензв'язуючий рецептор включає один стимулюючий сигнальний домен, що включає внутрішньоклітинний домен CD3z, або його фрагмент, і де антигензв'язуючий рецептор включає один костимулюючий сигнал домен, що включає внутрішньоклітинний домен CD28, або його фрагмент.

20 13. Антигензв'язуючий рецептор за варіантом 12, де стимулюючий сигнальний домен включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13, костимулюючий сигнальний домен включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

14. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-13, де позаклітинний домен з'єднаний з заякореним трансмембранним доменом, необов'язково через пептидний лінкер.

15. Антигензв'язуючий рецептор за варіантом 14, де пептидний лінкер включає амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID NO: 17).

25 16. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-15, де заякорений трансмембранний домен з'єднаний з косигнальним доменом або сигнальним доменом, необов'язково через пептидний лінкер.

17. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-16, де сигнальний і/або косигнальний домени з'єднані, необов'язково через принаймні один пептидний лінкер.

30 18. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-17, де антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv фрагмент, де scFv фрагмент приєднаний через C-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, необов'язково через пептидний лінкер.

35 19. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-17, де антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент або crossFab фрагмент, де Fab або crossFab фрагмент приєднаний через C-кінцевий залишок важкого ланцюга до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, необов'язково через пептидний лінкер.

40 20. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 7-19, де антигензв'язуючий рецептор включає один косигнальний домен, де косигнальний домен приєднаний через N-кінцевий залишок до C-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену.

21. Антигензв'язуючий рецептор за варіантом 20, де антигензв'язуючий рецептор додатково включає один стимулюючий сигнальний домен, де стимулюючий сигнальний домен приєднаний через N-кінцевий залишок до C-кінцевого залишку костимулюючого сигнального домену.

45 22. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-21, де немутований вихідний Fc домен являє собою Fc домен IgG₁ або IgG₄, перш за все Fc домен IgG₁ людини.

50 23. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-22, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну мутацію в положенні, вибраному з групи, що складається з L234, L235, I253, H310, P331, P329 і H435 відповідно до EU системи нумерації, перш за все, де амінокислотною мутацією є L234A, L235A, I253A, N297A, H310A, P329G і/або H435A.

24. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-23, де мутований Fc домен включає амінокислотну заміну в положенні, вибраному з групи, що складається з залишку 117, 118, 136, 180, 193, 212, 214 і 318 Fc IgG₁ людини (SEQ ID NO: 130), перш за все, де амінокислотною мутацією є L117A, L118A, I136A, N180A, H193A, P212G, P214G і/або H318A.

55 25. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-24, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну мутацію в положенні, вибраному з групи, що складається з L234, L235 і P329 відповідно до EU системи нумерації, краще амінокислотні мутації L234A, L235A і P329G ("PGLALA").

60 26. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-25, де мутований Fc домен включає амінокислотну мутацію P329G відповідно до EU системи нумерації, де зв'язування Fcγ

рецептора з мутованим Fc доменом знижене в порівнянні зі зв'язуванням Fc γ рецептора з немутованим вихідним Fc доменом, перш за все, де Fc γ рецептор являє собою Fc γ R11a і/або Fc γ R11a людини.

27. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-26, де мутований Fc домен включає амінокислотну заміну в положенні 212 Fc IgG $_1$ людини (SEQ ID NO: 130), перш за все, де амінокислотною мутацією є P212G.

28. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-24, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну мутацію в положенні, вибраному з групи, що складається з I253, H310 і H435 відповідно до EU системи нумерації, краще амінокислотні мутації I253A, H310A і H435A ("AAA"), де зв'язування FcRn з мутованим Fc доменом знижене в порівнянні зі зв'язуванням FcRn з немутованим вихідним Fc доменом.

29. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-24 або 28, де мутований Fc домен включає амінокислотну заміну в положеннях 136, 193 і 318 Fc IgG $_1$ людини (SEQ ID NO: 130), перш за все, де амінокислотною мутацією є I136A, H193A і H318A ("AAA").

30. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-27, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий фрагмент включає:

(i) варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає:

(a) 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RYWMN (SEQ ID NO: 1),

(б) CDR H2 з амінокислотною послідовністю EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 2) і

(в) CDR H3 з амінокислотною послідовністю PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3), а також

(ii) варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає:

(г) 1-у ділянку легкого ланцюга (CDR L), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4),

(д) CDR L2 з амінокислотною послідовністю GTNKRAP (SEQ ID NO: 5) і

(е) CDR L3 з амінокислотною послідовністю ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).

31. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-27 або 30, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 32, і варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 33.

32. Антигензв'язуючий рецептор за варіантом 1-27, 30 або 31, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH) з послідовністю SEQ ID NO: 8 і варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) з послідовністю SEQ ID NO: 9.

33. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-27 або 30-32, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 31.

34. Антигензв'язуючий рецептор за варіантом 33, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7.

35. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-27 або 30-32, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор включає:

а) гібридний поліпептид важкого ланцюга, який принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентичний амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з послідовності SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 48, і

б) поліпептид легкого ланцюга, який принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентичний амінокислотній послідовності, вибраній з групи, що складається з

послідовності SEQ ID NO: 41 і SEQ ID NO: 50.

36. Антигензв'язуючий рецептор за варіантом 35, що включає:

а) гібридний поліпептид важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 39 і

б) поліпептид легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 41.

37. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-24 або 28-29, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A ("AAA"), але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий фрагмент включає:

(i) варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає:

(а) 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю SYGMS (SEQ ID NO: 53),

(б) CDR H2 з амінокислотною послідовністю SSGGSY (SEQ ID NO: 54) і

(в) CDR H3 з амінокислотною послідовністю LGMITTGYAMDY (SEQ ID NO: 55) і

(ii) варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає:

(г) 1-у ділянку легкого ланцюга (CDR L), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RSSQTIVHSTGHTYLE (SEQ ID NO: 56),

(д) CDR L2 з амінокислотною послідовністю KVSNRFS (SEQ ID NO: 57) і

(е) CDR L3 з амінокислотною послідовністю FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 58).

38. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-24, 28, 29 або 37, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A ("AAA"), але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий фрагмент включає варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 61, а також варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 62.

39. Антигензв'язуючий рецептор за варіантом 1-24, 28, 29 або 37-38, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент включає:

а) варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH) з послідовністю SEQ ID NO: 61 і

б) варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) з послідовністю SEQ ID NO: 62.

40. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-24, 28, 29 або 37-39, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутації I253A, H310A і H435A ("AAA"), але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор включає амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 59.

41. Антигензв'язуючий рецептор за варіантом 40, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 59.

42. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-27 або 30-32, де принаймні один антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab фрагмент, здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, що включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом, де антигензв'язуючий рецептор включає:

а) гібридний поліпептид важкого ланцюга, який принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентичний амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 39, і

б) поліпептид легкого ланцюга, який принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або на 100 % ідентичний амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 41.

43. Антигензв'язуючий рецептор за варіантом 42, що включає:

а) гібридний поліпептид важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 39 і

б) поліпептид легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 41.

44. Виділений полінуклеотид, що кодує антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-43.

45. Виділений полінуклеотид, що кодує гібридний поліпептид важкого ланцюга або поліпептид легкого ланцюга антигензв'язуючого рецептора за будь-яким з варіантів 1-32, 35-39 і 42-43.

46. Композиція, що кодує антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-32, 35-39 і 42-43, яка включає перший виділений полінуклеотид, що кодує гібридний поліпептид важкого ланцюга, а також другий виділений полінуклеотид, що кодує поліпептид легкого ланцюга.

47. Поліпептид, який кодується полінуклеотидом за будь-яким з варіантів 44 або 45 або композицією за варіантом 46.

48. Вектор, перш за все вектор експресії, що включає полінуклеотид за варіантом 44 або полінуклеотиди за варіантом 45.

49. Трансдукована Т-клітина, що включає полінуклеотид за варіантом 44, композиція за варіантом 46 або вектор за варіантом 48.

5 50. Трансдукована Т-клітина, здатна експресувати антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-43.

51. Трансдукована Т-клітина за будь-яким з варіантів 49 або 50, де трансдукована Т-клітина є котрансдукованою з Т-клітинним рецептором (TCR), здатним специфічно зв'язуватися з антигеном-мішенню.

10 52. Набір, що включає:

(А) трансдуковану Т-клітину, здатну експресувати антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-43, і

(Б) антитіло, яке включає мутований Fc домен,

15 де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

53. Набір, що включає:

(А) виділений полінуклеотид, що кодує антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-43, і

(Б) антитіло, яке включає мутований Fc домен,

20 де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

54. Набір, що включає:

(А) композицію за варіантом 46 або вектор за варіантом 48, що кодує антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-43, і

25 (Б) антитіло, яке включає мутований Fc домен,

де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

55. Набір за будь-яким з варіантів 52-54, де немутований вихідний Fc домен являє собою Fc домен IgG₁ або IgG₄, перш за все Fc домен IgG₁ людини.

30 56. Набір за будь-яким з варіантів 52-55, де зв'язування Fc рецептора мутованого Fc домена знижене в порівнянні зі зв'язуванням Fc рецептора немутованого вихідного Fc домена, перш за все, де Fc рецептором є Fc γ рецептор або неонатальний Fc рецептор (FcRn).

57. Набір за варіантом 56, де зв'язування Fc рецептора визначають методом поверхневого плазмонного резонансу (ППР) при 25 °C.

35 58. Набір за будь-яким з варіантів 52-57, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну мутацію в положенні, вибраному з групи, що складається з L234, L235, I253, H310, P331, P329 і H435 відповідно до EU системи нумерації, перш за все, де амінокислотною мутацією є L234A, L235A, I253A, N297A, H310A, P329G і/або H435A.

40 59. Набір за будь-яким з варіантів 52-58, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну мутацію в положенні, вибраному з групи, що складається з L234, L235 і P329 відповідно до EU системи нумерації, краще амінокислотні мутації L234A, L235A і P329G ("PGLALA").

60. Набір за будь-яким з варіантів 52-59, де мутований Fc домен включає амінокислотну мутацію P329G відповідно до EU системи нумерації.

45 61. Набір за будь-яким з варіантів 52-60, де мутований Fc домен включає принаймні одну амінокислотну мутацію в положенні, вибраному з групи, що складається з I253, H310 і H435 відповідно до EU системи нумерації, краще амінокислотні мутації I253A, H310A і H435A ("AAA").

50 62. Набір за будь-яким з варіантів 52-61, де антитіло, яке включає мутований Fc домен, здатне специфічно зв'язуватися з антигеном на поверхні пухлинної клітини, перш за все, де антиген вибирають з групи, що складається з FAP, CEA, p95, BCMA, EpCAM, MSLN, MCSP, HER-1, HER-2, HER-3, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, FOLR1, Trop-2, CA-12-5, HLA-DR, MUC-1 (муцин), A33-антигену, PSMA, PSCA, рецептора трансферину, TNC (тенасцин) і CA-IX, і/або з пептидом, зв'язаним з молекулою головного комплексу гістосумісності людини (MHC).

55 63. Набір за будь-яким з варіантів 52-62, де антитіло, яке включає мутований Fc домен, здатне специфічно зв'язуватися з антигеном, який вибирають з групи, що складається з білка активації фібробластів (FAP), карциномембронального антигену (CEA), мезотеліну (MSLN), CD20, рецептора 1 фолієвої кислоти (FOLR1) і тенасцину (TNC).

64. Набір за будь-яким з варіантів 52-63 для застосування як лікарського засобу.

60 65. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-43 або трансдукована Т-клітина

за будь-яким з варіантів 49-51 для застосування як лікарського засобу, де трансдуковану Т-клітину, яка експресує антигензв'язуючий рецептор вводять до, одночасно з введенням або після введення антитіла, що включає мутований Fc домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

66. Набір за будь-яким з варіантів 52-63 для застосування при лікуванні захворювання, перш за все для застосування при лікуванні злоякісного захворювання.

67. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-43 або трансдукована Т-клітина за будь-яким з варіантів 49-51 для застосування при лікуванні злоякісного захворювання, де лікування включає введення трансдукованої Т-клітини, що експресує антигензв'язуючий рецептор, до, одночасно з введенням або після введення антитіла, що включає мутований Fc домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

68. Антигензв'язуючий рецептор, трансдукована Т-клітина або набір для застосування за варіантами 66 або 67, де вказане злоякісне захворювання вибирають з раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і раку крові.

69. Антигензв'язуючий рецептор, трансдукована Т-клітина або набір для застосування за варіантами 66-68, де антитіло, яке включає мутований Fc домен, здатне специфічно зв'язуватися з антигеном на поверхні пухлинних клітин, перш за все, де антиген вибирають з групи, що складається з FAP, CEA, p95, BCMA, EpCAM, MSLN, MCSP, HER-1, HER-2, HER-3, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Ft3, FOLR1, Trop-2, CA-12-5, HLA-DR, MUC-1 (муцин), A33-антигену, PSMA, PSCA, рецептора трансферину, TNC (тенасцин) і CA-IX, і/або з пептидом, зв'язаним з молекулою головного комплексу гістосумісності людини (MHC).

70. Антигензв'язуючий рецептор, трансдукована Т-клітина або набір для застосування за варіантами 66-69, де антитіло, яке включає мутований Fc домен, здатне специфічно зв'язуватися з антигеном, який вибирають з групи, що складається з білка активації фібробластів (FAP), карциноембріонального антигену (CEA), мезотеліну (MSLN), CD20, рецептора 1 фолієвої кислоти (FOLR1) і тенасцину (TNC).

71. Антигензв'язуючий рецептор, трансдукована Т-клітина або набір для застосування за будь-яким з варіантів 66-70, де трансдукована Т-клітина одержана з клітини, виділеної з організму суб'єкта, що потребує лікування.

72. Антигензв'язуючий рецептор, трансдукована Т-клітина або набір для застосування за будь-яким з варіантів 66-70, де трансдукована Т-клітина не одержана з клітини, виділеної з організму суб'єкта, що потребує лікування.

73. Спосіб лікування захворювання у пацієнта, який включає введення суб'єкту трансдукованої Т-клітини, здатної експресувати антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з варіантів 1-43, і введення до, одночасно з введенням або після введення трансдукованої Т-клітини, терапевтично ефективної кількості антитіла, що включає мутований Fc домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

74. Спосіб за варіантом 73, додатково включає виділення Т-клітини з організму суб'єкта і одержання трансдукованої Т-клітини при трансдукуванні виділеної Т-клітини полінуклеотидом за варіантом 44, композицією за варіантом або вектором за варіантом 48.

75. Спосіб за варіантом 74, де Т-клітину трансдукують ретровірусним або лентівірусним векторним конструктором або невірусним векторним конструктором.

76. Спосіб за варіантом 75, де невірусний векторний конструктор являє собою мінікільцевий вектор "спляча красуня".

77. Спосіб за будь-яким з варіантів 73-76, де трансдуковану Т-клітину вводять суб'єкту внутрішньовенним вливанням.

78. Спосіб за будь-яким з варіантів 73-77, де трансдукована Т-клітина контактує з анти-CD3 і/або анти-CD28 антитілами до введення суб'єкту.

79. Спосіб за будь-яким з варіантів 73-78, де трансдукована Т-клітина контактує принаймні з одним цитокином до введення суб'єкту, краще з інтерлейкіном-2 (IL-2), інтерлейкіном-7 (IL-7), інтерлейкіном-15 (IL-15) і/або інтерлейкіном-21, або їх варіантами.

80. Спосіб за будь-яким з варіантів 73-79, де захворювання являє собою злоякісне захворювання.

81. Спосіб за будь-яким з варіантів 73-79, де захворювання вибирають з раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і раку крові.

82. Спосіб індукування лізису клітини-мішені, що включає контактування клітини-мішені з трансдукованою Т-клітиною, здатною експресувати антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з

варіантів 1-43 в присутності антитіла, що включає мутований Fc домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc доменом.

83. Спосіб за варіантом 82, де клітина-мішень являє собою пухлинну клітину.

84. Спосіб за будь-яким з варіантів 82 або 83, де клітина-мішень експресує антиген, який вибирають з групи, що складається з FAP, CEA, p95, BCMA, EpCAM, MSLN, MCSP, HER-1, HER-2, HER-3, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD52Flt3, FOLR1, Trop-2, CA-12-5, HLA-DR, MUC-1 (муцин), A33-антигену, PSMA, PSCA, рецептора трансферрину, TNC (тенасцин) і CA-IX.

85. Спосіб за будь-яким з варіантів 82-84, де клітина-мішень експресує антиген, який вибирають з групи, що складається з білка активації фібробластів (FAP), карциномембріонального антигену (CEA), мезотеліну (MSLN), CD20, рецептора 1 фолієвої кислоти (FOLR1) і тенасцину (TNC).

86. Застосування антигензв'язуючого рецептора за будь-яким з варіантів 1-43, полінуклеотидів за будь-яким з варіантів 44 і 45 або трансдукованої Т-клітини за будь-яким з варіантів 49-51 для одержання лікарського засобу.

87. Застосування за варіантом 86, де лікарський засіб призначений для лікування злоякісного захворювання.

88. Застосування за варіантом 86, де лікарський засіб призначений для лікування захворювання.

89. Застосування за варіантом 87, що відрізняється тим, що вказане злоякісне захворювання вибирають з раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і раку крові.

90. Застосування за варіантом 88, що відрізняється тим, що вказане захворювання вибирають з раку епітеліального, ендотеліального або мезотеліального походження і раку крові.

Зазначені та інші варіанти розкриті і містяться в прикладах даного винаходу. Додаткову літературу, що стосується будь-якого з антитіл, способів, застосувань і сполук, що використовуються відповідно до даного винаходу, можна знайти в публічних бібліотеках та базах даних, наприклад, за допомогою електронних пристроїв. Наприклад, можна використовувати відкриту базу даних "Medline", доступ до якої можна отримати за інтернет-посиланням <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Спеціалістам в даній галузі техніки відомі інші бази даних і адреси, наприклад, такі як <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.infobiogen.fr/>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html, <http://www.tigr.org/>, і доступ до них можна отримати, наприклад, за інтернет-посиланням <http://www.lycos.com>.

Приклади

Нижче наведені приклади способів і композицій даного винаходу. Слід розуміти, що з урахуванням загального опису, наведеного вище, на практиці можна виконувати і інші варіанти здійснення даного винаходу.

Технологія рекомбінантних ДНК

Для роботи з ДНК використовували стандартні методи, [описані в інструкція Sambrook та ін., Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989]. Реагенти для молекулярної біології використовували відповідно до інструкцій фірм виробників. Загальна інформація про нуклеотидні послідовності легких і важких ланцюгів імунoglobulinів людини наведена в книзі: [Kabat, E.A. та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., NIH Publication № 91-3242 (1991)].

Секвенування ДНК

Послідовності ДНК визначали при секвенуванні дволанцюгової матриці.

Синтез генів

Необхідні генні сегменти одержували за допомогою ПЛР з використанням відповідних матриць, або одержували з використанням набору Geneart AG (Регенсбург, Німеччина) з синтетичних олігонуклеотидів і продуктів ПЛР з використанням системи для автоматизованого синтезу генів. Генні сегменти, фланковані унікальними сайтами розщеплення з використанням ендонуклеази рестрикції, клонували в стандартних клонуючих / секвенуючих векторах. Плазмідну ДНК виділяли з трансформованих бактерій і визначали концентрацію УФ спектроскопічним методом. Послідовності ДНК субклонованих генних фрагментів підтверджували (верифікували) секвенуванням ДНК. Генні сегменти конструювали з використанням придатних сайтів рестрикції, щоб забезпечити субклонування у відповідних експресійних векторах. Всі конструкти мали 5'-кінцеву послідовність ДНК, що кодує лідерний пептид, що забезпечує секрецію білків в еукаріотичних клітинах.

Очистка білків

Після стадії фільтрування білки очищали з відфільтрованих супернатантів клітинних культур

стандартними способами. Короткий опис методу: антитіла наносили на колонку Protein A-Sepharose (фірми GE Healthcare) і промивали ФСБ. Антитіла елюювали при pH 2,8, потім зразки негайно нейтралізували. Білок у вигляді агрегатів відокремлювали від мономерних антитіл методом ексклюзійної хроматографії (колонка Superdex 200, фірми GE Healthcare), використовуючи ФСБ або 20 мМ гістидин, 150 мМ NaCl, pH 6,0. Фракції, які містять мономерні антитіла, об'єднували, концентрували (при необхідності), наприклад, з використанням центрифужного концентратора Amicon Ultra (30 MWCO, фірми MILLIPORE), заморожували і зберігали при -20 або -80 °C. Частина зразків потім була використана для проведення аналізу білкового препарату і одержання аналітичних характеристик, наприклад, методом ДСН-ПААГ електрофорезу і ексклюзійної хроматографії (SEC).

ДСН-ПААГ електрофорез

Гелеву систему NuPAGE® Pre-Cast (фірми Invitrogen) використовували відповідно до інструкції фірми-виробника. Перш за все, використовували 10 % або 4-12 % гелі NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6,4) і робочі буферні розчини NuPAGE® MES (гелі в відновлюючих умовах з антиоксидантною буферною добавкою NuPAGE®) або MOPS (гелі в невідновлювальних умовах).

Аналітична ексклюзійна хроматографія

Ексклюзійну хроматографію (SEC) для визначення агрегації і олігомерного стану антитіл проводили в системі для високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Короткий опис методу: антитіла, очищені на колонці з імобілізованим білком А, наносили на колонку Tosoh TSKgel G3000SW в 300 мМ NaCl, 50 мМ KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,5, в системі Agilent 1100 для ВЕРХ, або на колонку Superdex 200 (фірми GE Healthcare) в 2× ФСБ в системі ВЕРХ Dionex. Вміст елюйованого білка визначали кількісно за даними УФ-поглинання та інтегруванню площ піків. Як стандарт використовували набір Gel Filtration Standard, фірми BioRad, артикул 151–1901.

Одержання антитіл

Мутації Pro329Gly, Leu234Ala і Leu235Ala вводили в консервативну ділянку для усунення зв'язування з Fc-гамма-рецепторами способом, описаним в заявці WO2012/130831A1. Відповідно, мутації I253A, H310A і H435A ("AAA") вводили в консервативну ділянку для усунення зв'язування з FcRn. Відповідні антитіла одержували в результаті котрансфекції клітин HEK293-EBNA векторами експресії ссавців з використанням поліетиленімину. Клітини трансфектували відповідними векторами експресії важких та легких ланцюгів в співвідношенні 1:1.

Лентівірусна трансдукція Т-клітин Jurkat NFAT

Для одержання лентівірусних векторів відповідні послідовності ДНК для правильної збірки антигензв'язуючого рецептора клонували в лентівірусному полінуклеотидному векторі під контролем конститутивно активного негайно-раннього промотора цитомегаловірусу людини (CMV). Ретровірусний вектор містив посттранскрипційний регуляторний елемент вірусу гепатиту бабака (WPRE), елемент центрального поліпуринового тракту (cPPT), ділянка початку реплікації pUC і ген, що кодує стійкість до антибіотиків, що сприяє розмноженню та селекції в бактеріях.

Для одержання функціональних вірусних частинок здійснювали трансфекцію на основі Lipofectamine LTX™ з використанням клітин Hek293T (ATCC CRL3216), (з густиною посадки) що характеризуються 60-70 % рівнем конфлюентності, і CAR-вмісних векторів, а також векторів переносу pCMV-VSV-G: pRSV-REV: pCgV в співвідношенні 3:1:1:1. Через 48 год. супернатант збирали, центрифугували протягом 5 хв при 250g для видалення клітинного дебрису і фільтрували через фільтр з поліетилсульфону з розміром пор 0,45 або 0,22 мкм. Концентровані вірусні частинки (Lenti-x-Concentrator, Takara) використовували для трансдукції клітин Jurkat NFAT (Signosis). Позитивно-трансдуковані клітини сортували для одержання пулу або окремих клонів з використанням сортера FACSAria (фірми BD Bioscience). Після розмноження клітин до відповідної густини Т-клітини Jurkat NFAT використовували в експериментах.

Приклад 1

В даному прикладі описаний аналіз за репортерним геном Т-клітин Jurkat NFAT з використанням пухлинних клітин SUDHDL4, що експресують CD20, як клітин-мішеней, і відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 6А), або пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 6Б), як клітин-мішеней. Як IgG використовували IgG GA101 з мутацією P329G LALA, що, з одного боку, розпізнає пухлинний антиген, а з іншого боку, розпізнається трансдукованими Т-клітинами Jurkat NFAT. Для позитивного контролю лунки 96-лункового планшета [Cellstar Greiner-bio-one, CAT-№ 655185] обробляли CD3-антитілами (фірми Biolegend®) в концентрації 10 мкг/мл в фосфатно-сольовому буферному розчині (ФСБ) або при 4 °C протягом ночі, або протягом принаймні 1 год. при 37 °C. Лунки, покриті CD3, двічі

промивали ФСБ, після стадії заключної промивки ФСБ повністю видаляли. Ефекторні клітини або клітини Jurkat NFAT дикого типу підраховували і оцінювали їх життєздатність з використанням Cedex HiRes. Число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл. Для цього відповідну аліквоту суспензії клітин центрифугували при 210g протягом 5 хв при кімнатній температурі (КТ) і осаджені клітини ресуспендували в свіжому середовищі RPMI-160+10 % ФТС+1 % Glutamax (середовище для культивування клітин). Клітини-мішені, які експресують досліджувані антиген, також підраховували і перевіряли їх життєздатність. Число клітин підбирали, аналогічно тому, як описано для ефекторних клітин, при цьому число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл середовища для культивування клітин. Клітини-мішені (М) і ефекторні клітини (Е) висівали в співвідношенні Е:М 5:1 або 1:1 (110000 клітин в лунці) в трьох повторах в 96-лунковий планшет для суспензійних культур (фірми Greiner-bio one). На наступній стадії готували серійні розведення GA101 з мутацією P329G LALA, направленою до досліджуваного антигену, в середовищі для культивування клітин, використовуючи планшет з глибокими лунками об'ємом 2 мл (фірми Axugen®). Для одержання кінцевих концентрацій в діапазоні від 1 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл в кінцевому зразку об'ємом 200 мкл в лунці, у відповідні лунки піпеткою вносили аліквоту об'ємом 50 мкл в різних розведеннях. 96-лунковий планшет центрифугували протягом 2 хв при 190g і КТ. Планшет, закритий плівкою Parafilm®, інкубували при 37 °C у вологій атмосфері, яка містить 5 % CO₂. Після інкубації протягом 20 год. вміст кожної лунки перемішували, закачуючи і випускаючи вміст лунки 10 разів з використанням багатоканальної піпетки. 100 мкл клітинної суспензії переносили в новий 96-лунковий планшет білого кольору з плоским прозорим дном (фірми Greiner-bio-one) і додавали 100 мкл розчину ONE-Glo™ для проведення люциферазного аналізу (фірми Promega). Після інкубації протягом 15 хв в темряві на роторному шейкері при 300 об/хв і КТ вимірювали рівень люмінесценції з використанням планшет-рідера Tecan® Spark10M, час виявлення складав 1 с в лунці.

При спільному культивуванні клітин-мішеней і ефекторних клітин в співвідношенні 5:1 (точки) або 1:1 (квадрати) протягом 20 год. згідно з даними, представленими на графіках, спостерігається залежна від дози активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, а також Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, коли як антитіло використовували IgG GA101 з мутацією P329G LALA (див. фіг. 6А і Б, дані, виділені чорним кольором). Якщо використовували IgG GA101 без мутації P329G LALA (фіг. 6А і Б, дані, виділені сірим кольором), активація трансдукованих Т-клітин Jurkat NFAT не спостерігалася. Кожна точка означає середнє значення з двох повторів біологічного зразка, кожен з яких технічно вимірювали три рази. Всі значення відображені у вигляді значень, скоригованих за базовою лінією. Значення представлені з урахуванням стандартного відхилення, зазначеного у вигляді ліній з маркерами.

Приклад 2

В даному прикладі описаний аналіз за репортерним геном Т-клітин Jurkat NFAT з використанням пухлинних клітин SUDHDL4 (фіг. 7В і 7Г) або WSUDLCL2 (фіг. 7А і 7Б), що експресують CD20, як клітин-мішеней, і єдиний клон Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, як клітин-мішеней. Як IgG використовували IgG GA101 з мутацією P329G LALA, що, з одного боку, розпізнає пухлинний антиген, а з іншого боку, розпізнається трансдукованими Т-клітинами Jurkat NFAT. Ефекторні клітини або клітини Jurkat NFAT дикого типу підраховували і оцінювали їх життєздатність з використанням Cedex HiRes. Число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл. Для цього відповідну аліквоту суспензії клітин центрифугували при 210g протягом 5 хв при кімнатній температурі (КТ) і осаджені клітини ресуспендували в свіжому середовищі RPMI-160+10 % ФТС+1 % Glutamax (середовище для культивування клітин). Клітини-мішені, які експресують досліджувані антиген, також підраховували і перевіряли їх життєздатність. Число клітин підбирали, аналогічно тому, як описано для ефекторних клітин, при цьому число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл середовища для культивування клітин. Клітини-мішені (М) і ефекторні клітини (Е) висівали в співвідношенні Е:М 10:1, 5:1 або 1:1 (110000 клітин в лунці) в трьох повторах в 96-лунковий планшет для суспензійних культур (фірми Greiner-bio one). На наступній стадії готували серійні розведення GA101 з мутацією P329G LALA, направленою до досліджуваного антигену, в середовищі для культивування клітин, використовуючи планшет з глибокими лунками об'ємом 2 мл (фірми Axugen®). Для одержання кінцевих концентрацій в діапазоні від 1 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл в кінцевому зразку об'ємом 200 мкл в лунці, у відповідні лунки піпеткою вносили аліквоту об'ємом 50 мкл в різних розведеннях. 96-лунковий планшет центрифугували протягом 2 хв при 190g і КТ. Планшет, закритий плівкою Parafilm®, інкубували при 37 °C у вологій атмосфері, яка містить 5 % CO₂. Після інкубації протягом 20 год. вміст

кожної лунки перемішували, закачуючи і випускаючи вміст лунки 10 разів з використанням багатоканальної піпетки. 100 мкл клітинної суспензії переносили в новий 96-лунковий планшет білого кольору з плоским прозорим дном (фірми Greiner-bio-one) і додавали 100 мкл розчину ONE-Glo™ для проведення люциферазного аналізу (фірми Promega). Після інкубації протягом 15 хв в темряві на роторному шейкері при 300 об/хв і КТ вимірювали рівень люмінесценції з використанням планшет-рідера Tecan® Spark10M, час виявлення складав 1 с в лунці.

При спільному культивуванні клітин-мішеней і ефektorних клітин в співвідношенні 10:1 (точки), 5:1 (квадрати) або 1:1 (трикутники) протягом 20 год. згідно з даними, представленими на графіках, спостерігається залежна від дози активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, коли використовували IgG GA101 з мутацією P329G LALA (див. фіг. 7А-Г, дані, виділені чорним кольором). Якщо використовували IgG GA101 без мутації P329G LALA (фіг. 7А-Г, дані, виділені сірим кольором), то виявлена лише незначна активація трансдукованих Т-клітин Jurkat NFAT при найвищій концентрації антитіл 1 мкг/мл. Кожна точка означає середнє значення за двома технічними вимірюваннями кожного зразка. Всі значення відображені у вигляді значень, скоригованих за базовою лінією. Значення представлені з урахуванням стандартного відхилення, зазначеного у вигляді ліній з маркерами.

Приклад 3

В даному прикладі описаний аналіз за репортерним геном Т-клітин Jurkat NFAT з використанням адгезивних пухлинних клітин NIH/3T3-huFAP cl 19, що експресують FAP, як клітин-мішеней. Як ефektorні клітини використовували відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 8А), або Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 8В). Як IgG використовували IgG FAP 4B9 з мутацією P329G LALA, що, з одного боку, розпізнає пухлинний антиген, а з іншого боку, розпізнається трансдукованими Т-клітинами Jurkat NFAT. IgG DP47/vk3, які містять мутацію P329G LALA, використовували як контроль ізотипів. Для позитивного контролю лунки 96-лункового планшета (Greiner-bio-one, CAT-№ 655185) обробляли CD3-антитілами (фірми Biolegend®) в концентрації 10 мкг/мл в фосфатно-сольовому буферному розчині (ФСБ) протягом принаймні 1 год. при 37 °С. Лунки, покриті CD3, двічі промивали ФСБ, після стадії заключної промивки ФСБ повністю видаляли. Прикріплені NIH/3T3-huFAP cl 19 клітини-мішені один раз промивали ФСБ і відокремлювали, використовуючи трипсин. Відокремлені клітини ресуспендували в DMEM+4,5 г LD-глюкози + L-глютаміну + 25 мМ HEPES+10 % ФТС і 1 % Glutamax. Ефektorні клітини або Т-клітини Jurkat NFAT дикого типу підраховували і оцінювали їх життєздатність з використанням Cedex HiRes. Число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл. Для цього відповідну аліквоту суспензії клітин центрифугували при 210g протягом 5 хв при кімнатній температурі (КТ) і осаджені клітини ресуспендували в свіжому середовищі RPMI-160+10 % ФТС+1 % Glutamax (середовище для культивування клітин). Клітини-мішені, які експресують досліджуваний антиген, також підраховували і перевіряли їх життєздатність. Число клітин підбирали, аналогічно тому, як описано для ефektorних клітин, при цьому число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл середовища для культивування клітин. Клітини-мішені (М) і ефektorні клітини (Е) висівали в співвідношенні Е:М 5:1 (110000 клітин в лунці) в трьох повторях в 96-лунковий планшет для суспензійних культур (фірми Greiner-bio one). На наступній стадії готували серійні розведення антитіл з мутацією P329G LALA, направленою до досліджуваного антигену, в середовищі для культивування клітин, використовуючи планшет з глибокими лунками об'ємом 2 мл (фірми Axugen®). Для одержання кінцевих концентрацій в діапазоні від 1 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл в кінцевому зразку об'ємом 200 мкл в лунці, у відповідні лунки піпеткою вносили аліквоту об'ємом 50 мкл в різних розведеннях. 96-лунковий планшет центрифугували протягом 2 хв при 190g і КТ. Планшет, закритий плівкою Parafilm®, інкубували при 37 °С у вологій атмосфері, яка містить 5 % CO₂. Після інкубації протягом 20 год. вміст кожної лунки перемішували, закачуючи і випускаючи вміст лунки 10 разів з використанням багатоканальної піпетки. 100 мкл клітинної суспензії переносили в новий 96-лунковий планшет білого кольору з плоским прозорим дном (фірми Greiner-bio-one) і додавали 100 мкл розчину ONE-Glo™ для проведення люциферазного аналізу (фірми Promega). Після інкубації протягом 15 хв в темряві на роторному шейкері при 300 об/хв і КТ вимірювали рівень люмінесценції з використанням планшет-рідера Tecan® Spark10M, час виявлення складав 1 с в лунці.

На фіг.8Б і 8Г представлені дані спільного культивування Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 8Г), або Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 8Б), з клітинами-мішенями і антитілами FAP 4B9 в концентрації 1 мкг/мл в порівнянні з різними контрольними умовами.

Люмінесцентний сигнал не виявлений при інкубації Т-клітин Jurkat NFAT в присутності 1 мкг/мл FAP 4B9 P329G LALA (фіг. 8Б і 8Г, чорний трикутник), а також тільки клітин-мішеней (фіг. 8Б і 8Г, перевернутий чорний трикутник).

Люмінесцентний сигнал теж не виявлений при спільному культивуванні Т-клітин Jurkat NFAT з клітинами-мішенями і в присутності 1 мкг/мл антитіл FAP 4B9 (фіг. 8Б і фіг. 8Г, чорний ромб). При цьому CD3-залежна активація клітин Jurkat NFAT, які спільно культивуються з клітинами-мішенями в присутності 1 мкг/мл антитіл FAP 4B9, підтверджує їх функціональність за даними детекції люмінесцентного сигналу (білі точки).

CD3-залежна активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 8Б, білі квадрати), і активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 8Г, білі квадрати), що спільно культивуються з клітинами-мішенями в присутності 1 мкг/мл антитіл FAP 4B9, найбільш виражена, про що свідчать найвищі з усіх люмінесцентні сигнали, оскільки вони об'єднують CAR-опосередковану активацію з CD3-опосередкованою активацією. CD3-опосередкований люмінесцентний сигнал також виявлений, коли CAR інкубують з клітинами-мішенями в присутності 1 мкг/мл антитіл DP47/vk3 (фіг. 8Б і фіг. 8Г, перевернуті білі трикутники). Кожна точка означає середнє значення за трьома технічними вимірюваннями кожного зразка. Всі значення відображені у вигляді значень, скоригованих за базовою лінією. Значення представлені з урахуванням стандартного відхилення, зазначеного у вигляді ліній з маркерами.

Приклад 4

В даному прикладі описаний аналіз за репортерним геном Т-клітин Jurkat NFAT з використанням адгезивних пухлинних клітин MKN45, що експресують CEA, як клітин-мішеней. Як ефекторні клітини використовували відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 9А) або Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 9Б). Використовували CEA A5B7 IgG або CEA T84 LCHA IgG, обидва з яких включають мутацію P329G LALA. Потім IgG DP47/vk3, які містять мутацію P329G LALA, використовували як контроль ізотипів.

Для позитивного контролю лунки 96-лункового планшета (Greiner-bio-one, CAT-№ 655185) обробляли CD3-антитілами (фірми Biolegend®) в концентрації 10 мкг/мл в фосфатно-сольовому буферному розчині (ФСБ) протягом 1 год. при 37 °С. Лунки, покриті CD3, двічі промивали ФСБ, після стадії заключної промивки ФСБ повністю видаляли.

Прикріплені MKN45 клітини-мішені один раз промивали ФСБ і відокремлювали, використовуючи трипсин. Відокремлені клітини ресуспендували в DMEM+4,5 г LD-глюкози + L-глютаміну + 25 мМ HEPES+10 % ФТС і 1 % Glutamax.

Ефекторні клітини або клітини Jurkat NFAT дикого типу підраховували і оцінювали їх життєздатність з використанням Cedex HiRes. Число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл. Для цього відповідну аліквоту суспензії клітин центрифугували при 210g протягом 5 хв при кімнатній температурі (КТ) і осаджені клітини ресуспендували в свіжому середовищі RPMI-160+10 % ФТС + 1 % Glutamax (середовище для культивування клітин).

Клітини-мішені, які експресують досліджуваний антиген, також підраховували і перевіряли їх життєздатність. Число клітин підбирали, аналогічно тому, як описано для ефекторних клітин, при цьому число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл в RPMI-160+10 % ФТС + 1 % Glutamax.

Клітини-мішені (М) і ефекторні клітини (Е) висівали в співвідношенні Е:М 5:1 (110000 клітин в лунці) в трьох повторях в 96-лунковий планшет для суспензійних культур (фірми Greiner-bio one).

На наступній стадії готували серійні розведення антитіл з мутацією P329G LALA, направленою до досліджуваного антигену, в середовищі для культивування клітин, використовуючи планшет з глибокими лунками об'ємом 2 мл (фірми Axygen®). Для одержання кінцевих концентрацій в діапазоні від 1 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл в кінцевому зразку об'ємом 200 мкл в лунці, у відповідні лунки піпеткою вносили аліквоту об'ємом 50 мкл в різних розведеннях. 96-лунковий планшет центрифугували протягом 2 хв при 190g в КТ. Планшет, закритий плівкою Parafilm®, інкубували при 37 °С у вологій атмосфері, яка містить 5 % CO₂.

Після інкубації протягом 20 год. вміст кожної лунки перемішували, закачуючи і випускаючи вміст лунки 10 разів з використанням багатоканальної піпетки. 100 мкл клітинної суспензії переносили в новий 96-лунковий планшет білого кольору з плоским прозорим дном (фірми Greiner-bio-one) і додавали 100 мкл розчину ONE-Glo™ для проведення люциферазного аналізу (фірми Promega). Після інкубації протягом 15 хв в темряві на роторному шейкері при 300 об/хв і КТ вимірювали рівень люмінесценції з використанням планшет-рідера Tecan® Spark10M, час виявлення складав 1 с в лунці.

При спільному культивуванні клітин-мішеней і ефекторних клітин в співвідношенні 5:1 (фіг. 9А і фіг. 9В, точки) протягом 20 год. згідно з даними, представленими на графіках, спостерігається залежна від дози активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, а також Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, коли як антитіло використовували CEA A5B7 з мутацією P329G LALA (див. фіг. 9А і фіг. 9В, сірі точки). При використанні CEA T84 LCHA з мутацією P329G LALA залежна від дози активація спостерігалася тільки для Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 9А, чорні точки). При цьому якщо використовували антитіла з мутацією P329G LALA, то активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, виявлена тільки при найвищій концентрації антитіл 1 мкг/мл.

У випадку використання контрольного антитіла DP47/vk3 IgG з мутацією P329G LALA (фіг. 9А і фіг. 9В, чорні трикутники) активації Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, або Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, не виявлено. Кожна точка означає середнє значення за трьома технічними вимірюваннями кожного зразка. Значення представлені з урахуванням стандартного відхилення, зазначеного у вигляді ліній з маркерами.

На фіг. 9Б і 9Г представлені дані спільного культивування Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 9Б), або Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 9Г), з клітинами-мішенями і антитілами CEA T8 LCHA P329G LALA або CEA A5B7 P329G LALA в концентрації 1 мкг/мл в порівнянні з різними контрольними умовами.

Люмінесцентний сигнал не виявлений при інкубації тільки CAR Т-клітин Jurkat NFAT в присутності 1 мкг/мл CEA T8 LCHA P329G LALA (фіг. 9Б і 9Г, чорний ромб), а також тільки клітин-мішеней (фіг. 9Б і 9Г, білі кола).

Люмінесцентний сигнал теж не виявлений при спільному культивуванні Т-клітин Jurkat NFAT з клітинами-мішенями в присутності 1 мкг/мл IgG (фіг. 9Б і фіг. 9Г, білий квадрат і білий ромб). При цьому CD3-залежна активація Т-клітин Jurkat NFAT, спільно культивованих з клітинами-мішенями в присутності 1 мкг/мл IgG, підтверджує їх функціональність за даними детекції люмінесцентного сигналу (фіг. 9Б і фіг. 9Г, сірий хрест).

CD3-залежна активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 9Б, чорна зірочка і сіра зірочка), і активація Т-клітин NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 9Г, чорна зірочка і сіра зірочка), спільно культивованих з клітинами-мішенями в присутності 1 мкг/мл IgG, найбільш виражена, про що свідчать найвищі з усіх люмінесцентні сигнали, оскільки вони об'єднують CAR-опосередковану активацію з CD3-опосередкованою активацією. CD3-опосередкований люмінесцентний сигнал також виявлений, коли CAR інкубують з клітинами-мішенями в присутності 1 мкг/мл антитіл DP47/vk3 (фіг. 9Б і фіг. 9Г, сірий плюс). Кожна точка означає середнє значення за трьома технічними вимірюваннями кожного зразка. Значення представлені з урахуванням стандартного відхилення, зазначеного у вигляді ліній з маркерами.

Приклад 5

В даному прикладі описаний аналіз за репортерним геном Т-клітин Jurkat NFAT з використанням адгезивних пухлинних клітин MKN4, що експресують CEA як клітин-мішеней. Як ефекторні клітини використовували відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 10 В), або Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 10 А). Використовували CH1A1A 98 99 або CEA hMN14 IgG, обидва з мутацією P329G LALA. Крім того, IgG DP47/vk3, що несе мутацію P329G LALA, використовували як контроль ізотипів.

Для позитивного контролю лунки 96-лункового планшета [Greiner-bio-one, CAT-№ 655185] обробляли CD3-антитілами (фірми Biolegend®) в концентрації 10 мкг/мл в фосфатно-сольовому буферному розчині (ФСБ) протягом 1 год. при 37 °С. Лунки, покриті CD3, двічі промивали ФСБ, після стадії заключної промивки ФСБ повністю видаляли.

Прикріплені MKN45 клітини-мішені один раз промивали ФСБ і відокремлювали, використовуючи трипсин. Відокремлені клітини ресуспендували в DMEM+4,5 г LD-глюкози + L-глютаміну + 25 мМ HEPES+10 % ФТС і 1 % Glutamax.

Ефекторні клітини або клітини Jurkat NFAT дикого типу підраховували і оцінювали їх життєздатність з використанням Cedex HiRes. Число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл. Для цього відповідну аліквоту суспензії клітин центрифугували при 210g протягом 5 хв при кімнатній температурі (КТ) і осаджені клітини ресуспендували в свіжому середовищі RPMI-160+10 % ФТС+1 % Glutamax (середовище для культивування клітин).

Клітини-мішені, які експресують досліджуваний антиген, також підраховували і перевіряли їх життєздатність. Число клітин підбирали, аналогічно тому, як описано для ефекторних клітин, при цьому число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл в RPMI-160+10 % ФТС+1 % Glutamax.

5 Клітини-мішені (М) і ефекторні клітини (Е) висівали в співвідношенні Е:М 5:1 (110000 клітин в лунці) в трьох повторах в 96-лунковий планшет для суспензійних культур (фірми Greiner-bio one).

На наступній стадії готували серійні розведення антитіл з мутацією P329G LALA, направленою до досліджуваного антигену, в середовищі для культивування клітин, використовуючи планшет з глибокими лунками об'ємом 2 мл (фірми Axygen®). Для одержання кінцевих концентрацій в діапазоні від 1 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл в кінцевому зразку об'ємом 200 мкл в лунці, у відповідні лунки піпеткою вносили аліквоту об'ємом 50 мкл в різних розведеннях. 96-лунковий планшет центрифугували протягом 2 хв при 190g і КТ. Планшет, закритий плівкою Parafilm®, інкубували при 37 °C у вологій атмосфері, яка містить 5 % CO₂.

15 Після інкубації протягом 20 год. вміст кожної лунки перемішували, закачуючи і випускаючи вміст лунки 10 разів з використанням багатоканальної піпетки. 100 мкл клітинної суспензії переносили в новий 96-лунковий планшет білого кольору з плоским прозорим дном (фірми Greiner-bio-one) і додавали 100 мкл розчину ONE-Glo™ для проведення люциферазного аналізу (фірми Promega). Після інкубації протягом 15 хв в темряві на роторному шейкері при 300 об/хв і 20 КТ вимірювали рівень люмінесценції з використанням планшет-рідера Tecan® Spark10M, час виявлення складав 1 с в лунці.

Після спільного культивування протягом 20 год. клітин-мішеней і Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, в співвідношенні 5: 1 (фіг. 10А чорні і сірі точки) ніякої активації не виявлено, в випадку використання антитіла CEA hMN14 або антитіла CH1A1A 98 99 (фіг. 9А і фіг. 9Б, сірі точки). Т-клітини Jurkat NFAT, які експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, характеризуються невеликою активацією в присутності антитіла CEA hMN14 або антитіла CH1A1A 98 99 в концентрації 0,1 і 1 мкг/мл (фіг. 10В, чорні і сірі точки).

У випадку використання контрольного антитіла DP47/vk3 IgG з мутацією P329G LALA (фіг. 10А і фіг. 10В, чорні трикутники) активації ні Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, ні Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, не виявлено. Кожна точка означає середнє значення за трьома технічними вимірюваннями кожного зразка. Всі значення відображені у вигляді значень, скоригованих за базовою лінією. Значення представлені з урахуванням стандартного відхилення, зазначеного у вигляді ліній з маркерами.

35 На фіг. 10Б і 10Г представлені дані спільного культивування Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. Г), або Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 9Г), з клітинами-мішенями і антитілами CEA hMN14 або антитілами CH1A1A 98 99 в концентрації 1 мкг/мл в порівнянні з різними контрольними умовами.

У всіх проведених контрольних експериментах не виявлено будь-якого люмінесцентного сигналу, за винятком випадків, коли як активуючий агент використовували CD3. Кожна точка означає середнє значення за трьома технічними вимірюваннями кожного зразка. Значення представлені з урахуванням стандартного відхилення, зазначеного у вигляді ліній з маркерами.

45 Приклад 6

В даному прикладі описаний аналіз за репортерним геном Т-клітин Jurkat NFAT з використанням адгезивних пухлинних клітин CT26TNC cl 19, що експресують TNC, як клітин-мішеней. Як ефекторні клітини використовували відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 11В), або Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 11А). Як IgG використовували TNCA2B10 з мутацією P329G LALA. Потім IgG DP47/vk3, які містять мутацію P329G LALA, використовували як контроль ізотипів.

Для позитивного контролю лунки 96-лункового планшета (фірми Greiner-bio-one, CAT-№ 655185) обробляли CD3-антитілами (фірми Biolegend®) в концентрації 10 мкг/мл в фосфатно-сольовому буферному розчині (ФСБ) протягом 1 год. при 37 °C. Лунки, покриті CD3, двічі промивали ФСБ, після стадії заключної промивки ФСБ повністю видаляли.

Прикріплені CT26TNC cl 19 клітини-мішені один раз промивали ФСБ і відокремлювали, використовуючи трипсин. Відокремлені клітини ресуспендували в RPMI-1630+10 % ФТС і 1 % Glutamax+15 мкг/мл пуроміцину.

60 Ефекторні клітини або Т-клітини Jurkat NFAT дикого типу підраховували і оцінювали їх

життєздатність з використанням Cedex HiRes. Число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл. Для цього відповідну аліквоту суспензії клітин центрифугували при 210g протягом 5 хв при кімнатній температурі (КТ) і осаджені клітини ресуспендували в свіжому середовищі RPMI-160+10 % ФТС+1 % Glutamax (середовище для культивування клітин).

5 Клітини-мішені, які експресують досліджуваний антиген, також підраховували і перевіряли їх життєздатність. Число клітин підбирали, аналогічно тому, як описано для ефекторних клітин, при цьому число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл в RPMI-160+10 % ФТС+1 % Glutamax.

10 Клітини-мішені (М) і ефекторні клітини (Е) висівали в співвідношенні Е:М 5:1 (110000 клітин в лунці) в трьох повторах в 96-лунковий планшет для суспензійних культур (фірми Greiner-bio one).

15 На наступній стадії готували серійні розведення антитіл з мутацією P329G LALA, направленою до досліджуваного антигену, в середовищі для культивування клітин, використовуючи планшет з глибокими лунками об'ємом 2 мл (фірми Axygen®). Для одержання кінцевих концентрацій в діапазоні від 1 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл в кінцевому зразку об'ємом 200 мкл в лунці, у відповідні лунки піпеткою вносили аліквоту об'ємом 50 мкл в різних розведеннях. 96-лунковий планшет центрифугували протягом 2 хв при 190g і КТ. Планшет, закритий плівкою Parafilm®, інкубували при 37 °C у вологій атмосфері, яка містить 5 % CO₂.

20 Після інкубації протягом 20 год. вміст кожної лунки перемішували, закачуючи і випускаючи вміст лунки 10 разів з використанням багатоканальної піпетки. 100 мкл клітинної суспензії переносили в новий 96-лунковий планшет білого кольору з плоским прозорим дном (фірми Greiner-bio-one) і додавали 100 мкл розчину ONE-Glo™ для проведення люциферазного аналізу (фірми Promega). Після інкубації протягом 15 хв в темряві на роторному шейкері при 300 об/хв і КТ вимірювали рівень люмінесценції з використанням планшет-рідера Tecan® Spark10M, час виявлення складав 1 с в лунці.

25 При спільному культивуванні клітин-мішеней і ефекторних клітин в співвідношенні 5:1 (фіг. 11А і фіг. 11В, чорні точки) протягом 20 год. згідно з даними, представленими на графіках, спостерігається залежна від дози активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, а також Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, коли як антитіло використовували TNC A2B10 з мутацією P329G LALA. Якщо використовували контрольне антитіло DP47/vk3 IgG з мутацією P329G LALA (фіг. 11А і 11В, чорні точки), то активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, або Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, не спостерігалася. Кожна точка означає середнє значення за трьома технічними вимірюваннями кожного зразка. Всі значення відображені у вигляді значень, скоригованих за базовою лінією. Значення представлені з урахуванням стандартного відхилення, зазначеного у вигляді ліній з маркерами.

30 На фіг.11Б і 11Г представлені дані спільного культивування Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 11Г), або Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 11Б), з клітинами-мішенями і TNC A2B10 в концентрації 1 мкг/мл в порівнянні з різними контрольними умовами.

35 Люмінесцентний сигнал не виявлений при спільній інкубації Т-клітин Jurkat NFAT і клітин-мішеней в присутності IgG в концентрації 1 мкг/мл (фіг. 11Б і 11Г, білий трикутник). При цьому CD3-залежна активація клітин Jurkat NFAT, спільно культивованих з клітинами-мішенями в присутності 1 мкг/мл IgG, підтверджує їх функціональність за даними детекції люмінесцентного сигналу (фіг. 11Б і фіг. 11Г, білий квадрат).

40 CD3-залежна активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 11Б, біле коло), і активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 11Г, біле коло), спільно культивованих з клітинами-мішенями в присутності 1 мкг/мл IgG, найбільш виражена, про що свідчать найвищі з усіх люмінесцентні сигнали, оскільки вони об'єднують CAR-опосередковану активацію з CD3-опосередкованою активацією. CD3-опосередкований люмінесцентний сигнал також виявлений, коли CAR інкубують з клітинами-мішенями в присутності 1 мкг/мл антитіл DP47/vk3 (фіг. 11Б і 55 фіг. 11Г, чорний ромб). Кожна точка означає середнє значення за трьома технічними вимірюваннями кожного зразка. Значення представлені з урахуванням стандартного відхилення, зазначеного у вигляді ліній з маркерами.

Приклад 7

60 В даному прикладі описаний аналіз за репортерним геном Т-клітин Jurkat NFAT з використанням адгезивних пухлинних клітин CT26TNC cl 19, що експресують TNC, як клітин-

мішеней. Як ефекторні клітини використовували відсортований пул Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 12A). Як IgG використовували TNCA2B10 з мутацією P329G LALA. Потім IgG DP47/vk3, які містять мутацію P329G LALA, використовували як контроль ізотипів.

5 Для позитивного контролю лунки 96-лункового планшета (Greiner-bio-one, CAT-№ 655185) обробляли CD3-антитілами (фірми Biolegend®) в концентрації 10 мкг/мл в фосфатно-сольовому буферному розчині (ФСБ) протягом 1 год. при 37 °С. Лунки, покриті CD3, двічі промивали ФСБ, після стадії заключної промивки ФСБ повністю видаляли.

10 Прикріплені СТ26TNC сіл 19 клітини-мішені один раз промивали ФСБ і відокремлювали, використовуючи трипсин. Відокремлені клітини ресуспендували в RPMI-1630+10 % ФТС і 1 % Glutamax+15 мкг/мл пуроміцину.

Ефекторні клітини або клітини Jurkat NFAT дикого типу підраховували і оцінювали їх життєздатність з використанням Cedex HiRes. Число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл. Для цього відповідну аліквоту суспензії клітин центрифугували при 210g протягом 5 хв при кімнатній температурі (КТ) і осаджені клітини ресуспендували в свіжому середовищі RPMI-160+10 % ФТС + 1 % Glutamax (середовище для культивування клітин).

15 Клітини-мішені, які експресують досліджуваний антиген, також підраховували і перевіряли їх життєздатність. Число клітин підбирали, аналогічно тому, як описано для ефекторних клітин, при цьому число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл в RPMI-160+10 % ФТС+1 % Glutamax.

20 Клітини-мішені (М) і ефекторні клітини (Е) висівали в співвідношенні Е:М 5:1 (110000 клітин в лунці) в трьох повторах в 96-лунковий планшет для суспензійних культур (фірми Greiner-bio one).

25 На наступній стадії готували серійні розведення антитіл з мутацією P329G LALA, направленою до досліджуваного антигену, в середовищі для культивування клітин, використовуючи планшет з глибокими лунками об'ємом 2 мл (фірми Ахуген®). Для одержання кінцевих концентрацій в діапазоні від 1 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл в кінцевому зразку об'ємом 200 мкл в лунці, у відповідні лунки піпеткою вносили аліквоту об'ємом 50 мкл в різних розведеннях. 96-лунковий планшет центрифугували протягом 2 хв при 190g і КТ. Планшет, закритий плівкою Parafilm®, інкубували при 37 °С у вологій атмосфері, яка містить 5 % CO₂.

30 Після інкубації протягом 20 год. вміст кожної лунки перемішували, закачуючи і випускаючи вміст лунки 10 разів з використанням багатоканальної піпетки. 100 мкл клітинної суспензії переносили в новий 96-лунковий планшет білого кольору з плоским прозорим дном (фірми Greiner-bio-one) і додавали 100 мкл розчину ONE-Glo™ для проведення люциферазного аналізу (фірми Promega). Після інкубації протягом 15 хв в темряві на роторному шейкері при 300 об/хв і КТ вимірювали рівень люмінесценції з використанням планшет-рідера Tecan® Spark10M, час виявлення складав 1 с в лунці.

35 При спільному культивуванні клітин-мішеней і ефекторних клітин в співвідношенні 5:1 (фіг. 12A, чорні точки) протягом 20 год. згідно з даними, представленими на графіках, спостерігається залежна від дози активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, коли як антитіло використовували TNC A2B10 з мутацією P329G LALA, починаючи з концентрації 0,01 мкг/мл. Якщо використовували контрольне антитіло DP47/vk3 IgG з мутацією P329G LALA (фіг. 12A і 12B, сірі точки), то активація Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, не спостерігалася. 45 Кожна точка означає середнє значення за трьома технічними вимірюваннями кожного зразка. Всі значення відображені у вигляді значень, скоригованих за базовою лінією. Значення представлені з урахуванням стандартного відхилення, зазначеного у вигляді ліній з маркерами.

На фіг. 12Б представлені дані спільного культивування Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, з клітинами-мішенями і антитілами TNC A2B10 в концентрації 1 мкг/мл в порівнянні з різними контрольними умовами.

50 Люмінесцентний сигнал не виявлений при спільній інкубації Т-клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD, з клітинами-мішенями за відсутності антитіл (фіг. 12Б, чорний квадрат), а також при інкубації клітин Jurkat NFAT з клітинами-мішенями в присутності антитіла TNC A2B10 в концентрації 1 мкг/мл (фіг. 12Б, білі точки). При цьому клітини Jurkat NFAT, культивовані спільно з клітинами-мішенями в присутності TNC A2B10 в концентрації 1 мкг/мл, поміщені в лунки, покриті CD3, характеризуються чітким люмінесцентним сигналом.

60 Крім того, Т-клітини Jurkat NFAT, які експресують анти-P329G--CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD Fab, культивовані спільно з клітинами-мішенями в присутності або TNC A2B10 в концентрації 1 мкг/мл або антитіла DP47/vk3 в концентрації 1 мкг/мл, поміщені в лунки, покриті

CD3, характеризуються високим люмінесцентним сигналом. Кожна точка означає середнє значення за трьома технічними вимірюваннями кожного зразка. Значення представлені з урахуванням стандартного відхилення, зазначеного у вигляді ліній з маркерами.

Приклад 8

В даному прикладі описаний аналіз за репортерним геном Т-клітин Jurkat NFAT з використанням пухлинних клітин SUDHDL4, що експресують CD20, як клітин-мішеней, і пул клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 13A) або анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 13Б) як ефektorні клітини. Як IgG використовували GA101 IgG з мутацією P329G LALA, D265A P29G, тільки з мутацією LALA або без мутацій, що, з одного боку, розпізнає пухлинний антиген, а з іншого боку, розпізнається Т-клітинами Jurkat NFAT. Ефektorні клітини підраховували і оцінювали їх життєздатність з використанням Cedex HiRes. Число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл. Для цього відповідну аліквоту суспензії клітин центрифугували при 210g протягом 5 хв при кімнатній температурі (КТ) і осаджені клітини ресуспендували в свіжому середовищі RPMI-160+10 % ФТС + 1 % Glutamax. Клітини-мішені, які експресують досліджуваний антиген, також підраховували і перевіряли їх життєздатність. Число клітин підбирали, аналогічно тому, як описано для ефektorних клітин, при цьому число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл середовища для культивування клітин. Клітини-мішені (М) і ефektorні клітини (Е) висівали в співвідношенні Е:М 5:1 (110000 клітин в лунці) в трьох повторах в 96-лунковий планшет для суспензійних культур (фірми Greiner-bio one). На наступній стадії готували серійні розведення різних антитіл, направлених до досліджуваного антигену, в середовищі для культивування клітин, використовуючи планшет з глибокими лунками об'ємом 2 мл (фірми Axugen®). Для одержання кінцевих концентрацій в діапазоні від 1 мкг/мл до 10 пг/мл в кінцевому зразку об'ємом 200 мкл в лунці, у відповідні лунки піпеткою вносили аліквоту об'ємом 50 мкл в різних розведеннях. 96-лунковий планшет центрифугували протягом 2 хв при 190g і КТ. Планшет, закритий плівкою Parafilm®, інкубували при 37 °C у вологій атмосфері, яка містить 5 % CO₂. Після інкубації протягом 20 год. вміст кожної лунки перемішували, закачуючи і випускаючи вміст лунки 10 разів з використанням багатоканальної піпетки. 100 мкл клітинної суспензії переносили в новий 96-лунковий планшет білого кольору з плоским прозорим дном (фірми Greiner-bio-one) і додавали 100 мкл розчину ONE-Glo™ для проведення люциферазного аналізу (фірми Promega). Після інкубації протягом 15 хв в темряві на роторному шейкері при 300 об/хв і КТ вимірювали рівень люмінесценції з використанням планшет-рідера Tecan® Spark10M, час виявлення складав 1 с в лунці. Згідно з даними, представленими на графіках, залежна від дози активація клітин-мішеней спостерігається тільки у випадках, коли використовуються антитіла, що включають мутацію P329G або мутації P329G і LALA, але не у випадку, коли присутня тільки мутація LALA. Крім того, активація ефektorних клітин не спостерігалася, Якщо використовували антитіло GA101 дикого типу.

Приклад 9

В даному прикладі описаний аналіз за репортерним геном Т-клітин Jurkat NFAT з використанням пухлинних клітин SUDHDL4, що експресують CD20, як клітин-мішеней і пул клітин Jurkat NFAT, що експресують анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 14A) або анти-P329G-ds-Fab-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD (фіг. 14Б) як ефektorні клітини. Як IgG використовували GA101 IgG з мутацією P329G LALA, тільки з мутацією P329G, тільки з мутацією LALA або без мутацій, що, з одного боку, розпізнає пухлинний антиген, а з іншого боку, розпізнається Т-клітинами Jurkat NFAT. Ефektorні клітини підраховували і оцінювали їх життєздатність з використанням Cedex HiRes. Число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл. Для цього відповідну аліквоту суспензії клітин центрифугували при 210g протягом 5 хв при кімнатній температурі (КТ) і осаджені клітини ресуспендували в свіжому середовищі RPMI-160+10 % ФТС+1 % Glutamax. Клітини-мішені, які експресують досліджуваний антиген, також підраховували і перевіряли їх життєздатність. Число клітин підбирали, аналогічно тому, як описано для ефektorних клітин, при цьому число клітин підбирали до вмісту 1×10^6 життєздатних клітин/мл середовища для культивування клітин. Клітини-мішені (М) і ефektorні клітини (Е) висівали в співвідношенні Е:М 5:1 (110000 клітин в лунці) в трьох повторах в 384-лунковий планшет. На наступній стадії готували серійні розведення різних антитіл, направлених до досліджуваного антигену, в середовищі для культивування клітин, використовуючи 96-лунковий планшет. Для одержання кінцевих концентрацій в діапазоні від 1 мкг/мл до 10 пг/мл в кінцевому зразку об'ємом 30 мкл в лунці, у відповідні лунки піпеткою вносили аліквоту об'ємом 10 мкл в різних розведеннях. 384-лунковий планшет центрифугували протягом 2 хв при 190g і КТ. Планшет, закритий плівкою Parafilm®, інкубували при 37 °C у вологій атмосфері, яка містить 5 % CO₂. Після інкубації протягом 20 год. додавали 6 мкл

- розчину ONE-Glo™ для проведення люциферазного аналізу і зчитування проводили негайно з використанням планшет-рідера Tecan® Spark10M, час виявлення складав 1 с в лунці. Згідно з даними, представленими на графіках, залежна від дози активація клітин-мішеней спостерігається тільки у випадках, коли використовували антитіла, що включають мутації P329G або мутацію P329G і LALA, але не у випадку, коли присутня тільки мутація LALA. Крім того, активація ефektorних клітин не спостерігалася, якщо використовували антитіло GA101 дикого типу.

Приклади послідовностей

Таблиця 2

Анти-P329G-ds-scFv амінокислотні послідовності

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
Анти-P329G CDR H1 за Кабат	RYWMN	1
Анти-P329G CDR H2 за Кабатом	EITPDSSTINYTPSLKD	2
Анти-P329G CDR H3 за Кабатом	PYDYGAWFAS	3
Анти-P329G CDR L1 за Кабатом	RSSTGAVTTSNYAN	4
Анти-P329G CDR L2 за Кабатом	GTNKRAP	5
Анти-P329G CDR L3 за Кабатом	ALWYSNHWV	6
Анти-P329G-ds-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD з'єднаний з pETR17096	EVKLLS GGGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSRYWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNANT LYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGLVT VSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQESALTTS PGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHFLTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCA LWYSNHWVFGCGTKLTVLGGGGSFWVLVVVGGLVACY SLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	7
Анти-P329G-ds VH	EVKLLS GGGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSRYWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNANT LYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGLVT VSA	8
Анти-P329G-ds VL	QAVVTQESALTTS PGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWV QEKPDHFLTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTIT GAQTEDEAIYFCA LWYSNHWVFGCGTKLTVL	9
Анти-P329G-ds-scFv	EVKLLS GGGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSRYWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNANT LYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGLVT VSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQESALTTS PGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHFLTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCA LWYSNHWVFGCGTKLTVL	10
CD28ATD	FWVLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV	11
CD28CSD	RSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFA AYRS	12
CD3zSSD	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	13

Продовження таблиці 2

CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	14
eGFP	VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKS AMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDF KEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRD HMLLEFVTAAGITLGMDELYK	15
(G4S)4 лінкер	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	16
G4S лінкер	GGGS	17
T2A лінкер	GEGRGSLTTCGDVEENPGP	18

Таблиця 3

Анти-P329G-ds-scFv послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
Анти-P329G-ds-scFv- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD з'єднаний з pETR17096	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGG AGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGC CTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTC AGCAGGTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCC GGCAAGTGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCACCCCC GACAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGCCTGAAG GACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACA CCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGG ACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCTACGACTA CGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGT GGCGGGGGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGG GCGGATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCC TGACCACCAGCCCCGGCGAGACCGTGACCCTGACCT GCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGACCACCAGCAACT ACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCACCTGT TCACCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCC CCGGCGTGCCCGCCAGGTTTCAAGCGGCAGCCTGCG GCGACAAGGCGCCCTGACCATCACCGGCGCCGAGCA CCGAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGT ACAGCAACCACTGGGTGTTTCGGCTGTGGCACCAGC TGACCGTGCTGGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGC TGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCC TGCTGGTGACCGTGCCCTTCATCATCTTCTGGGTGAG GAGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACAT GAACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCCCACCAGGAA GCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCGC CGCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGC CGACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT GTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTA CGACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGCAGGGACCCCG AGATGGGCGGCAAGCCAGGAGGAAGAACCCCGAG GAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATG GCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAG AGGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCA GGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGC CCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGG	19

Анти-P329G-ds VH	GAGGTGAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGT GCAGCCCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCG CCAGCGGCTTCGACTTCAGCAGGTAAGTGAAGTGA GGTGAGGCAGGCCCCCGGCAAGTGTCTGGAGTGGAT CGGCGAGATCACCCCGACAGCAGCACCATCAACTA CACCCCGAGCCTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGG GACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGATCA AGGTGAGGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCG TGAGGCCCTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCT GGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCC	20
Анти-P329G-ds VL	CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTGACCACC AGCCCGGCGAGACCGTGACCCTGACCTGCAGGAGC AGCACCGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAAC TGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCACTGTTCACCGGC CTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCCGGCGTG CCCGCCAGGTTGAGCGGCAGCCTGATCGGCGACAAG GCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCAGACCGAGGAC GAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTACAGCAACC ACTGGGTGTTGCGCTGTGGCACCAAGCTGACCGTGC TG	21
Анти-P329G-ds-scFv	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGG AGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGC CTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTC AGCAGGTAAGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCCCCC GGCAAGTGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCACCCCC GACAGCAGCACCATCAACTACACCCCGAGCCTGAAG GACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACA CCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGG ACACCGCCCTGTAAGTGTGCGTGAGGCCCTACGACTA CGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCGCCGAGGGGGCGGAAGTGGT GGCGGGGGAAGCGGCGGGGGGTGGCAGCGGAGGGG GCGGATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCC TGACCACAGCCCCGGCGAGACCGTGACCCTGACCT GCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGACCACAGCAACT ACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCACTGT TCACCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCC CCGGCGTGCCCGCCAGGTTGAGCGGCAGCCTGATCG GCGACAAGGCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCAGAG CCGAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGT ACAGCAACCACTGGGTGTTGCGCTGTGGCACCAAGC TGACCGTGC	22

IRES внутрішній зв'язування рибосоми	EV71, сайт	CCCGAAGTAACTTAGAAGCTGTAAATCAACGATCAATA GCAGGTGTGGCACACCAGTCATACCTTGATCAAGCAC TTCTGTTTCCCCGGAAGTATCAATAGGCTGCTCG CGCGGCTGAAGGAGAAAACGTTTCGTTACCCGACCAA CTACTTCGAGAAGCTTAGTACCACCATGAACGAGGCA GGGTGTTTCGCTCAGCACAACCCCAAGTGTAGATCAGG CTGATGAGTCACTGCAACCCCATGGGCGACCATGG CAGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCCATGGAGAAATC CATGGGACGCTCTAATTCTGACATGGTGTGAAGTGCC TATTGAGCTAACTGGTAGTCCTCCGGCCCCCTGATTGC GGCTAATCCTAACTGCGGAGCACATGCTCACAACCA GTGGGTGGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGG AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTTTTATTCC TATATTGGCTGCTTATGGTGACAATCAAAAAGTTGTTA CCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGTGCAACA GGGCAACTGTTTACCTATTTATTGGTTTTGTACCATTA TCACTGAAGTCTGTGATCACTCTCAAATTCATTTTGAC CCTCAACACAATCAAAC	23
CD28ATD		TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTTC TGGGTG	24
CD28CSD		AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGC AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCG CAGCCTATCGCTCC	25
CD3zSSD		AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCG TACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAA GAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGC CGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTG AGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAG GGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCC CTGCCCCCTCGC	26
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD		TTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCC TGCTACAGCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCT TCTGGGTGAGGAGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACA GCGACTACATGAACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCC CCACCAGGAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCA GGGACTTCGCCGCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCA GCAGGAGCGCCGACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGC CAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGG AGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGGGG CAGGGACCCCGAGATGGGCGGCAAGCCCAGGAGGA AGAACCCCCAGGAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGA AGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCA TGAAGGGCGAGAGGAGGAGGGGCAAGGGCCACGAC GGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGAC ACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGGCCCTGCCCCC AGG	27
T2A елемент		TCCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGT GACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGG	28

eGFP	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTG CCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGC CACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCA CCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCG TGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTGCTTCAGCC GCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAA GTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCAC CATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC GGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTAC AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGA AGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAA CATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA CCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT GCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGC CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT GGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATCAC TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA	29
Анти-P329G-ds-scFv- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD- eGFP, з'єднаний з pETR17096	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGG AGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGC CTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTC AGCAGGTAAGTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCCC GGCAAGTGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCACCCCC GACAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGCCTGAAG GACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACA CCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGG ACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCTACGACTA CGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGT GGCGGGGGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGG GCGGATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCC TGACCACCAGCCCCGGCGAGACCGTGACCCTGACCT GCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGACCACCAGCAACT ACGCCAAGTGGGTGAGGAGAAGCCCGACCACCTGT TCACCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCC CCGGCGTGCCCGCCAGGTTGAGCGGCAGCCTGATCG GCGACAAGGCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCCAAG CCGAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGT ACAGCAACCACTGGGTGTTCTGGCTGTGGCACCAAGC TGACCGTGCTGGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGC TGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCC TGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAG GAGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACAT GAACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCCCACCAGGAA GCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCGC CGCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGC CGACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT GTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTA CGACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGCAGGGACCCCG AGATGGGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCAG GAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATG GCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAG AGGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCA GGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGC	30

	CCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGGTCCGGAGA GGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA GGAGAATCCCCGGCCCTAGGGTGAGCAAGGGCGAGG AGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGC TGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGT CCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAG CTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGC CCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCT ACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACA TGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGA AGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG CACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCT ATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGT GAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAG CGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCA CTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTT CGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA GCTGTACAAGTGA	
--	---	--

Таблиця 4

Анти-P329G-scFv амінокислотні послідовності

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
Анти-P329G CDR H1 за Кабатом	див. таблицю 2	1
Анти-P329G CDR H2 за Кабатом	див. таблицю 2	2
Анти-P329G CDR H3 за Кабатом	див. таблицю 2	3
Анти-P329G CDR L1 за Кабатом	див. таблицю 2	4
Анти-P329G CDR L2 за Кабатом	див. таблицю 2	5
Анти-P329G CDR L3 за Кабатом	див. таблицю 2	6
Гібридний анти- P329G-scFv- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	EVKLLSGLLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRWYMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT TVSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQAVVTQESALTT SPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCA LWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSFWVLVVVGGV LACY SLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMT PRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLY NELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	31
Анти-P329G VH	EVKLLSGLLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRWYMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT TVSA	32

Анти-P329G VL	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTIT GAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTCLTVL	33
Анти-P329G-scFv	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSAASGDFDSRYWMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT TVSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQAVVTQESALTT SPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCA LWYSNHWVFGGGTCLTVL	34
CD28ATD	див. таблицю 2	11
CD28CSD	див. таблицю 2	12
CD3zSSD	див. таблицю 2	13
CD28ATD-CD28CDS- CD3zSSD	див. таблицю 2	14
eGFP	див. таблицю 2	15
(G4S)4 лінкер	див. таблицю 2	16
G4S лінкер	див. таблицю 2	17
T2A лінкер	див. таблицю 2	18

Таблиця 5

Анти-P329G-scFv послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
Гібридний анти- P329G-scFv- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGG AGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGCGGCAGC CTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTC AGCAGGTAAGTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCC GGCAAGGGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCACCCCC GACAGCAGCACCATCAACTACACCCCCAGCCTGAAG GACAAGTTTCATCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACA CCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCGAGG ACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGGCCCTACGACTA CGGCGCCTGGTTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGT GGCGGGGGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGG GCGGATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCC TGACCACCAAGCCCCGCGAGACCGTGACCTGACCT GCAGGAGCAGCACCGGCGCGGTGACCAACGACAACCT ACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCACTGT TCACCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCC CCGGCGTGCCCGCCAGGTTTCAGCGGCAGCCTGATCG GCGACAAGGCCGCGCCTGACCATCACCGGCGCCCGA CCGAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGT ACAGCAACCACTGGGTGTTTCGGCGGTGGCACCAAGC TGACCGTGCTGGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGC TGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCC TGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAG GAGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACAT GAACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCCCACCAGGAA GCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCG CGCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGC CGACGCCCGCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT GTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGAGGAGTA CGACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGCGAGGACCCCG AGATGGGCGGGAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCAG	35

Анти-P329G-scFv послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
	GAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATG GCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAG AGGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCA GGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGC CCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGG	
Анти-P329G VH	GAGGTGAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGT GCAGCCCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCG CCAGCGGCTTCGACTTCAGCAGGTAAGTGAAGTGA GGTGAGGCAGGCCCCCGCAAGGGTCTGGAGTGGA TCGGCGAGATCACCCCGACAGCAGCACCATCAACT ACACCCCGAGCCTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAG GGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGATC AAGGTGAGGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGC GTGAGGCCCTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGC TGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCC	36
Анти-P329G VL	CAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCCTGACCACC AGCCCCGGCGAGACCGTGACCCTGACCTGCAGGAGC AGCACCGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAAC TGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCACTGTTACCGGC CTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCCCCGGCGTG CCCGCCAGGTTTCAGCGGCAGCCTGATCGGCGACAAG GCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCAGACCGAGGAC GAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGTACAGCAACC ACTGGGTGTTTCGGCGGTGGCACCAAGCTGACCGTGC TG	37
CD28ATD	див. таблицю 3	24
CD28CSD	див. таблицю 3	25
CD3zSSD	див. таблицю 3	26
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	див. таблицю 3	27
T2A елемент	див. таблицю 3	28
eGFP	див. таблицю 3	29
Гібридний анти- P329G-scFv- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD- eGFP	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACCGGTGTGCATTCCGAGGTGAAGCTGCTGG AGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCAGC CTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCGACTTC AGCAGGTAAGTGAAGTGGGTGAGGCAGGCCCCC GGCAAGGGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCACCCCC GACAGCAGCACCATCAACTACACCCCGAGCCTGAAG GACAAGTTCATCATCAGCAGGAGGACAACGCCAAGAACA CCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTGAGGAGCAGG ACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGGCCCTACGACTA CGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGCCAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCGCCGGAGGGGGCGGAAGTGGT GGCGGGGGAAGCGGCGGGGGTGGCAGCGGAGGGG GCGGATCTCAGGCCGTGGTGACCCAGGAGAGCGCCC TGACCACCAGCCCCGGCGAGACCGTGACCCCTGACCT GCAGGAGCAGCACCGGCGCCGTGACCACCAGCAACT ACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAGCCCGACCACTGT TCACCGGCCTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGCCC CCGGCGTGCCCGCCAGGTTTCAGCGGCAGCCTGATCG GCGACAAGGCCGCCCTGACCATCACCGGCGCCCGAGA CCGAGGACGAGGCCATCTACTTCTGCGCCCTGTGGT ACAGCAACCACTGGGTGTTTCGGCGGTGGCAOCCAAGC TGACCGTGCTGGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGC	38

Таблиця 5

Анти-P329G-scFv послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
	TGGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCC TGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAG GAGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACAT GAACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCACCAGGAA GCACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCGC CGCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGC CGACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT GTATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTA CGACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGCAGGGACCCCG AGATGGGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCAAG GAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATG GCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAG AGGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCA GGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGC CCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGGTCCGGAGA GGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA GGAGAATCCCGGCCCTAGGGTGAGCAAGGGCGAGG AGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGC TGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGT CCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAG CTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGC CCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCT ACGGCGTGCAAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACA TGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGA AGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG CACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCT ATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGT GAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAG CGTGACGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC CATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACACCA CTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTT CGTGACCGCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA GCTGTACAAGTGA	

Таблиця 6

Анти-P329G-ds-Fab амінокислотні послідовності

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
Анти-P329G CDR H1 за Кабатом	див. таблицю 2	1
Анти-P329G CDR H2 за Кабатом	див. таблицю 2	2
Анти-P329G CDR H3 за Кабатом	див. таблицю 2	3
Анти-P329G CDR L1 за Кабатом	див. таблицю 2	4
Анти-P329G CDR L2 за Кабатом	див. таблицю 2	5
Анти-P329G CDR L3 за Кабатом	див. таблицю 2	6

Таблиця 6

Анти-P329G-ds-Fab амінокислотні послідовності

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
Анти-P329G-ds-Fab- важкий ланцюг- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD з'єднаний з pETR17100	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSRYWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNANT LYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT VSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	39
Анти-P329G-ds-Fab важкий ланцюг	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSRYWMNWV RQAPGKCLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNANT LYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT VSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	40
Анти-P329G-ds-Fab легкий ланцюг	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWV QEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTIT GAQTEDEAIYFCALWYSNHWWFGCGTKLTVLRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	41
Анти-P329G-ds VL	див. таблицю 2	9
CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	42
Анти-P329G-ds VH	див. таблицю 2	8
CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	43
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	див. таблицю 2	14

Таблиця 7

Анти-P329G-ds-Fab послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
Анти-P329G-ds-Fab- важкий ланцюг- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD з'єднаний з pETR17100	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTGGTAGCAA CAGCTACGGGTGTGCATTCCAGGCCGTGGTGACCC AGGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACC GTGACCCTGACCTGCAGGAGCAGCAACGGCGCCGTG ACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAG CCCGACCACCTGTTACCGGCCTGATCGGCGGCACC AACAAAGAGGGCCCCCGGCGTGCCCGCCAGGTTCAAG GGCAGCCTGATCGGCGACAAGGCCGCCCTGACCATC ACCGGCGCCCAGACCGAGGACGAGGCCATCTACTTC TGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGC TGTGGCACCAAGCTGACCGTGCTGCGTACGGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCT GAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC	44

Анти-P329G-ds-Fab послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
	TACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGTTAGGAATCCCCGAAGTAAC TTAGAAGCTGTAAATCAACGATCAATAGCAGGTGTGG CACACCAGTCATACCTTGATCAAGCACTTCTGTTTCCC CGGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCGCGGCTGAA GGAGAAAACGTTTCGTTACCCGACCAACTACTTCGAGA AGCTTAGTACCACCATGAACGAGGCAGGGTGTTCGCG TCAGCACAACCCAGTGTAGATCAGGCTGATGATCA CTGCAACCCCCATGGGCGACCATGGCAGTGGCTGCG TTGGCGGCCTGCCCATGGAGAAATCCATGGGACGCT CTAATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTATTGAGCTAA CTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGATTGCGGCTAATCCTA ACTGCGGAGCACATGCTCACAAACCAGTGGGTGGTG TGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACT TTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCTATATTGGCTG CTTATGGTGACAATCAAAAAGTTGTTACCATATAGCTA TTGGATTGGCCATCCGGTGTGCAACAGGGCAACTGTT TACCTATTTATTGTTTTGTACCATTATCACTGAAGTCT GTGATCACTCTCAAATTCATTTTGACCCTCAACACAAT CAAACGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTT CTTGGTAGCAACAGCTACCGGTGTGCACTCCGAGGT GAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGC CCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGC GGCTTCGACTTCAGCAGGTACTGGATGAACTGGGTGA GGCAGGCCCCCGGCAAGTGTCTGGAGTGGATCGGC GAGATCACCCCGACAGCAGCACCATCAACTACACCC CCAGCCTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAA CGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTG AGGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGG CCCTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGC CAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCTAGCAC AAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGC AAGAGCACAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGAC ACCTTCCCCGCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATA GCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCTTCTAGCAGCC TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCC CAAGAGCTGCGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGCT GGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCT GCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGG AGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATG AACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCCCACCAGGAAG CACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCGCC GCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCC GACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTG TATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTAC GACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGGCAGGGACCCCGA GATGGGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCAGG AGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGG CCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGA GGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAG	

Анти-P329G-ds-Fab послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
	GGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCC CTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGG	
Анти-P329G-ds VL	див. таблицю 3	21
CL	CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAATCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG	45
Анти-P329G-ds VH	див. таблицю 3	20
CH1	GCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCT CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCC GGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCT GGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCT TCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCCAAGAGCTGC	46
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	див. таблицю 3	27
Анти-P329G-ds-Fab- важкий ланцюг- CD28ATD-CD28CSD- CD3ZSSD- eGFP з'єднаний з pETR17100	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACGGGTGTGCATTCCCAGGCCGTGGTGACCC AGGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACC GTGACCCTGACCTGCAGGAGCAGCAACGGCGCCGTG ACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAG CCCGACCACCTGTTACCCGGCCTGATCGGCGGCACC AACAAGAGGGCCCCCGGCGTGCCCGCCAGGTTCAAG GGCAGCCTGATCGGCGACAAGGCCGCCCTGACCATC ACCGGCGCCAGACCGAGGACGAGGCCATCTACTTC TGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGC TGTGGCACCAAGCTGACCGTGCTGCGTACGGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCT GAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGTAGGAATTCCCCGAAGTAAC TTAGAAGCTGTAAATCAACGATCAATAGCAGGTGTGG CACACCAGTCATACCTTGATCAAGCACTTCTGTTTCCC CGGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCGCGGCTGAA GGAGAAAACGTTTCGTTACCCGACCAACTACTTCGAGA AGCTTAGTACCACCATGAACGAGGCAGGGTGTTCGC TCAGCACAACCCCAAGTGTAGATCAGGCTGATGAGTCA CTGCAACCCCATGGGCGACCATGGCAGTGGCTGCG TTGGCGGCCTGCCCATGGAGAAATCCATGGGACGCT CTAATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTATTGAGCTAA CTGGTAGTCCTCCGGCCCCCTGATTGCGGCTAATCCTA ACTGCGGAGCATGCTCACAAACCAGTGGGTGGTG	47

Анти-P329G-ds-Fab послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
	TGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACT TTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCCTATATTGGCTG CTTATGGTGACAATCAAAAAGTTGTTACCATATAGCTA TTGGATTGGCCATCCGGTGTGCAACAGGGCAACTGTT TACCTATTTATTGGTTTTGTACCATTATCACTGAAGTCT GTGATCACTCTCAAATTCATTTTGACCCTCAACACAAT CAAACGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTT CTTGGTAGCAACAGCTACCGGTGTGCACTCCGAGGT GAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCGCTGGTGAGC CCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGC GGCTTCGACTTCAGCAGGTAAGTGAAGTGGGTGA GGCAGGCCCGGCAAGTGTCTGGAGTGGATCGGC GAGATCACCCCGACAGCAGCACCATCAACTACACCC CCAGCCTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAA CGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTG AGGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGG CCCTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGC CAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCTAGCACC AAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGC AAGAGCACAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGAC ACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATA GCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCTTCTAGCAGCC TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCC CAAGAGCTGCGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGCT GGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCT GCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGG AGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATG AACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCCCACCAGGAAG CACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCGCC GCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCC GACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTG TATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTAC GACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGGCAGGGACCCCGA GATGGGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCAGG AGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGG CCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGA GGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAG GGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCC CTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGGTCCGGAGAG GGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAG GAGAATCCCGGCCCTAGGGTGAGCAAGGGCGAGGA GCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTTCGAGCT GGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTC CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGC TGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCC CGTGCCCTGGCCCCACCTCGTGACCACCTGACCTA CGGCGTGAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCAT GAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG	

Таблиця 7

Анти-P329G-ds-Fab послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
	CACAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGCTCT ATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGT GAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAG CGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCA CTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTT CGTGACCGCCGCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGA GCTGTACAAGTGA	

Таблиця 8

Анти-P329G-Fab амінокислотні послідовності

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
Анти-P329G CDR H1 за Кабатом	див. таблицю 2	1
Анти-P329G CDR H2 за Кабатом	див. таблицю 2	2
Анти-P329G CDR H3 за Кабатом	див. таблицю 2	3
Анти-P329G CDR L1 за Кабатом	див. таблицю 2	4
Анти-P329G CDR L2 за Кабатом	див. таблицю 2	5
Анти-P329G CDR L3 за Кабатом	див. таблицю 2	6
Анти-P329G-Fab- важкий ланцюг- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD з'єднаний з pETR17594	EVKLLSGLLVQPGGSLKLSAASGFDFSRWYMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT TVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSFWV LVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMN TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	48
Анти-P329G-Fab важкий ланцюг	EVKLLSGLLVQPGGSLKLSAASGFDFSRWYMNWV RQAPGKGLEWIGEITPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNKN TLYLQMIKVRSEDTALYYCVRPYDYGAWFASWGQGT TVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	49
Анти-P329G-Fab легкий ланцюг	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWV QEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTIT GAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	50
Анти-P329G VL	див. таблицю 4	33
CL	див. таблицю 6	42
Анти-P329G VH	див. таблицю 4	32
CH1	див. таблицю 6	43

Таблиця 8

Анти-P329G-Fab амінокислотні послідовності

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD	див. таблицю 2	14

Таблиця 9

Анти-P329G-Fab послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
Анти-P329G-Fab-важкий ланцюг-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD з'єднаний з pETR17594	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACGGGTGTGCATTCCCAGGCCGTGGTGACCC AGGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACC GTGACCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCAGCGCCGTG ACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAG CCCGACCACCTGTTACCGGCCTGATCGGCGGCACC AACAAAGAGGGCCCCCGGCGTGCCCGCCAGGTTCAAG GGCAGCCTGATCGGCGACAAGGCCGCCCTGACCATC ACCGGCGCCCAGACCGAGGACGAGGCCATCTACTTC TGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGGC GGTGGCACCAAGCTGACCGTGCTGCGTACGGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCT GAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGTAGGAATTCCCGAAGTAAC TTAGAAGCTGTAAATCAACGATCAATAGCAGGTGTGG CACACCAGTCATACCTTGATCAAGCACTTCTGTTTCCC CGGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCGCGGCTGAA GGAGAAAACGTTTCGTTACCCGACCAACTACTTCGAGA AGCTTAGTACCACCATGAACGAGGCAGGGTGTTCGCG TCAGCACAACCCCAAGTGTAGATCAGGCTGATGAGTCA CTGCAACCCCCCATGGGCGACCATGGCAGTGGCTGCG TTGGCGGCCTGCCCATGGAGAAATCCATGGGACGCT CTAATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTATTGAGCTAA CTGGTAGTCCTCCGGCCCCCTGATTGCGGCTAATCCTA ACTGCGGAGCACATGCTCACAACCAAGTGGGTGGT TGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACT TTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCTATATTGGCTG CTTATGGTGACAATCAAAAAGTTGTTACCATATAGCTA TTGGATTGGCCATCCGGTGTGCAACAGGGCAACTGTT TACCTATTTATTGGTTTTGTACCATTATCACTGAAGTCT GTGATCACTCTCAAATTCATTTTGACCCTCAACACAAT CAAACGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTT CTTGGTAGCAACAGCTACCGGTGTGCACTCCGAGGT GAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGC CCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGC GGCTTCGACTTCAGCAGGTAAGTGGATGAACTGGGTGA GGCAGGCCCCCGGCAAGGGTCTGGAGTGGATCGGC GAGATCACCCCGACAGCAGCACCATCAACTACACCC CCAGCCTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAA CGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTG AGGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGG	51

Анти-P329G-Fab послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
	CCCTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGC CAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCTAGCACC AAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGC AAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGAC ACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATA GCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCCTTAGCAGCC TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCC CAAGAGCTGCGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGCT GGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCT GCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGG AGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATG AACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCCCACCAGGAAG CACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCGCC GCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCC GACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTG TATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTAC GACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGGCAGGGACCCCGA GATGGGCGGCAAGCCCAGGAGGAAGAACCCCCAGG AGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGG CCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGA GGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAG GGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCC CTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGG	
Анти-P329G VL	див. таблицю 5	37
CL	див. таблицю 7	45
Анти-P329G VH	див. таблицю 5	36
CH1	див. таблицю 7	46
CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD	див. таблицю 3	27
Анти-P329G-Fab- важкий ланцюг- CD28ATD-CD28CSD- CD3zSSD- eGFP з'єднаний з pETR17594	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACGGGTGTGCATTCCAGGCCGTGGTGACCC AGGAGAGCGCCCTGACCACCAGCCCCGGCGAGACC GTGACCCTGACCTGCAGGAGCAGCACCAGGCGCCGTG ACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAGAAG CCCGACCACCTGTTACCGGCCTGATCGGCGGCACC AACAAGAGGGCCCCCGGCGTGCCCGCCAGGTTACG GGCAGCCTGATCGGCGACAAGGCCGCCCTGACCATC ACCGGCGCCCAGACCGAGGACGAGGCCATCTACTTC TGCGCCCTGTGGTACAGCAACCACTGGGTGTTCCGGC GGTGGCACCAAGCTGACCGTGCTGCGTACGGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCT GAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGTAGGAATTCCCCGAAGTAAC TTAGAAGCTGTAAATCAACGATCAATAGCAGGTGTGG CACACCAGTCATACCTTGATCAAGCACTTCTGTTTCCC CGGACTGAGTATCAATAGGCTGCTCGCGCGGCTGAA	52

Анти-P329G-Fab послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
	GGAGAAAACGTTTCGTTACCCGACCAACTACTTCGAGA AGCTTAGTACCACCATGAACGAGGCAGGGTGTTCGC TCAGCACAACCCCAAGTGTAGATCAGGCTGATGAGTCA CTGCAACCCCATGGGCGACCATGGCAGTGGCTGCG TTGGCGGCCTGCCCATGGAGAAATCCATGGGACGCT CTAATTCTGACATGGTGTGAAGTGCCTATTGAGCTAA CTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGATTGCGGCTAATCCTA ACTGCGGAGCACATGCTCACAACCAAGTGGGTGGT TGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGCACTACT TTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCTATATTGGCTG CTTATGGTGACAATCAAAAAGTTGTTACCATATAGCTA TTGGATTGGCCATCCGGTGTGCAACAGGGCAACTGTT TACCTATTTATTGGTTTTGTACCATTATCACTGAAGTCT GTGATCACTCTCAAATTCATTTTGACCCTCAACACAAT CAAACGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTT CTTGGTAGCAACAGCTACCGGTGTGCACTCCGAGGT GAAGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGC CCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGC GGCTTCGACTTCAGCAGGTAAGTGGATGAAGTGGGTGA GGCAGGCCCCCGGCAAGGGTCTGGAGTGGATCGGC GAGATCACCCCGACAGCAGCACCATCAACTACACCC CCAGCCTGAAGGACAAGTTCATCATCAGCAGGGACAA CGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGATCAAGGTG AGGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGCGTGAGG CCCTACGACTACGGCGCCTGGTTCGCCAGCTGGGGC CAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCTAGCACC AAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGC AAGAGCACCAAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGAC ACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATA GCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCCTTCTAGCAGCC TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCC CAAGAGCTGCGGAGGGGGCGGATCCTTCTGGGTGCT GGTGGTGGTGGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCT GCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGAGG AGCAAGAGGAGCAGGCTGCTGCACAGCGACTACATG AACATGACCCCCAGGAGGCCCGGCCCCACCAGGAAG CACTACCAGCCCTACGCCCCCCCCAGGGACTTCGCC GCCTACAGGAGCAGGGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCC GACGCCCCCGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTG TATAACGAGCTGAACCTGGGCAGGAGGGAGGAGTAC GACGTGCTGGACAAGAGGAGGGGGCAGGGACCCCGA GATGGGCGGCAAGGCCAGGAGGAAGAACCCCCAGG AGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGG CCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGA GGAGGAGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAG GGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCC CTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGGTCCGGAGAG GGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAG GAGAATCCCGGCCCTAGGGTGAAGGAGGCGAGGA GCTGTTCAACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCT GGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGT CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGC	

Таблиця 9

Анти-P329G-Fab послідовності ДНК

Конструкція	Послідовність ДНК	SEQ ID NO
	TGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCC CGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTA CGGCGTGCAAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCAT GAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC GAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG CACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGCT ATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGT GAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAG CGTGCAAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCA CTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTT CGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA GCTGTACAAGTGA	

Таблиця 10

Анти-AAA-scFv амінокислотні послідовності

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
Анти-AAA CDR H1 за Кабатом	SYGMS	53
Анти-AAA CDR H2 за Кабатом	SSGGSY	54
Анти-AAA CDR H3 за Кабатом	LGMITTYAMDY	55
Анти-AAA CDR L1 за Кабатом	RSSQTIVHSTGHTYLE	56
Анти-AAA CDR L2 за Кабатом	KVSNRFS	57
Анти-AAA CDR L3 за Кабатом	FQGSHVPYT	58
Гібридний анти-AAA-scFv-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLKL SCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGSYI YYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSSLKSEDTAMYCY ARLGMITTYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSG GGSGGGGSDVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI VHSTGHTYLEWFLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSQVPSDF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGG GTKLEIKGGGGSFVWLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	59

Таблиця 10

Анти-AAA-scFv амінокислотні послідовності

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
Анти-AAA-scFv	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLKL SCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGSYI YYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSLSEDTAMYYC ARLGMITTGYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSDVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI VHSTGHTYLEWFLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGSHPVPTFGG GTKLEIK	60
Анти-AAA VH	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLKL SCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGSYI YYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSLSEDTAMYYC ARLGMITTGYAMDYWGQGTSTVTVSS	61
Анти-AAA VL	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIHSTGHTYLE WFLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGYYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIK	62

Таблиця 11

Анти-AAA-Fab амінокислотні послідовності

Конструкція	Послідовність білка	SEQ ID NO
Анти-AAA CDR H1 за Кабатом	див. таблицю 10	53
Анти-AAA CDR H2 за Кабатом	див. таблицю 10	54
Анти-AAA CDR H3 за Кабатом	див. таблицю 10	55
Анти-AAA CDR L1 за Кабатом	див. таблицю 10	56
Анти-AAA CDR L2 за Кабатом	див. таблицю 10	57
Анти-AAA CDR L3 Kabat	див. таблицю 10	58
Гібридний анти-AAA-Fab-важкий ланцюг-CD28ATD-CD28CSD-CD3zSSD	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLKL SCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGSYI YYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSLSEDTAMYYC ARLGMITTGYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCGGGGSFWLVVVGGVLACYSLLVTV AFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA PPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	63
Анти-AAA-Fab важкий ланцюг	MNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLKL SCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGSYI YYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSLSEDTAMYYC ARLGMITTGYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC	64

Таблиця 11

Анти-AAA-Fab амінокислотні послідовності

Конструкція	Послідовність білка	SEQ ID NO
Анти-AAA-Fab легкий ланцюг	DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQTIVHSTGHTYLE WFLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPYTFGGGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	65
Анти-AAA VL	див. таблицю 10	62
CL	див. таблицю 6	42
Анти-AAA VH	див. таблицю 10	61
CH1	див. таблицю 6	43

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
CD27 людини	ATGGCGCGCCCGCATCCGTGGTGGCTGTGCGTGCTG GGCACCCTGGTGGGCCTGAGCGCGACCCGCGCC GAAAAGCTGCCCGGAACGCCATTATTGGGCGCAGGG CAAACGTGTGCTGCCAGATGTGCGAACCGGGCACCTTT CTGGTGAAAGATTGCGATCAGCATCGCAAAGCGGCG CAGTGCATCCGTGCATTCCGGGCGTGAGCTTTAGC CCGGATCATCATACCCGCGCGCATTCGCAAAGCTGC CGCCATTGCAACAGCGGCCTGCTGGTGCGCAACTGC ACCATTACCGCGAACGCGGAATGCGCGTGCCGCAAC GGCTGGCAGTGCCGCGATAAAGAATGCACCGAATGC GATCCGCTGCCGAACCCGAGCCTGACCGCGCGCAGC AGCCAGGCGCTGAGCCCGCATCCGCGAGCCGACCCAT CTGCCGTATGTGAGCGAAATGCTGGAAGCGCGCACCC GCGGGCCATATGCAGACCCTGGCGGATTTTCGCCAG CTGCCGGCGCGCAACCTGAGCACCCATTGGCCGCGCG CAGCGCAGCCTGTGCGAGCAGCGATTTTATTCGCATTC TGGTGATTTTACCGGCATGTTTCTGGTGTTTACCCTG GCGGGCGCGCTGTTTCTGCATCAGCGCCGCAAAATAT CGCAGCAACAAAGGCGAAAGCCCGGTGGAACCGGCG GAACCGTGCCATTATAGCTGCCCGCGCGAAGAAGAA GGCAGCACCATTCGATTGAGGAAGATTATCGCAAAC CGGAACCGGCGTGAGCCCG	66
CD27 людини	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGK LCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDCIPGVSFSPDH HTRPHCESCRHCNSGLLVNRCTITANAECACRNGWQC RDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSE MLEARTAGHMQLTADFRQLPARTLSTHWPPQRSCLSS DFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRKYRSNKGESPV PAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP	67
CD27 миші	ATGGCGTGGCCGCGCCGCTATTGGCTGTGCATGCTG GGCACCCTGGTGGGCCTGAGCGCGACCCGCGCC GAACAGCTGCCCGGATAAACATTATTGGACCGGCGG CGGCCTGTGCTGCCGCATGTGCGAACCGGGCACCTT TTTTGTGAAAGATTGCGAACAGGATCGCACCGCGGCG CAGTGCATCCGTGCATTCCGGGACCCAGCTTTAGC CCGGATTATCATACCCGCGCGCATTCGCAAAGCTGCC GCCATTGCAACAGCGGCTTTCTGATTGCGAACTGCAC CGTGACCGCGAACGCGGAATGCAGCTGCAGCAAAAA CTGGCAGTGCCGCGATCAGGAATGCACCGAATGCGA TCCGCGCTGAACCCGGCGCTGACCGCGCAGCCGAG CGAAACCCCGAGCCCGCAGCCGCGCGCCGACCCATCT	68

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
	GCCGCATGGCACCGAAAAACCGAGCTGGCCGCTGCA TCGCCAGCTGCCGAACAGCACCGTGTATAGCCAGCG CAGCAGCCATCGCCCGCTGTGCAGCAGCGATTGCAT TCGCATTTTTGTGACCTTTAGCAGCATGTTTCTGATTT TTGTGCTGGGCGCGATTCTGTTTTTTCATCAGCGCCG CAACCATGGCCCGAACGAAGATCGCCAGGCGGTGCC GGAAGAACCGTGCCCGTATAGCTGCCCGCGCGAAGA AGAAGGCAGCGCGATTCCGATTACAGGAAGATTATCGC AAACCGGAACCGGCGTTTTATCCG	
CD27 миші	MAWPPPYWLCMLGTLVGLSATLAPNSCPDKHYWTGGG LCCRMCEPGTFFVKDCEQDRTAAQCDPCIPGTSFSPDY HTRPHCESCRHCNSGFLIRNCTVTANAECSCSKNWQC RDQECTECDPPLNPALTRQPSETPSPQPPPTLPHGTE KPSWPLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCSSDCIRIFVTFSS MFLIFVLGAILFFHQRRNHGPNEDRQAVPEEPCPYSCPR EEEGSAIQEDYRKPEPAFYF	69
CD28 людини	ATGCTGCGCCTGCTGCTGGCGCTGAACCTGTTTCCGA GCATTACAGGTGACCGGCAACAAAATTCTGGTGAAACA GAGCCCGATGCTGGTGGCGTATGATAACGCGGTGAA CCTGAGCTGCAAATATAGCTATAACCTGTTTAGCCGC GAATTTGCGCGCAGCCTGCATAAAGGCCTGGATAGC GCGGTGGAAGTGTGCGTGGTGTATGGCAACTATAGC CAGCAGCTGCAGGTGTATAGCAAAACCGGCTTTAACT GCGATGGCAAACCTGGGCAACGAAAGCGTGACCTTTTA TCTGCAGAACCTGTATGTGAACCAGACCGATATTTATT TTTGCAAAATTGAAGTGATGTATCCGCCGCCGTATCT GGATAACGAAAAAAGCAACGGCACCATTATTCATGTG AAAGGCAAACATCTGTGCCCGAGCCCGCTGTTTCCG GGCCCGAGCAAACCGTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTG GGCGGCGTGCTGGCGTGCTATAGCCTGCTGGTGACC GTGGCGTTTATTATTTTTTGGGTGCGCAGCAAACGCA GCCGCTGCTGCATAGCGATTATATGAACATGACCCC GCGCCGCCCGGGCCCGACCCGCAAACATTATCAGCC GTATGCGCCGCCGCGCGATTGCGGCGTATCGCAG C	70
CD28 людини	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLS KYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQV YSKTGFNCDGKLGNESVTFYLNLYVNQTDIYFCKIEVM YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVL VVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	71
CD28 миші	ATGACCCTGCGCCTGCTGTTTCTGGCGCTGAACCTTT TTAGCGTGACGGTGACCGAAAAACAAATTCTGGTGAA ACAGAGCCCGCTGCTGGTGGTGGATAGCAACGAAGT GAGCCTGAGCTGCCGCTATAGCTATAACCTGCTGGC GAAAGAATTTGCGCGCAGCCTGTATAAAGGCGTGAAC AGCGATGTGGAAGTGTGCGTGGGCAACGGCAACTTT ACCTATCAGCCGCAGTTTCGCAGCAACGCGGAATTTA ACTGCGATGGCGATTTTGATAACGAAACCGTGACCTT TCGCCTGTGGAACCTGCATGTGAACCATAACCGATATT TATTTTTGCAAAATTGAATTTATGTATCCGCCGCCGTA TCTGGATAACGAACGCAGCAACGGCACCATTATTCAT ATTAAGAAAAACATCTGTGCCATACCCAGAGCAGCC CGAAACTGTTTTGGGCGCTGGTGGTGGTGGCGGGCG TGCTGTTTTGCTATGGCCTGCTGGTGACCGTGGCGCT GTGCGTGATTTGGACCAACAGCCGCCGCAACCGCCT GCTGCAGAGCGATTATATGAACATGACCCCGCGCCG	72

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
	CCCGGGCCTGACCCGCAAACCGTATCAGCCGTATGC GCCGGCGCGCGATTTTGC GGCGTATCGCCCG	
CD28 миші	MTLRLLFLALNFFSVQVTENKILVKQSPLLVVDSNEVSLS CRYSYNLLAKEFRASLYKGVNSDVEVCVGNNGNFTYQPQ FRSNAEFNCDGDFDNETVTFRLWNLHVNHDIYFCKIEF MYPPPYLDNERSNGTIIHIKEKHLCHTQSSPKLFWALVVV AGVLCYGLLVTVLALCVIWTNSRRNRLLQSDYMNMTPR RPGLTRKPYQPYAPARDFAAAYRP	73
CD137 людини	ATGGGAAACAGCTGTTACAACATAGTAGCCACTCTGT TGCTGGTCCTCAACTTTGAGAGGACAAGATCATTGCA GGATCCTTGTAGTAACTGCCAGCTGGTACATTCTGT GATAATAACAGGAATCAGATTTGCAGTCCCTGTCTC CAAATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTG TGACATATGCAGGCAGTGTAAGGTGTTTTCAGGACC AGGAAGGAGTGTTCTCCACCAGCAATGCAGAGTGT GACTGCACTCCAGGGTTTTCACTGCCTGGGGGCAGGA TGCAGCATGTGTGAACAGGATTGTAAACAAGGTCAAG AACTGACAAAAAAGGTTGTAAAGACTGTTGCTTTGG GACATTTAACGATCAGAAACGTGGCATCTGTGACCC TGGACAACTGTTCTTTGGATGGAAAGTCTGTGCTTG TGAATGGGACGAAGGAGAGGGACGTGGTCTGTGGAC CATCTCCAGCCGACCTCTCTCCGGGAGCATCCTCTGT GACCCCGCCTGCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACTC TCCGCAGATCATCTCCTTCTTTCTTGCGCTGACGTG ACTGCGTTGCTCTTCCTGCTGTTCTTCCTCACGCTCC GTTTCTCTGTTGTAAACGGGGCAGAAAGAACTCCT GTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAA CTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCC AGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGTGA	74
CD137 людини	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDN NRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK KGCKDCCFGTFNDQKRIGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISF FLALTSTALLFLLFFLTRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	75
CD137 миші	ATGGGCAACAACCTGCTATAACGTGGTGGTGATTGTGC TGCTGCTGGTGGGCTGCGAAAAAGTGGGCGCGGTGC AGAACAGCTGCGATAACTGCCAGCCGGGCACCTTTTG CCGCAAATATAACCCGGTGTGCAAAAGCTGCCCGCC GAGCACCTTTAGCAGCATTGGCGGCCAGCCGAACTG CAACATTTGCCGCGTGTGCGCGGGCTATTTTCGCTTT AAAAAATTTTGAGCAGCACCCATAACGCGGAATGCG AATGCATTGAAGGCTTTCATTGCCTGGGCCCCGAGTG CACCCGCTGCGAAAAAGATTGCCGCCCGGGCCAGGA ACTGACCAAACAGGGCTGCAAAACCTGCAGCCTGGG CACCTTTAACGATCAGAACGGCACCGGCGTGTGCCG CCCGTGGACCAACTGCAGCCTGGATGGCCGCAGCGT GCTGAAAACCGGCACCACCGAAAAAGATGTGGTGTG CGGCCCCGCGGTGGTGAGCTTTAGCCCGAGCACCCAC CATTAGCGTGACCCCGGAAGGCGGCCCGGGCGGCC ATAGCCTGCAGGTGCTGACCCTGTTTCTGGCGCTGAC CAGCGCGCTGCTGCTGGCGCTGATTTTATTACCCTG CTGTTTAGCGTGCTGAAATGGATTTCGAAAAAATTTCC GCATATTTTAAACAGCCGTTTAAAAAACCCAGGCG CGGCGCAGGAAGAAGATGCGTGAGCTGCCGCTGCC CGCAGGAAGAAGAAGGCGGCGGCGGCGGCTATGAA	76

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
	CTG	
CD137 миші	MGNNCYNVVVIVLLLVGCEKVGAVQNSCDNCQPGTFCR KYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNCNICRVCAGYFRFKKFC SSTHNAECECIEGFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQG CKTCSLGTENDQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTT EKDVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLLQVLTFL ALTSALLLALIFITLLFSVLKWIRKKFPHIFKQPFKKTGAA QEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL	77
OX40 людини	ATGTGCGTGGGCGCGCGCCGCTGGGCCGCGGCC GTGCGCGCGCTGCTGCTGCTGGGCCCTGGGCCTGA GCACCGTGACCGGCCTGCATTGCGTGGGCGATACCT ATCCGAGCAACGATCGCTGCTGCCATGAATGCCGCC CGGGCAACGGCATGGTGAGCCGCTGCAGCCGCGAG CAGAACACCGTGTGCGCGCCCGTGCAGCCCGGGCTTT TATAACGATGTGGTGAGCAGCAAACCGTGCAAACCGT GCACCTGGTGCAACCTGCGCAGCGGCAGCGAACGCA AACAGCTGTGCACCGCGACCCAGGATACCGTGTGCC GCTGCCGCGCGGGCACCCAGCCGCTGGATAGCTATA AACCGGGCGTGGATTGCGCGCCGTGCCCGCCGGGC CATTTTAGCCCGGGCGATAACCAGGCGTGCAAACCGT GGACCAACTGCACCCTGGCGGGCAAACATACCCTGC AGCCGGCGAGCAACAGCAGCGATGCGATTTGCGAAG ATCGCGATCCGCCGGCGACCCAGCCGCGAGGAAACCC AGGGCCCGCCGGCGCGCCCGATTACCGTGACGCCG ACCGAAGCGTGGCCGCGCACCCAGCCAGGGCCCGAG CACCCGCCCGGTGGAAGTGCCGGGCGGCCGCGCGG TGCGGGCGATTCTGGGCCCTGGGCCTGGTGCTGGGCC TGCTGGGCCCGCTGGCGATTCTGCTGGCGCTGTATC TGCTGCGCCGCGATCAGCGCCTGCCGCCGGATGCGC ATAAACCGCCGGGCGGGCGGCAGCTTTCGACCCCGA TTCAGGAAGAACAGGCGGATGCGCATAGCACCCCTGG CGAAAATT	78
OX40 людини	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPS NDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYND VVSSKPCPKCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTCVCRRA GTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCT LAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPI TVQPTAEWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVL GLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQE EQADAHSTLAKI	79
OX40 миші	ATGTATGTGTGGGTGCAGCAGCCGACCGCGCTGCTG CTGCTGGCGCTGACCCTGGGCGTGACCGCGCGCCG CCTGAACCTGCGTGAAACATACCTATCCGAGCGGCCAT AAATGCTGCCGCGAATGCCAGCCGGGCCATGGCATG GTGAGCCGCTGCGATCATAACCCGCGATACCCTGTGC CATCCGTGCGAAACCGGCTTTTATAACGAAGCGGTGA ACTATGATACCTGCAAACAGTGACCCAGTGCAACCA TCGCAGCGGCAGCGAACTGAAACAGAACTGCACCCC GACCCAGGATACCGTGTGCCGCTGCCGCCCGGGCAC CCAGCCGCGCCAGGATAGCGGCTATAAACTGGGCGT GGATTGCGTGCCGTGCCCGCCGGGCCATTTTAGCCC GGGCAACAACCAGGCGTGCAAACCGTGGACCAACTG CACCTGAGCGGCAAACAGACCCGCCATCCGGCGAG CGATAGCCTGGATGCGGTGTGCGAAGATCGCAGCCT GCTGGCGACCCCTGCTGTGGGAAACCCAGCGCCCGAC CTTTCGCCCAGCACCGTGCAGAGCACCAACCGTGTG GCCGCGCACCGAGCGAACTGCCGAGCCCGCCGACCCCT	80

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
	GGTGACCCCGGAAGGCCCGCGTTTGCGGTGCTGCTGGGCTGGGCCTGGGCCTGCTGGCGCCGCTGACCGTGCTGCTGGCGCTGTATCTGCTGCGCAAAGCGTGCGCCTGCCGAACACCCCGAAACCGTGCTGGGGCAACAGCTTTCGCACCCCGATTGAGGAAGAACATACCGATGCGCATTTTACCCTGGCGAAAATT	
OX40 миші	MYVWVQQPTALLLLALTGLVTARRLNKCVKHTYPSGHKCCRECPGHGMVSRCDHTRDTLCHPCETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCPTQDTCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDVCPGPHGFSPGNNQACKPWTNCTLSGKQTRHPASDSLDAVCEDRSLLATLLWETQRPTFRPTTVQSTTVWPRTSELPSPPTLVTPGPAFAVLLGLGLLLAPLTVLLALYLLRKAWRLPNTPKPCWGNFRTPIQEEHTDAHFTLAKI	81
ICOS людини	ATGAAAAGCGGCCTGTGGTATTTTTTCTGTTTTGCCTGCGCATTAAGTGCTGACCGGCGAAATTAACGGCAGCGCGAACTATGAAATGTTTATTTTTCATAACGGCGGCGTGCGAGATTCTGTGCAAATATCCGGATATTGTGCAGCAGTTTAAAATGCAGCTGCTGAAAGGCGGCCAGATTCTGTGCGATCTGACCAAAACCAAAGGCAGCGGCAACACCGTGAGCATTAAAAGCCTGAAATTTTGCATAGCCAGCTGAGCAACAACAGCGTGAGCTTTTTTCTGTATAACCTGGATCATAGCCATGCGAACTATTATTTTGAACCTGAGCATTTTTGATCCGCCGCCGTTTAAAGTGACCCTGACCGCGCGCTATCTGCATATTTATGAAAGCCAGCTGTGCTGCCAGCTGAAATTTTGGCTGCCGATTGGCTGCGCGCGCTTTGTGGTGGTGTGCATTCTGGGCTGCATTCTGATTTGCTGGCTGACCAAAAAAAAAATATAGCAGCAGCGTGCATGATCCGAACGGCGAATATATGTTTATGCGCGCGGTGAACACCGCGAAAAAAAGCCGCCTGACCGATGTGACCCTG	82
ICOS людини	MKSGLWYFFLFCLRIKVL TGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDSHANYFCNLSIFDPPPKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPICAAAFVVVCILGCLICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL	83
ICOS миші	ATGAAACCGTATTTTTGCCGCGTGTTTGTGTTTTGCTTTCTGATTGCGCTGCTGACCGGCGAAATTAACGGCAGCGCGATCATCGCATGTTTAGCTTTTCATAACGGCGGCGTGCGAGATTAGCTGCAAATATCCGGAACCGTGCGAGCAGCTGAAAATGCGCCTGTTTCGCGAACGCGAAGTGCTGTGCGAACTGACCAAAACCAAAGGCAGCGGCAACGCGGTGAGCATTAAAACCCGATGCTGTGCCTGTATCATCTGAGCAACAACAGCGTGAGCTTTTTTCTGAACAACCCGGATAGCAGCCAGGGCAGCTATTATTTTGCAGCCTGAGCATTTTTGATCCGCCGCCGTTTCAGGAACGCAACCTGAGCGGCGGCTATCTGCATATTTATGAAAGCCAGCTGTGCTGCCAGCTGAAACTGTGGCTGCCGGTGGGCTGCGCGGCGTTTGTGGTGGTGTGCTGCTGTTTGGCTGCA TTCTGATTATTTGTTTAGCAAAAAAAAAATATGGCAGCAGCGTGCATGATCCGAACAGCGAATATATGTTTATGCGCGGTGAACACCAACAAAAAAGCCGCCTGGCGGCGGTGACCAGC	84
ICOS миші	MKPYFCRVFVFCFLIRLLTGEINGSADHRMFSFHNGGVQISCKYPETVQQLKMRLFREREVLCELTKTKGSGNAVSIKNPMLCLYHLSNNSVSFFLNNPDSSQGSYYFCSLSIFDPP	85

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
	PFQERNLSGGYLHIYESQLCCQLKLWLPVGCAAFVVLL FGCILIIWFSSKKYGGSSVHDPNSEYMFMAAVNTNKK SRL AGVTS	
DAP10 людини	ATGATTTCATCTGGGCCATATTCTGTTTCTGCTGCTGCT GCCGGTGGCGGGCGGCGCAGACCACCCCGGGCGAAC GCAGCAGCCTGCCGGCGTTTTATCCGGGCACCAGCG GCAGCTGCAGCGGCTGCGGCAGCCTGAGCCTGCCG CTGCTGGCGGGCCTGGTGGCGGCGGATGCGGTGGC GAGCCTGCTGATTGTGGGCGCGGTGTTTCTGTGCGC GCGCCCGCGCCGAGCCCGGCGCAGGAAGATGGCA AAGTGTATATTAACATGCCGGGCCGCGGC	86
DAP10 людини	MIHLGHILFLLLLPVAQAQTTPGERSSLPAYFGTSGSCS GCGSLSLPLLALGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPA QEDGKVYINMPGRG	87
DAP10 миші	ATGGATCCGCCGGGCTATCTGCTGTTTCTGCTGCTGCT TGCCGGTGGCGGCGAGCCAGACCAGCGCGGGCAGC TGCAGCGGCTGCGGCACCCTGAGCCTGCCGCTGCTG GCGGGCCTGGTGGCGGCGGATGCGGTGATGAGCCT GCTGATTGTGGGCGTGGTGTGTTGTGTCATGCGCCC GCATGGCCGCGCGGCGCAGGAAGATGGCCGCGTGT ATATTAACATGCCGGGCCGCGGC	88
DAP10 миші	MDPPGYLLFLLLLPVAASQTSAGSCSGCGTSLPLLAGL VAADAVMSLLIVGVVFCMRPHGRPAQEDGRVYINMPG RG	89
DAP12 людини	ATGGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGCTCCTGCTC CTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCTCTG TCCAGGCCCCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTA CGGTGAGCCCGGGCGTGTGCTGGCAGGGATCGTGATG GGAGACCTGGTGTGCTGACAGTGCTCATTGCCCTGGCC GTGTACTTCTGGGCCGCTGGTCCCTCGGGGGCGA GGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAACAGCGTAT CACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGG TCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAACACACAG AGGCCGTATTACAAATGA	90
DAP12 людини	MGGLEPCSRLLLLPLLA VSGLRPVQAQAQSDCSCSTV SPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAEEA ATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK	91
DAP12 миші	ATGGGGGCTCTGGAGCCCTCCTGGTGCCTTCTGTTT CTTCTGTCTCCTGACTGTGGGAGGATTAAGTCCCG TACAGGCCCAGAGTGACACTTTCCCAAGATGCGACTG TTCTTCCGTGAGCCCTGGTGTACTGGCTGGGATTGTT CTGGGTGACTTGGTGTGACTCTGCTGATTGCCCTGG CTGTGTACTCTCTGGGCCGCTGGTCTCCCGAGGTC AAGGGACAGCGGAAGGGACCCGGAACAACACATTG CTGAGACTGAGTCGCCTTATCAGGAGCTTCAGGGTCA GAGACCAGAAGTATACAGTGACCTCAACACACAGAGG CAATATTACAGATGA	92
DAP12 миші	MGALEPSWCLLFLPVLLTVGGLSPVQAQSDTFPRDCS SVSPGVLAGIVLGDVLTLLIALAVYSLGRLVSRGQGTAE GTRKQHIAETESPYQELQGQRPEVYSDLNTQRRYYR	93
CD3z людини	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFI YGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	94
CD3z людини	ATGAAGTGGAAGGCGCTTTTACCCGCGGCCATCCTG CAGGCACAGTTGCCGATTACAGAGGCACAGAGCTTTG	95

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
	GCCTGCTGGATCCCAAACCTCTGCTACCTGCTGGATGG AATCCTCTTCATCTATGGTGTCACTTCTCACTGCCTTGT TCCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAGCCCC CCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACG AGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG GAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGT ACAATGAACTGCAGAAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTA CAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGG GCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCA GGCCCTGCCCCCTCGCTAA	
CD3z миші	MKWKVSVLACILHVRFPGAEAQSFGLLDPKLCYLLDGIL FIYGVITALLYLRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGR REEYDVLEKKRARDPEMGGKQQRNRNPQEGVYNALQK DKMAEAYSEIGTKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYD ALHMQTLAPR	96
CD3z миші	ATGAAGTGGAAGTGTCTGTTCTCGCCTGCATCCTCC ACGTGCGGTTCCCAGGAGCAGAGGCACAGAGCTTTG GTCTGCTGGATCCCAAACCTCTGCTACTTGTAGATGG AATCCTCTTCATCTACGGAGTCATCATCAGCCCTGT ACCTGAGAGCAAAATTCAGCAGGAGTGCAGAGACTG CTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTACAATGA GCTCAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATATGACGTCTTG GAGAAGAAGCGGGCTCGGGATCCAGAGATGGGAGG CAAACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCGAGGAAGGCGT ATACAATGCACTGCAGAAAGACAAGATGGCAGAAGCC TACAGTGAGATCGGCACAAAAGGCGAGAGGCGGAGA GGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGC ACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGC AGACCCTGGCCCCCTCGCTAA	97
FCGR3A людини	MWQLLLPTALLLVSAAGMRTECLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCGAYSPEDNSTQWFHNESSLISSQASSYFID AATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPR WVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHH NSDFYIPKATLKDGSYFCRGLFGSKNVSSSETVNITITQG LAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDGLYFSVKTNL RSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK	98
FCGR3A людини	ATGTGGCAGCTGCTGCTGCCGACCGCGCTGCTGCTG CTGGTGAGCGCGGGCATGCGCACCGAAGATCTGCCG AAAGCGGTGGTGTCTTCTGGAACCGCAGTGGTATCGC GTGCTGGAAGAAAGATAGCGTGACCTGAAATGCCAG GGCGCGTATAGCCCGGAAGATAACAGCACCCAGTGG TTTCATAACGAAAGCCTGATTAGCAGCCAGGCGAGCA GCTATTTTATTGATGCGGCGACCGTGGATGATAGCGG CGAATATCGCTGCCAGACCAACCTGAGCACCTGAG CGATCCGGTGAGCTGGAAGTGCATATTGGCTGGCT GCTGCTGCAGGCGCCGCGCTGGGTGTTTAAAGAAGA AGATCCGATTATCTGCGCTGCCATAGCTGGAAAAAC ACCGCGCTGCATAAAGTGACCTATCTGCAGAACGGCA AAGGCCGCAATATTTTCATCATAACAGCGATTTTAT ATTCCGAAAGCGACCCCTGAAAGATAGCGGCAGCTATT TTTGCCGCGGCCTGTTTGGCAGCAAAAACGTGAGCA GCGAAACCGTGAACATTACCATTAACCCAGGGCCTGGC GGTGAGCACCATTAGCAGCTTTTTTCCGCCGGGCTAT CAGGTGAGCTTTTGCCTGGTGATGGTGCTGCTGTTTG CGGTGGATACCGGCCTGTATTTTAGCGTGAAAACCAA	99

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
	CATTTCGCAGCAGCACCCGCGATTGGAAAGATCATAAA TTTAAATGGCGCAAAGATCCGCAGGATAAA	
FCGR3A миші	MFQNAHSGSQWLLPPLTILLFADFADRSAAALPKAVVKL DPPWIIQVLKEDMVTLMCEGTHNPGNSSTQWFHNGRSI RSQVQASYTfKATVNDSGEYRCQMEQTRLSDPVDLGI SDWLLLQTPQRFVLEGETITLRCHSWRNKLLNRISFFHN EKSVRYHHYKSNFSIPKANHSHSGDYCKGSLGSTQHQ SKPVTITVQDPATTSSISLVWYHTAFSLVMCLLFAVDGL YFYVRRNLQTPREYWRKSLIRKHQAPQDK	100
FCGR3A миші	ATGTTTCAGAATGCACACTCTGGAAGCCAATGGCTAC TTCCACCACTGACAATTCTGCTGCTGTTTGCTTTTGCA GACAGGCAGAGTGCAGCTCTTCCGAAGGCTGTGGTG AAACTGGACCCCCCATGGATCCAGGTGCTCAAGAA GACATGGTGACACTGATGTGCGAAGGGACCCACAAC CCTGGGAACCTCTTCTACCCAGTGTTCCACAACGGGA GGTCCATCCGGAGCCAGGTCCAAGCCAGTTACACGT TTAAGGCCACAGTCAATGACAGTGGAGAATATCGGTG TCAAATGGAGCAGACCCGCTCAGCGACCCCTGTAGAT CTGGGAGTGATTTCTGACTGGCTGCTGCTCCAGACCC CTCAGCGGGTGTTTCTGGAAGGGGAAACCATCACGC TAAGGTGCCATAGCTGGAGGAACAACTACTGAACAG GATCTCATTCTTCCATAATGAAAAATCCGTGAGGTATC ATCACTACAAAAGTAATTTCTCTATCCCAAAAGCCAAC CACAGTCACAGTGGGGACTACTACTGCAAAGGAAGTC TAGGAAGTACACAGCACCAAGTCCAAGCCTGTCACCAT CACTGTCCAAGATCCAGCAACTACATCCTCCATCTCT CTAGTCTGGTACCACACTGCTTTCTCCCTAGTGATGT GCCTCCTGTTTGCAGTGGACACGGGCCTTTATTTCTA CGTACGGAGAAATCTTCAAACCCCGAGGGAGTACTG GAGGAAGTCCCTGTCAATCAGAAAGCACCAGGCTCCT CAAGACAAGTGA	101
NKG2D людини	MGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQK QRCPVVKSKCRENASPFFFCFIAVAMGIRFIIMVAIWSA VFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFD ESKNWYESQASCM SQNASLLKVYSKEDQDLLKLKVS YH WMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGD CALY ASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV	102
NKG2D людини	ATGGGCTGGATTGCGGGCCGCGCAGCCGCCATAGC TGGGAAATGAGCGAATTTTATAACTATAACCTGGATCT GAAAAAAGCGATTTTAGCACCCGCTGGCAGAAACAG CGCTGCCCCGGTGGTGAAAAGCAAATGCCGCGAAAAC GCGAGCCCGTTTTTTTTTTGCTGCTTTATTGCGGTGG CGATGGGCATTGCTTTATTATTATGGTGGCGATTTG GAGCGCGGTGTTTCTGAACAGCCTGTTTAACCAGGAA GTGCAGATTCCGCTGACCGAAAGCTATTGCGGCCCCG TGCCCGAAAAACTGGATTTGCTATAAAAACTGCTA TCAGTTTTTTGATGAAAGCAAAACTGGTATGAAAGCC AGGCGAGCTGCATGAGCCAGAACGCGAGCCTGCTGA AAGTGTATAGCAAAGAAGATCAGGATCTGCTGAAACT GGTGAAGAGCTATCATTGGATGGGCCTGGTGCATATT CCGACCAACGGCAGCTGGCAGTGGGAAGATGGCAGC ATTCTGAGCCCGAACCTGCTGACCATTATTGAAATGC AGAAAGGCGATTGCGCGCTGTATGCGAGCAGCTTTAA AGGCTATATTGAAACTGCAGCACCCCGAACACCTAT ATTTGCATGCAGCGCACCGTG	103
NKG2D миші	MALIRDRKSHHSEMSKCHNYDLKPAKWDTSQEQKQR LALTTSQPGENGIIRGRYPKIEKLKISPMFVVRVLAIALAIRF	104

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
	TLNTLMWLAIFKETFPVLCNKEVPVSSREGYCGPCPN NWICHRNNCYQFFNEEKTWNQSQASCLSQNSSLLKIYS KEEQDFLKLVKSYHWMGLVQIPANGSWQWEDGSSLSY NQLTLVEIPKGSACVYGSSFKAYTEDCANLNTYICMKRA V	
NKG2D миші	ATGGCGCTGATTGCGGATCGCAAAAGCCATCATAGCG AAATGAGCAAATGCCATAACTATGATCTGAAACCGGC GAAATGGGATACCAGCCAGGAACAGCAGAAACAGCG CCTGGCGCTGACCACCAGCCAGCCGGGCGAAACGG CATTATTCGCGGCCGCTATCCGATTGAAAACTGAAA ATTAGCCCGATGTTTGTGGTGCGCGTGCTGGCGATTG CGCTGGCGATTGCTTTACCCTGAACACCCTGATGTG GCTGGCGATTTTTAAAGAAACCTTTCAGCCGGTGCTG TGCAACAAAGAAGTGCCGGTGAGCAGCCGCGAAGGC TATTGCGGCCCGTGCCCGAACAACCTGGATTTGCCATC GCAACAACCTGCTATCAGTTTTTTAACGAAGAAAAACC TGGAACCAGAGCCAGGCGAGCTGCCTGAGCCAGAAC AGCAGCCTGCTGAAAATTTATAGCAAAGAAGAACAGG ATTTTCTGAACTGGTGAAAAGCTATCATTGGATGGG CCTGGTGAGATTCCGGCGAACGGCAGCTGGCAGTG GGAAGATGGCAGCAGCCTGAGCTATAACCAGCTGAC CCTGGTGGAATTCCGAAAGGCAGCTGCGCGGTGTA TGGCAGCAGCTTTAAAGCGTATACCGAAGATTGCGCG AACCTGAACACCTATATTTGCATGAAACGCGCGGTG	105
CD28 YMNM	YMNM	106
CD28 PYAP	PYAP	107
CD28 FMNM	FMNM	108
CD28 AYAA	AYAA	109
Сигнальний пептид	ATMGWSCIILFLVATATGVHS	110
Послідовність ДНК сигнального пептиду	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAA CAGCTACCGGTGTGCACTCC	111
Анти-CD20 (GA101) важкий ланцюг	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWV RQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARNVFDGYWLVYWGG GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	112
Анти-CD20 (GA101) легкий ланцюг	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHSNGITYLYW YLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCAQNLLELPYTFGGGTGKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	113
Анти-FAP(4B9) PGLALA важкий ланцюг	EVQLLESGLGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS	114

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
	VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Анти-FAP(4B9) легкий ланцюг	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	115
Анти-CEA (A5B7) важкий ланцюг	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWRQAPGKGLEWVGFIIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDRLRFYFDYWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	116
Анти-CEA (A5B7) легкий ланцюг	QAVLTQPASLSASPGASALTCTLRGINVGAYSIIWYQKQPGSPQYLLRYKSDSDKQSGVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSGASAVFGGKTTLVLRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	117
Анти-CEA (T84.66LCHA) важкий ланцюг	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFNIKDTYIMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	118
Анти-CEA (T84.66LCHA) легкий ланцюг	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQKPGQAPRLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	119
Анти-CEA (CH1A1A98/992F1) важкий ланцюг	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVFTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK	120

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
	SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Анти-CEA (CH1A1A98/992F1) легкий ланцюг	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASAAVGTYYVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASVYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	121
Анти-CEA (hMN14) PGLALA ланцюг важкий	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFDFTTYWMSWV RQAPGKGLEWIGIEHPDSSTINYAPSLKDRFTISRDNANK TLFLQMDSLRLPEDTGVYFCASLYFGFPWFAYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVF SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	122
Анти-CEA (hMN14) легкий ланцюг	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVGTSAWYQQ KPGKAPKLLIYWTSTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS LQPEDATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	123
Анти-TNC (2B10) PGLALA ланцюг важкий	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYGYAAYGAFDYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	124
Анти-TNC (2B10) легкий ланцюг	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIKNDLGWYQQ KPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPEDFATYYCLQNGLPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	125
Анти-HER2 (PER) PG LALA важкий ланцюг 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDV RQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDR SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	126
Анти-HER2 (PER) легкий ланцюг 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSGVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASVRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISL	127

Таблиця 12

Конструкція	Амінокислотна послідовність	SEQ ID NO
	QPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
Анти-HER2 (PER) PG LALA важкий ланцюг 2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDV RQAPGKGLEWVADVNPNSSGGSIYNQRFKGRFTLSVDR SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	128
Анти-HER2 (PER) легкий ланцюг 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	129
IgG ₁ Fc людини	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	130

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- 5 <110> Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ
 <120> ПОЛІПШЕНІ АНТИГЕНЗВ'ЯЗУЮЧІ РЕЦЕПТОРИ
 <130> P34178
 10 <160> 130
 <170> PatentIn version 3.5
 15 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 20 <220>
 <223> Anti-P329G CDR H1 Kabat
 <400> 1
 Arg Tyr Trp Met Asn
 25 1 5

<210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 5
 <220>
 <223> Anti-P329G CDR H2 Kabat
 <400> 2
 10
 Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Asp
 15
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-P329G CDR H3 Kabat
 25 <400> 3
 Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser
 1 5 10
 30 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 35 <220>
 <223> Anti-P329G CDR L1 Kabat
 <400> 4
 40 Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-P329G CDR L2 Kabat
 50 <400> 5
 Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 1 5
 55 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 60

<220>

<223> Anti-P329G CDR L3 Kabat

<400> 6

5

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val

1 5

<210> 7

10

<211> 433

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

15

<223> Anti-P329G-ds-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD fusion pETR17096

<400> 7

20

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

25

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu

50 55 60

30

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

35

85 90 95

Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly

100 105 110

40

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr

130 135 140

45

Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr

145 150 155 160

Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp

50

165 170 175

Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr

180 185 190

55

Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile

195 200 205

Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu

210 215 220

60

Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly
225 230 235 240

5 Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Phe Trp Val
245 250 255

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
260 265 270

10 Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
275 280 285

His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
290 295 300

15 Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
305 310 315 320

Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
20 325 330 335

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
340 345 350

25 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
355 360 365

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
370 375 380

30 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
385 390 395 400

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
35 405 410 415

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
420 425 430

40 Arg

<210> 8
<211> 119
45 <212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Anti-P329G-ds VH

50 <400> 8

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

55 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
60 35 40 45

Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 50 55 60
 5 Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 10 Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 15 115
 <210> 9
 <211> 109
 <212> PRT
 20 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-P329G-ds VL
 25 <400> 9
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 30 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 40 65 70 75 80
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 45 His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 10
 <211> 248
 50 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-P329G-ds-scFv
 55 <400> 10
 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 60

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
5 35 40 45

Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
10 65 70 75 80

Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
15 85 90 95

Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
20 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
130 135 140

Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr
25 145 150 155 160

Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
30 165 170 175

Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr
180 185 190

Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile
35 195 200 205

Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu
210 215 220

Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly
40 225 230 235 240

Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
245

45
<210> 11
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial sequence

50
<220>
<223> CD28ATM

55
<400> 11

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
60 20 25

<210> 12
 <211> 41
 <212> PRT
 5 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> CD28CSD

 10 <400> 12

 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15

 15 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30

 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40
 20
 <210> 13
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 25
 <220>
 <223> CD3zSSD

 <400> 13
 30
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 35 20 25 30

 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45

 40 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60

 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 45
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95

 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 50 100 105 110

 <210> 14
 <211> 180
 <212> PRT
 55 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> CD28ATM-CD28-CD3z

 60 <400> 14

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 1 5 10 15
 5 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
 20 25 30
 Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
 35 40 45
 10 Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
 50 55 60
 Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 15 65 70 75 80
 Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 85 90 95
 20 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
 100 105 110
 Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 115 120 125
 25 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 130 135 140
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 30 145 150 155 160
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 165 170 175
 35 Leu Pro Pro Arg
 180
 <210> 15
 <211> 238
 40 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> eGFP
 45 <400> 15
 Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15
 50 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 55 35 40 45
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 50 55 60
 60 Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln

	65	70	75	80
	His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg			
	85	90	95	
5	Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val			
	100	105	110	
10	Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile			
	115	120	125	
	Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn			
	130	135	140	
15	Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly			
	145	150	155	160
	Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val			
	165	170	175	
20	Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro			
	180	185	190	
	Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser			
25	195	200	205	
	Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val			
	210	215	220	
30	Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys			
	225	230	235	
	<210> 16			
	<211> 20			
35	<212> PRT			
	<213> Artificial sequence			
	<220>			
	<223> (G4S)4 linker			
40	<400> 16			
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
	1	5	10	15
45	Gly Gly Gly Ser			
	20			
	<210> 17			
50	<211> 5			
	<212> PRT			
	<213> Artificial sequence			
	<220>			
55	<223> G4S linker			
	<400> 17			
	Gly Gly Gly Gly Ser			
60	1	5		

<210> 18
 <211> 19
 <212> PRT
 5 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> T2A linker

 10 <400> 18

 Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn
 1 5 10 15

 15 Pro Gly Pro

 <210> 19
 <211> 1356
 20 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Anti-P329G-ds-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD fusion pETR17096
 25
 <400> 19
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgag 60

 gtgaagctgc tggagagcgg cgggcgccctg gtgcagcccg gcggcagcct gaagctgagc 120
 30 tgcgccgccca gcggcttcga cttcagcagg tactggatga actgggtgag gcaggccccc 180
 ggcaagtgtc tggagtggat cggcgagatc acccccgaca gcagcaccat caactacacc 240
 35 cccagcctga aggacaagtt catcatcagc agggacaacg ccaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgatca aggtgaggag cgaggacacc gccctgtact actgcgtgag gccctacgac 360
 tacggcgccct ggttcgccag ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cgccggaggg 420
 40 ggcggaagtg gtggcggggg aagcggcggg ggtggcagcg gagggggcgg atctcaggcc 480
 gtggtgacct aggagagcgc cctgaccacc agccccggcg agaccgtgac cctgacctgc 540
 45 aggagcagca ccggcgccgt gaccaccagc aactacgcca actgggtgca ggagaagccc 600
 gaccacctgt tcaccggcct gatcggcggc accaacaaga gggcccccg cggtcccgcc 660
 aggttcagcg gcagcctgat cggcgacaag gccgccctga ccatcaccgg cgcccagacc 720
 50 gaggacgagg ccatctactt ctgcgccctg tggtagagca accactgggt gttcggctgt 780
 ggcaccaagc tgaccgtgct gggagggggc ggatccttct ggggtgctgt ggtggtgggc 840
 55 ggcgtgctgg cctgctacag cctgctggtg accgtggcct tcacatctt ctgggtgagg 900
 agcaagagga gcaggctgct gcacagcgac tacatgaaca tgacccccag gaggcccggc 960
 cccaccagga agcactacca gccctacgcc cccccaggg acttcgccgc ctacaggagc 1020
 60

agggtgaagt tcagcaggag cgccgacgcc cccgcctacc agcagggcca gaaccagctg 1080
tataacgagc tgaacctggg caggagggag gactacgacg tgctggacaa gaggaggggc 1140
5 agggaccccc agatgggagg caagcccagg aggaagaacc ccaggaggg cctgtataac 1200
gagctgcaga aggacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagagg 1260
aggaggggca agggccacga cggcctgtac cagggcctga gcaccgccac caaggacacc 1320
10 tacgacgcc tgcacatgca ggccctgcc cccagg 1356
<210> 20
<211> 357
15 <212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Anti-P329G-ds VH
20 <400> 20
gaggtgaagc tgctggagag cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggcag cctgaagctg 60
agctgcgccg ccagcggcct cgacttcagc aggtactgga tgaactgggt gaggcaggcc 120
25 cccggcaagt gtctggagtg gatcggcgag atcaccgccg acagcagcac catcaactac 180
acccccagcc tgaaggacaa gtatcatc agcagggaca acgccaagaa caccctgtac 240
30 ctgcagatga tcaaggtag gagcaggac accgccctgt actactcgt gaggcctac 300
gactacggcg cctggttcgc cagctggggc cagggcaccc tggtagcgt gagcgcc 357
<210> 21
35 <211> 327
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
40 <223> Anti-P329G-ds VL
<400> 21
caggccgtgg tgaccagga gagcgccctg accaccagcc ccggcgagac cgtgaccctg 60
45 acctgcagga gcagcaccgg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggag 120
aagcccgacc acctgtcac cggcctgatc ggcggcacca acaagagggc ccccggcgtg 180
cccgccaggt tcagcggcag cctgatcggc gacaaggccg ccctgacat caccggcgcc 240
50 cagaccgagg acgaggccat ctactctgc gccctgtgtt acagcaacca ctgggtgttc 300
ggctgtggca ccaagctgac cgtgctg 327
55 <210> 22
<211> 799
<212> DNA
<213> Artificial sequence
60 <220>

<223> Anti-P329G-ds-scFv

<400> 22

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccgggtg gcattccgag 60
5 gtgaagctgc tggagagcgg cgggcgccctg gtgcagcccg gcggcagcct gaagctgagc 120
tgcgccgcca gcggcttcga cttcagcagg tactggatga actgggtgag gcaggccccc 180
10 ggcaagtgtc tggagtggat cggcgagatc acccccgaca gcagcaccat caactacacc 240
cccagcctga aggacaagtt catcatcagc agggacaacg ccaagaacac cctgtacctg 300
cagatgatca aggtgaggag cgaggacacc gccctgtact actgcgtgag gccctacgac 360
15 tacggcgccct ggttcgccag ctgggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cgccggaggg 420
ggcgggaagtg gtggcggggg aagcggcggg ggtggcagcg gagggggcgg atctcaggcc 480
20 gtggtgacct aggagagcgc cctgaccacc agccccggcg agaccgtgac cctgacctgc 540
aggagcagca cgggcgcctg gaccaccagc aactacgcca actgggtgca ggagaagccc 600
gaccacctgt tcaccggcct gatcgcgggc accaacaaga gggcccccg cggtcccgcc 660
25 aggttcagcg gcagcctgat cggcgacaag gccgccctga ccatcaccgg cgcccagacc 720
gaggacgagg ccatctactt ctgcgccctg tggtagagca accactgggt gttcggctgt 780
30 ggcaccaagc tgaccgtgc 799

<210> 23

<211> 647

<212> DNA

35 <213> Artificial sequence

<220>

<223> IRES EV71, internal ribosomal entry side

40 <400> 23

cccgaagtaa cttagaagct gtaaataaac gatcaatagc aggtgtggca caccagtcat 60
acctgatca agcacttctg ttccccgga ctgagtatca ataggctgct cgcgcggctg 120
45 aaggagaaaa cggtcgttac ccgaccaact acttcgagaa gcttagtacc accatgaacg 180
aggcaggggtg ttgcgtcag cacaacccca gtgtagatca ggctgatgag tcaatgcaac 240
cccatgggc gaccatggca gtggctgcgt tggcgccctg cccatggaga aatccatggg 300
50 acgctctaata tctgacatgg tgtgaagtgc ctattgagct aactggtagt cctccggccc 360
ctgattgcgg ctaatcctaa ctgcggagca catgctcaca aaccagtggg tgggtgtctg 420
55 taacgggcaa ctctgcagcg gaaccgacta ctttgggtgt ccgtgtttcc tttattcct 480
atattggctg cttatggtga caatcaaaaa gttgtacca tatagctatt ggattggcca 540
tccggtgtgc aacagggcaa ctgtttacct atttattggt ttgtacat tatcactgaa 600
60

gtctgtgatc actctcaaat tcattttgac cctcaacaca atcaaac 647

<210> 24
<211> 81
5 <212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> CD28ATM

10 <400> 24
tttgggtgc tgggtgggtg tgggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60

gcctttatta tttctgggt g 81

15 <210> 25
<211> 123
<212> DNA
<213> Artificial sequence

20 <220>
<223> CD28CSD

<400> 25
25 aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60

gggccacccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctaicgc 120

tcc 123

30 <210> 26
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial sequence

35 <220>
<223> CD3z SSD

<400> 26
40 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg tttggacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180

45 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctcga gtacagccac caaggacacc 300

50 tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

<210> 27
<211> 540
55 <212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> CD28ATM-CD28-CD3z

60 <400> 27

ttctgggtgc tgggtggtgt gggcggcgtg ctggcctgct acagcctgct ggtgaccgtg 60
 gccttcacatca tcttctgggt gaggagcaag aggagcaggc tgctgcacag cgactacatg 120
 5 aacatgaccc ccaggaggcc cggccccacc aggaagcact accagcccta cgtccccccc 180
 agggacttcg ccgcctacag gagcaggggtg aagttcagca ggagcgccga cgtccccgcc 240
 taccagcagg gccagaacca gctgtataac gagctgaacc tgggcaggag ggaggagtac 300
 10 gacgtgctgg acaagaggag gggcagggac cccgagatgg gcggcaagcc caggaggaag 360
 aacccccagg agggcctgta taacgagctg cagaaggaca agatggccga ggcctacagc 420
 15 gagatcgga tgaagggcga gaggaggagg ggcaagggcc acgacggcct gtaccagggc 480
 ctgagcaccg ccaccaagga cacctacgac gccctgcaca tgcaggccct gccccccagg 540
 <210> 28
 20 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 25 <223> T2A element
 <400> 28
 tccggagagg gcagaggaag tcttctaaca tgcggtgacg tggaggagaa tcccggccct 60
 30 agg 63
 <210> 29
 <211> 717
 <212> DNA
 35 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> eGFP
 40 <400> 29
 gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgccca tcttggtcga gctggacggc 60
 gacgtaaacg gccacaagti cagcgtgtcc ggcgagggcg agggcgatgc cacctacggc 120
 45 aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc 180
 gtgaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc ttcagccgct accccgacca catgaagcag 240
 caccgactct tcaagtccgc catgcccga ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc 300
 50 aaggacgacg gcaactacaa gacccgcgcc gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg 360
 aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag 420
 55 ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc 480
 atcaaggtag acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac 540
 cactaccagc agaacacccc catcgggcgc gggcccgctg tgctgccga caaccactac 600
 60

ctgagcacc cgtccgccct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg 660

ctggagtgcg tgaccgccgc cgggatcact ctggcatgg acgagctgta caagtga 717

5 <210> 30
 <211> 2136
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

10 <220>
 <223> Anti-P329G-ds-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD-eGFP fusion pETR17096

<400> 30
 atgggatgga gctgtatcat cctctcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgag 60

15 gtgaagctgc tggagagcgg cggcggcctg gtgcagcccg gcggcagcct gaagctgagc 120

tgccgcccca gcggcttcca cttcagcagg tactggatga actgggtgag gcaggccccc 180

20 ggcaagtgtc tggagtggat cggcgagatc acccccgaca gcagcaccat caactacacc 240

cccagcctga aggacaagtt catcatcagc agggacaacg ccaagaacac cctgtacctg 300

cagatgatca aggtgaggag cgaggacacc gccctgtact actgcgtgag gccctacgac 360

25 tacggcgctt ggttcgccag ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cgccggaggg 420

ggcgggaagt gtggcggggg aagcggcggg ggtggcagcg gagggggcgg atctcaggcc 480

30 gtggtgacct aggagagcgc cctgaccacc agccccggcg agaccgtgac cctgacctgc 540

aggagcagca ccggcgccgt gaccaccagc aactacgcca actgggtgca ggagaagccc 600

gaccacctgt tcaccggcct gatcggcggc accaacaaga gggcccccg cgtgcccgcc 660

35 aggttcagcg gcagcctgat cggcgacaag gccgccctga ccatcaccgg cgcccagacc 720

gaggacgagg ccatctactt ctgcgccctg tggtagca accactgggt gttcggctgt 780

40 ggcaccaagc tgaccgtgct gggagggggc ggtatcttct ggggtgctgt ggtggtgggc 840

ggcgtgctgg cctgctacag cctgctggtg accgtggcct tcatcatctt ctgggtgagg 900

agcaagagga gcaggctgct gcacagcgac tacatgaaca tgacccccag gagggccggc 960

45 cccaccagga agcactacca gccctacgcc cccccaggg acttcgccgc ctacaggagc 1020

aggggtgaagt tcagcaggag cgccgacgcc cccgcctacc agcagggcca gaaccagctg 1080

50 tataacgagc tgaacctggg caggagggag gagtacgacg tgctggacaa gaggaggggc 1140

agggaccccc agatgggcgg caagcccagg aggaagaacc ccaggaggg cctgtataac 1200

gagctgcaga aggacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagagg 1260

55 aggaggggca agggccacga cggcctgtac cagggcctga gcaccgccac caaggacacc 1320

tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc ccaggtccg gagagggcag aggaagtctt 1380

60 ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc ggccctaggg tgagcaaggg cgaggagctg 1440

ttaccgggg tggtgccc atctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc 1500

agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgacct gaagttcatc 1560

5 tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacct gacctacggc 1620

gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttct caagtcggcc 1680

10 atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttctca aggacgacgg caactacaag 1740

acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc 1800

atcgacttca aggaggacgg caacatctg gggcacaagc tggagtaca ctacaacagc 1860

15 cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaagtgaa ctcaagatc 1920

cgcacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcgcgacc actaccagca gaacaccccc 1980

20 atcggcgacg gccccgtgct gctgccgcac aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg 2040

agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggtctgc tggagttcgt gaccgccgcc 2100

gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtga 2136

25 <210> 31
<211> 433
<212> PRT
<213> Artificial sequence

30 <220>
<223> Anti-P329G-scFv- CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD fusion

<400> 31

35 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
40 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

45 Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

50 Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
55 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

60 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr

130 135 140
 Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 5 Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
 165 170 175
 Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr
 10 180 185 190
 Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile
 195 200 205
 15 Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu
 210 215 220
 Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly
 20 225 230 235 240
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Phe Trp Val
 245 250 255
 Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
 25 260 265 270
 Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu
 275 280 285
 30 His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg
 290 295 300
 Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
 35 305 310 315 320
 Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 325 330 335
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 40 340 345 350
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 355 360 365
 45 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 370 375 380
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 50 385 390 395 400
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 405 410 415
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 55 420 425 430
 Arg
 60 <210> 32

<211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 5 <220>
 <223> Anti-P329G VH

 <400> 32

 10 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 15 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 20 50 55 60

 Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 30 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

 <210> 33
 35 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 40 <223> Anti-P329G VL

 <400> 33

 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 45 1 5 10 15

 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 50 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 55 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 60 85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

5 <210> 34
<211> 248
<212> PRT
<213> Artificial sequence

10 <220>
<223> Anti-P329G-scFv
<400> 34

15 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 20 25 30

20 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
25 50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

30 Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

35 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
40 130 135 140

Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr
145 150 155 160

45 Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
165 170 175

Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr
180 185 190

50 Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile
195 200 205

Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu
55 210 215 220

Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly
225 230 235 240

60 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

245

<210> 35
 <211> 1356
 5 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Anti-P329G-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD fusion
 10
 <400> 35
 atgggatgga gctgtatcat cctctcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgag 60

 gtgaagctgc tggagagcgg cgggggcctg gtgcagcccg gcggcagcct gaagctgagc 120
 15 tgcgccgcca gcggcttca cttcagcagg tactggatga actgggtgag gcaggcccc 180
 ggcaagggtc tggagtggat cggcgagatc acccccgaca gcagcaccat caactacacc 240
 20 cccagcctga aggacaagtt catcatcagc agggacaacg ccaagaacac cctgtacctg 300
 cagatgatca aggtgaggag cgaggacacc gccctgtact actgcgtgag gccctacgac 360
 tacggcgctt ggttcgccag ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cgccggaggg 420
 25 ggcggaagtg gtggcggggg aagcggcggg ggtggcagcg gagggggcgg atctcaggcc 480
 gtggtgaccc aggagagcgc cctgaccacc agccccggcg agaccgtgac cctgacctgc 540
 30 aggagcagca ccggcgccgt gaccaccagc aactacgcca actgggtgca ggagaagccc 600
 gaccacctgt tcaccggcct gatcggcggc accaacaaga gggcccccg cgtgcccgcc 660
 aggttcagcg gcagcctgat cggcgacaag gccgccctga ccatcaccgg cgcccagacc 720
 35 gaggacgagg ccatctactt ctgcgccctg tggtagca accactgggt gttcggcggt 780
 ggcaccaagc tgaccgtgct gggagggggc ggtaccttct ggggtgctgt ggtggtgggc 840
 40 ggcgtgctgg cctgctacag cctgctggtg accgtggcct tcattcatct ctgggtgagg 900
 agcaagagga gcaggctgct gcacagcgac tacatgaaca tgacccccag gagggccggc 960
 cccaccagga agcactacca gccctacgcc cccccaggg acttcgccgc ctacaggagc 1020
 45 agggatgaagt tcagcaggag cgccgacgcc cccgcctacc agcagggcca gaaccagctg 1080
 tataacgagc tgaacctggg caggagggag gactacgacg tgctggacaa gaggaggggc 1140
 50 agggaccccc agatgggcgg caagcccagg aggaagaacc cccaggaggg cctgtataac 1200
 gagctgcaga aggacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagagg 1260
 aggaggggca agggccacga cggcctgtac cagggcctga gcaccgccac caaggacacc 1320
 55 tacgacgcc tgcacatgca ggcctgccc cccagg 1356

 <210> 36
 <211> 357
 60 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Anti-P329G VH

5

<400> 36

gaggtgaagc tgctggagag cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggcag cctgaagctg 60

agctgcgccg ccagcggcct cgactcagc aggtactgga tgaactgggt gaggcaggcc 120

10 cccggcaagg gtctggagtg gatcggcgag atcacccccg acagcagcac catcaactac 180

acccccagcc tgaaggacaa gtcatcatc agcagggaca acgccaagaa caccctgtac 240

15 ctgcagatga tcaaggtgag gagcggaggac accgccctgt actactgcgt gaggccctac 300

gactacggcg cctggttcgc cagctggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcgcc 357

<210> 37

20 <211> 327

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

25 <223> Anti-P329G VL

<400> 37

caggccgtgg tgaccagga gagcgccctg accaccagcc ccggcgagac cgtgaccctg 60

30 acctgcagga gcagcaccgg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggag 120

aagcccgacc acctgttcac cggcctgac ggcggcacca acaagagggc ccccggcgtg 180

cccgccaggt tcagcggcag cctgatcggc gacaaggccg ccctgaccat caccggcgcc 240

35 cagaccgagg acgaggccat ctacttctgc gccctgtggt acagcaacca ctgggtgttc 300

ggcgggtggca ccaagctgac cgtgctg 327

40 <210> 38

<211> 2136

<212> DNA

<213> Artificial sequence

45 <220>

<223> Anti-P329G-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD-eGFP fusion

<400> 38

atgggatgga gctgtatcat cctctcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgag 60

50 gtgaagctgc tggagagcgg cggcggcctg gtgcagcccg gcggcagcct gaagctgagc 120

tgcgccgcca gcggcttca cttcagcagg tactggatga actgggtgag gcaggccccc 180

55 ggcaagggtc tggagtggat cggcgagatc acccccgaca gcagcaccat caactacacc 240

cccagcctga aggacaagt catcatcagc agggacaacg ccaagaacac cctgtacctg 300

cagatgatca aggtgaggag cgaggacacc gccctgtact actgcgtgag gccctacgac 360

60

tacggcgctt ggttcgccag ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cgccggaggg 420
ggcgggaagtg gtggcggggg aagcggcggg ggtggcagcg gagggggcgg atctcaggcc 480
5 gtggtgaccc aggagagcgc cctgaccacc agccccggcg agaccgtgac cctgacctgc 540
aggagcagca cggcgccgt gaccaccagc aactacgcca actgggtgca ggagaagccc 600
gaccacctgt tcaccggcct gatcggcggc accaacaaga gggcccccg cgtgcccgcc 660
10 aggttcagcg gcagcctgat cggcgacaag gccgccctga ccatcaccgg cgcccagacc 720
gaggacgagg ccatctactt ctgcgccctg tggtagca accactgggt gttcggcggt 780
15 ggcaccaagc tgaccgtgct gggagggggc ggtatcttct ggggtgctgt ggtggtgggc 840
ggcgtgctgg cctgctacag cctgctggtg accgtggcct tcatcatctt ctgggtgagg 900
agcaagagga gcaggctgct gcacagcgac tacatgaaca tgacccccag gagggccggc 960
20 cccaccagga agcactacca gccctacgcc cccccaggg acttcgccgc ctacaggagc 1020
aggggtgaagt tcagcaggag cgccgacgcc cccgcctacc agcagggcca gaaccagctg 1080
25 tataacgagc tgaacctggg caggagggag gtagtagcag tgctggacaa gaggaggggc 1140
agggaccccc agatggggcg caagcccagg aggaagaacc cccaggaggg cctgtataac 1200
gagctgcaga aggacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagagg 1260
30 aggaggggca agggccacga cggcctgtac cagggcctga gcaccgccac caaggacacc 1320
tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc cccagggtccg gagagggcag aggaagtctt 1380
35 ctaacatgag gtgacgtgga ggagaatccc ggcctaggg tgagcaaggg cgaggagctg 1440
ttcaccgggg tgggtcccat cctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc 1500
agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgacct gaagttcatc 1560
40 tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacct gacctacggc 1620
gtgcagtgtc tcagccgcta cccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc 1680
45 atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag 1740
acccgcgccc aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc 1800
atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtaca ctacaacagc 1860
50 cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttaagatc 1920
cgccacaaca tcaggagcgg cagcgtgcag ctgcgcgacc actaccagca gaacaccccc 1980
55 atcggcgacg gcccgtgct gctgcccagc aaccactacc tgagcaccca gtccgccctg 2040
agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggtctgc tggagttcgt gaccgcccgc 2100
gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtga 2136
60

<210> 39
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

5

<220>
 <223> Anti-P329G-ds-Fab- heavy chain-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD fusion
 pETR17100

10

<400> 39
 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly
 210 215 220
 Gly Gly Ser Phe Trp Val Leu Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
 225 230 235 240
 Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
 245 250 255
 Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg

60

260 265 270

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
275 280 285

5 Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
290 295 300

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
305 310 315 320

10 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
325 330 335

15 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
340 345 350

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
355 360 365

20 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
370 375 380

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
385 390 395 400

25 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
405

30 <210> 40
<211> 222
<212> PRT
<213> Artificial sequence

35 <220>
<223> Anti-P329G-ds-Fab heavy chain

<400> 40

40 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

45 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

55 Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

60

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 5 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 10 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 15 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 20
 <210> 41
 <211> 216
 <212> PRT
 25 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti P329G-ds-Fab light chain
 30 <400> 41
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 35 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45
 40 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 45 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 50 His Trp Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 55 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 60

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

5 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

10 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 42
15 <211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
20 <223> CL

<400> 42

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
25 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

30 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

35 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
40 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

45 <210> 43
<211> 103
<212> PRT
<213> Artificial sequence

50 <220>
<223> CH1

<400> 43

55 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

60

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
5 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

10 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
100

15 <210> 44
<211> 2645
<212> DNA
<213> Artificial sequence

20 <220>
<223> Anti-P329G-ds-Fab-heavy chain-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD fusion
pETR17100

25 <400> 44
atgggatgga gctgtatcat cctctcttg gtagcaacag ctacgggtgt gcattcccag 60

gccgtggtga cccaggagag cgccctgacc accagccccg gcgagaccgt gaccctgacc 120

30 tgcaggagca gcaccggcgc cgtgaccacc agcaactacg ccaactgggt gcaggagaag 180

cccgaccacc tgttaccgg cctgatcggc ggcaccaaca agagggcccc cggcgtgccc 240

gccaggttca gcggcagcct gatcggcgac aaggccgccc tgaccatcac cggcgcccag 300

35 accgaggacg aggccatcta cttctcgcc ctgtgttaca gcaaccactg ggtgttcggc 360

tgtggcacca agctgaccgt gctgcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 420

40 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480

tatcccagag aggccaaagt acagtgaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 540

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600

45 acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacagggggag agtgtagga attccccgaa 720

50 gtaacttaga agctgtaaat caacgatcaa tagcaggtgt ggcacaccag tcataccttg 780

atcaagcact tctgtttccc cggactgagt atcaataggc tgctcgcgcg gctgaaggag 840

aaaacgttcg ttaccgacc aactactcg agaagcttag taccaccatg aacgaggcag 900

55 ggtgtttcgc tcagcacaac cccagtgtag atcaggctga tgagtactg caacccccat 960

gggcgaccat ggcagtggct gcgttggcgg cctgcccattg gagaaatcca tgggacgctc 1020

60 taattctgac atggtgtgaa gtgcctattg agctaactgg tagtcctccg gccctgatt 1080

gctggctaact ctaactgcgg agcacatgct cacaaccag tgggtggtgt gtcgtaacgg 1140

gcaactctgc agcggaaccg actactttgg gtgtccgtgt ttcttttat tcctatattg 1200

5 gctgcttatg gtgacaatca aaaagtgtt accatatagc tattggattg gccatccggt 1260

gtgcaacagg gcaactgttt acctatttat tggttttgta ccattatcac tgaagtctgt 1320

10 gatcactctc aaattcattt tgaccctcaa cacaatcaaa cgccaccatg ggatggagct 1380

gtatcatcct ctcttggtg gcaacagcta ccggtgtgca ctccgaggtg aagctgctgg 1440

agagcggcgg cggcctggtg cagcccggcg gcagcctgaa gctgagctgc gccgccagcg 1500

15 gcttcgactt cagcaggtag tggatgaact gggtaggca ggccccggc aagtgtctgg 1560

agtggatcgg cgagatcacc cccgacagca gcaccatcaa ctacacccc agcctgaagg 1620

20 acaagttcat catcagcagg gacaacgcca agaaccct gtacctgcag atgatcaagg 1680

tgaggagcga ggacaccgcc ctgtactact gcgtgaggcc ctacgactac ggcgcctggt 1740

tcgccagctg gggccaggcg accctggtga ccgtgagcgc cgctagcacc aagggcccct 1800

25 ccgtgttccc cctggcccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc gctctgggct 1860

gcctggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc ggagccctga 1920

30 cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat agcctgagca 1980

gcgtggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcaccagac ctacatctgc aacgtgaacc 2040

acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc ggagggggcg 2100

35 gatccttctg ggtgctggtg gtggtgggcg gcgtgctggc ctgctacagc ctgctggtga 2160

ccgtggcctt catcatcttc tgggtgagga gcaagaggag caggctgctg cacagcgact 2220

40 acatgaacat gacccccagg agggccggcc ccaccaggaa gcactaccag ccctacgccc 2280

ccccaggga ctgcgccgcc tacaggagca gggtaagtt cagcaggagc gccgacgcc 2340

ccgcctacca gcagggccag aaccagctgt ataacgagct gaacctgggc aggagggagg 2400

45 agtacgacgt gctggacaag aggaggggca gggacccga gatgggcggc aagcccagga 2460

ggaagaacct ccaggagggc ctgtataacg agctgcagaa ggacaagatg gccgaggcct 2520

50 acagcgagat cggcatgaag ggcgagagga ggaggggcaa gggccacgac gcctgtacc 2580

agggcctgag caccgccacc aaggacacct acgacgccct gcacatgcag gccctgcccc 2640

ccagg 2645

55 <210> 45
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial sequence

60

<220>

<223> CL

<400> 45

5 cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgttg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
10 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
15 agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

<210> 46

<211> 309

<212> DNA

20 <213> Artificial sequence

<220>

<223> CH1

25 <400> 46

gctagcacca agggccccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 60
ggcacagccg ctctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 120
30 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 180
ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 300
35 aagagctgc 309

<210> 47

<211> 3425

40 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

45 <223> Anti-P329G-ds-Fab-heavy chain-CD28TM-CD28CSD-CD3ZSSD-eGFP fusion
pETR17100

<400> 47

atgggatgga gctgtatcat cctcttctg gtagcaacag ctacgggtgt gcattcccag 60
50 gccgtggtga cccaggagag cgccctgacc accagccccg gcgagaccgt gaccctgacc 120
tgaggagca gcaccggcgc cgtgaccacc agcaactacg ccaactgggt gcaggagaag 180
cccgaccacc tgttaccgg cctgatcggc ggcaccaaca agagggcccc cggcgtgccc 240
55 gccaggttca gcggcagcct gatcggcgac aaggccgccc tgaccatcac cggcgcccag 300
accgaggacg aggccatcta cttctcgcc ctgtgttaca gcaaccactg ggtgttcggc 360
60 tgtggacca agctgaccgt gctgcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480

5 tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtactcc 540

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 600

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660

10 ggctgagct cgcccgacac aaagagcttc aacaggggag agtgtagga attccccgaa 720

gtaacttaga agctgtaaata caacgatcaa tagcaggtgt ggcacaccag tcataccttg 780

15 atcaagcact tctgtttccc cggactgagt atcaataggc tgctcgcgcg gctgaaggag 840

aaaacgttcg ttaccgacc aactacttcg agaagcttag taccaccatg aacgaggcag 900

ggtgtttcgc tcagcacaac ccagtgtag atcaggctga tgagtactg caacccccat 960

20 gggcgacct ggcagtggct gcgtggcg cctgccatg gagaaatcca tgggacgctc 1020

taattctgac atggtgtgaa gtgcctattg agctaactgg tagtcctccg gccctgatt 1080

gctgttaac ctaactgcg agcacatgct cacaaccag tgggtggtgt gtcgtaacgg 1140

25 gcaactctgc agcggaaccg actacttgg gtgtccgtgt ttcttttat tctatattg 1200

gctgctatg gtgacaatca aaaagtgtt accatatagc tattggattg gccatccgt 1260

30 gtgcaacagg gcaactgtt accatattat tggtttga ccattatcac tgaagtctgt 1320

gatcactctc aaattcattt tgacctcaa cacaatcaaa cgccaccatg ggatggagct 1380

gtatcatcct ctcttgga gcaacagcta ccggtgtgca ctccgagggt aagctgctgg 1440

35 agagcggcgg cgccctgggt cagcccgcg gcagcctgaa gctgagctgc gccgccagcg 1500

gcttcgactt cagcaggtag tggatgaact gggtaggca ggccccggc aagtgtctgg 1560

40 agtggatcgg cgagatcacc ccgacagca gcacatcaa ctacacccc agcctgaagg 1620

acaagttcat catcagcagg gacaacgcca agaaccct gtacctgcag atgatcaagg 1680

tgaggagcga ggacaccgcc ctgtactact gcgtgaggcc ctacgactac ggcgcctggt 1740

45 tcgccagctg gggccagggc accctgtga ccgtgagcgc cgtagcacc aagggccct 1800

ccgtgtccc cctggcccc agcagcaaga gcaccagcg cgacacagcc gctctgggt 1860

50 gcctgtgcaa ggactacttc ccgagcccg tgaccgtgc ctggaacagc ggagccctga 1920

cctccggcgt gcacacctc ccgccgtgc tcagagttc tggcctgtat agcctgagca 1980

gcgtgtcac cgtgcctct agcagcctgg gacccagac ctacatctgc aacgtgaacc 2040

55 acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc ggagggggcg 2100

gatcctctg ggtgctggt gtggtggcg gcgtgctggc ctgtacagc ctgctggtga 2160

60 ccgtggcct catcatctc tgggtagga gcaagaggag caggctgctg cacagcgact 2220

	acatgaacat gacccccagg agggcccgcc ccaccaggaa gactaccag ccctacgccc	2280
5	ccccaggga cttcgccgcc tacaggagca ggggtgaagt cagcaggagc gccgacgccc	2340
	ccgcctacca gcagggccag aaccagctgt ataacgagct gaacctgggc aggagggagg	2400
	agtacgacgt gctggacaag aggaggggca gggaccccga gatgggcggc aagcccagga	2460
10	ggaagaaccc ccaggagggc ctgtataacg agctgcagaa ggacaagatg gccgaggcct	2520
	acagcgagat cggcatgaag ggcgagagga ggaggggcaa gggccacgac ggctgtacc	2580
15	agggcctgag caccgccacc aaggacacct acgacgccct gcacatgcag gccctgcccc	2640
	ccaggtcgag agagggcaga ggaagtctt taacatgcgg tgacgtggag gagaatcccg	2700
	gccctagggg gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccacg ctggtcgagc	2760
20	tggacggcga cgtaaaccgg cacaagtcca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca	2820
	cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc	2880
25	ccaccctgt gaccaccctg acctacggcg tgcagtgcct cagccgctac cccgaccaca	2940
	tgaagcagca cgacttctt aagtcgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca	3000
	tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca	3060
30	ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg	3120
	ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga	3180
35	agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc	3240
	tcgccgacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgtg ctgcccgaca	3300
	accactacct gagcaccag tcgcccctga gcaaagaccc caacgagaag cgcgatcaca	3360
40	tggtcctgct ggagttcgtg accgccgcgg ggatcactct cggcatggac gagctgtaca	3420
	agtga	3425

45	<210> 48
	<211> 407
	<212> PRT
	<213> Artificial sequence
50	<220>
	<223> Anti-P329G-Fab-heavy chain-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD fusion pETR17594
	<400> 48

55 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 5 50 55 60
 Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 15 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 20 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 25 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 30 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly
 35 210 215 220
 Gly Gly Ser Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
 225 230 235 240
 40 Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
 245 250 255
 Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
 260 265 270
 45 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 275 280 285
 Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 50 290 295 300
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 305 310 315 320
 55 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 325 330 335
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 340 345 350
 60

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 355 360 365
 5 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 370 375 380
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 385 390 395 400
 10 Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 405
 <210> 49
 <211> 222
 15 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-P329G-Fab heavy chain
 20 <400> 49
 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 30 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Thr Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 50 55 60
 35 Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ile Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 40 Val Arg Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 45 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 50 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 55 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 60 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

5 <210> 50
<211> 216
<212> PRT
<213> Artificial sequence

10 <220>
<223> Anti-P329G-Fab light chain
<400> 50

15 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 20 25 30
20 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
25 50 55 60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
30 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val
100 105 110
35 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
40 130 135 140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160
45 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190
50 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
55 210 215
<210> 51
<211> 2645
<212> DNA
60 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Anti-P329G-Fab-heavy chain-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD fusion
pETR17594

5

<400> 51

atgggatgga gctgtatcat cctctcttg gtagcaacag ctacgggtgt gcattcccag 60

gccgtggtga cccaggagag cgccctgacc accagccccg gcgagaccgt gaccctgacc 120

10

tgcaggagca gcaccggcgc cgtgaccacc agcaactacg ccaactgggt gcaggagaag 180

cccgaccacc tgttcaccgg cctgatcggc ggcaccaaca agagggcccc cggcgtgccc 240

15 gccagggtca gcggcagcct gatcggcgac aaggccgccc tgaccatcac cggcgcccag 300

accgaggacg aggccatcta ctctcgccc ctgtgttaca gcaaccactg ggtgttcggc 360

ggtggcacca agctgaccgt gctgcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 420

20

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggttaactcc 540

25 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 600

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660

ggcctgagct cgcccgctac aaagagcttc aacaggggag agtgtagga attccccgaa 720

30

gtaacttaga agctgtaaat caacgatcaa tagcagggtgt ggcacaccag tcataccttg 780

atcaagcact tctgtttccc cggactgagt atcaatagcg tgctcgcgcg gctgaaggag 840

35 aaaacgttcg ttaccgacc aactacttcg agaagcttag taccaccatg aacgaggcag 900

ggtgtttcgc tcagcacaac ccagtgtag atcaggctga tgagtcactg caacccccat 960

gggcgaccat ggcagtggct gcgttggcgg cctgccccatg gagaaatcca tgggacgctc 1020

40

taattctgac atggtgtgaa gtgcctattg agctaactgg tagtcctccg gccctgatt 1080

gcggctaate ctaactcgg agcacatgct cacaaccag tgggtggtgt gtcgtaacgg 1140

45 gcaactctgc agcggaaccg actactttgg gtgtccgtgt ttcttttat tcctatattg 1200

gctgcttatg gtgacaatca aaaagtgtt accatatagc tattggattg gccatccggt 1260

gtgcaacagg gcaactgttt acctatttat tggttttgta ccattatcac tgaagtctgt 1320

50

gatcactctc aaattcattt tgaccctcaa cacaatcaaa cgccaccatg ggatggagct 1380

gtatcatcct ctcttggtg gcaacagcta ccggtgtgca ctccgaggtg aagctgctgg 1440

55 agagcggcgg cggcctggtg cagcccgccg gcagcctgaa gctgagctgc gccgccagcg 1500

gcttcgactt cagcaggtag tggatgaact gggtaggca ggccccggc aagggtctgg 1560

agtggatcgg cgagatcacc cccgacagca gcaccatcaa ctacaccccc agcctgaagg 1620

60

acaagttcat catcagcagg gacaacgcca agaaccacct gtacctgcag atgatcaagg 1680

tgaggagcga ggacaccgcc ctgtactact gcgtgaggcc ctacgactac ggcgcctggt 1740

5 tcgccagctg gggccagggc accctggtga ccgtgagcgc cgctagcacc aagggcccct 1800

ccgtgtccc cctggcccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc gctctgggct 1860

gctgtgtaa ggactacttc cccgagcccg tgacctgtc ctggaacagc ggagccctga 1920

10 cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat agcctgagca 1980

gcgtgttcac cgtgccttct agcagcctgg gcaccagac ctacatctgc aacgtgaacc 2040

15 acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc ggagggggcg 2100

gatcctctg ggtgctggtg gtggtgggcg gcgtgctggc ctgctacagc ctgctggtga 2160

ccgtggcctt catcatcttc tgggtgagga gcaagaggag caggctgctg cacagcgact 2220

20 acatgaacat gacccccagg aggcccgcc ccaccaggaa gcactaccag ccctacgccc 2280

ccccaggga cttcgccgcc tacaggagca gggtaagtt cagcaggagc gccgacgccc 2340

25 ccgcctacca gcagggccag aaccagctgt ataacgagct gaacctgggc aggagggagg 2400

agtacgacgt gctggacaag aggaggggca gggacccga gatgggcggc aagcccagga 2460

ggaagaaccc ccaggagggc ctgtataacg agctgcagaa ggacaagatg gccgaggcct 2520

30 acagcgagat cggcatgaag ggcgagagga ggaggggcaa gggccacgac ggctgtacc 2580

agggcctgag caccgccacc aaggacacct acgacgccct gcacatgcag gccctgcccc 2640

35 ccagg 2645

<210> 52

<211> 3425

<212> DNA

40 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Anti-P329G-Fab-heavy chain-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD-eGFP fusion
pETR17594

45 <400> 52

atgggatgga gctgtatcat cctctcttg gtagcaacag ctacgggtgt gcattcccag 60

gccgtggtga ccaggagag cgcctgacc accagccccg gcgagaccgt gacctgacc 120

50 tgcaggagca gcaccggcg cgtgaccacc agcaactacg ccaactgggt gcaggagaag 180

cccgaccacc tgttaccgg cctgatcggc ggcaccaaca agagggcccc cggcgtgccc 240

55 gccaggttca gcggcagcct gatcggcgac aaggccgccc tgaccatcac cggcgcccag 300

accgaggacg aggccatcta cttctcgcc ctgtgttaca gcaaccactg ggtgttcggc 360

ggtggcacca agctgaccgt gctgcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420

60

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtactcc 540

5 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 600

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660

10 ggctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtagga attccccgaa 720

gtaacttaga agctgtaaata caacgatcaa tagcaggtgt ggcacaccag tcataccttg 780

atcaagcact tctgtttccc cggactgagt atcaataggc tgctcgcgcg gctgaaggag 840

15 aaaacgttcg ttaccgacc aactacttcg agaagcttag taccaccatg aacgaggcag 900

ggtgtttcgc tcagcacaac cccagtgtag atcaggctga tgagtactg caacccccat 960

gggagacat ggagtggtt gctgtggcg cctgcccatt gagaaatcca tgggacgctc 1020

20 taattctgac atggtgtgaa gtgcctattg agctaactgg tagtctccg gccctgatt 1080

gaggtaac ctaactgcg agcacatgct cacaaccag tgggtggtgt gtcgtaacgg 1140

25 gcaactctgc agcggaaccg actactttgg gtgtccgtgt ttcttttat tctatattg 1200

gctgctatg gtgacaatca aaaagtgtt accatatagc tattggattg gccatccgtt 1260

gtgaacagg gcaactgtt accatattat tggttttgta ccattatcac tgaagtctgt 1320

30 gatcactctc aaattcattt tgacctcaa cacaatcaaa cgccaccatg ggatggagct 1380

gtatcatcct ctcttggtg gcaacagcta ccggtgtgca ctccgaggtg aagctgctgg 1440

35 agagcggcgg cggcctggtg cagcccgcg gcagcctgaa gctgagctgc gccgccagcg 1500

gcttcgactt cagcaggtag ttgatgaact gggtaggca gggcccgcc aagggtctgg 1560

agtggatcgg cgagatcacc cccgacagca gcacctcaa ctacacccc agcctgaagg 1620

40 acaagttcat catcagcagg gacaacgcca agaaccct gtacctgcag atgatcaagg 1680

tgaggagcga ggacaccgcc ctgtactact gcgtgaggcc ctacgactac ggcgcctggt 1740

45 tcgccagctg gggccagggc acctgtgtga ccgtgagcgc cgtagcacc aagggccct 1800

ccgtgtccc cctggcccc agcagcaaga gcaccagcg cgacacagcc gctctgggct 1860

gctgtgtcaa ggactacttc cccgagccg tgacctgtc ctggaacagc ggagccctga 1920

50 cctccggcgt gcacacctc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat agcctgagca 1980

gcgtgtcac cgtgccttct agcagcctgg gcaccagac ctacatctgc aacgtgaacc 2040

55 acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc ggagggggcg 2100

gatccttctg ggtgctggtg gtggtggcg gcgtgctggc ctgtacagc ctgctggtga 2160

ccgtggcctt catcatctc tgggtgagga gcaagaggag caggctgctg cacagcgact 2220

60

acatgaacat gacccccagg aggccccggcc ccaccaggaa gcactaccag ccctacgccc 2280
 cccccagga cttcgcgcc tacaggagca ggggtgaagt cagcaggagc gccgacgccc 2340
 5 ccgcctacca gcagggccag aaccagctgt ataacgagct gaacctgggc aggagggagg 2400
 agtacgacgt gctggacaag aggaggggca gggaccccga gatgggcggc aagcccagga 2460
 ggaagaacct ccaggagggc ctgtataacg agctgcagaa ggacaagatg gccgaggcct 2520
 10 acagcgagat cggcatgaag ggcgagagga ggaggggcaa gggccacgac ggctgtacc 2580
 agggcctgag caccgccacc aaggacacct acgacgcct gcacatgcag gccctgcccc 2640
 15 ccagggtccg agagggcaga ggaagtctc taacatgcg tgacgtggag gagaatccc 2700
 gccctagggg gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggg ggtgcccatc ctggtcgagc 2760
 tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccg cgagggcgag ggcgatgcca 2820
 20 cctacggcaa gctgacctg aagttcatct gcaccacgg caagctgcc gtgccctggc 2880
 ccaccctgt gaccacctg acctacggcg tgcagtgtt cagccgtac cccgaccaca 2940
 25 tgaagcagca cgactcttc aagtcgcca tggcgaagg ctacgtccag gagcgacca 3000
 tcttctcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagtc gagggcgaca 3060
 ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg 3120
 30 ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggc gacaagcaga 3180
 agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc 3240
 35 tcgccgacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgtg ctgcccgaca 3300
 accactacct gagcaccag tccgccctga gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca 3360
 40 tggctctgt ggagttctg accgccgccg ggtactctt cggcatggac gagctgtaca 3420
 agtga 3425
 <210> 53
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-AAA CDR H1 Kabat
 50 <400> 53
 Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5
 55 <210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 60

<220>
 <223> Anti-AAA CDR H2 Kabat

 <400> 54
 5 Ser Ser Gly Gly Ser Tyr
 1 5

 <210> 55
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 15 <223> Anti-AAA CDR H3 Kabat

 <400> 55

 Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
 20 1 5 10

 <210> 56
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Anti-AAA CDR L1 Kabat

 30 <400> 56

 Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Thr Gly His Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

 35 <210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 40 <220>
 <223> Anti-AAA CDR L2 Kabat

 <400> 57

 45 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

 <210> 58
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Anti-AAA CDR L3 Kabat
 55 <400> 58

 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5
 60

<210> 59
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

5

<220>
 <223> Anti-AAA-scFv-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD fusion

10

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 15 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

20

Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80

25

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110

30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

35

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160

40

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 180 185 190

45

Thr Gly His Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 195 200 205

50

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 225 230 235 240

55

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 245 250 255

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 260 265 270

60

Gly Gly Gly Gly Ser Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu
 275 280 285
 5 Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 290 295 300
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 305 310 315 320
 10 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 325 330 335
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 15 340 345 350
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 355 360 365
 20 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 370 375 380
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 385 390 395 400
 25 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 405 410 415
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 30 420 425 430
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 435 440 445
 35 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455
 <210> 60
 <211> 272
 40 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-AAA-scFv
 45 <400> 60
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 50 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 55 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60
 60 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro

	65	70	75	80
	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn			
	85	90	95	
5	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met			
	100	105	110	
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp			
10	115	120	125	
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly			
	130	135	140	
15	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	145	150	155	160
	Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			
	165	170	175	
20	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser			
	180	185	190	
	Thr Gly His Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
25	195	200	205	
	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
	210	215	220	
30	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
	225	230	235	240
	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly			
	245	250	255	
35	Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	260	265	270	
40	<210> 61			
	<211> 140			
	<212> PRT			
	<213> Artificial sequence			
45	<220>			
	<223> Anti-AAA VH			
	<400> 61			
50	Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly			
	1	5	10	15
	Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys			
	20	25	30	
55	Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe			
	35	40	45	
	Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu			
60	50	55	60	

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 5 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 10 Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 15 <210> 62
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 20 <220>
 <223> Anti-AAA VL
 <400> 62
 25 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 30 20 25 30
 Thr Gly His Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 35 40 45
 35 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 40 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 45 100 105 110
 <210> 63
 <211> 428
 <212> PRT
 50 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-AAA-Fab-heavy chain-CD28ATM-CD28CSD-CD3zSSD fusion
 55 <400> 63
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 60 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys

	20	25	30
	Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
	35	40	45
5	Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu		
	50	55	60
10	Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro		
	65	70	75
	80		
	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn		
	85	90	95
15	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met		
	100	105	110
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp		
	115	120	125
20	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
	130	135	140
	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
25	145	150	155
	160		
	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
	165	170	175
30	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
	180	185	190
	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
	195	200	205
35	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
	210	215	220
	Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
40	225	230	235
	240		
	Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly		
	245	250	255
45	Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile		
	260	265	270
	Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met		
	275	280	285
50	Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro		
	290	295	300
	Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe		
55	305	310	315
	320		
	Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
	325	330	335
60	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		

340 345 350
 Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 355 360 365
 5
 Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 370 375 380
 Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 10 385 390 395 400
 Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 405 410 415
 15 Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 420 425
 <210> 64
 <211> 243
 20 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-AAA-Fab heavy chain
 25 <400> 64
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Val Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 30 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 50 55 60
 40 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 45 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Met Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp
 50 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 55 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 60

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

5 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

10 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys

15 <210> 65
<211> 219
<212> PRT
<213> Artificial sequence

20 <220>
<223> Anti-AAA-Fab light chain

<400> 65

25 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

30 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
20 25 30

Thr Gly His Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

35 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

40 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
45 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

50 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

55 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
60 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

5 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 66
<211> 780
10 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 66
15 atggcgcgcc cgcacccgtg gtggctgtgc gtgctgggca ccctggtggg cctgagcgcg 60
accccgggcg cgaaaagctg cccggaacgc cattattggg cgcagggcaa actgtgctgc 120
cagatgtgcg aaccggggcac ctttctggtg aaagattgcg atcagcatcg caaagcggcg 180
20 cagtgcgacg cgtgcattcc gggcgtgagc ttagcccggt atcatcatac ccgcccgcat 240
tgcgaaagct gccgccattg caacagcggc ctgctgtgac gcaactgcac cattaccgcg 300
aacgcggaat gcgcgtgccg caacggctgg cagtgccgcg ataaagaatg caccgaatgc 360
25 gatccgctgc cgaacccgag cctgaccgcg cgcagcagcc aggcgctgag cccgcatccg 420
cagccgaccc atctgccgta tgtgagcgaa atgctggaag cgcgaccgcg gggccatatg 480
30 cagaccctgg cggattttcg ccagctgccg gcgcgcaccc tgagcaccca ttggccgccg 540
cagcgcagcc tgtgcagcag cgattttatt cgcattctgg tgatttttag cggcattgtt 600
ctggtgttta ccctggcggg gcgcgtgttt ctgcatcagc gccgcaaata tcgcagcaac 660
35 aaaggcgaaa gcccggtgga accggcgga cgtgccatt atagctgccc gcgcgaagaa 720
gaaggcagca ccattccgat tcaggaagat tatcgcaaac cggaaccggc gtgcagcccg 780

40 <210> 67
<211> 260
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 67

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

50 Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
35 40 45

55 Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
60 65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
 85 90 95
 5 Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
 100 105 110
 Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
 115 120 125
 10 Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
 130 135 140
 Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
 15 145 150 155 160
 Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
 165 170 175
 20 His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
 180 185 190
 Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
 195 200 205
 25 Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser
 210 215 220
 Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys His Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu
 30 225 230 235 240
 Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro
 245 250 255
 35 Ala Cys Ser Pro
 260
 <210> 68
 <211> 750
 40 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 68
 atggcgtggc cgccgccgta ttggctgtgc atgctgggca ccttggtggg cctgagcgcg 60
 45 accctggcgc cgaacagctg cccggataaa cattattgga ccggcggcgg cctgtgctgc 120
 cgcatgtgcg aaccgggcac ctttttgtg aaagattgcg aacaggatcg caccgcggcg 180
 50 cagtgcgacg cgtgcattcc gggcaccagc ttagcccg attatcatac ccgcccgcgcat 240
 tgcgaaagct gccgccattg caacagcggc ttctgattc gcaactgcac cgtgaccgcg 300
 aacgcggaat gcagctgcag caaaaactgg cagtgccgcg atcaggaatg caccgaatgc 360
 55 gatccgccgc tgaaccggc gctgaccgc cagccgagcg aaaccccgag cccgcagccg 420
 ccgccgaccc atctgccgca tggcaccgaa aaaccgagct ggccgctgca tcgccagctg 480
 60 ccgaacagca ccgtgtatag ccagcgagc agccatcgcc cgctgtgcag cagcgattgc 540

attgcattt ttgtacctt tagcagcatg ttctgattt ttgtgctggg cgcgattctg 600

tttttcattc agcgccgcaa ccatggcccg aacgaagatc gccaggcggg gccggaagaa 660

5 ccgtgcccgt atagctgccc ggcggaagaa gaaggcagcg cgattccgat tcaggaagat 720

tatcgcaaac cggaaccggc gttttatccg 750

10 <210> 69
<211> 250
<212> PRT
<213> Mus musculus

15 <400> 69

Met Ala Trp Pro Pro Pro Tyr Trp Leu Cys Met Leu Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

20 Gly Leu Ser Ala Thr Leu Ala Pro Asn Ser Cys Pro Asp Lys His Tyr
20 25 30

Trp Thr Gly Gly Gly Leu Cys Cys Arg Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
35 40 45

25 Phe Val Lys Asp Cys Glu Gln Asp Arg Thr Ala Ala Gln Cys Asp Pro
50 55 60

Cys Ile Pro Gly Thr Ser Phe Ser Pro Asp Tyr His Thr Arg Pro His
30 65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Phe Leu Ile Arg Asn Cys
85 90 95

35 Thr Val Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ser Cys Ser Lys Asn Trp Gln Cys
100 105 110

Arg Asp Gln Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Ala Leu
115 120 125

40 Thr Arg Gln Pro Ser Glu Thr Pro Ser Pro Gln Pro Pro Pro Thr His
130 135 140

Leu Pro His Gly Thr Glu Lys Pro Ser Trp Pro Leu His Arg Gln Leu
45 145 150 155 160

Pro Asn Ser Thr Val Tyr Ser Gln Arg Ser Ser His Arg Pro Leu Cys
165 170 175

50 Ser Ser Asp Cys Ile Arg Ile Phe Val Thr Phe Ser Ser Met Phe Leu
180 185 190

Ile Phe Val Leu Gly Ala Ile Leu Phe Phe His Gln Arg Arg Asn His
195 200 205

55 Gly Pro Asn Glu Asp Arg Gln Ala Val Pro Glu Glu Pro Cys Pro Tyr
210 215 220

Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Ala Ile Pro Ile Gln Glu Asp
60 225 230 235 240

Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Phe Tyr Pro
 245 250

5 <210> 70
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10 <400> 70
 atgctgccc tgctgctggc gctgaacctg ttccgagca ttcaggtagc cggcaacaaa 60
 attctggtga aacagagccc gatgctggtg gcgtatgata acgcggtgaa cctgagctgc 120
 15 aaatatagct ataacctgtt tagccgcgaa ttccgcgca gcctgcataa aggcctggat 180
 agcgcggtgg aagtgtgctg ggtgatggc aactatagcc agcagctgca ggtgatagc 240
 aaaaccggct ttaactgcga tggcaaaactg ggcaacgaaa gcgtgacctt ttatctgcag 300
 20 aacctgtatg tgaaccagac cgatatttat ttgcaaaa ttgaagtgat gtatccgccg 360
 ccgtatctgg ataacgaaaa aagcaacggc accattatc atgtgaaagg caaacatctg 420
 25 tgcccagacc cgctgttcc gggcccagc aaaccgttt gggtgctggt ggtggtgggc 480
 ggctgctgg cgctgatag cctgctggtg accgtggcgt ttattttt ttgggtgcgc 540
 agcaaacgca gccgcctgct gcatagcgat tatatgaaca tgaccccgcg ccgcccgggc 600
 30 ccgaccgca aacattatca gccgatgcg ccgcccgcgc attttgcggc gtatcgagc 660

<210> 71
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71

40 Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
 1 5 10 15
 Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
 20 25 30

45 Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
 35 40 45

50 Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
 50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
 65 70 75 80

55 Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
 85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
 100 105 110

60

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
 115 120 125
 5 Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
 130 135 140
 Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
 145 150 155 160
 10 Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
 165 170 175
 Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
 180 185 190
 15 Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
 195 200 205
 Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 20 210 215 220
 <210> 72
 <211> 654
 <212> DNA
 25 <213> Mus musculus
 <400> 72
 atgacctgc gcctgctgt tctggcgctg aacttttta gcgtgcaggt gaccgaaaac 60
 30 aaaattctgg tgaaacagag cccgctgctg gtggtggata gcaacgaagt gagcctgagc 120
 tgccgctata gctataacct gctggcgaaa gaatttcgcg cgagcctgta taaaggcgtg 180
 aacagcgatg tggaagtgtg cgtgggcaac ggcaacttta cctatcagcc gcagtttcgc 240
 35 agcaacgcgg aatttaactg cgtggcgat ttgataacg aaaccgtgac ctttcgcctg 300
 tggaacctgc atgtgaacca taccgatatt tattttgca aaattgaatt tatgtatccg 360
 40 ccgccgtatc tggataacga acgcagcaac ggcaccatta tcatattaa agaaaaacat 420
 ctgtgccata cccagagcag cccgaaactg ttttgggcgc tgggtggtgt ggcgggctg 480
 ctgttttgc atggcctgct ggtgaccgtg gcgctgtgcg tgatttgac caacagccgc 540
 45 cgcaaccgcc tgctgcagag cgatttatg aacatgacct cgccgcccc gggcctgacc 600
 cgcaaaccgt atcagccgta tgcgccggcg cgcgatttg cggcgatcg cccg 654
 50 <210> 73
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 55 <400> 73
 Met Thr Leu Arg Leu Leu Phe Leu Ala Leu Asn Phe Phe Ser Val Gln
 1 5 10 15
 60 Val Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Leu Leu Val Val

	20	25	30	
	Asp Ser Asn Glu Val Ser Leu Ser Cys Arg Tyr Ser Tyr Asn Leu Leu			
	35	40	45	
5	Ala Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val Asn Ser Asp Val			
	50	55	60	
10	Glu Val Cys Val Gly Asn Gly Asn Phe Thr Tyr Gln Pro Gln Phe Arg			
	65	70	75	80
	Ser Asn Ala Glu Phe Asn Cys Asp Gly Asp Phe Asp Asn Glu Thr Val			
	85	90	95	
15	Thr Phe Arg Leu Trp Asn Leu His Val Asn His Thr Asp Ile Tyr Phe			
	100	105	110	
	Cys Lys Ile Glu Phe Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Arg			
	115	120	125	
20	Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Ile Lys Glu Lys His Leu Cys His Thr			
	130	135	140	
	Gln Ser Ser Pro Lys Leu Phe Trp Ala Leu Val Val Val Ala Gly Val			
25	145	150	155	160
	Leu Phe Cys Tyr Gly Leu Leu Val Thr Val Ala Leu Cys Val Ile Trp			
	165	170	175	
30	Thr Asn Ser Arg Arg Asn Arg Leu Leu Gln Ser Asp Tyr Met Asn Met			
	180	185	190	
	Thr Pro Arg Arg Pro Gly Leu Thr Arg Lys Pro Tyr Gln Pro Tyr Ala			
	195	200	205	
35	Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Pro			
	210	215		
	<210> 74			
40	<211> 768			
	<212> DNA			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 74			
45	atgggaaaca gctgttaca catagtagcc actctgttgc tggctcctcaa cttgagagg			60
	acaagatcat tgcaggatcc tttagtaac tgcccagctg gtacattctg tgataataac			120
	aggaatcaga ttgcagtc ctgtcctcca aatagtttct ccagcgaggc tggacaaagg			180
50	acctgtgaca tatgcaggca gtgtaaagggt gtttcagga ccaggaagga gtgttcctcc			240
	accagcaatg cagagtgtga ctgcactcca gggtttcaact gcctgggggc aggatgcagc			300
55	atgtgtgaac aggattgtaa acaaggtaa gaactgacaa aaaaagggtg taaagactgt			360
	tgctttggga catttaacga tcagaaacgt ggcactctgc gaccctggac aaactgttct			420
	ttggatggaa agtctgtgct tgtgaatggg acgaaggaga gggacgtggt ctgtggacca			480
60				

tctccagccg acctctctcc gggagcatcc tctgtgaccc cgcctgcccc tgcgagagag 540
 ccaggacact ctccgcagat catctccttc tttcttgccg tgacgtcgac tgcgttgctc 600
 5 ttcctgctgt tcttctcac gctccgttcc tctgttgta aacggggcag aaagaaactc 660
 ctgtatatat tcaaacaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc 720
 tgtagctgcc gatttcaga agaagaagaa ggaggatgtg aactgtga 768
 10
 <210> 75
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 75
 Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
 1 5 10 15
 20 Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
 20 25 30
 Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
 25 35 40 45
 Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
 50 55 60
 30 Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
 65 70 75 80
 Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
 85 90 95
 35 Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
 100 105 110
 Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
 40 115 120 125
 Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
 130 135 140
 45 Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
 145 150 155 160
 Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
 165 170 175
 50 Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
 180 185 190
 Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
 55 195 200 205
 Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 210 215 220
 60 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

 245 250 255

5 <210> 76
 <211> 768
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

10 <400> 76
 atgggcaaca actgctataa cgtggtggtg attgtgctgc tgctggtggg ctgcgaaaaa 60

 gtgggcgcggtg tgcagaacag ctgcgataac tgccagccgg gcaccttttg ccgcaaatat 120

15 aacccggtgt gcaaaagctg cccgccgagc acccttagca gcattggcgg ccagccgaac 180

 tgcaacattt gccgcgtgtg cgcgggctat ttctgcttta aaaaattttg cagcagcacc 240

20 cataacgagg aatgcgaatg cattgaaggc ttctattgcc tgggcccgca gtgcaccgcg 300

 tgcgaaaaag attgccgccc gggccaggaa ctgaccaaac agggctgcaa aacctgcagc 360

 ctgggcacct ttaacgatca gaacggcacc ggcgtgtgcc gcccgtggac caactgcagc 420

25 ctggatggcc gcagcgtgct gaaaaccggc accaccgaaa aagatgtggt gtgcggcccg 480

 ccggtggtga gctttagccc gagcaccacc attagcgtga ccccggaagg cggcccgggc 540

30 ggccatagcc tgcagggtgt gaccctgttt ctggcgctga ccagcgcgct gctgctggcg 600

 ctgattttta ttacctgct gtttagcgtg ctgaaatgga ttgcaaaaa atttccgcat 660

 atttttaaac agccgtttaa aaaaaccacc ggcgcggcgc aggaagaaga tgcgtgcagc 720

35 tgccgctgcc cgcaggaaga agaaggcggc ggcggcggct atgaactg 768

 <210> 77
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <400> 77

45 Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val

 1 5 10 15

 Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln

 20 25 30

50 Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro

 35 40 45

55 Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys

 50 55 60

 Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr

 65 70 75 80

60 His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro

	85	90	95	
	Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr			
	100	105	110	
5	Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn			
	115	120	125	
	Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg			
10	130	135	140	
	Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro			
	145	150	155	160
15	Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu			
	165	170	175	
	Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala			
	180	185	190	
20	Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe			
	195	200	205	
	Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln			
25	210	215	220	
	Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser			
	225	230	235	240
30	Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu			
	245	250	255	
	<210> 78			
	<211> 831			
35	<212> DNA			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 78			
40	atgtgcgtgg gcgcgcgccg cctgggccgc ggcccgtgcg cggcgctgct gctgctgggc	60		
	ctgggcctga gcaccgtgac cggcctgcat tgcgtgggcg atacctatcc gagcaacgat	120		
	cgctgctgcc atgaatgccg cccggggcaac ggcatggtga gccgctgcag ccgcagccag	180		
45	aacaccgtgt gccgccgtg cggccccggc ttataaacg atgtggtgag cagcaaaccg	240		
	tgcaaaccgt gcacctggtg caacctgcgc agcggcagcg aacgcaaaca gctgtgcacc	300		
	gcgaccagag ataccgtgtg ccgctgccgc gcgggcaccc agccgctgga tagctataaa	360		
50	ccgggctgtg attgcgcgcc gtgcccgcgc ggccatttta gcccgggcga taaccaggcg	420		
	tgcaaaccgt ggaccaactg caccctggcg ggcaaacata ccctgcagcc ggcgagcaac	480		
55	agcagcgatg cgattgcga agatcgcat ccgccggcga cccagccgca ggaaaccag	540		
	ggccccccgg cgcgcccgat taccgtgcag ccgaccgaag cgtggccgcg caccagccag	600		
	ggccccgagca cccgcccggt ggaagtgcgc ggccggccgc cgggtggcgc gattctgggc	660		
60				

ctgggcctgg tgctgggcct gctgggcccg ctggcgattc tgctggcgct gtatctgctg 720
 cgccgcgata agcgccctgcc gccggatgcg cataaacccg cgggcggcgg cagcttccg 780
 5 accccgattc aggaagaaca ggcggatgcg catagcacc tggcgaaaat t 831
 <210> 79
 <211> 277
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 79
 Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
 15 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 20 20 25 30
 Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
 35 40 45
 Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60
 25 Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
 65 70 75 80
 Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
 85 90 95
 30 Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 100 105 110
 Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 115 120 125
 Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140
 40 Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175
 45 Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190
 Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205
 Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
 210 215 220
 55 Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
 225 230 235 240
 Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
 245 250 255
 60

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

5 Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 80
<211> 816
10 <212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 80
atgtatgtgt ggggtcagca gccgaccgcg ctgctgctgc tggcgctgac cctgggctg 60
15 accgcgcgcc gccitgaactg cgtgaaacat acctatccga gcggccataa atgctgccgc 120
gaatgccagc cgggcatgg catggtgagc cgctgcgatc ataccgcga taccctgtgc 180
20 catccgtgcg aaaccggctt ttataacgaa gcggtgaact atgatacctg caaacagtgc 240
accagtga accatgcag cggcagcgaa ctgaaacaga actgcacccc gaccaggat 300
accgtgtgcc gctgccgcc gggcaccag ccgcgccagg atagcggcta taaactgggc 360
25 gtggattgcg tgccgtgcc gccgggcat tttagcccg gcaacaacca ggcgtgcaa 420
ccgtggacca actgcacct gagcggcaaa cagaccgcc atccggcgag cgatagcctg 480
30 gatgcggtgt gcgaagatcg cagcctgctg gcgacctgc tgtgggaaac ccagcggccg 540
accttcgcc cgaccacct gcagagcacc accgtgtggc cgcgcaccag cgaactgccg 600
agcccgccga cctgtgtgac cccggaaggc ccggcgttg cgggtgctgt gggcctgggc 660
35 ctgggcctgc tggcgccgt gaccgtgctg ctggcgctgt atctgctgcg caaagcgtgg 720
cgctgccga acacccgaa accgtgtgg ggcaacagct ttgcacccc gattcaggaa 780
40 gaacataccg atgcgcattt taccctggcg aaaatt 816

<210> 81
<211> 272
<212> PRT
45 <213> Mus musculus

<400> 81

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu
50 1 5 10 15

Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
20 25 30

55 Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
35 40 45

Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu
50 55 60

60

Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys
 65 70 75 80
 5 Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr
 85 90 95
 Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg
 100 105 110
 10 Gln Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro
 115 120 125
 Gly His Phe Ser Pro Gly Asn Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn
 130 135 140
 15 Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Thr Arg His Pro Ala Ser Asp Ser Leu
 145 150 155 160
 Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu
 165 170 175
 20 Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val
 180 185 190
 25 Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro
 195 200 205
 Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu
 210 215 220
 30 Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp
 225 230 235 240
 Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr
 245 250 255
 35 Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
 260 265 270
 40 <210> 82
 <211> 597
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 82
 atgaaaagcg gcctgtgta tttttctg tttgcctgc gcattaaagt gctgaccggc 60
 gaaattaacg gcagcgcgaa ctatgaaatg ttatttttc ataacggcgg cgctgcagatt 120
 50 ctgtgcaaat atccgatat tgtgcagcag tttaaagtgc agctgctgaa aggcgccag 180
 attctgtgcg atctgaccaa aaccaaaggc agcggcaaca ccgtgagcat taaaagcctg 240
 aaattttgcc atagccagct gagcaacaac agcgtgagct ttttctgta taacctggat 300
 55 catagccatg cgaactatta ttttgcaac ctgagcattt ttgatccgcc gccgtttaa 360
 gtgaccctga ccggcggcta tctgcatatt tatgaaagcc agctgtgctg ccagctgaaa 420
 60 tttggctgc cgattggctg cgcggcggtt gtggtggtgt gcattctggg ctgcattctg 480

atttgctggc tgaccaaaaa aaaatatagc agcagcgtgc atgatccgaa cggcgaatat 540

atgtttatgc ggcggtgaa caccgcgaaa aaaagccgcc tgaccgatgt gaccctg 597

5 <210> 83
<211> 199
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 83

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
1 5 10 15

15 Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
20 25 30

Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
20 35 40 45

Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
50 55 60

25 Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
65 70 75 80

Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
85 90 95

30 Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
100 105 110

Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
35 115 120 125

His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
130 135 140

40 Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
145 150 155 160

Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
165 170 175

45 Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
180 185 190

Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
50 195

<210> 84
<211> 600
<212> DNA
55 <213> Mus musculus

<400> 84
atgaaaccgt attttgccg cgtgtttgtg tttgcttc tgattcgct gctgaccggc 60

60 gaaattaacg gcagcgcgga tcatgcgatg ttagcttc ataacggcgg cgtgcagatt 120

agctgcaaat atccggaac cgtgcagcag ctgaaatgc gcctgttcg cgaacgcgaa 180
 gtgctgtgcg aactgaccaa aaccaaaggc agcggcaacg cggtagcat taaaacccg 240
 5 atgctgtgcc tgtatcatct gagcaacaac agcgtgagct ttttctgaa caaccggat 300
 agcagccagg gcagctatta ttttgcagc ctgagcattt ttgatccgcc gccgtttcag 360
 10 gaacgcaacc tgagcggcgg ctatctgcat atttatgaaa gccagctgtg ctgccagctg 420
 aaactgtggc tgccggtggg ctgcgcggcg tttgtggtgg tgctgctgtt tggctgcatt 480
 ctgattattt ggttagcaa aaaaaatat ggcagcagcg tgcattatcc gaacagcgaa 540
 15 tatatgttta tggcggcggg gaacaccaac aaaaaagcc gcctggcggg cgtgaccagc 600

<210> 85
 <211> 200
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 85

25 Met Lys Pro Tyr Phe Cys Arg Val Phe Val Phe Cys Phe Leu Ile Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser
 20 25 30

30 Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val
 35 40 45

Gln Gln Leu Lys Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu
 35 50 55 60

Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro
 65 70 75 80

40 Met Leu Cys Leu Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
 85 90 95

Asn Asn Pro Asp Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser
 100 105 110

45 Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr
 115 120 125

Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu
 50 130 135 140

Pro Val Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Leu Leu Phe Gly Cys Ile
 145 150 155 160

55 Leu Ile Ile Trp Phe Ser Lys Lys Lys Tyr Gly Ser Ser Val His Asp
 165 170 175

Pro Asn Ser Glu Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn Lys Lys
 180 185 190

60

Ser Arg Leu Ala Gly Val Thr Ser
195 200

5 <210> 86
<211> 279
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10 <400> 86
atgattcatc tgggccatat tctgtttctg ctgctgctgc cgggtggcggc ggcgcagacc 60
accccgggcg aacgcagcag cctgccggcg tttatccgg gcaccagcgg cagctgcagc 120
ggctgcggca gcctgagcct gccgctgctg gcgggcctgg tggcggcgga tgcggtggcg 180
15 agcctgctga ttgtgggcgc ggtgtttctg tgcgcgcgcc cgcgccgcag cccggcgcgag 240
gaagatggca aagtgtatat taacatgccg ggccgcggc 279

20 <210> 87
<211> 93
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 87

Met Ile His Leu Gly His Ile Leu Phe Leu Leu Leu Pro Val Ala
1 5 10 15

30 Ala Ala Gln Thr Thr Pro Gly Glu Arg Ser Ser Leu Pro Ala Phe Tyr
20 25 30

Pro Gly Thr Ser Gly Ser Cys Ser Gly Cys Gly Ser Leu Ser Leu Pro
35 40 45

35 Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Asp Ala Val Ala Ser Leu Leu Ile
50 55 60

40 Val Gly Ala Val Phe Leu Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln
65 70 75 80

Glu Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly
85 90

45 <210> 88
<211> 237
<212> DNA
<213> Mus musculus

50 <400> 88
atggatccgc cgggctatct gctgtttctg ctgctgctgc cgggtggcggc gagccagacc 60
agcgcgggca gctgcagcgg ctgcggcacc ctgagcctgc cgctgctggc gggcctggtg 120
55 gcggcggaatg cggtagtag cctgctgatt gtgggcgtgg tgtttgtgtg catgcgcccg 180
catggccgcc cggcgcagga agatggccgc gtgtatatta acatgccggg ccgcggc 237

60 <210> 89
<211> 79

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 89

5

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

10

Ala Ser Gln Thr Ser Ala Gly Ser Cys Ser Gly Cys Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Pro Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Asp Ala Val Met Ser Leu
35 40 45

15

Leu Ile Val Gly Val Val Phe Val Cys Met Arg Pro His Gly Arg Pro
50 55 60

Ala Gln Glu Asp Gly Arg Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly
65 70 75

20

<210> 90

<211> 342

<212> DNA

<213> Homo sapiens

25

<400> 90

atgggggggac ttgaacctg cagcaggctc ctgctctgc ctctctgct ggctgtaagt 60

30

ggctctccgct ctgtccaggc ccaggcccag agcgattgca gttgctctac ggtgagcccg 120

ggcgtgctgg cagggatcgt gatgggagac ctggtgctga cagtgtcat tgcctggcc 180

gtgtacttcc tgggccggct ggtccctcgg gggcgagggg ctgcggaggc agcgaccggg 240

35

aaacagcgta tctactgagac cgagtcgcct tatcaggagc tccagggtca gaggtcggat 300

gtctacagcg acctcaacac acagaggccg tattacaaat ga 342

40

<210> 91

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

45

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

50

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
20 25 30

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

55

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
50 55 60

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Ala Thr Arg
65 70 75 80

60

Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly
85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr
5 100 105 110

Lys

10 <210> 92
<211> 345
<212> DNA
<213> Mus musculus

15 <400> 92
atgggggctc tggagccctc ctgggtgcctt ctgttccttc ctgtcctoct gactgtggga 60
ggattaagtc ccgtacaggc ccagagtgac actttcccaa gatgcgactg ttcttcctgt 120
20 agccctgggtg tactggctgg gattgttctg ggtgacttg tttgactct gctgattgcc 180
ctggctgtgt actctctggg ccgcctggtc tcccagggtc aaggacagc ggaagggacc 240
cggaacaac acattgctga gactgagtcg cttatcagg agcttcaggg tcagagacca 300
25 gaagtataca gtgacctcaa cacacagagg caatattaca gatga 345

<210> 93
<211> 114
30 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 93

35 Met Gly Ala Leu Glu Pro Ser Trp Cys Leu Leu Phe Leu Pro Val Leu
1 5 10 15

Leu Thr Val Gly Gly Leu Ser Pro Val Gln Ala Gln Ser Asp Thr Phe
20 25 30

40 Pro Arg Cys Asp Cys Ser Ser Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile
35 40 45

Val Leu Gly Asp Leu Val Leu Thr Leu Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr
45 50 55 60

Ser Leu Gly Arg Leu Val Ser Arg Gly Gln Gly Thr Ala Glu Gly Thr
65 70 75 80

50 Arg Lys Gln His Ile Ala Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln
85 90 95

Gly Gln Arg Pro Glu Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Gln Tyr
100 105 110

55 Tyr Arg

60 <210> 94
<211> 164

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94

5 Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

10 Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45

15 Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

20 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
25 100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
115 120 125

30 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
145 150 155 160

35 Leu Pro Pro Arg

<210> 95
<211> 492
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 95

45 atgaagtgga aggcgctttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag 60

gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc 120

atctatggtg tcattctcac tgcttgctc ctgagagtga agttcagcag gagcgagag 180

50 cccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 240

gaggagtacg atgttttga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 300

55 agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 360

gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 420

taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg 480

60

ccccctcgct aa

492

<210> 96

<211> 164

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 96

10 Met Lys Trp Lys Val Ser Val Leu Ala Cys Ile Leu His Val Arg Phe
1 5 10 15

Pro Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30

15 Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Ile Thr Ala
35 40 45

20 Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn
50 55 60

Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

25 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu Lys Lys Arg Ala Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Gln Gln Arg Arg Arg Asn Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn
100 105 110

30 Ala Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Thr
115 120 125

35 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Thr
145 150 155 160

40 Leu Ala Pro Arg

<210> 97

<211> 495

45 <212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 97

atgaagtgga aagtgtctgt tctgcctgc atcctccacg tgcggtccc aggagcagag 60

50 gcacagagct ttggtctgct ggaatccaaa ctctgctact tgctagatgg aatcctcttc 120

atctacggag tcatcatcac agccctgtac ctgagagcaa aattcagcag gagtgcagag 180

55 actgtgccca acctgcagga cccaaccag ctctacaatg agctcaatct agggcgaaga 240

gaggaatatg acgtcttgga gaagaagcgg gctcgggatc cagagatggg aggcaaacag 300

cagaggagga ggaaccccca ggaaggcgta tacaatgcac tgcagaaaga caagatggca 360

60

gaagcctaca gtgagatcgg cacaaaaggc gagaggcgga gaggcaaggg gcacgatggc 420
ctttaccagg gtctcagcac tgccaccaag gacacctatg atgccctgca tatgcagacc 480

5 ctggcccctc gctaa 495

<210> 98
<211> 254
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 98

15 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
20 25 30

20 Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
50 55 60

25 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
85 90 95

30 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110

35 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
130 135 140

40 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe
165 170 175

45 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190

50 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
210 215 220

55 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
225 230 235 240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
245 250

60

<210> 99
 <211> 762
 <212> DNA
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 99
 atgtggcagc tgctgtgcc gaccgcgctg ctgctgtggt tgagcgcggg catgcgcacc 60
 10 gaagatctgc cgaaagcggg ggtgtttctg gaaccgcagt ggtatcgcgt gctggaaaaa 120
 gatagcgtga ccctgaaatg ccagggcgcg tatagcccgg aagataacag caccagtggt 180
 ttccataacg aaagcctgat tagcagccag gcgagcagct attttattga tgcggcgacc 240
 15 gtggatgata gcggcgaata tcgctgccag accaacctga gcaccctgag cgatccgggtg 300
 cagctggaag tgcatattgg ctggctgctg ctgcaggcgc gcgctgggt gtttaaagaa 360
 20 gaagatccga ttcatctgcg ctgccatagc tggaaaaaca ccgcgctgca taaagtgacc 420
 tatctgcaga acggcaaagg ccgcaaatat ttcatcata acagcgattt ttatattccg 480
 aaagcgaccc tgaaagatag cggcagctat tttgccgcg gcctgtttgg cagcaaaaac 540
 25 gtgagcagcg aaaccgtgaa cattaccatt acccagggcc tggcgggtgag caccattagc 600
 agctttttc cgccgggcta tcaggtgagc tttgcctgg tgatggtgct gctgtttgcg 660
 30 gtggataccg gcctgtattt tagcgtgaaa accaacattc gcagcagcac ccgcgattgg 720
 aaagatcata aatttaaatg gcgcaaagat ccgcaggata aa 762

 <210> 100
 35 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 100
 40 Met Phe Gln Asn Ala His Ser Gly Ser Gln Trp Leu Leu Pro Pro Leu
 1 5 10 15
 Thr Ile Leu Leu Leu Phe Ala Phe Ala Asp Arg Gln Ser Ala Ala Leu
 45 20 25 30
 Pro Lys Ala Val Val Lys Leu Asp Pro Pro Trp Ile Gln Val Leu Lys
 35 40 45
 50 Glu Asp Met Val Thr Leu Met Cys Glu Gly Thr His Asn Pro Gly Asn
 50 55 60
 Ser Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Gly Arg Ser Ile Arg Ser Gln Val
 65 70 75 80
 55 Gln Ala Ser Tyr Thr Phe Lys Ala Thr Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr
 85 90 95
 Arg Cys Gln Met Glu Gln Thr Arg Leu Ser Asp Pro Val Asp Leu Gly
 60 100 105 110

Val Ile Ser Asp Trp Leu Leu Leu Gln Thr Pro Gln Arg Val Phe Leu
115 120 125

5 Glu Gly Glu Thr Ile Thr Leu Arg Cys His Ser Trp Arg Asn Lys Leu
130 135 140

Leu Asn Arg Ile Ser Phe Phe His Asn Glu Lys Ser Val Arg Tyr His
145 150 155 160

10 His Tyr Lys Ser Asn Phe Ser Ile Pro Lys Ala Asn His Ser His Ser
165 170 175

Gly Asp Tyr Tyr Cys Lys Gly Ser Leu Gly Ser Thr Gln His Gln Ser
15 180 185 190

Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Asp Pro Ala Thr Thr Ser Ser Ile
195 200 205

20 Ser Leu Val Trp Tyr His Thr Ala Phe Ser Leu Val Met Cys Leu Leu
210 215 220

Phe Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Tyr Val Arg Arg Asn Leu Gln
225 230 235 240

25 Thr Pro Arg Glu Tyr Trp Arg Lys Ser Leu Ser Ile Arg Lys His Gln
245 250 255

Ala Pro Gln Asp Lys
30 260

<210> 101
<211> 786
<212> DNA
35 <213> Mus musculus

<400> 101
atgtttcaga atgcacactc tggaagccaa tggctacttc caccactgac aattctgctg 60

40 ctgtttgctt ttgcagacag gcagagtgcg gctcttcgga aggctgtggt gaaactggac 120

ccccatgga tccaggtgct caaggaagac atggtgacac tgatgtgcga agggaccac 180

aacctggga actcttctac ccagtgggtc cacaacggga ggtccatccg gagccaggtc 240

45 caagccagtt acacgtttaa ggccacagtc aatgacagtg gagaatatcg gtgtcaaatg 300

gagcagaccc gcctcagcga cctgtagat ctgggagtga ttctgactg gctgctgctc 360

50 cagacccctc agcgggtgtt tctggaaggg gaaaccatca cgctaagggtg ccatagctgg 420

aggaacaaac tactgaacag gatctcattc ttccataatg aaaaatccgt gaggtatcat 480

cactacaaaa gtaatttctc tatcccaaaa gcccaaccaca gtcacagtgg ggactactac 540

55 tgcaaaggaa gtctaggaag tacacagcac cagtccaagc ctgtcaccat cactgtccaa 600

gatccagcaa ctacatcctc catctctcta gtctgtgacc acactgcttt ctccctagtg 660

60 atgtgcctcc tgtttgcagt ggacacgggc ctttatttct acgtacggag aaatcttcaa 720

```

accccgaggg agtactggag gaagtcctg tcaatcagaa agcaccaggc tcctcaagac    780
aagtga                                786
5
<210> 102
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens
10
<400> 102

Met Gly Trp Ile Arg Gly Arg Arg Ser Arg His Ser Trp Glu Met Ser
1      5      10      15

15
Glu Phe His Asn Tyr Asn Leu Asp Leu Lys Lys Ser Asp Phe Ser Thr
      20      25      30

Arg Trp Gln Lys Gln Arg Cys Pro Val Val Lys Ser Lys Cys Arg Glu
20      35      40      45

Asn Ala Ser Pro Phe Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala Val Ala Met Gly
      50      55      60

25
Ile Arg Phe Ile Ile Met Val Ala Ile Trp Ser Ala Val Phe Leu Asn
65      70      75      80

Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys
      85      90      95

30
Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln
      100      105      110

Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met
35      115      120      125

Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp
      130      135      140

40
Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile
145      150      155      160

Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro
      165      170      175

45
Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr
      180      185      190

Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr
50      195      200      205

Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val
      210      215

55
<210> 103
<211> 648
<212> DNA
<213> Homo sapiens
60
<400> 103

```

atgggctgga ttgcggccg ccgcagccgc catagctggg aaatgagcga atttcataac 60
tataacctgg atctgaaaaa aagcgatttt agcaccgcgt ggcagaaaca gcgctgcccg 120
5 gtggtgaaaa gcaaatgccg cgaaaacgcg agcccgtttt tttttgctg ctttattgcg 180
gtggcgatgg gcattcgctt tattattatg gtggcgattt ggagcgcggt gtttctgaac 240
agcctgttta accaggaagt gcagattccg ctgaccgaaa gctattgcgg cccgtgcccg 300
10 aaaaactgga ttgctataa aaacaactgc tatcagtttt ttgatgaaag caaaaactgg 360
tatgaaagcc aggcgagctg catgagccag aacgcgagcc tgctgaaagt gtatagcaaa 420
15 gaagatcagg atctgctgaa actggtgaaa agctatcatt ggatgggcct ggtgcatatt 480
ccgaccaacg gcagctggca gtgggaagat ggcagcattc tgagcccga cctgctgacc 540
attattgaaa tgcagaaagg cgattgcgcg ctgtatgcga gcagctttaa aggctatatt 600
20 gaaaactgca gcaccccgaa cacctatatt tgcattgcgc gcaccgtg 648
<210> 104
<211> 232
25 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 104
30 Met Ala Leu Ile Arg Asp Arg Lys Ser His His Ser Glu Met Ser Lys
1 5 10 15
Cys His Asn Tyr Asp Leu Lys Pro Ala Lys Trp Asp Thr Ser Gln Glu
20 25 30
35 Gln Gln Lys Gln Arg Leu Ala Leu Thr Thr Ser Gln Pro Gly Glu Asn
35 40 45
Gly Ile Ile Arg Gly Arg Tyr Pro Ile Glu Lys Leu Lys Ile Ser Pro
40 50 55 60
Met Phe Val Val Arg Val Leu Ala Ile Ala Leu Ala Ile Arg Phe Thr
65 70 75 80
45 Leu Asn Thr Leu Met Trp Leu Ala Ile Phe Lys Glu Thr Phe Gln Pro
85 90 95
Val Leu Cys Asn Lys Glu Val Pro Val Ser Ser Arg Glu Gly Tyr Cys
100 105 110
50 Gly Pro Cys Pro Asn Asn Trp Ile Cys His Arg Asn Asn Cys Tyr Gln
115 120 125
Phe Phe Asn Glu Glu Lys Thr Trp Asn Gln Ser Gln Ala Ser Cys Leu
55 130 135 140
Ser Gln Asn Ser Ser Leu Leu Lys Ile Tyr Ser Lys Glu Glu Gln Asp
145 150 155 160
60 Phe Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val Gln Ile

	165	170	175	
	Pro Ala Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ser Leu Ser Tyr			
	180	185	190	
5	Asn Gln Leu Thr Leu Val Glu Ile Pro Lys Gly Ser Cys Ala Val Tyr			
	195	200	205	
10	Gly Ser Ser Phe Lys Ala Tyr Thr Glu Asp Cys Ala Asn Leu Asn Thr			
	210	215	220	
	Tyr Ile Cys Met Lys Arg Ala Val			
	225	230		
15	<210> 105			
	<211> 696			
	<212> DNA			
	<213> Mus musculus			
20	<400> 105			
	atggcgctga ttcgcgatcg caaaagccat catagcgaaa tgagcaaagc ccataactat	60		
	gatctgaaac cggcgaaatg ggataccagc caggaacagc agaaacagcg cctggcgctg	120		
25	accaccagcc agccggggcga aaacggcatt attcgcggcc gctatccgat tgaaaaactg	180		
	aaaattagcc cgatgtttgt ggtgcgcgtg ctggcgattg cgctggcgat tcgctttacc	240		
	ctgaacaccc tgatgtggct ggcgattttt aaagaaacct ttcagccggg gctgtgcaac	300		
30	aaagaagtgc cggtagcag ccgcgaaggc tattgcggcc cgtgcccga ccaactggatt	360		
	tgccatcgca acaactgcta tcagttttt aacgaagaaa aaacctggaa ccagagccag	420		
35	gcgagctgcc tgagccagaa cagcagcctg ctgaaaattt atagcaaaga agaacaggat	480		
	tttctgaaac tggtagaaaag ctatcattgg atgggcctgg tgcagattcc ggcgaacggc	540		
	agctggcagt gggaagatgg cagcagcctg agctataacc agctgaccct ggtggaaatt	600		
40	ccgaaaggca gctgcgcggg gtatggcagc agctttaaag cgtataccga agattgcgcg	660		
	aacctgaaca cctatatattg catgaaacgc gcggtg	696		
45	<210> 106			
	<211> 4			
	<212> PRT			
	<213> Artificial sequence			
50	<220>			
	<223> CD28 YMNM			
	<400> 106			
55	Tyr Met Asn Met			
	1			
	<210> 107			
	<211> 4			
60	<212> PRT			

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> CD28 PYAP
 5 <400> 107
 Pro Tyr Ala Pro
 1
 10 <210> 108
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 15 <220>
 <223> CD28 FMNM
 <400> 108
 20 Phe Met Asn Met
 1
 <210> 109
 25 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 30 <223> CD28 AYAA
 <400> 109
 Ala Tyr Ala Ala
 35 1
 <210> 110
 <211> 21
 <212> PRT
 40 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Signal peptide
 45 <400> 110
 Ala Thr Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala
 1 5 10 15
 50 Thr Gly Val His Ser
 20
 <210> 111
 <211> 57
 55 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Signal peptide DNA sequence
 60

<400> 111
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcactcc 57

<210> 112
5 <211> 449
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
10 <223> Anti-CD20 (GA101) heavy chain

<400> 112

15 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

20 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

25 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
30 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

35 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

40 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
45 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

50 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

55 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
60 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 5 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 10 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 15 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 20 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 25 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 30 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 35 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 40 <210> 113
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 45 <220>
 <223> Anti-CD20 (GA101) light chain
 <400> 113
 50 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 55 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 60 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro

	50	55	60
	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
	65	70	75 80
5	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn		
	85	90	95
	Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
10	100	105	110
	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
	115	120	125
15	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
	130	135	140
	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
	145	150	155 160
20	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
	165	170	175
	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
25	180	185	190
	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
	195	200	205
30	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215	
	<210> 114		
	<211> 447		
35	<212> PRT		
	<213> Artificial sequence		
	<220>		
	<223> Anti-FAP(4B9) PGLALA heavy chain		
40	<400> 114		
	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10 15
45	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
	20	25	30
	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
50	35	40	45
	Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50	55	60
55	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65	70	75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
60			

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
5 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

10 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

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

15 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
20 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

25 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

30 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
35 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

40 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

45 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
50 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

55 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

60

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
5 435 440 445

<210> 115
<211> 215
<212> PRT
10 <213> Artificial sequence

<220>
<223> Anti-FAP(4B9) light chain

15 <400> 115

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

25 Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
30 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

35 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

40 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
45 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

50 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

55 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 116
60 <211> 451

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

5 <223> Anti-CEA (A5B7) PGLALA heavy chain

<400> 116

10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
20 25 30

15 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

20 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
25 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

30 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

35 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

40 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

45 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

50 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
55 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

60 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

	275	280	285
	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
	290	295	300
5	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
	305	310	315 320
10	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile		
	325	330	335
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	340	345	350
15	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	355	360	365
	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
	370	375	380
20	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
	385	390	395 400
	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
25	405	410	415
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	420	425	430
30	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	435	440	445
	Pro Gly Lys		
35	450		
	<210> 117		
	<211> 223		
	<212> PRT		
	<213> Artificial sequence		
40			
	<220>		
	<223> Anti-CEA (A5B7) light chain		
	<400> 117		
45			
	Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala		
	1	5	10 15
	Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala		
50	20	25	30
	Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr		
	35	40	45
55	Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val		
	50	55	60
	Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile		
60	65	70	75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 5 100 105 110
 Leu Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 115 120 125
 10 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 130 135 140
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 145 150 155 160
 15 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 165 170 175
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 20 180 185 190
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 195 200 205
 25 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 118
 <211> 451
 30 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-CEA (T84.66LCHA) PGLALA heavy chain
 35 <400> 118
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 40 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 45 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
 50 55 60
 50 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 55 Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 60 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

5 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

10 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
15 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

20 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

25 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
30 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

35 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

40 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
45 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

50 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

55 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
60 435 440 445

Pro Gly Lys
450

5 <210> 119
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial sequence

10 <220>
<223> Anti-CEA (T84.66LCHA) light chain

<400> 119

15 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30
20 Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
25 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
30 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110
35 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
40 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
45 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
50 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
55 210 215

<210> 120
<211> 451
<212> PRT
60 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Anti-CEA (CH1A1A98/992F1) PGLALA heavy chain

5 <400> 120

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

10 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

15 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
20 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

25 Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

30 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
35 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

40 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

45 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
50 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

55 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 5 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 10 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 15 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 20 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 25 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 30 Pro Gly Lys
 450
 <210> 121
 35 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 40 <223> Anti-CEA (CH1A1A98/992F1) light chain
 <400> 121
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 45 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr
 20 25 30
 50 Val Ala Trp Tyr Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 55 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 60 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 5 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 10 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 15 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 20 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 25 <210> 122
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 30 <220>
 <223> Anti-CEA (hMN14) PGLALA heavy chain
 <400> 122
 35 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 40 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 45 Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 50 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 55 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 60 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

	130	135	140
	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
	145	150	155 160
5	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
	165	170	175
	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
10	180	185	190
	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
	195	200	205
15	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
	210	215	220
	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro		
	225	230	235 240
20	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
	245	250	255
	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
25	260	265	270
	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
	275	280	285
30	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
	290	295	300
	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
	305	310	315 320
35	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys		
	325	330	335
	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
40	340	345	350
	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
	355	360	365
45	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
	370	375	380
	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
	385	390	395 400
50	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
	405	410	415
	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
55	420	425	430
	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	435	440	445
60	Lys		

<210> 123
 <211> 213
 5 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Anti-CEA (hMN14) light chain
 10
 <400> 123

 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 20 35 40 45
 Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
 85 90 95
 30 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 35 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 40 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 45 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 50 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 55 <210> 124
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 60 <220>

<223> Anti-TNC (2B10) PGLALA heavy chain

<400> 124

5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

10 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
15 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

20 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

25 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
30 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

35 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

40 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
45 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

50 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

55 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
60 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 5 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 10 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 15 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 20 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 25 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 30 450
 <210> 125
 <211> 214
 <212> PRT
 35 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-TNC (2B10) light chain
 40 <400> 125
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 50 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 55 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
 85 90 95
 60 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

	100	105	110
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
	115	120	125
5	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
	130	135	140
10	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
	145	150	155 160
	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165	170	175
15	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180	185	190
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200	205
20	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
25	<210> 126		
	<211> 449		
	<212> PRT		
	<213> Artificial sequence		
30	<220>		
	<223> Anti-HER2 (PER) PG LALA heavy chain 1		
	<400> 126		
35	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr		
	20	25	30
40	Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40	45
	Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe		
	50	55	60
45	Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65	70	75 80
50	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
	100	105	110
55	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
	115	120	125
	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
	130	135	140
60			

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 5 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 10 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 15 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 20 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 25 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 30 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 35 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 40 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 45 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 50 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 55 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

60

<210> 127
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 5
 <220>
 <223> Anti-HER2 (PER) light chain 1
 <400> 127
 10 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
 15 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 20 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 25 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 30 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 35 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 40 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 45 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 50 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 128
 <211> 449
 55 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Anti-HER2 (PER) PG LALA heavy chain 2
 60

<400> 128

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 10 35 40 45
 Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 15 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 20 Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 25 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 30 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 35 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 40 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 45 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 50 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 55 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 60 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 5 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 10 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 15 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 20 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 25 435 440 445
 Lys
 30 <210> 129
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 35 <220>
 <223> Anti-HER2 (PER) light chain 2
 <400> 129
 40 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
 20 25 30
 45 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 55 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 60

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

5 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

10 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

15 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
20 210

<210> 130
<211> 330
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 130

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
30 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

35 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

40 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
45 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

50 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

55 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
60 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

5 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

10 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
15 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

20 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

25 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
30 325 330

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антигензв'язуючий рецептор, який включає заякорений трансмембранний домен і позаклітинний домен, який включає антигензв'язуючий фрагмент, де антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з доменом мутованого (Fc) фрагмента, який кристалізується, але не здатний специфічно зв'язуватися з немutowаним вихідним Fc-доменом, де мутований Fc-домен включає принаймні одну амінокислотну заміну в порівнянні з немutowаним вихідним Fc-доменом, де мутований Fc-домен включає амінокислотну мутацію P329G, відповідно до системи нумерації EU, де антигензв'язуючий фрагмент здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc-доменом, який включає мутацію P329G, але не здатний специфічно зв'язуватися з немutowаним вихідним Fc-доменом, та де антигензв'язуючий фрагмент включає:
 - (i) варіабельну ділянку (VH) важкого ланцюга, що включає:
 - (a) 1-у ділянку важкого ланцюга (CDR H), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RYWMN (SEQ ID NO: 1),
 - (б) CDR H2 з амінокислотною послідовністю EITPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 2), і
 - (в) CDR H3 з амінокислотною послідовністю PYDYGAWFAS (SEQ ID NO: 3), а також
 - (ii) варіабельну ділянку (VL) легкого ланцюга, що включає:
 - (г) 1-у ділянку легкого ланцюга (CDR L), яка визначає комплементарність з амінокислотною послідовністю RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 4),
 - (д) CDR L2 з амінокислотною послідовністю GTNKRAP (SEQ ID NO: 5), і
 - (е) CDR L3 з амінокислотною послідовністю ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 6).
2. Антигензв'язуючий рецептор за п. 1, де немutowаним вихідним Fc-доменом є Fc-домен IgG1 людини.
3. Антигензв'язуючий рецептор за п. 1 або 2, де зв'язування Fc-рецептора з мутованим Fc-доменом знижене в порівнянні зі зв'язуванням Fc-рецептора з немutowаним вихідним Fc-доменом, переважно, де Fc-рецептором є Fc γ -рецептор або неонатальний Fc-рецептор (FcRn).
4. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з пп. 1-3, де заякорений трансмембранний домен являє собою трансмембранний домен, який вибирають з групи, яка складається з

трансмембранного домену CD8, CD3z, F CGR3A, NKG2D, CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 або DAP12, або його фрагмента, перш за все, де заякореним трансмембранним доменом є CD28 трансмембранний домен або його фрагмент.

5 Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з пп. 1-4, який додатково включає принаймні один стимулюючий сигнальний домен і/або принаймні один костимулюючий сигнальний домен, переважно, де принаймні один стимулюючий сигнальний домен є внутрішньоклітинним доменом CD3z.

10 6. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з пп. 1-5, де принаймні один костимулюючий сигнальний домен індивідуально вибирають з групи, яка складається з внутрішньоклітинного домену CD27, CD28, CD137, OX40, ICOS, DAP10 і DAP12, або їх фрагментів, переважно, де принаймні один костимулюючий сигнальний домен являє собою внутрішньоклітинний домен CD28 або його фрагмент.

15 7. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з пп. 1-6, де антигензв'язуючий рецептор включає один стимулюючий сигнальний домен, який включає внутрішньоклітинний домен CD28 або його фрагмент, і де антигензв'язуючий рецептор включає один костимулюючий сигнальний домен, який включає внутрішньоклітинний домен CD3z або його фрагмент.

8. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з пп. 1-7, де антигензв'язуючий фрагмент являє собою scFv.

20 9. Антигензв'язуючий рецептор за п. 8, де scFv фрагмент приєднаний через С-кінцевий залишок до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, необов'язково через пептидний лінкер.

25 10. Антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з пп. 1-7, де антигензв'язуючий фрагмент являє собою Fab або crossFab фрагмент, де Fab або crossFab фрагмент приєднаний через С-кінцевий залишок важкого ланцюга до N-кінцевого залишку заякореного трансмембранного домену, необов'язково через пептидний лінкер.

11. Трансдукована Т-клітина, здатна експресувати антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з пп. 1-10.

12. Виділений полінуклеотид, який кодує антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з пп. 1-10.

13. Вектор, переважно вектор експресії, який включає полінуклеотид за п. 12.

30 14. Набір для лікування злоякісних захворювань, який включає:

(А) трансдуковану Т-клітину, здатну експресувати антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з пп. 1-10, і

(Б) антитіло, яке включає мутований Fc-домен,

35 де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc-доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc-доменом.

15. Набір для лікування злоякісних захворювань, який включає:

(А) виділений полінуклеотид, який кодує антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з пп. 1-10, і

(Б) антитіло, яке включає мутований Fc-домен,

40 де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc-доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc-доменом.

16. Набір за будь-яким з пп. 14 або 15, де антитіло, яке включає мутований Fc-домен, здатне специфічно зв'язуватися з антигеном, який вибирають з групи, яка складається з білка активації фібробластів (FAP), карциноембріонального антигену (CEA), мезотеліну (MSLN), CD20, рецептора 1 фолієвої кислоти (FOLR1) і тенасцину (TNC).

45 17. Набір за будь-яким з пп. 14-16 для застосування як лікарського засобу.

18. Набір за будь-яким з пп. 14-16 для застосування при лікуванні захворювання, переважно для застосування при лікуванні злоякісного захворювання.

50 19. Трансдукована Т-клітина за п. 11 для застосування як лікарського засобу, де трансдуковану Т-клітину, яка експресує антигензв'язуючий рецептор, вводять до, одночасно з введенням або після введення антитіла, яке включає мутований Fc-домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc-доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc-доменом.

55 20. Трансдукована Т-клітина за п. 11 для застосування при лікуванні злоякісного захворювання, де лікування включає введення трансдукованої Т-клітини, яка експресує антигензв'язуючий рецептор, до, одночасно з введенням або після введення, антитіла, яке включає мутований Fc-домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc-доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc-доменом.

60 21. Спосіб лікування злоякісного захворювання у суб'єкта, який включає введення суб'єкту трансдукованої Т-клітини, здатної експресувати антигензв'язуючий рецептор за будь-яким з пп. 1-10, і введення до, одночасно з введенням або після введення трансдукованої Т-клітини,

терапевтично ефективної кількості антитіла, яке включає мутований Fc-домен, де антигензв'язуючий рецептор здатний специфічно зв'язуватися з мутованим Fc-доменом, але не здатний специфічно зв'язуватися з немутованим вихідним Fc-доменом.

22. Застосування антигензв'язуючого рецептора за будь-яким з пп. 1-10, трансдукованої Т-клітини за п. 12 або полінуклеотиду за п. 11 для одержання лікарського засобу, призначеного для лікування злоякісного захворювання.

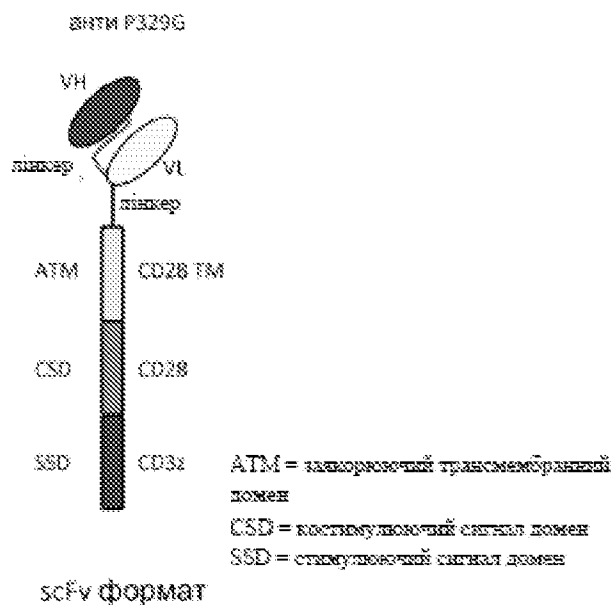


Fig. 1A

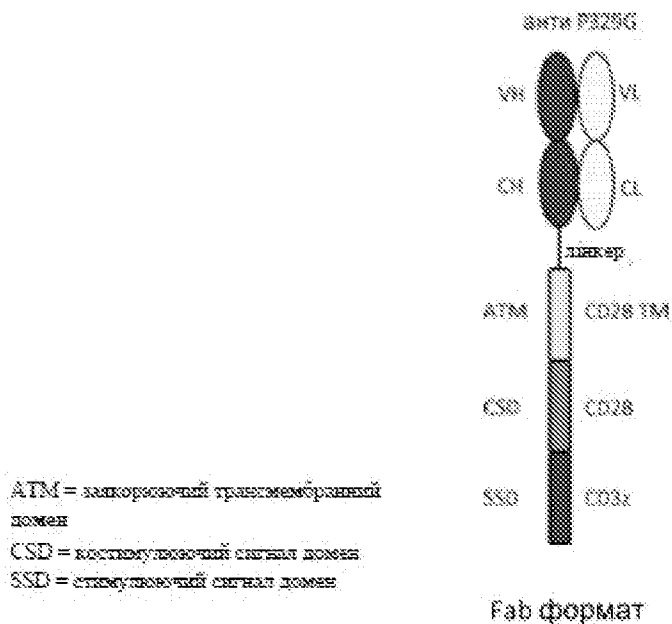


Fig. 1B

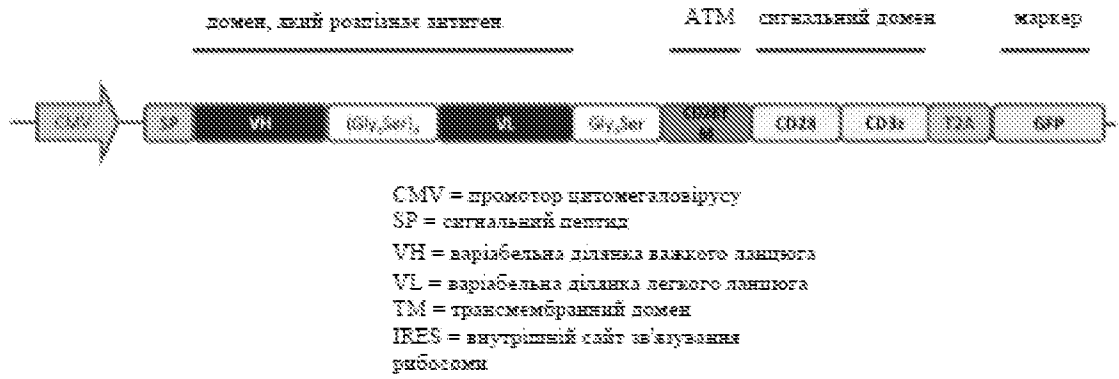


Fig. 2A

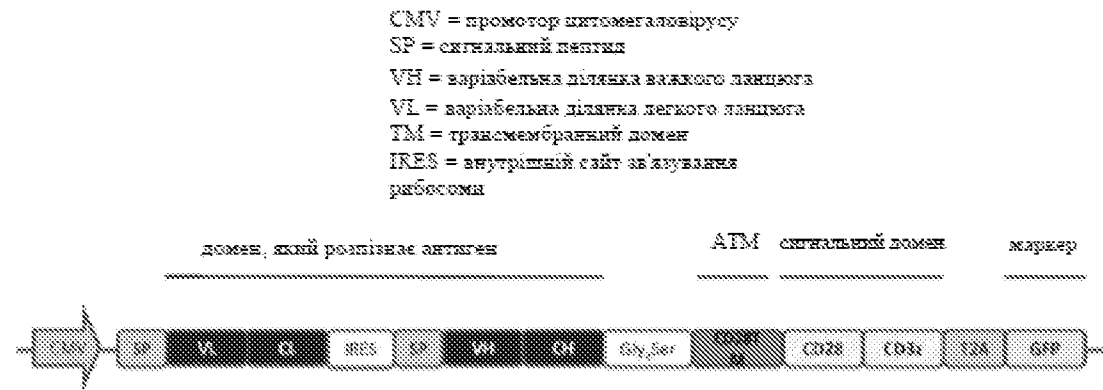
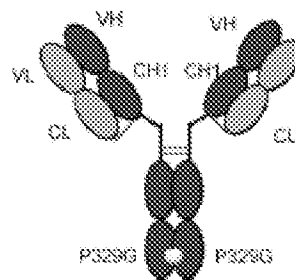


Fig. 2B



P329G IgG1

Fig. 3

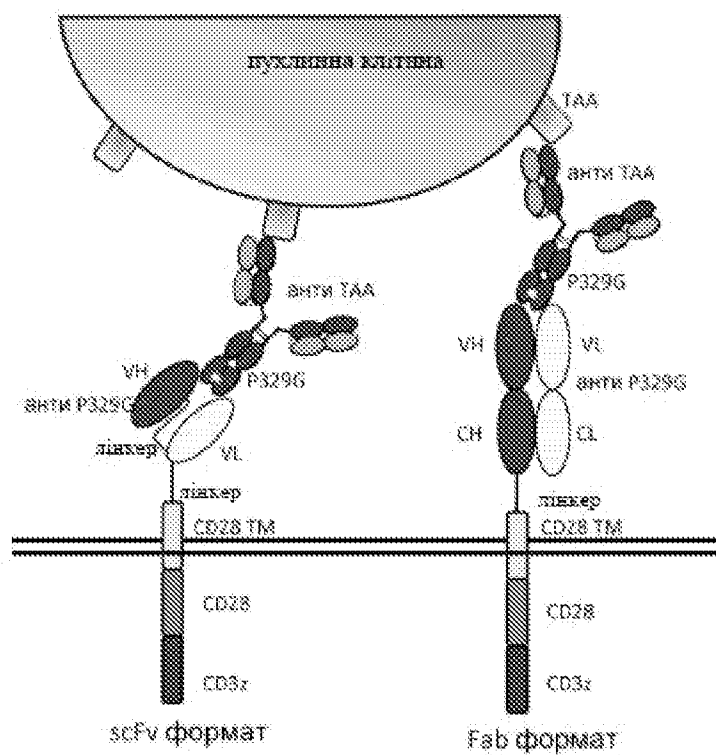
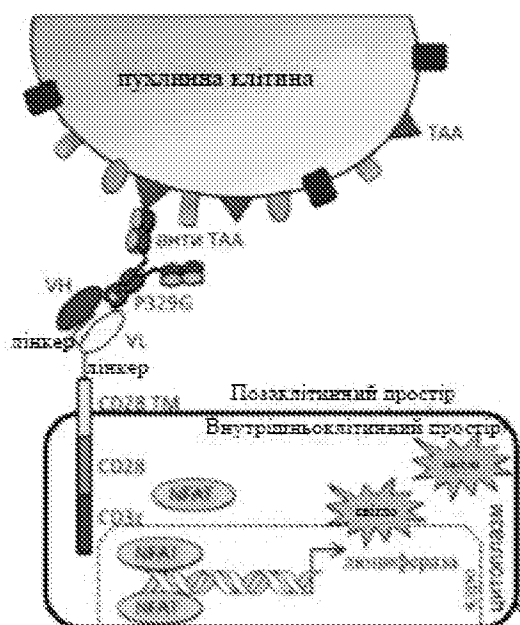


Fig. 4



Dir. 5

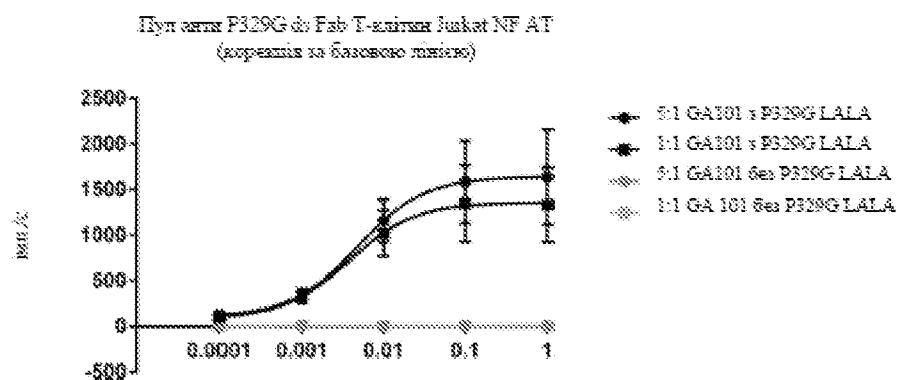


Fig. 6A

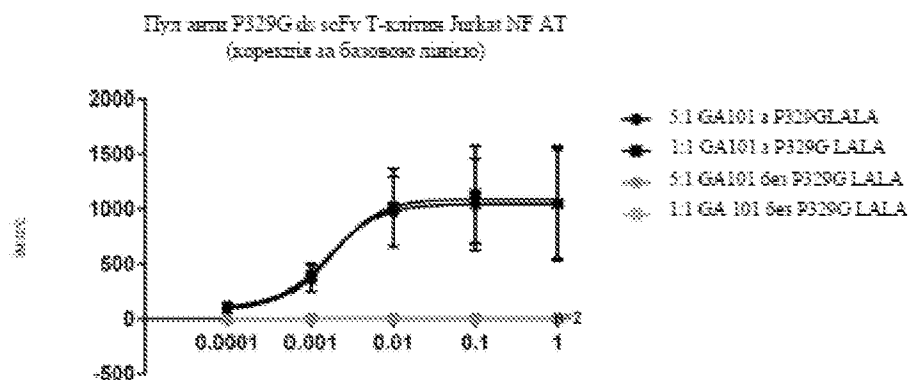


Fig. 6B

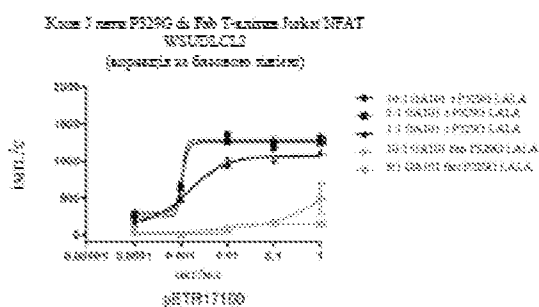
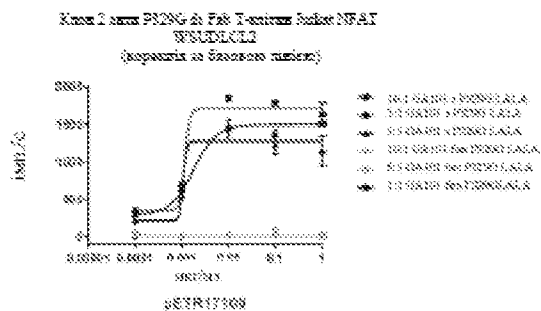
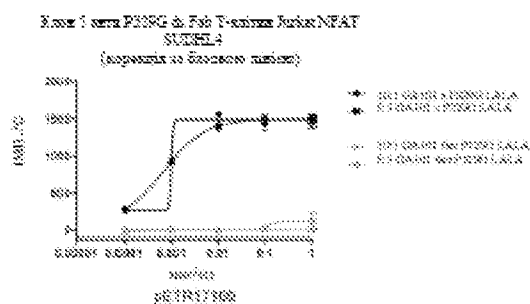


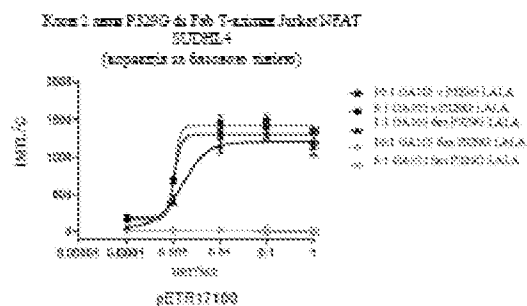
Fig. 7A



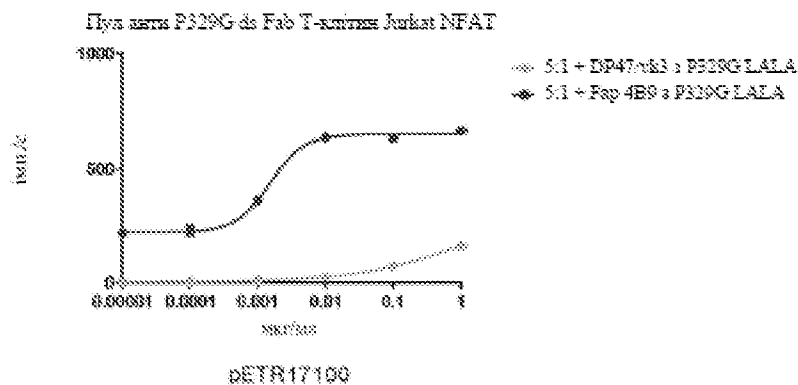
Фиг. 7Б



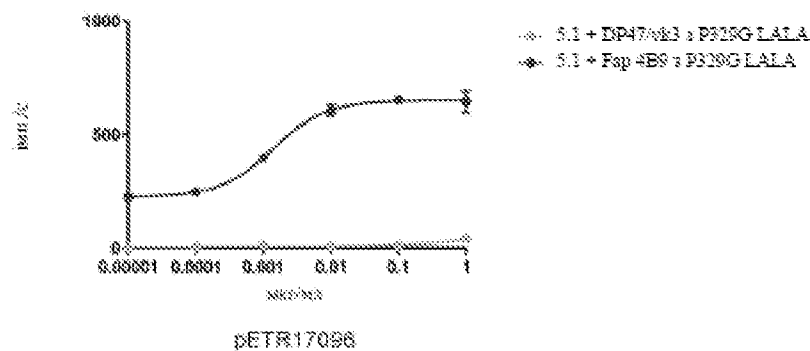
Фиг. 7В



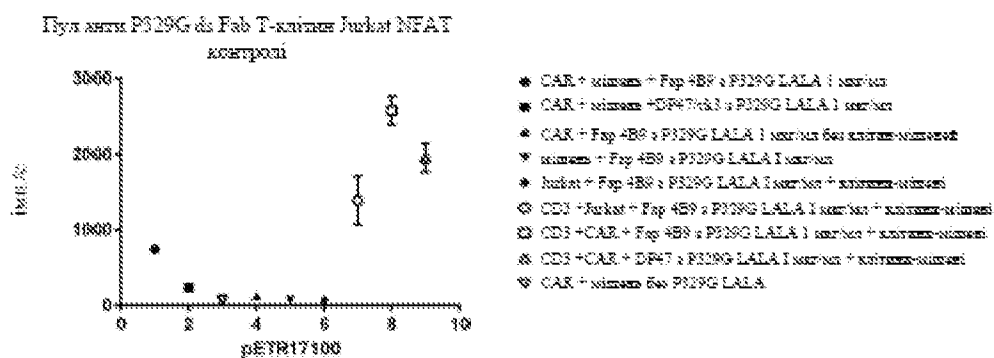
Фиг. 7Г



Фиг. 8А



Фиг. 8Б



Фиг. 8В

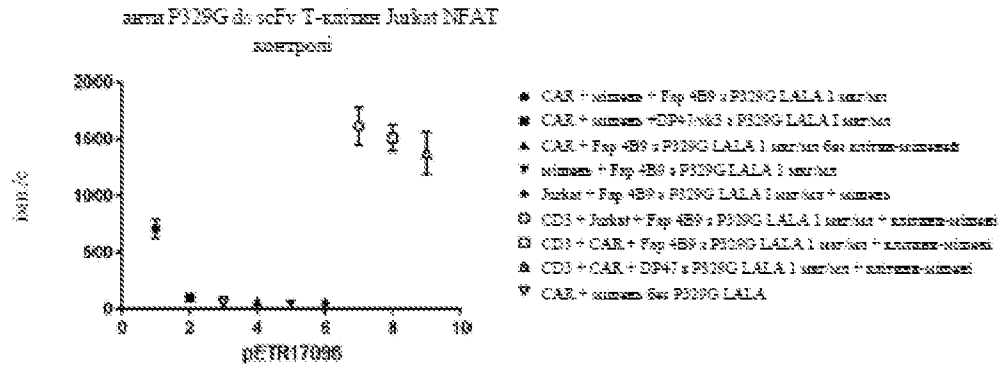


Fig. 8Г

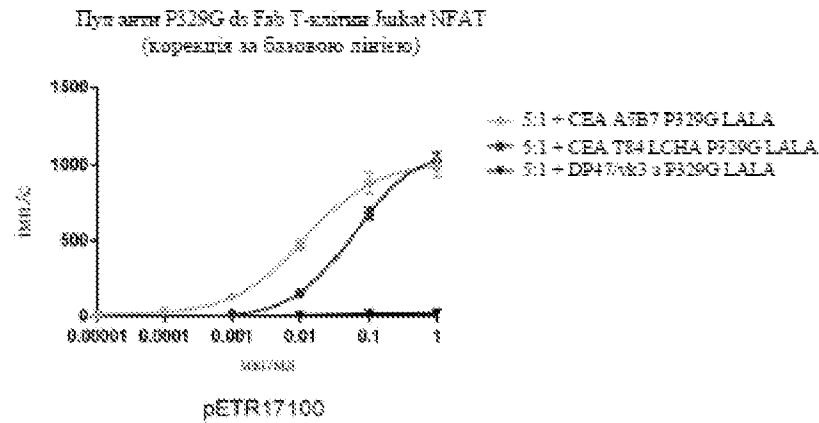


Fig. 9А

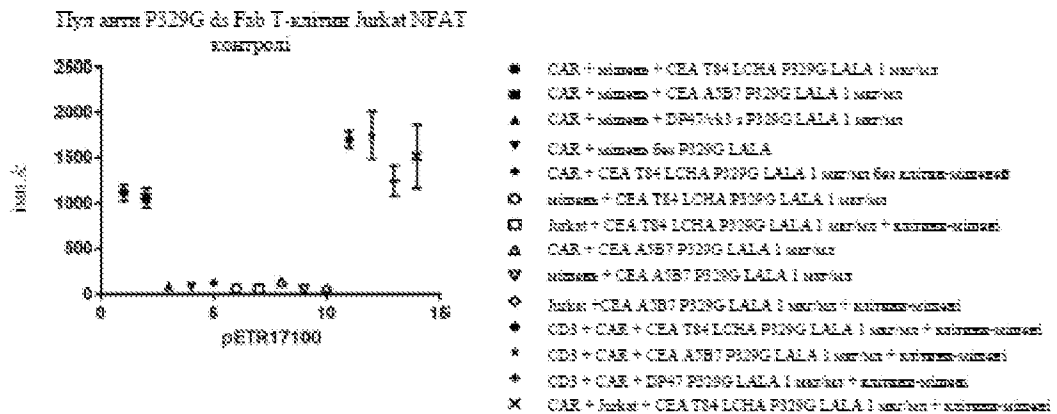


Fig. 9Б

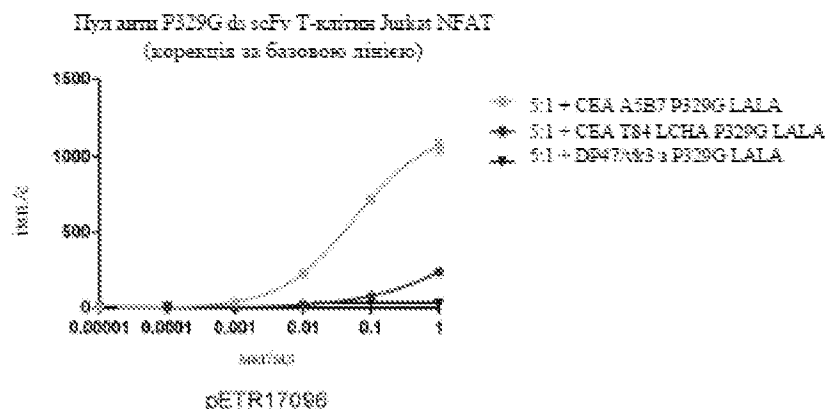


Fig. 9B

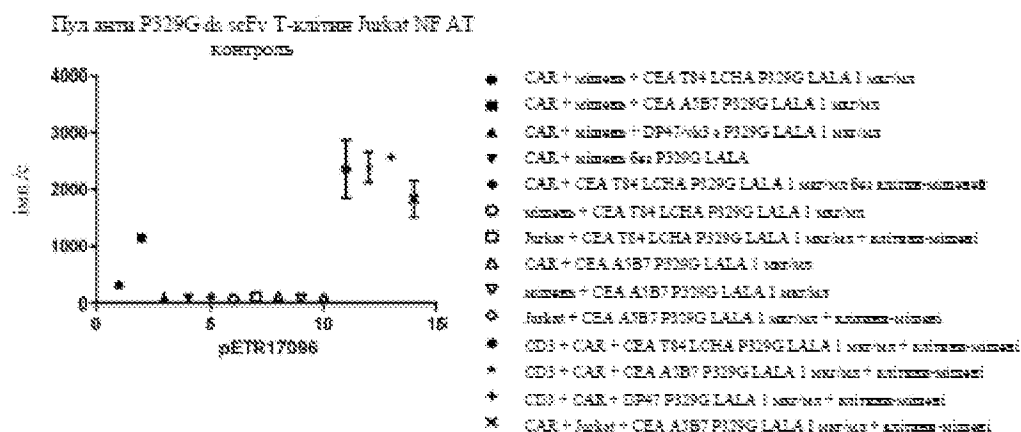


Fig. 9Г

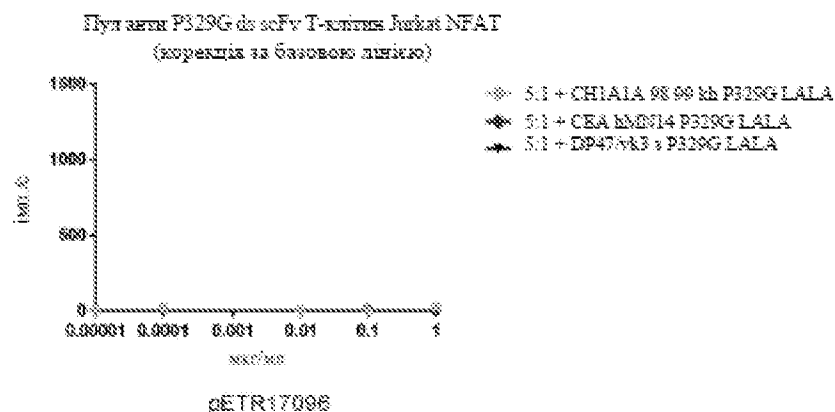
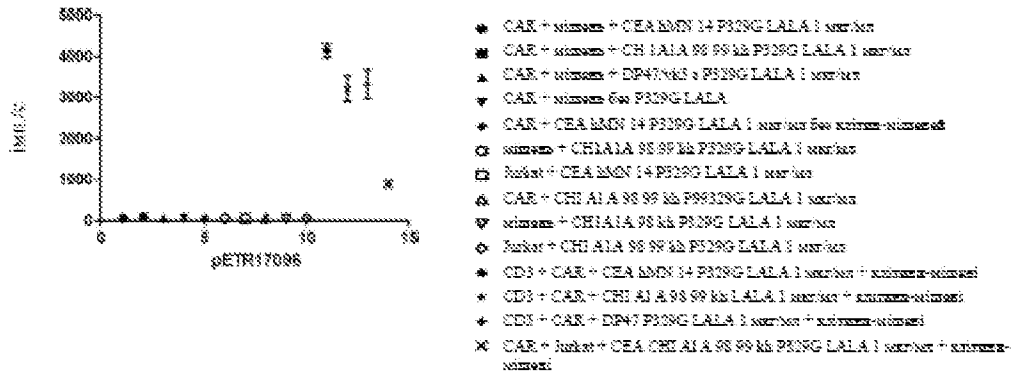


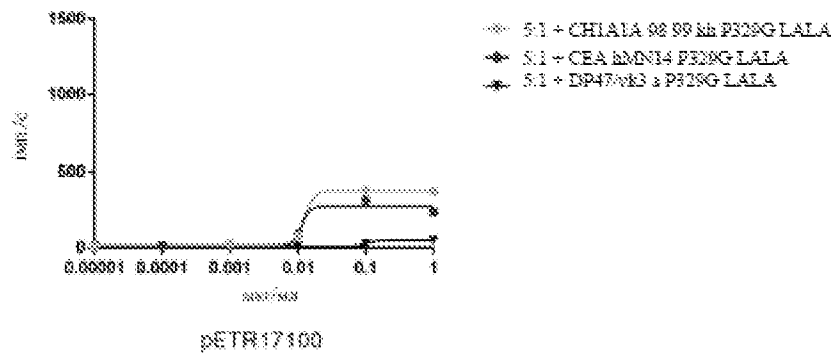
Fig. 10A

Плътність P329G до зв'язування T-клетками NFAT
контроль



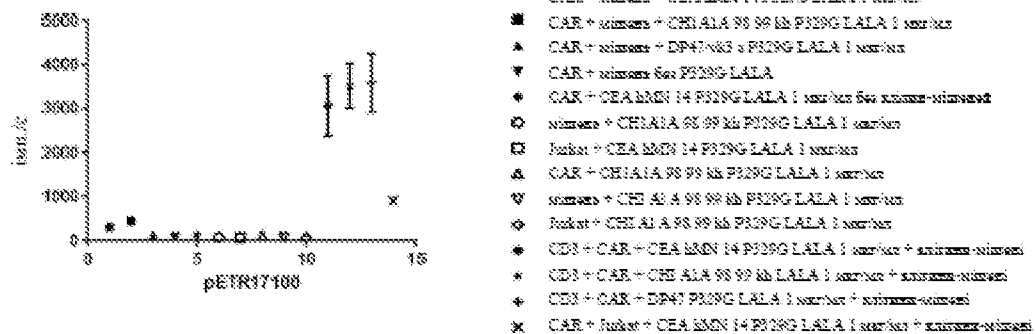
Фиг. 10Б

Плътність P329G до зв'язування T-клетками NFAT
(корекція за базовою лінією)



Фиг. 10В

Плътність P329G до зв'язування T-клетками NFAT
контроль



Фиг. 10Г

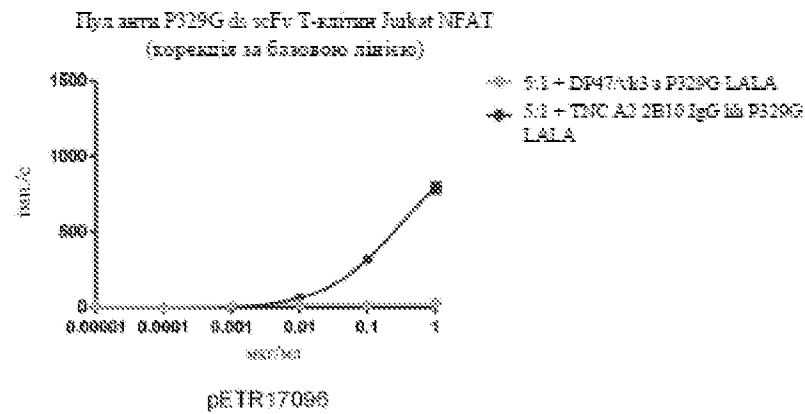


Fig. 11A

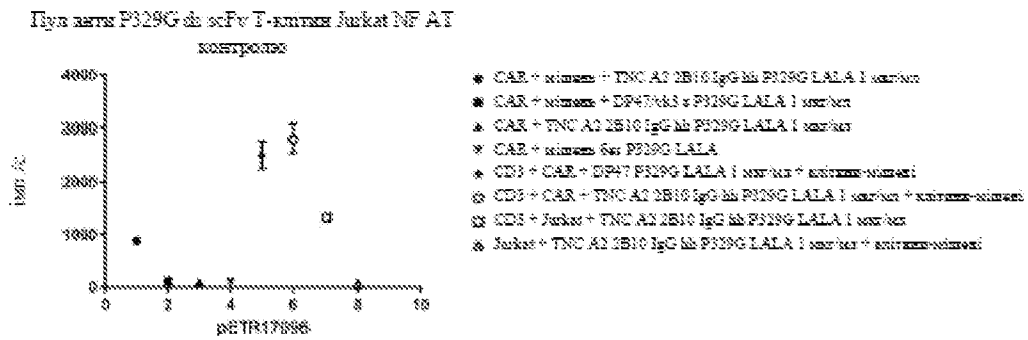


Fig. 11E

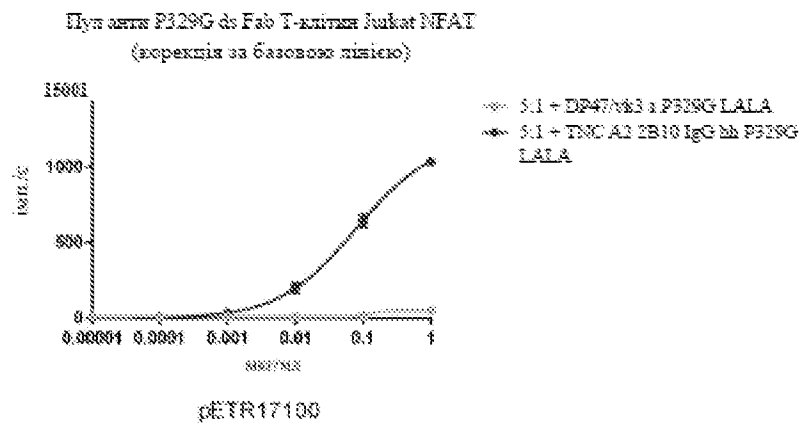


Fig. 11B

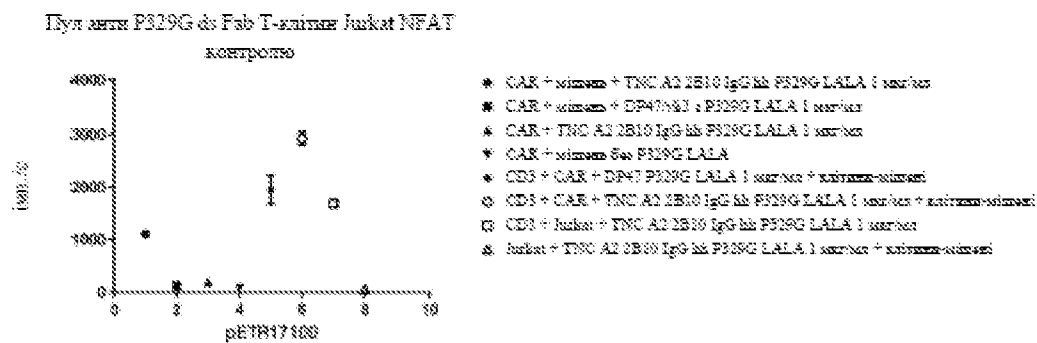


Fig. 11Г

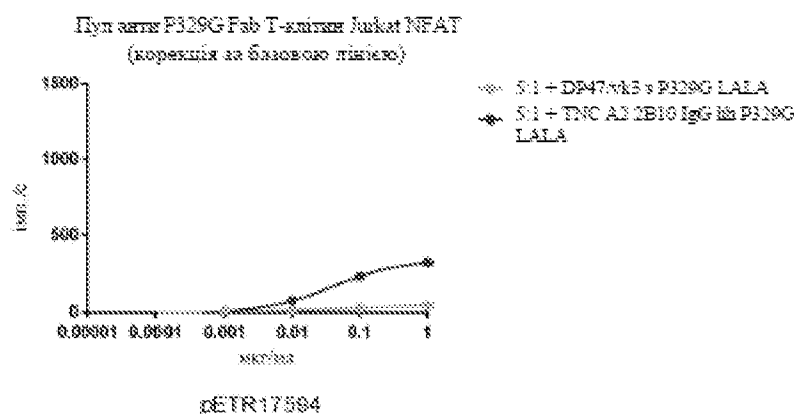


Fig. 12A

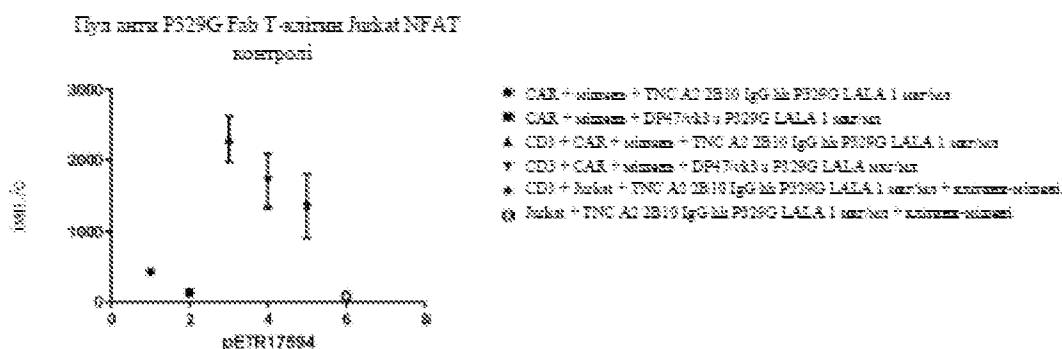
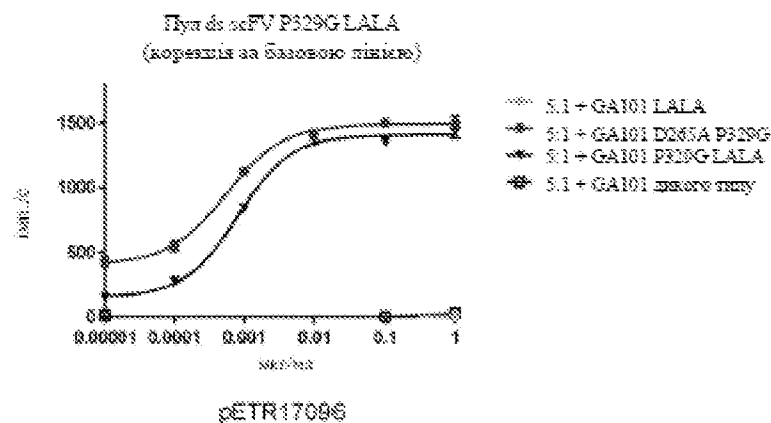
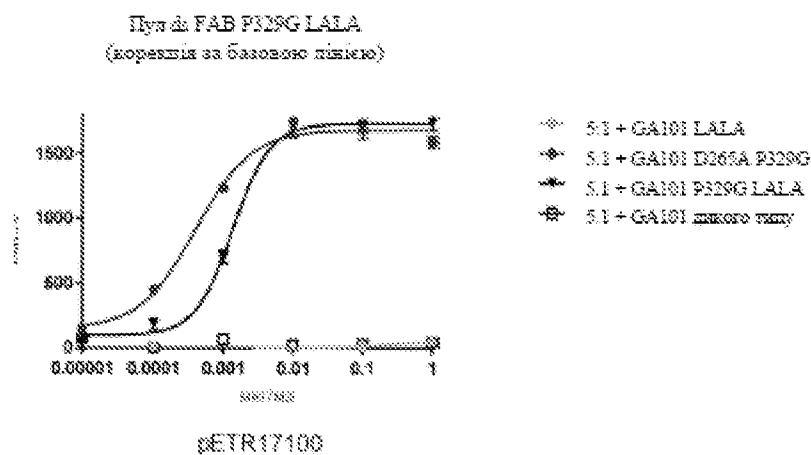


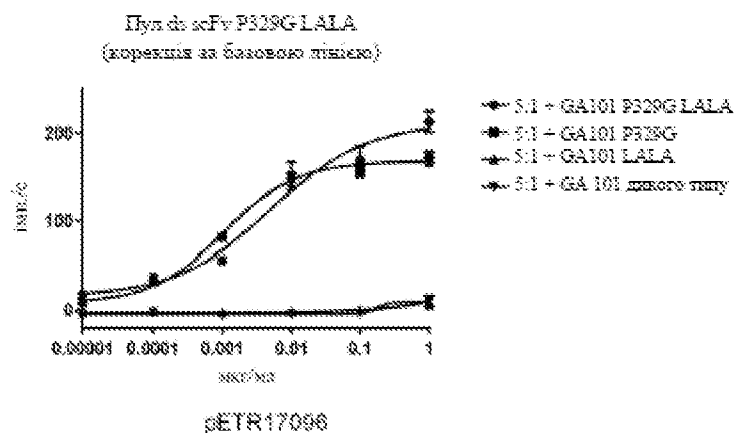
Fig. 12Б



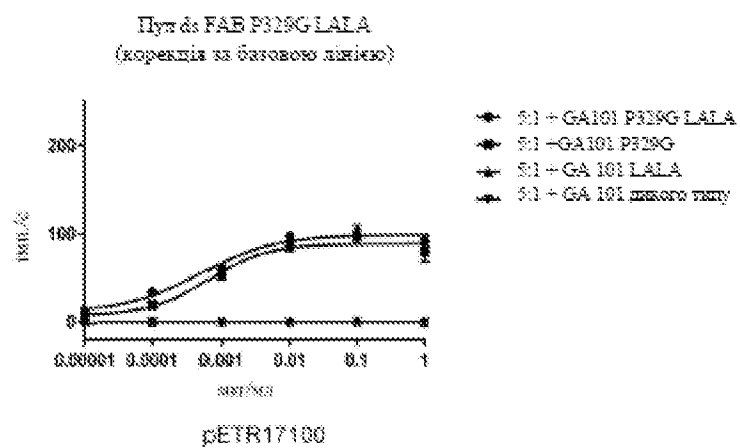
Фиг. 13А



Фиг. 13Б



Фиг. 14А



Фиг. 14Б