



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2020 00705**

(22) Data de depozit: **06/11/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. **6/2021**

(71) Solicitant:
• **SPITALUL CLINIC JUDEȚEAN DE
URGENTĂ "PIUS BRÎNZEU" TIMIȘOARA,**
BD.LIVIU REBREANU NR.156, TIMIȘOARA,
TM, RO

(72) Inventatori:
• **NEDEA COSMIN-EDUARD,**
STR.MIHAI BRAVU, BL.E15, SC.B, ET.1,
AP.4, CURTEA DE ARGEȘ, AG, RO;
• **PĂUNESCU VIRGIL,**
STR.AUGUST TREBONIU LAURIAN, NR.7,
AP.2, TIMIȘOARA, TM, RO;
• **GAVRILIUC OANA ISABELA,**
STR.MARTIR MARIUTAC, BL.B27, AP.3,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• **ZOGOREAN ROXANA, ALEEA MUNCII,**
AB18, SC.I, AP.11, DEVA, HD, RO;

• **IVAN ALEXANDRA, NR.32, BEREGSĂU
MARE, COMUNA SĂCĂLAZ, TM, RO;**
• **CRISTEA IUSTINA-MIRABELA,**
CALEA TIMIȘOAREI, NR.59, DUDEȘTII
NOI, TM, RO;
• **ȚAȚU CĂLIN ADRIAN, STR.OGLINZILOR,**
NR.5, AP.1, TIMIȘOARA, TM, RO;
• **BOJIN MARIA FLORINA,**
BD.16 DECEMBRIE 1989, NR.61, AP.11,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• **ANGHEL SIMONA- SANDA,**
STR.MARTIR VASILE BALMUȘ, NR.32-44,
SC.C, AP.8, TIMIȘOARA, TM, RO

(74) Mandatar:
**CABINET DE PROPRIETATE
INDUSTRIALĂ TUDOR ICLĂNZAN,**
PIAȚA VICTORIEI NR.5, SC.D, AP.2,
TIMIȘOARA, TM

(54) **CELULE CITOTOXICE PURTĂTOARE DE RECEPTORI
HIMERICI DE ANTIGEN UNIVERSALI CARE ȚINTESC
ANTIGENE DIVERSE ȘI MULTIPLE PENTRU TRATAMENT
ADOPTIV**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de producere a unor celule citotoxice purtătoare de receptori himerici de antigen (RHA) universali care țintesc antigene diverse și multiple pentru terapii adoptive ale bolilor neoplazice, inflamatorii, autoimune și ale infecțiilor intracelulare. Metoda, conform invenției, constă într-o platformă modulară comună pentru legarea, prin intermediul receptorului himeric de imunoglobuline de mare afini-

tate, de molecule cu potențial terapeutic de tip anticorpi monoclonali de tip IgG1 și IgG3 sau molecule hibrid care conțin domeniul Fc al acestor tipuri de molecule, mărind astfel spectrul țintelor posibile și asigurând o specificitate mai mare a tratamentului.

Revendicări: 11
Figuri: 6

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



| |
|--|
| OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI |
| Cerere de brevet de invenție |
| Nr. a 2020 00705 |
| Data depozit 06 -11- 2020 |

96

1

CELULE CITOTOXICE PURTĂTOARE DE RECEPTORI HIMERICI DE ANTIGEN UNIVERSALI CARE ȚINTEȘC ANTIGENE DIVERSE ȘI MULTIPLE PENTRU TRATAMENT ADOPTIV

Domeniul invenției este cel al medicinei în general și cel al produselor folosite în terapii adoptive ale bolilor neoplazice, inflamatorii, autoimune, al infecțiilor intracelulare și al altor maladii, în special.

Prezența invenție se încadrează în domeniul terapiilor adoptive care folosesc celule imune citotoxice modificate genetic cu receptori himerici de antigen (RHA) capabile să declanșeze un răspuns citotoxic față de celulele care exprimă un anumit antigen recunoscut de RHA. Mai precis, această invenție descrie construirea unor variante de RHA care pot recunoaște un antigen de interes prin intermediul imunoglobulinelor și declanșa un răspuns citotoxic printr-un mecanism diferit de cel întâlnit natural în citotoxicitatea mediată de anticorpi și a celulelor imune care exprimă aceste molecule.

Terapia adoptivă cu limfocite T purtătoare de receptori himerici de antigeni (RHA) a revoluționat oncoimunoterapia, în special cea focusată pe cancerule cu celule B (leucemia limfoblastica acută și limfoame agresive non-Hodgkin), odată cu aprobarea pe piață a tratamentelor Kymriah și Yescarta, în 2017 (1, 2), ca urmare a ratei ridicate de răspuns la aceste terapii în studii clinice (3, 4).

RHA sunt proteine modulare artificiale transmembranare al căror rol este de a declanșa un răspuns citotoxic după recunoașterea unui antigen/molecule de pe suprafața celulelor țintă. Sunt compuse din trei elemente având ca referință membrană celulară:

a. un ecto-domeniu care se găsește la suprafața extracelulară și care la rândul lui conține un modul de legare care recunoaște o moleculă (antigen) de pe suprafața celulei țintă și o regiune flexibilă tip balama care permite orientarea modului de legare în spațiu,

b. un domeniu transmembranar care ancorează moleculă în membrana celulară și care poate media interacțiuni cu molecule de tip adaptor care să activeze ulterior cai de semnalizare intracelulară și

c. un domeniu intracelular compus din unul sau mai multe module care mediază răspunsul citotoxic declanșat de legarea antigenului, proliferarea și supraviețuirea celulelor citotoxice.

Modulul de recunoaștere ale molecule țintă în RHA este reprezentat, de regulă, de regiunile variabile ale lanțurilor ușor și greu ale unui anticorp monoclonal, răspunzătoare în mod normal de recunoașterea naturală a epitopului prezent pe antigen, care sunt unite în *cis* printr-un lanț peptidic (scFv- „single chain variable fragment”) și refac funcțional un fragment Fab („antigen-binding fragment”) al moleculelor de imunoglobulina.

Majoritatea RHA recunosc o singură țintă și foarte puține pot recunoaște două sau 3 ținte simultan (bi-, tri-specifice), dar odată ce o celulă este modificată prin introducerea unui gene ce codifică RHA, țintele moleculare rămân fixe. În plus, afinitatea față de antigenul vizat nu se poate modifica. O afinitate crescută față de țintă este de dorit când antigenul țintit este specific celulelor anormale și una mai scăzută când acesta este exprimat în exces pe suprafața celulelor anormale dar se găsește și pe celulele normale. În plus, utilizarea terapiilor care țintesc un

singur antigen suferă, în special în domeniul tratării cancerului, de riscul de apariție a rezistenței prin pierderea expresiei antigenului de pe celule țintite.

Pentru a controla efectul terapeutic și al efectelor secundare asociate cu acesta, este nevoie de crearea unor sisteme universale și modulare care să permită rafinarea țintirii celulelor anormale atât la nivelul moleculelor țintite, ținte variate, separat sau simultan, cât și la nivelul afinității interacțiunii între RAH și moleculă țintită.

În acest sens este cunoscută invenția **EP2990416B1** care descrie o platforma modulară și universală pentru modificarea limfocitelor T și NK formată din două componente: o componentă constantă, formată dintr-un RHA care recunoaște un antigen uman neimunogenic (peptidă) și o componentă variabilă care constă dintr-o moleculă de imunoglobulină la care este adăugat antigenul recunoscut de primul component. Deși acest sistem, denumit UniCAR, este un sistem modular și universal, care poate ținti diverse sau multiple antigene cu afinitate variabilă prin intermediul schimbării componentei variabile, suferă de dezavantajul că modularitatea depinde de molecula de anticorp care trebuie modificată să includă peptidă de recunoaștere și, ca urmare, anticorpilor monoclonali terapeutici deja existenți pe piață nu pot fi folosiți pentru direcționarea efectului citotoxic.

O altă variantă de platforma modulară este cea descrisă în invențiile **WO2016/077734A2** și **WO2016/160602A2** în celule de tip NK (Natural Killer cells- celule ucigașe naturale) primare și respectiv linii celulare derivate din NK (NK92) care sunt modificate cu varianta F158V de mai mare afinitate a receptorului de imunoglobuline de tip IgG (isotipul 1 și 3 cu predilecție) CD16A (FcγRIIIa) decât cea care este mai prevalența în populație. Receptorul CD16A mediază în mod natural răspunsul citotoxic al celulelor NK după recunoașterea

complexelor imune anticorp-antigen formate pe suprafața celulelor anormale (infectate viral sau canceroase). Este important de menționat că afinitatea crescută a alelei 158V a receptorului de imunoglobulină CD16A față de imunoglobuline este asociată cu un răspuns favorabil la terapia cu anticorpi monoclonali în anumite cancere (5,6).

În afară receptorului CD16A, diferite celulele imune exprimă pe suprafața lor receptori care recunosc cu diferite afinități și alte clase de imunoglobuline prin intermediul regiunii terminale constante Fc (fragment cristalizabil) ale moleculei de imunoglobulina. Acești receptori Fc mediază diferite răspunsuri imune stimulatorii sau inhibitorii legate de fagocitoză sau distrugerea celulelor anormale (prin eliberarea de granule citotoxice sau legare de receptori care induc apoptoza în celulele țintă). Majoritatea receptorilor de imunoglobuline sunt de mică afinitate și recunosc imunoglobulinele doar când sunt complexate cu antigene, nu și în formă monomerică. Excepție sunt receptorul de imunoglobuline IgG, FcγRI (CD64) și receptorul de imunoglobuline IgE, FcεRI.

Snyder et al, 2018 a descris un RHA care conține domeniul extracelular al receptorului de mare afinitate CD64 și domeniile transmembranal și intracelular al CD16A. Celulele NK care exprimă acest RHA sunt capabile să lege molecule monomerice de imunoglobuline IgG și să exercite efect citotoxic dependent de anticorp (7).

Problema tehnică a invenției constă în realizarea unor celule imune citotoxice modificate genetic cu RHA pentru a recunoaște ținte de pe suprafața celulelor anormale prin intermediul unor anticorpi specifici, diverși atât individual cât și în combinație, în scopul distrugerii celulelor anormale.

Invenția elimina dezavantajele cunoscute prin aceea că este constituită din celule imune citotoxice care exprimă RHA universali care țintesc, prin intermediul anticorpilor, antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv ale bolilor neoplazice, inflamatorii, autoimune, al infecțiilor intracelulare și al altor maladii, în special, receptorul himeric cuprinzând următoarele:

- un modul extracelular, de legare cu afinitate mare pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor de tip IgG, derivat din ectodomeniul receptorului de imunoglobuline IgG, Fc γ RI (CD64) care conține o peptida "eticheta", de preferință neimunogena, ca de exemplu, cea provenită de la myc- N-EQKLISEEDL-C și care poate fi folosită pentru determinarea expresiei receptorului himeric sau pentru purificarea celulelor care exprimă acești receptori. De asemenea, domeniul extracelular conține o regiune flexibilă tip „balama” care să permită un grad ridicat de libertate modulului de legare, această regiune balama fiind derivată din diferite molecule (CD8a, CD28, IgG sau alte molecule). Se constituie astfel o platforma comună pentru legarea de molecule cu potențial terapeutic, de tip anticorpi monoclonali de tip IgG1 sau IgG3 sau molecule hibrid care conțin partea Fc a acestor tipuri de molecule, de către receptorul himeric de imunoglobuline de mare afinitate, măbind astfel spectrul țintelor posibile.

- un domeniu transmembranar, care ancorează molecula hibrid în membrana celulară, provenit de la CD8a, CD28, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, FcR γ , Il2R γ sau alte molecule și NU din molecula CD16A și care poate fi ales în funcție de celulă de destinație, întrucât poate media interacțiuni cu alte proteine de tip adaptor, specific exprimate într-un anumit tip de celulă.

- un domeniu intracelular care mediază un semnal, citotoxic sau de alt fel, direct sau indirect, prin intermediul unuia sau mai multor module care NU provin

din moleculă CD16A și care pot semnaliza efectul citotoxic. Domeniul intracelular conține unul sau mai multe module care pot semnaliza efectul citotoxic care sunt derivate din domeniile intracitoplasmice ale moleculelor de tip adaptor CD3 ζ , FcR γ , DAP10, DAP12, care conțin module de semnalizare și transduc semnalul citotoxic în limfocite T, NKT, NK sau alte celule imune. Astfel, efectul citotoxic se realizează direct, fără intermediul moleculelor de tip senzor cu care moleculele adaptor interacționează în mod normal pentru exercitarea efectului citotoxic (RCT -receptor de celule T, CD16A, RCN -receptori de citotoxicitate naturală, NKp30, 44, 46, receptori NK de grup 2 -NKG2C, D). Domeniul intracelular poate conține module adiționale care să asigure amplificarea semnalului citotoxic, precum și proliferarea și/sau supraviețuirea celulelor care exprimă acești receptori (CD28, CD137, CD244, CD2, SLAMF6, CD226, Il2R γ și alte molecule). Modulele costimulatoare pot fi situate și în *trans*, pe alți receptori himerici de antigen care recunosc un alt antigen prezent fie pe aceeași celulă, fie pe o celulă diferită și, ca urmare, proliferarea și supraviețuirea celulelor citotoxice să se declanșeze numai după legarea simultană a celor două antigene.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- permite tratamentul adoptiv mai flexibil prin încărcarea moleculele terapeutice pe celulelor imune înainte de administrare acestora sau administrarea lor înainte, concomitent sau ulterior celulelor imune.
- asigură un răspuns citotoxic mai specific
- în cazul tratamentelor cu celule NK alogene, asigura reducerea costurilor de tratament și intervenție terapeutică fără întârziere dată, în mod normal, de durata producției de celule modificate.

Se dă în continuare, un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figurile care reprezintă:

- Figura 1, care schematizează procesul natural de citotoxicitate mediat de anticorpi al celulelor NK față de celule anormale (formă de decagon) bazat pe receptorul CD16A de mică afinitate pentru IgG (A) și modul de citotoxicitate mediat de receptorul hibrid de mare afinitate pentru IgG bazat pe modulul de legare derivat din CD64 (B-D). Spre deosebire de receptorul natural CD16A care interacționează cu adaptori pentru transducția semnalului, receptorul himeric conține într-o singură moleculă elementele necesare semnalizării (citotoxic + proliferare + supraviețuire). Panelul B ilustrează faptul că multiple celule anormale (decagoane) pot fi țintite prin anticorpi specifici și diferite tipuri de celule imune (rotunde) care exprimă receptori himerici de IgG. Panelul C descrie situația în care mai mult de un antigen de pe suprafața unei celule este țintit pentru creșterea specificității efectului citotoxic. Panelul D indică o situație în care receptorul hibrid de mare afinitate pentru IgG conține doar modulul citotoxic în domeniul intracelular și pentru proliferarea și/sau supraviețuirea celulei citotoxice este nevoie de semnalizarea printr-un receptor himeric de antigen ce recunoaște un al doilea antigen, prezent pe aceeași celulă sau pe o celulă învecinată.
- Figura 2, care descrie modulele principale ale receptorului himeric de mare afinitate pentru Fc a IgG. În afara modulelor indicate, elemente opționale pot fi adăugate, ca de exemplu, un epitop peptidic liniar neimunogenic cum ar fi myc, care să permită detecția și purificarea celulelor care exprimă proteina himerică, precum și un element tip balama, care să permită un grad de libertate ridicat modulului de legare.
- Figura 3, care indică analiză prin citometrie de flux a expresiei unor receptori himerici de mare afinitate pentru IgG bazați pe modulul de

legare derivat din CD64, în celule 293T, măsurată prin fluorescența emisă de anticorpi anti-CD64-APC (A, B) or anti-myc-PE (C).

- Figura 4, care indică analiza prin citometrie de flux a expresiei unor receptori himerici de mare afinitate pentru IgG bazați pe modulul de legare derivat din CD64, în celule NK92, măsurată prin fluorescența emisă de anticorpi anti-CD64-APC. Constructele exprimă și proteina fluorescentă ZsGreen1.

- Figura 5, care prezintă Secvența la nivel de aminocizi a unui exemplar de receptor himeric de mare afinitate pentru IgG (CD64-myc-CD8a-41BB-CD3z), compus din modulul de legare de mare afinitate CD64 indicat în caractere îngroșate, un epitop myc, indicat în litere italice, regiunea balama și domeniului transmembranar derivat din CD8a, precum și din domeniul intracitoplasmatic ale 4-1BB (CD137) și respectiv, CD3z.

- Figura 6, care ilustrează schema vectorului lentiviral autoinactivant de a 3-a generație care conține Secvența receptorului himeric descris în figura 5. Constructele prezentate în figurile anterioare sunt clonate între locurile enzimelor de restricție *BamHI* și *AsiSI*.

Invenția se referă la crearea de celule imune citotoxice care să exprime receptori himerici de antigen (RHA) bazați pe module de legare ale receptorilor de imunoglobuline de mare afinitate (MLRI-MA) pentru terapii adoptive în neoplasme sau alte afecțiuni. Efectul citotoxic al celulelor modificate este independent de domeniul transmembranar și intracelular al receptorului de imunoglobuline CD16A care mediază în mod normal citotoxicitatea mediată de anticorpi. Ca urmare a folosirii MLRI-MA, RHA devin universali, întrucât pot lega anticorpi care recunosc ținte variate cu diferite afinități. În plus, folosirea

de combinații de anticorpi terapeutici, în paralel cu celulele purtătoare de RHA cu MLRI-HA, asigură o specificitate mai mare a tratamentului, deoarece pot ținti celule cu mai mult de o țintă sau celule separate.

Realizarea invenției asigură următoarele efecte:

- țintirea cu afinitate variabilă de diverse antigene specifice care se exprimă pe suprafața unor celule anormale, prin schimarea moleculei care se leagă de receptorul himeric de imunoglobuline de mare afinitate
- țintirea specifică a unei celule care exprimă mai mult de un antigen sau de celule diferite aflate în proximitate care exprimă câte cel puțin un antigen
- proliferarea celulelor modificate după recunoașterea specifică a două antigene diferite în ipostază când modulele coactivatoare se găsesc în trans (pe molecule himerice diferite)
- folosirea de diferite celule imune (limfocite NK, NKT, T, monocite, macrofage, celule dendritice, euzinofile, bazofile) pentru tratament adoptiv
- în cazul folosirii celulelor NK, pot fi folosite celule alogene recoltate de la subiecți sănătoși și, ca urmare, celulele modificate pot fi produse și stocate prin înghețare și utilizate la nevoie, împreună cu anticorp(i) specific(i) pentru tipul de tumoră dorit.

Construcția de receptori Fc himeric de mare afinitate pentru IgG

Secvența peptidică a domeniului extracelular a Fc γ RI (CD64), Secvența 1, demonstrată a fi funcțională pentru legarea de IgG monomeric în diferite fuziuni (8), a fost folosită ca domeniu de legare pentru diferite constructe himerice. La

această regiune a fost adăugată o peptida eticheta derivată din proteina myc, Secvența 2, care să confere posibilitatea de detecție a expresiei receptorului himeric pe suprafața celulară și de purificare a celulelor recombinante cu ajutorul anticorpilor anti-myc. La acest ectodomeniu au fost adăugate variate module ce conțin o regiune transmembranară și module intracitoplasmice derivate din aceeași moleculă sau din molecule diferite.

Regiunea 19-86 din FcERG, (Secvența 3) și 247-369 din IL2RG (Secvența 4) au fost folosite pentru construcția receptorilor himerici CD64-FcERG și respectiv CD64-IL2RG. Un receptor himeric bazat pe CD64 dar care este ancorat la suprafața celulară printr-o legătură glicozilfosfatidilinozitol, fără a străbate membrana celulară, a fost construit prin adăugarea regiunii (192-233) din CD16B- Secvența 5. Acest construct, CD64-CD16B, permite legarea unei celule recombinante de celula țintă și facilitează efectul citotoxic indirect prin creșterea aderenței și timpului de proximitate între cele două celule.

Pentru construirea unui receptor himeric de antigen cu modularitate crescută, ectodomeniul prezentat anterior a fost fuzionat prin intermediul unui regiuni flexibile GGGS (Secvența 6) cu o regiune balama derivată din regiunea (138-203) a CD8a (secvență 7), urmată de domeniul costimulator derivat din CD137/41BB (214-255, Secvența 8) și domeniul intracelular al CD3Z (52-164, Secvența 9).

Fuziunile la nivel de aminoacid prezentate mai sus au fost optimizate la nivel de de nucleotide pentru expresie în celule umane, sintetizate și clonate de VectorBuilder, USA, într-un vector lentiviral autoinactivant ilustrat în figura 6, între locuri recunoscute de enzimele de restricție *BamHI* și *AsiSI*, astfel încât receptorul himeric poate fi înlocuit de alte transgene. Expresia transgenei este sub controlul promotorului puternic constitutiv EF1a. În tandem cu transgena este

exprimată, prin intermediul unei secvențe ce permite translația independentă de găsirea capătului 5' al RNAului mesager, IRES (Internal ribosomal entry site), o proteină fluorescentă, ZsGreen1, a cărei expresie este corelată cu cea a transgenei, utilă pentru evaluarea transducției/transfecției.

Constructul prezentat în figurile 5 și 6 și reprezentat de secvențele 10 și 11, este de asemenea modular datorită faptului că între regiunea transmembranară și cea balamă, se află un motiv recunoscut de enzima de restricție *EcoRV* și, ca urmare, atât ectodomeniul cât și endodomeniul și regiunea transmembranară pot fi înlocuite cu noi module sintetizate sau clonate. Astfel, combinații de domenii transmembranare și intracitoplasmice au fost sintetizate și subclonate între locurile de legare *EcoRV* și *AsiSI* conform tabelului 1.

Tabelul 1

| DTM | DCS1 | DCS2 | DC |
|------------|-------------|-------------|--------------------|
| NKG2D | CD244 | - | CD3Z (secvența 12) |
| NKG2D | CD2 | - | CD3Z (secvența 13) |
| NKG2D | CD244 | CD2 | CD3Z (secvența 14) |
| NKG2D | CD244 | CD244 | CD3Z (Secvența 15) |

DTM- domeniu transmembranar, DCS- domeniu costimulator, DC- domeniu citotoxic

Modularitatea este extinsă la nivelul modulului transmembranar datorită faptului că secvența domeniului transmembranar al NKG2D în secvențele 12-15, este delimitat de locusurile enzimelor de restricție *EcoRV* și *BspeI*. Diferite domenii transmembranare pot fi sintetizate sau asamblate prin extensia unor

primeri parțial complementari și apoi subclonate în vectorii ai căror domenii sunt indicați în secvențele (12-15). Astfel, perechile de primeri cu secvențele 16-17, 18-19 și 20-21 care au secvențe complementare suprapuse, pot fi combinați și extinși prin metodă PCR cu enzime de fidelitate crescută și pot crea domeniile transmembranare ale proteinelor NKp46, 44 și respectiv 30.

Crearea de celule recombinante

Pentru evaluarea expresiei receptorilor himerici, vectorii lentivirali conținând constructele corespunzătoare, sunt introduși prin transfecție cu Lipofectamina 3000 în celule 293T, singuri sau în combinații cu plasmidele necesare pentru producția de lentivirusuri (pSPAX2, Addgene # 12260 și pMD2.G Addgene #12259) în raport molar de 1:1:0.2 între plamida de transfer (purtătoare de receptor himeric), cea de împachetare (psPAX2) și plasmida ce codează proteina de anvelopa VsVg, pMD2.G. În cazul producției de virus sunt respectate condițiile recomandate de producătorul de Lipofectamine 3000 și supernatantul culturii care conține virusul produs este recoltat la 52 ore de la transfecție și purificat prin centrifugare la 500g x10 min și filtrare prin filtre PVDF de 0.45 μm. Virusul este titrat prin incubarea a 5x10⁵ celule ușor de transfectat (de ex., 293T, Jurkat) / godeu (placă de 6 godeuri) cu diferite diluții de supernatant viral în prezența de polibren (8μg/ml). Plăcile sunt centrifugate 60 min x 1200 g și incubarea continuă tipic pentru 6 ore după care mediul este schimbat. Procentul de celule fluorescente, determinate prin citometrie în flux, în funcție de diluția folosită și numărul de celule, determina titrul virusului.

Titru viral = % de celule fluorescente * nr de celule / volumul de supernatant viral * diluția

Expresia receptorului himeric se determină prin marcarea a 10^6 celule cu anticorp anti-CD64 conjugat cu alofococianină (APC) (Biolegend, USA) sau anti-myc (9E10, 9B11)-PE/APC (CellSignal, USA) conform recomandărilor producătorului și analiză de citometrie în flux.

Celule imune primare (de exemplu, T, NKT sau NK) sunt transduse după activare cu supernatant viral conținând un exces de virus (multiplicitate de infecție de 20-50) față de numărul de celule în prezența de polibren 8 $\mu\text{g/ml}$. Similar pot fi folosite și linii celulare (NK92 sau Jurkat). Celulele NK92 sunt celule derivate din celule NK și sunt folosite ca tratament adoptiv după iradiere în studii clinice pentru terapia diferitelor forme de cancer. Transducția celulelor NK și NK92 este semnificativ îmbunătățită în prezența inhibitorului BX75 (6 $\mu\text{g/ml}$). Celule transduse sunt evidențiate prin expresia proteinei fluorescente sau a receptorului himeric. Celule transduse sunt sortate prin FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) pentru a obține populații relativ pure de celule recombinante.

Determinarea funcționalității receptorului himeric.

Legarea de anticorpi monomeri

Un prim exemplu de funcționalitate a receptorilor himerici de mare afinitate pentru IgG1 sau IgG3 este legarea acestor molecule în formă monomerică (necomplexate cu antigene). În acest scop, 10^6 celule care exprimă receptorul himeric sunt spălate cu PBS și incubate cu o plajă de concentrații de anticorp (0.1 μg – 5 μg). Legarea acestuia este detectată, după spălare, cu anticorpi secundari marcați fluorescenți care recunosc regiunea Fab a primului anticorp.

Citotoxicitatea dependentă de anticorpi a celulelor recombinante

În acest test, celulele țintă care exprimă un antigen ce se dorește țintit, sunt marcate și apoi incubate în diferite proporții cu celulele efectoare (celule NK, T,

NKT), care exprimă sau nu receptorul himeric, în prezența sau absența unui anticorp specific. După un timp de incubare, se adaugă un colorant care marchează doar celulele în curs de moarte (iodura de propidiu sau 7-AAD). Celulele dublu pozitive sunt celulele țintă afectate de răspunsul citotoxic. Folosirea în paralel a controalelor negative, a celulelor efectoare care nu exprimă receptor himeric, a unui anticorp nespecific sau absența unui anticorp, determina dacă citotoxicitatea este dependentă de expresia receptorului himeric și / sau a anticorpului specific.

Secvența 1

>sp|P12314|1-292

MWFLTLLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLP
GSSSTQWFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHR
GWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNS
NLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLL
EGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARRED
SGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLPTPVWFH

Secvența 2

EQKLISEEDL

Secvența 3

>sp|P30273|19-86

LGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLST
RNQETYETLKHEKPPQ

Secvența 4

>sp|P31785|247-369

GSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLED
LVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGAS
PCNQHSPYWAPPCYTLKPET

Secvența 5

>sp|O75015|17-233

GLAVSTISSFSPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNI

Secvența 6

GGGS

Secvența 7

>sp|P01732|138-203

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDSQFRVSP
LDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKP
KAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFV
PVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT

Secvența 8

>sp|Q07011|214-255

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

Secvența 9

>sp|P20963|52-164

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKP
QRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT
KDTYDALHMQALPPR

Secvența 10

MWFLTLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLP
SSSTQWFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSDGEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRG
WLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSN
LTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLE
GNLVTLSCEKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSG
LYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLPTPVWFHGEQKLISEEDLGGG
GSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP
LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQALPPR*

Secvența 11

atgtggttctgaccacactgctgctgtgggtgccagtgatggacaggtggacacaacaaggcctgatcacctg
cagcctccatgggtgtccgtgtccaagaggaaaccgtgacactgcactgcgaggtgctgcatctgcctggctctagc
agcaccagtggttctcaatggcaccgccacacagaccagcacaccagctacagaatcaccagcgccagcgtga
acgacagcggcgagtatagatgccagagaggcctgagcggcagaagcgcattcagctggaaatccacagag
gctggctgctgctgcaggttccagcagagtgttaccgagggcgagcccctggctctgagatgcatgcctggaagg
acaagctggtgtacaacgtgctgtactaccggaacggcaaggccttcaagttcttccactggaacagcaacctgacct

cctcaagaccaacatcagccacaacggcacctaccactgtagcggcatgggcaagcacagatacacaagcggcgg
catcagcgtgaccgtgaaagagctgttcccgtcctgtgctgaacgcctctgtgacatctccactgctggaaggcaac
ctcgtgaccctgagctgcgagacaaaactgctgctccagaggcctggcctgcagctgtacttcagcttctacatgggca
gcaagaccctgcggggcagaaataccagcagcgagtaccagatcctgaccgccagaagagaggacagcggcctg
tattggtgcgaagccgccaccgaggatggcaatgtgctgaagagaagccccgagctggaactgcaggttctgggact
gcaactgcccacacctgtgtggtttcacggcgagcagaagctgatctccgaagaggatctcggggcggtggctcga
ccacgacgccagcggcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgccagag
gcgtgccggccagcggcgggggggcgagtgcacacgagggggctggacttcgctgtgatatctacatctgggcg
cccttggccgggacttgggggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcct
gtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaag
aagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagtcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcagggccag
aaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggacaagagacgtggccgggaccc
tgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggc
ggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcggcgaggggcaaggggcacgatggccttaccagggctc
cagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgtga

Secvența 12

gatatcccccttcttcttctgctgcttcatcgccgtggccatgggcatcagattcatcatcatggtggccatctggtccggat
ggagaagaaagagaaaggagaagcagagcagaccagccccaaaggagttcctgaccatctacgaggacgtgaag
gacctgaagaccagaagaaaccacgagcaggagcagacctccccggcgggcagcaccatctacagcatgatc
cagagccagagcagcggccccaccagccaggagcccgcctacacctgtacagcctgatccagcccagcagaaa
gagcggcagcagaaagagaaaccacagccccagcttcaacagcaccatctacgaggtgatcggcaagagccagcc
caaggcccagaaccccgccagactgagcagaaaggagctggagaacttcgacgtgtacagcagagtgaagttcag
caggagcgcagacgccccgcgtacaagcaggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagaga
ggagtacgatgtttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctca
ggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcg

29

ccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccaggggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcac
atgcaggccctgccccctcgctgagcgatcgc

Secvența 13

gatatccccttcttcttctgctgcttcacgccgtggccatgggcatcagattcatcatcatggtggccatctggtccggat
ggagaagaaagagaaaggagaagcagagcgagaccagcccaaggagttcctgacatctacgaggacgtgaag
gacctgaagaccagaagaaaccacgagcaggagcagacctccccggcggcggcagcaccatctacagcatgatc
cagagccagagcagcgcaccaccagccaggagcccgcctacacctgtacagcctgatccagcccagcagaaa
gagcggcagcagaaagagaaaccacagccccagcttcaacagcaccatctacgaggtgatcggcaagagccagcc
caaggcccagaaccccgccagactgagcagaaaggagctggagaacttcgacgtgtacagcaaaagaaaaaagca
gCGgtccaggcggaaacgacgaggaactggagacaagagcccaccgggtcGCCaccgaggaaagaggcagaaa
gccccaccagatccccgccagcaccctcagaaccccgtaccagccagcatcctccccccccctggacaccgc
tcccaggcccctagccacagacctccaccactggccacagagtgcagcaccagcctcaaaagcggcctccagctc
cttctggcacacaggtgcaccagcagaaggccctcctctgcctagaccagagtgaacctaagcctcctcacggc
gccgccgagaacagcctgagcccctctagcaatagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaag
cagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggacaagagacgtgg
ccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaag
ataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcagcgcggaggggcaaggggcacgatggccttt
accaggggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgctgagcgatc
gc

Secvența 14

gatatccccttcttcttctgctgcttcacgccgtggccatgggcatcagattcatcatcatggtggccatctggtccggaa
aaagaaaaaagcagcgggtccaggcggaaacgacgaggaactggagacaagagcccaccgggtcGCCaccgagga

aagaggcagaaagccccaccagatccccgccagcaccctcagaaccccgctaccagccagcatcctccccccc
ccctggacaccgctcccaggcccctagccacagacctccaccacctggccacagagtgcagcaccagcctcaaaag
cggcctccagctccttctggcacacaggtgcaccagcagaagggccctcctctgcctagaccagagtgcaccta
gcctcctcacggcgccgagaaacagcctgagccccttagcaatagagtgaagttcagcaggagcgcagacgc
ccccgctacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttgg
acaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaat
gaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcagcgcggagggggcaagg
gcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccc
ctcgctgagcgatcgc

Secvența 15

gatatccccttcttcttctgctgcttcacgccgtggccatgggcatcagattcatcatcatggtggccatctggtccggat
ggagaagaaagagaaaaggagaagcagagcagaccagcccaaggagttcctgaccatctacgaggacgtgaag
gacctgaagaccagaagaaaccacgagcaggagcagacctcccggcggcagcaccatctacagcatgatc
cagagccagagcagcgcccccaccagccaggagcccgcctacacctgtacagcctgatccagcccagcagaaa
gagcggcagcagaaaagaaaaccacagccccagcttcaacagcaccatctacgaggtgatcggcaagagccagcc
caaggcccagaaccccgccagactgagcagaaaaggagctggagaacttcgacgtgtacagctggagaaggaaga
ggaaagaaaaacagtccgaaacctcccctaaggaattcctcacaatctatgaggatgtcaaagatctcaaaacaagga
ggaacctgagcaagaacagacattccctggggcggtccacaatctattccatgattcagtcaccagtcagcgtc
ctacctcccaggaacctgcctatacactctactccctgattcagccaagcaggaagtccgggagcaggaagaggaat
cactcccctagctttaactccacaatctatgaggtcatcgggaagtcccagccaaaggctcagaaccctgctaggctgt
ccaggaaggaactcgagaatttcgatgtgtattccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaag
cagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggacaagagacgtgg
ccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaaag
ataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcagcgcggagggggcaaggggcacgatggccttt
accagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgctgagcgate
gc

Secvența 16

NKp46-EcoRV

ACGTAGATATCATGGGCCTGGCCTTCCTGGTGCTGGTGGCCCTGGTGTG
GTTCCCTGGTGGAGG

Secvența 17

NKp46-BspeI

TATCGATCCGGATCTCTTTCTGCTCAGCCAGTCCTCCACCAGGAACCAC
ACCAGGGCCACC

Secvența 18

NKp44-EcoRV

ACGTAGATATCCTGGTGCCCGTGTTCTGCGGCCTGCTGGTGGCCAAGAG
CCTGGTGCTGAGCG

Secvența 19

NKp44-BspeI

TATCGATCCGGAGCCCCACCACACCAGCAGGGCGCTCAGCACCAGGCT
CTTGGCCACCAGC

Secvența 20

NKp30-EcoRV

acgtaGATATCGCCGGCACCGTGCTGCTGCTGAGAGCCGGCTTCTACGCC
GTGAGCTTCCTG

Secvența 21

NKp30-BspeI

tatcgaTCCGGAGGTGCTGCCCACGGCCACGCTCAGGAAGCTCACGGCGTA
GAAGCCGGCTC

Bibliografie:

1. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah-tisagenlecleucel>
2. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/yescarta-axicabtagene-ciloleucel>
3. Neelapu, SS, Locke, FL et al, Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma, N Engl J Med 2017; 377:2531-2544
4. Maude, SL, Laetsch, T.W. et al, Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia, N Engl J Med 2018;378:439-48.
5. Ghilmini, M., Ruffin, K., et al. (2005). Single agent rituximab in patients with follicular or mantle cell lymphoma: clinical and biological factors that are predictive of response and event-free survival as well as the effect of rituximab on the immune system: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). Ann. Oncol. 16, 1675–82.
6. Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Piantaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., et al. (2004). Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. Cancer Res. 64, 4664–4669.
7. Snyder KM, Hullsiek R, Mishra HK, Mendez DC, Li Y, Rogich A, Kaufman DS, Wu J and Walcheck B (2018) Expression of a Recombinant High Affinity IgG Fc Receptor by Engineered NK Cells as a Docking Platform for Therapeutic mAbs to Target Cancer Cells.Front. Immunol. 9:2873. doi: 10.3389/fimmu.2018.02873
8. Harrison, €! T., Hutchinson, M. J. and Allen, J. M., Nucleic Acids. Res 1994. 22 : 3813.

REVENDICĂRI

1. Celule imune purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv al bolilor neoplazice, inflamatorii, autoimune, al infecțiilor intracelulare și al altor maladii, prin intermediul anticorpilor sau a moleculelor ce contin domeniul Fc **caracterizate prin aceea că** receptorul himeric hibrid cuprinde următoarele:

- un modul extracelular, de legare cu afinitate mare pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor de tip IgG derivat din ectodomeniul receptorului de imunoglobuline IgG Fc γ RI (CD64),

- un domeniu transmembrantar care ancorează molecula hibrid în membrana celulară și provine, în funcție de celulă de destinație, de la CD8a, CD28, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, FcR γ , Il2R γ sau alte molecule, dar NU din molecula CD16A.

- un domeniu intracelular care mediază un semnal citotoxic sau de alt fel, direct sau indirect, independent de molecula CD16A și conține unul sau mai multe module care pot semnaliza efectul citotoxic derivate din domeniile

intracitoplasmice ale moleculelor de tip adaptor, în special CD3 ζ , FcR γ , DAP10, DAP12 care conțin module de semnalizare și transduc semnalul citotoxic în limfocite sau alte celule citotoxice

2. Celule purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv conform revendicării 1 **caracterizate prin aceea că** ectodomeniul conține o peptidă “eticheta” provenită de la myc- N-EQKLISEEDL-C și care poate fi folosită pentru determinarea expresiei receptorului himeric sau pentru purificarea celulelor care exprimă acești receptori.

3. Celule purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv conform revendicării 1 **caracterizate prin aceea că** ectodomeniul conține o regiune flexibilă de tip „balama” care să permită un grad ridicat de libertate modulului de legare, această regiune balama fiind derivată din diferite molecule (în special CD8a, CD28, IgG)

4. Celule purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv conform revendicării 1 **caracterizate prin aceea că se constituie** o platforma comună pentru legarea, prin intermediul receptorului himeric de imunoglobuline de mare afinitate, de molecule cu potențial terapeutic de tip anticorpi monoclonali de tip IgG1 sau IgG3 sau molecule hibrid care conțin domeniul Fc a acestor tipuri de molecule, măbind astfel spectrul țintelor posibile.

5. Celule purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv conform revendicării

1 **caracterizate prin aceea că** domeniul intracelular conține unul sau mai multe module care pot semnaliza efectul citotoxic care sunt derivate în special din domeniile intracitoplasmice ale moleculelor tip adaptor CD3 ζ , FcR γ , DAP10, DAP12, care conțin module de semnalizare și transduc semnalul citotoxic în limfocite T, NK, NKT sau alte celule citotoxice, astfel încât efectul citotoxic se realizează direct, fără intermediul moleculelor de tip senzor cu care moleculele adaptor interacționează în mod normal pentru exercitarea efectului citotoxic (în special RCT -receptor de celule T, CD16A, RCN -receptori de citotoxicitate naturală, NKp30, 44, 46, receptori NK de grup 2 -NKG2C, D).

6. Celule purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv conform revendicării 1 **caracterizate prin aceea că** domeniul intracelular conține module adiționale care să asigure amplificarea semnalului citotoxic, precum și proliferarea și/sau supraviețuirea celulelor care exprimă acești receptori (în special CD28, CD137, CD244, CD2, SLAMF6, CD226, IL2R γ).

7. Celule purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv conform revendicării 5 **caracterizate prin aceea că** modulele costimulatoare pot fi situate și în *trans*, pe alți receptori himerici de antigen care recunosc un alt antigen prezent fie pe aceeași celulă, fie pe o celulă diferită și, ca urmare, proliferarea și supraviețuirea celulelor citotoxice să se declanșeze numai după legarea simultană a celor două antigene.

8. Celule purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv conform revendicării

1 **caracterizate prin aceea că** permite țintirea cu afinitate variabilă de diverse antigene specifice care se exprimă pe suprafața unor celule anormale prin schimbarea moleculei care se leagă de receptorul himeric de imunoglobuline de mare afinitate

9. Celule purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv conform revendicării 1 **caracterizate prin aceea că se** permite țintirea specifică a unei celule care exprimă mai mult de un antigen sau de celule diferite aflate în proximitate care exprimă câte cel puțin un antigen

10. Celule purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv conform revendicării 1 **caracterizate prin aceea că se** permite proliferarea celulelor după țintirea specifică a două antigene diferite în ipostază când modulele coactivatoare se găsesc în trans (pe molecule himerice diferite)

11. Celule purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene multiple și diverse pentru tratamentul adoptiv conform revendicării 1 **caracterizate prin aceea că se** permite folosirea de diferite celule imune (limfocite NK, NKT, T, monocite, macrofage, celule dendritice, euzinofile, bazofile) pentru tratament adoptiv.

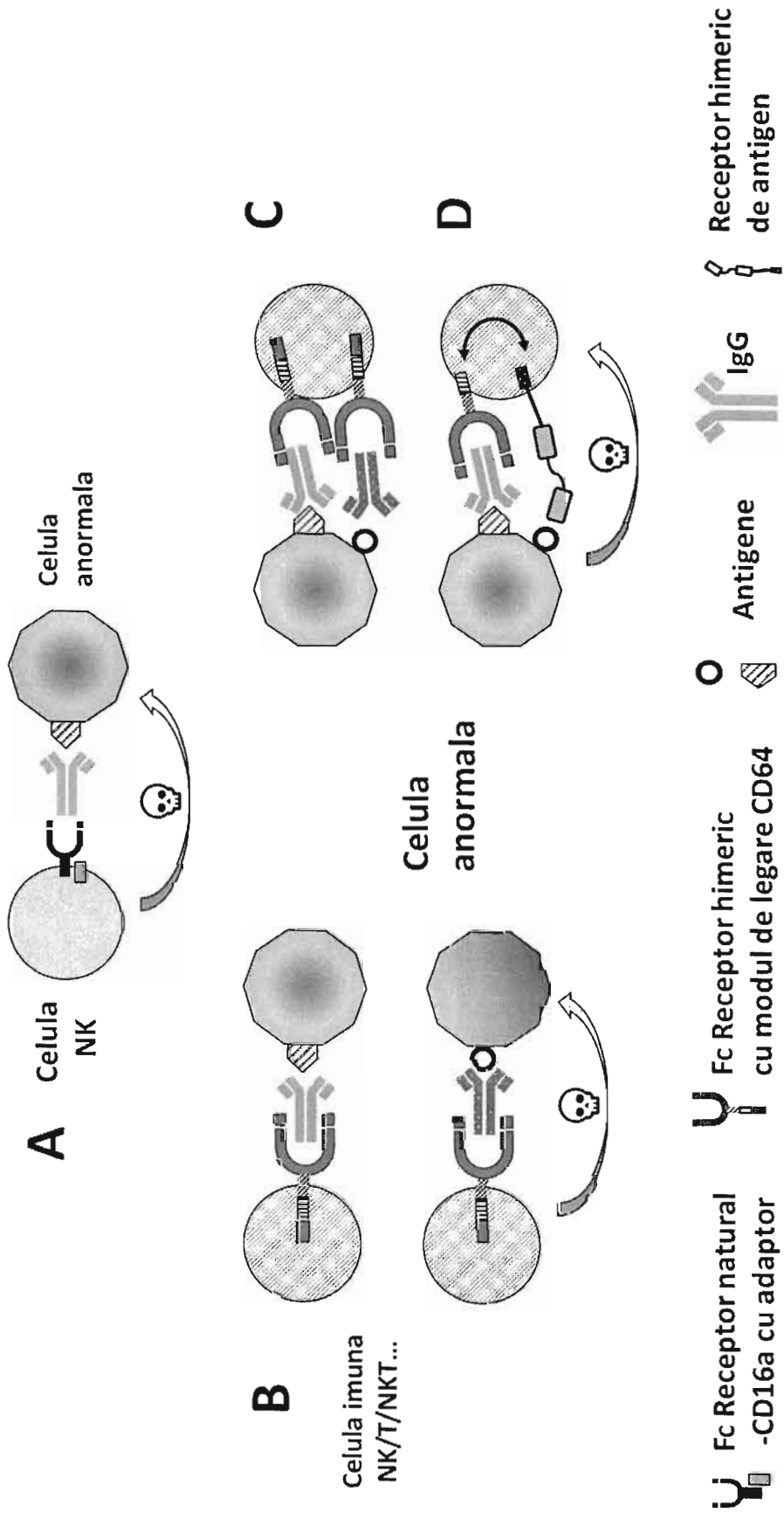


Fig. 1

8

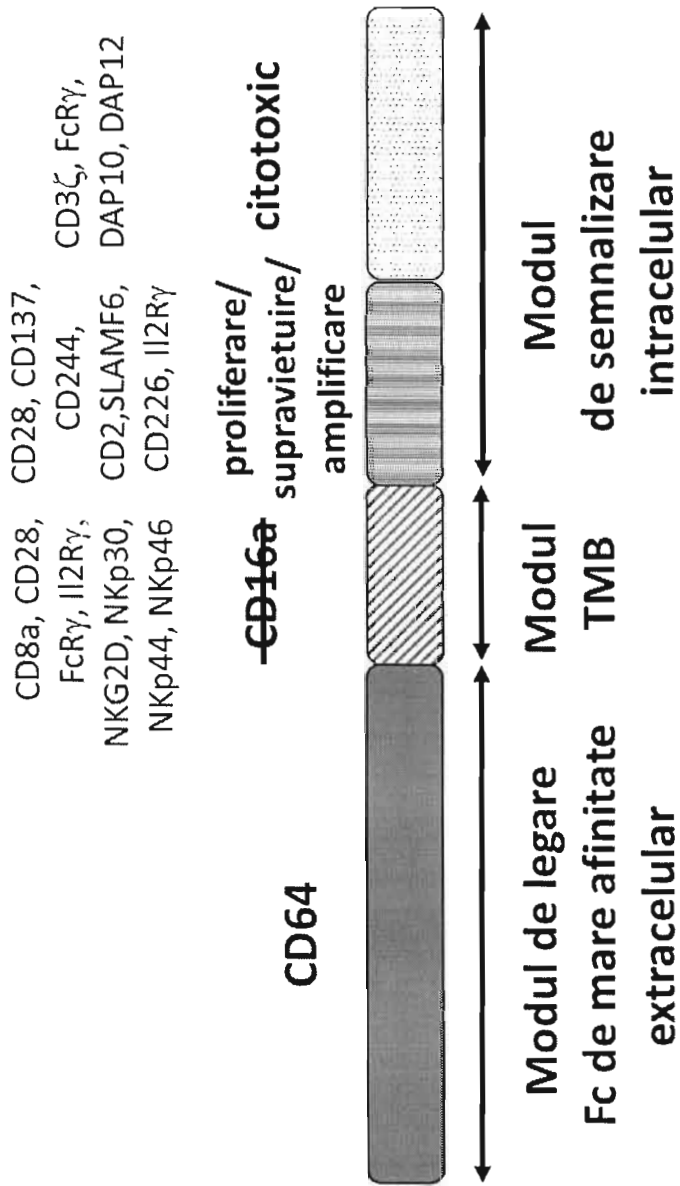


Fig. 2

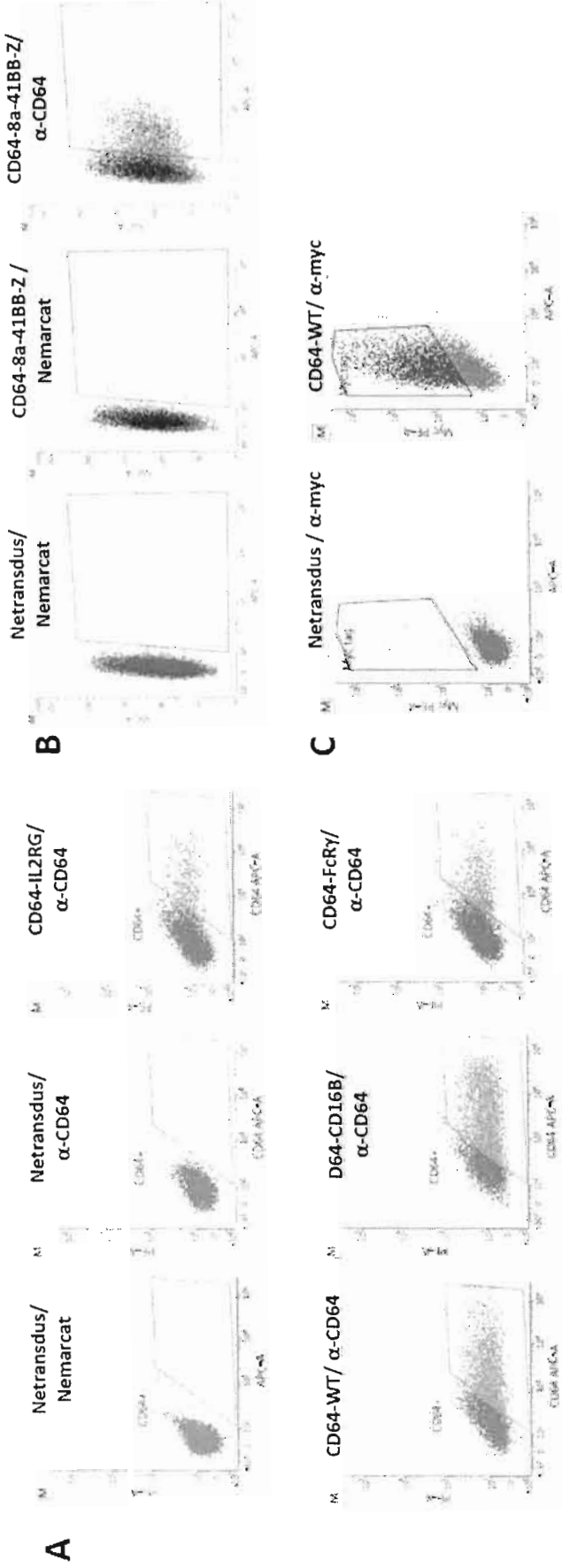


Fig. 3

08

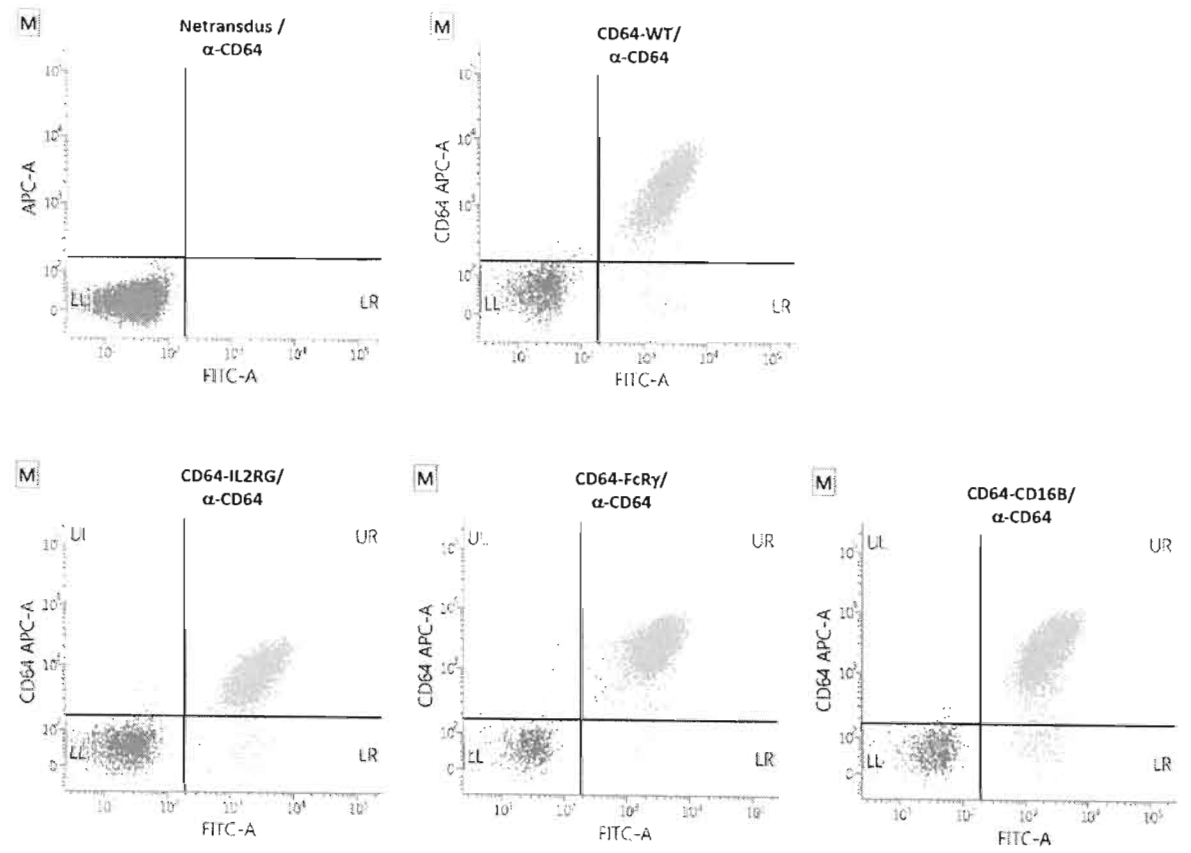
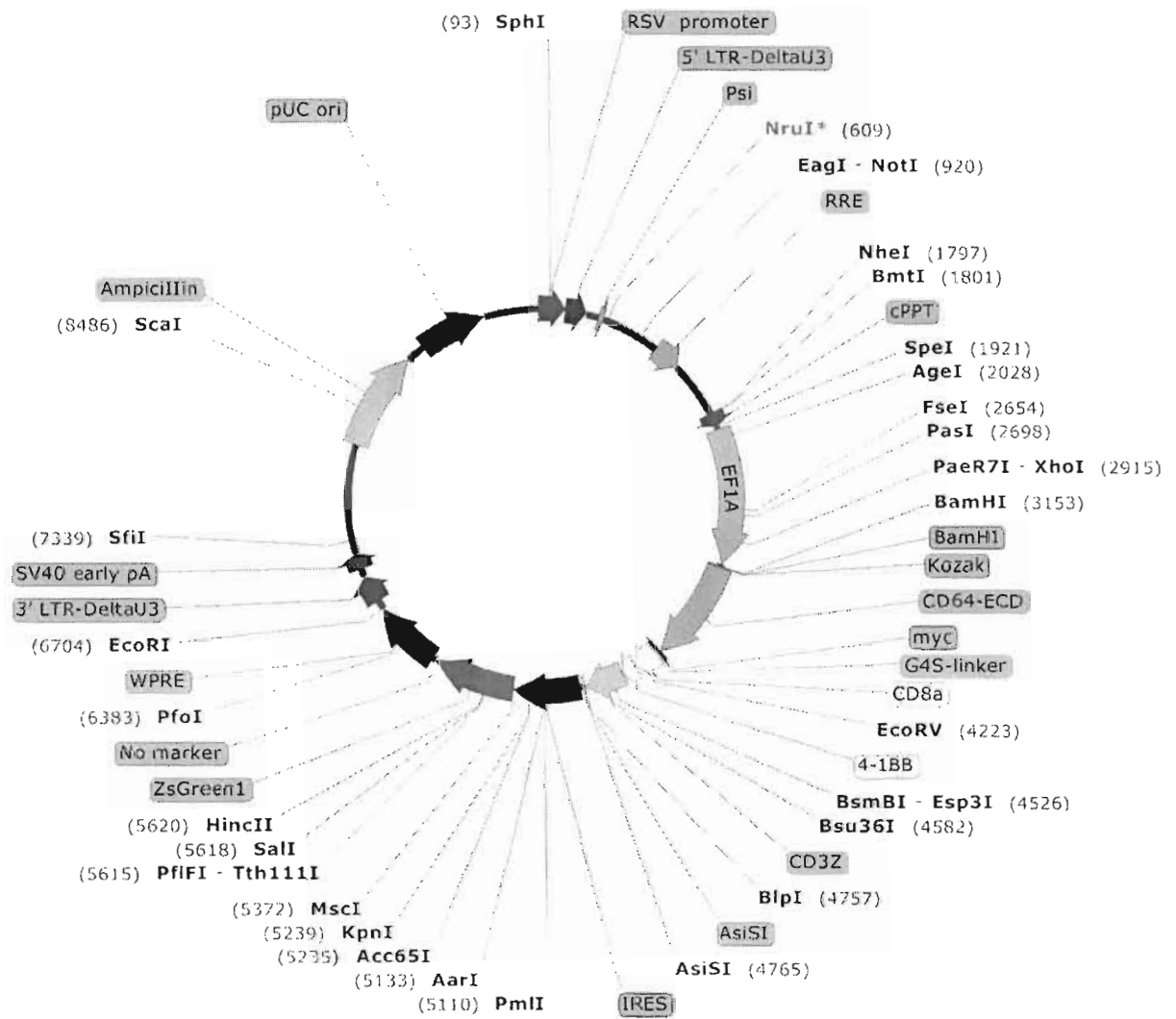


Fig. 4

MWFLTLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEEVTLHCEVLHLPGSS
STQWFLNGTATQSTPASYRITSASVNDSEYRCQRLSGRSDPIQLEIHRGW
LLQVSSRVFTEGEPALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTIL
KTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELEFPAPVLNASVTSPLLEGNLV
TLSCETKLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWC
EAATEDGNVLRSPLELQVLGLQLPVWFHGEQKLISEEDLGGGGSTTP
APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC
GVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPPEEEGG
CELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEINLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGGKHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPR*

Fig. 5



pLV-EF1A-CD64-myc-8a-41BB-Z-IRES-ZsGreen1-VB200603-1365cfh
10,265 bp

Fig. 6