

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391927** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.10.05

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/15 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.28

(54) **ПОЛИПЕПТИДЫ CD8, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/132,824; 10 2021 100 038.6;
63/247,775**

(72) Изобретатель:
**Баджва Гаган, Калра Мамта, Мата
Мелинда (US)**

(32) **2020.12.31; 2021.01.04; 2021.09.23**

(33) **US; DE; US**

(74) Представитель:
**Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В.,
Угрюмов В.М., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.
(RU)**

(86) **PCT/US2021/065367**

(87) **WO 2022/147029 2022.07.07**

(88) **2022.09.09**

(71) Заявитель:
ИММАТИКС ЮС, ИНК. (US)

(57) Данное изобретение относится к Т-клеткам, способным к коэкспрессии Т-клеточных рецепторов ("TCR") вместе с полипептидами CD8, и их применению в терапии с использованием адоптивного переноса клеток. Данное описание дополнительно относится к модифицированным последовательностям CD8, векторам и ассоциированным с ними способам.

MALPVTALLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCGVLLSNPTSGCSWLF

← Сигнальный пептид →
-21 -1 1

QPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCS

lg-подобный домен

ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR

← → «Стеблевая» область
115 116

GLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLSLVITLYCNHNRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPLSARY

← Трансмембранный домен → Цитоплазматический домен
160 161 188 189

V
← →
214

A1

202391927

202391927

A1

ПОЛИПЕПТИДЫ CD8, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Данный документ представляет собой международную заявку в соответствии с Договором о патентной кооперации, по которой заявляется приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 63/132,824, поданной 31 декабря 2020 года, предварительной заявке на патент США № 63/247,775, поданной 23 сентября 2021 года, и предварительной заявке на патент Германии № 10 2021 100 038.6, поданной 4 января 2021 года, содержание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Официальная копия перечня последовательностей представлена посредством EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII вместе с файлом под названием «3000011-022977_Sequence_Listing_Final.txt», созданным 28 декабря 2021 года и имеющим размер 514610 байт, и подана одновременно с настоящим описанием. Перечень последовательностей, содержащийся в этом документе в формате ASCII, является частью настоящего описания и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Область изобретения

[0003] Данное описание относится к Т-клеткам, способным к коэкспрессии Т-клеточных рецепторов («TCR») вместе с полипептидами CD8, и их применению в терапии с использованием адоптивного переноса клеток. Данное описание дополнительно относится к модифицированным последовательностям CD8, векторам, композициям, трансформированным Т-клеткам и ассоциированным с ними способам.

Уровень техники

[0004] CD8 и CD4 представляют собой трансмембранные гликопротеины, характерные для различных популяций Т-лимфоцитов, чьи антигенные ответы ограничиваются молекулами МНС класса I и класса II соответственно. Они играют важную роль как в дифференцировке и селекции Т-клеток в ходе развития тимуса, так и в активации зрелых

Т-лимфоцитов в ответ на антигенпредставляющие клетки. Как CD8, так и CD4 являются белками суперсемейства иммуноглобулинов. Они определяют антигенную рестрикцию путем связывания с молекулами МНС на поверхности контакта, отличной от области, представляющей антигенный пептид, однако структурная основа их сходных функций, по-видимому, очень различна. Их сходство последовательностей является низким, и, тогда как CD4 экспрессируется на клеточной поверхности в виде мономера, CD8 экспрессируется в виде гомодимера $\alpha\alpha$ (например, ФИГ. 55С) или гетеродимера $\alpha\beta$ (например, ФИГ. 55А). У людей этот гомодимер CD8 $\alpha\alpha$ может функционально заменять гетеродимер CD8 $\alpha\beta$. CD8 контактирует с кислой петлей в $\alpha 3$ -домене МНС класса I, тем самым повышая авидность Т-клетки в отношении ее мишени. CD8 также вовлечен в события фосфорилирования, приводящие к активации CTL посредством связывания его цитоплазматического хвоста α -цепи с тирозинкиназой p56^{lck}.

[0005] Желательной является разработка способов производства Т-клеток с усиленной специфической цитотоксической активностью для иммунотерапии.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В одном варианте реализации изобретения описанные в данном документе полипептиды CD8 могут содержать иммуноглобулин- (Ig)-подобный домен CD8 α , CD8 β -область, трансмембранный домен CD8 α и цитоплазматический домен CD8 α . В другом варианте реализации изобретения CD8 β -область представляет собой «стеблевую» область или домен CD8 β .

[0007] В одном варианте реализации изобретения описанные в данном документе полипептиды CD8 могут содержать (а) иммуноглобулин- (Ig)-подобный домен, включающий по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, (b) CD8 β -область, включающую по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, (с) трансмембранный домен, включающий по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, и (d) цитоплазматический домен, включающий по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4.

[0008] В одном варианте реализации изобретения описанные в данном документе полипептиды CD8 имеют по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5.

[0009] В одном варианте реализации изобретения описанные в данном документе полипептиды CD8 имеют по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7.

[0010] В одном варианте реализации изобретения описанные в данном документе полипептиды CD8 могут содержать сигнальный пептид по меньшей мере с около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 293 или SEQ ID NO: 294, слитый с N-концом или с C-концом описанных в данном документе полипептидов CD8.

[0011] В одном варианте реализации изобретения описанные в данном документе полипептиды CD8 могут содержать (a) SEQ ID NO: 1, включающую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен; (b) SEQ ID NO: 2, включающую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен; (c) SEQ ID NO: 3, включающую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, и (d) SEQ ID NO: 4, включающую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен.

[0012] В одном варианте реализации изобретения описанные в данном документе полипептиды CD8 могут представлять собой полипептиды CD8 α или модифицированного CD8 α .

[0013] В одном варианте реализации изобретения данное описание относится к нуклеиновым кислотам, которые кодируют описанные в данном документе полипептиды.

[0014] В одном варианте реализации изобретения вектор может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую описанные в данном документе полипептиды CD8.

[0015] В одном варианте реализации изобретения вектор может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую T-клеточный рецептор (TCR), содержащий α -цепь и β -цепь. В другом варианте реализации изобретения вектор может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR-T.

[0016] В одном варианте реализации изобретения α -цепь TCR и β -цепь TCR могут быть выбраны из SEQ ID NO: 15 и 16; 17 и 18; 19 и 20; 21 и 22; 23 и 24; 25 и 26; 27 и 28; 29 и 30; 31 и 32; 33 и 34; 35 и 36; 37 и 38; 39 и 40; 41 и 42; 43 и 44; 45 и 46; 47 и 48; 49 и 50; 51

и 52; 53 и 54; 55 и 56; 57 и 58; 59 и 60; 61 и 62; 63 и 64; 65 и 66; 67 и 68; 69 и 70; 71 и 303; 304 и 74; 75 и 76; 77 и 78; 79 и 80; 81 и 82; 83 и 84; 85 и 86; 87 и 88; 89 и 90; и 91 и 92.

[0017] В одном варианте реализации изобретения вектор может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид CD8 β .

[0018] В одном варианте реализации изобретения полипептид CD8 β может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14.

[0019] В одном варианте реализации изобретения вектор может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую 2A-пептид или сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), расположенную между нуклеиновой кислотой, кодирующей модифицированный полипептид CD8 α , и нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид CD8 β .

[0020] В одном варианте реализации изобретения вектор может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую 2A-пептид, расположенную между нуклеиновой кислотой, кодирующей α -цепь TCR, и нуклеиновой кислотой, кодирующей β -цепь TCR.

[0021] В одном варианте реализации изобретения 2A-пептид может быть выбран из P2A (SEQ ID NO: 93), T2A (SEQ ID NO: 94), E2A (SEQ ID NO: 95) или F2A (SEQ ID NO: 96).

[0022] В одном варианте реализации изобретения IRES может быть выбран из группы, состоящей из IRES из пикорнавируса, IRES из флавивируса, IRES из пестивируса, IRES из ретровируса, IRES из лентивируса, IRES из РНК-вируса насекомых и IRES из клеточной мРНК.

[0023] В одном варианте реализации изобретения вектор может дополнительно содержать последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента (PRE), выбранную из PRE вируса гепатита сурков (WPRE) и его вариантов, PRE вируса гепатита В (HBV) (HPRE) или их комбинации.

[0024] В одном варианте реализации изобретения вектор может дополнительно содержать промотор, выбранный из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора гена фосфоглицераткиназы (PGK), промотора гена основного белка миелина (MBP), промотора гена глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), модифицированного LTR MoMuLV, содержащего энхансер вируса миелопролиферативной саркомы (MNDU3), промотора гена убиквитина С, промотора гена EF-1 альфа, промотора вируса стволовых клеток мышей (MSCV) или их комбинации.

[0025] В одном варианте реализации изобретения вектор может представлять собой вирусный вектор или вектор, отличный от вирусного.

[0026] В одном варианте реализации изобретения вектор может быть выбран из аденовирусов, поксвирусов, альфавирусов, аренавирусов, флавивирусов, рабдовирусов, ретровирусов, лентивирусов, герпесвирусов, парамиксовирусов, пикорнавирусов или их комбинации.

[0027] В одном варианте реализации изобретения вектор может быть псевдотипирован белком оболочки вируса, выбранного из нативного эндогенного вируса кошек (RD114), химерной версии RD114 (RD114TR), вируса лейкоза гиббонов (GALV), химерной версии GALV (GALV-TR), амфотропного вируса лейкоза мышей (MLV 4070A), бакуловируса (GP64), вируса везикулярного стоматита (VSV-G), вируса чумы кур (FPV), вируса Эбола (EboV) или оболочечного гликопротеина ретровирусов бабуинов (BaEV), вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) или их комбинации.

[0028] В одном варианте реализации изобретения вектор может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую Т-клеточный рецептор (TCR).

[0029] В другом варианте реализации изобретения вектор может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR).

[0030] В одном варианте реализации изобретения выделенная нуклеиновая кислота может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Т-клеточный рецептор, содержащий α -цепь и β -цепь, и полипептид CD8, содержащий α -цепь и β -цепь. Выделенная нуклеиновая кислота может содержать нуклеиновую кислоту, на по меньшей мере 80% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 295, 297, 299 или 301. Выделенная нуклеиновая кислота может быть на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 295, 297, 299 или 301. В одном аспекте, описанные в данном документе последовательности могут представлять собой выделенные или рекомбинантные последовательности.

[0031] В одном варианте реализации изобретения выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 267.

[0032] В одном варианте реализации изобретения выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 279.

[0033] В одном варианте реализации изобретения выделенный(выделенные) полипептид(полипептиды) может(могут) кодироваться описанными в данном документе нуклеиновыми кислотами.

[0034] В одном варианте реализации изобретения выделенный полипептид может содержать аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 296, 298, 300 или 302. Аминокислотная последовательность может быть на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 296, 298, 300 или 302. В другом аспекте, SEQ ID NO: 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 296, 298, 300 или 302 включают 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20 или больше аминокислотных замен или делеций. В еще одном аспекте, SEQ ID NO: 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 296, 298, 300 или 302 включают не более 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20 аминокислотных замен или делеций.

[0035] В одном варианте реализации изобретения выделенный полипептид может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268.

[0036] В одном варианте реализации изобретения выделенный полипептид может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 280. В одном варианте реализации изобретения клетка может быть трансдуцирована вектором.

[0037] В одном варианте реализации изобретения клетка может включать $\alpha\beta$ -Т-клетку, $\gamma\delta$ -Т-клетку, естественную клетку-киллер, CD4+ /CD8+ клетку или их комбинации.

[0038] В одном варианте реализации изобретения $\alpha\beta$ Т-клетка может включать CD4+ Т-клетку и CD8+ Т-клетку.

[0039] В одном варианте реализации изобретения способ получения Т-клеток для иммунотерапии может включать выделение Т-клеток из образца крови субъекта-человека, активацию выделенных Т-клеток, трансдуцирование активированных Т-клеток вектором и обеспечение размножения трансдуцированных Т-клеток.

[0040] В одном варианте реализации изобретения Т-клетка может представлять собой CD4+ Т-клетку.

[0041] В одном варианте реализации изобретения Т-клетка может представлять собой CD8+ Т-клетку.

[0042] В одном варианте реализации изобретения Т-клетка может представлять собой $\gamma\delta$ -Т-клетку.

[0043] В одном варианте реализации изобретения Т-клетки могут представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетку и могут экспрессировать описанный в данном документе полипептид CD8.

[0044] В одном варианте реализации изобретения Т-клетки могут представлять собой $\gamma\delta$ -Т-клетку и могут экспрессировать описанный в данном документе модифицированный полипептид CD8, например, модифицированный полипептид CD8 α или модифицированный полипептид CD8 α со «стеблевой» областью CD8 β , например, m1CD8 α в конструкциях № 11 и № 12 (ФИГ. 4) и CD8 α^* (ФИГ. 55B).

[0045] В одном варианте реализации изобретения способ лечения пациента, у которого наблюдается рак, может включать введение пациенту композиции, содержащей популяцию размноженных Т-клеток, причем Т-клетки уничтожают раковые клетки, которые представляют пептид в комплексе с молекулой МНС на поверхности, причем пептид выбран из SEQ ID NO: 98-255, причем рак выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, меланомы, рака печени, рака молочной железы, рака матки, карциномы из клеток Меркеля, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака желчевыводящих путей, рака толстой и прямой кишки, рака мочевого пузыря, рака почки, лейкоза, рака яичника, рака пищевода, злокачественной опухоли головного мозга, рака желудка, рака предстательной железы или их комбинации.

[0046] В одном варианте реализации изобретения композиция может дополнительно содержать адъювант.

[0047] В одном варианте реализации изобретения адъювант может быть выбран из антитела к CD40, имиквимода, резиквимода, GM-CSF, циклофосфамида, сунитиниба, бевацизумаба, атезолизумаба, интерферона-альфа, интерферона-бета, CpG-олигонуклеотидов и производных, поли(I:C) и производных, РНК, силденафила, составов на основе частиц сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLG), вирусом, интерлейкина (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-23 или их комбинаций.

[0048] В одном варианте реализации изобретения способ вызова иммунного ответа у пациента, у которого наблюдается рак, может включать введение пациенту композиции, содержащей популяцию размноженных Т-клеток, причем Т-клетки уничтожают раковые клетки, которые представляют пептид в комплексе с молекулой МНС на поверхности, причем пептид выбран из SEQ ID NO: 98-255, причем рак выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, меланомы, рака печени, рака молочной железы, рака матки, карциномы из клеток Меркеля, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака желчевыводящих путей, рака толстой и прямой кишки, рака мочевого пузыря, рака почки, лейкоза, рака яичника, рака пищевода,

злокачественной опухоли головного мозга, рака желудка, рака предстательной железы или их комбинации.

[0049] Данное описание дополнительно относится к популяции модифицированных Т-клеток, которые представляют экзогенный корецептор CD8, содержащий описанный в данном документе полипептид, например, аминокислотные последовательности, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90% или на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 99% или на 100% идентичные SEQ ID NO: 5, 7, 258, 259, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14, и Т-клеточный рецептор.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0050] На ФИГ. 1 показана репрезентативная субъединица CD8 α , например, SEQ ID NO: 258 (CD8 α 1). В данном варианте реализации CD8 α 1 включает пять доменов: (1) сигнальный пептид, (2) Ig-подобный домен-1, (3) «стеблевая» область, (4) трансмембранный (ТМ) домен и (5) цитоплазматический хвост (Cyto), содержащий *lck*-связывающий мотив.

[0051] На ФИГ. 2 показано выравнивание последовательностей CD8 α 1 (SEQ ID NO: 258) и m1CD8 α (SEQ ID NO: 7).

[0052] На ФИГ. 3 показано выравнивание последовательностей CD8 α 2 (SEQ ID NO: 259) и m2CD8 α (SEQ ID NO: 262), в котором цистеиновая замена в положении 112 обозначена стрелкой.

[0053] На ФИГ. 4 показаны векторы согласно аспекту данного изобретения.

[0054] На ФИГ. 5А показаны титры вирусных векторов, показанных на ФИГ. 4.

[0055] На ФИГ. 5В показаны титры дополнительных вирусных векторов в соответствии с вариантом реализации данного изобретения. Конструкция № 13; конструкция № 14; конструкция № 15; конструкция № 16; конструкция № 17; конструкция № 18; конструкция № 19; конструкция № 21; конструкция № 10n; конструкция № 11n; и TCR: R11KEA (SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16) (конструкция № 8), которая связывает PRAME-004 (SLLQHLIGL) (SEQ ID NO: 147). Следует отметить, что конструкции № 10 и № 10n относятся к разным сериям одной конструкции (SEQ ID NO: 291 и 292) и конструкции № 11 и № 11n относятся к разным сериям одной конструкции (SEQ ID NO: 285 и 286).

[0056] На ФИГ. 6 показано производство Т-клеток.

[0057] На ФИГ. 7А показана экспрессия маркеров активации до и после активации CD3+CD8+ клеток.

[0058] На ФИГ. 7В показана экспрессия маркеров активации до и после активации CD3+CD4+ клеток.

[0059] На ФИГ. 8А показана кратность размножения клеток, трансдуцированных различными конструкциями, от донора № 1. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля). Следует отметить, что конструкции № 9 и № 9b относятся к разным сериям одной конструкции (SEQ ID NO: 287 и 288).

[0060] На ФИГ. 8В показана кратность размножения клеток, трансдуцированных различными конструкциями, от донора № 2. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа) (конструкция № 8); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля).

[0061] На ФИГ. 9А показаны графики проточной цитометрии для клеток, трансдуцированных конструкцией № 9.

[0062] На ФИГ. 9В показаны графики проточной цитометрии для клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0063] На ФИГ. 9С показаны графики проточной цитометрии для клеток, трансдуцированных конструкцией № 11.

[0064] На ФИГ. 9D показаны графики проточной цитометрии для клеток, трансдуцированных конструкцией № 12.

[0065] На ФИГ. 10 показан % CD8+CD4+ от клеток, трансдуцированных различными конструкциями, для донора № 1 и донора № 2. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля).

[0066] На ФИГ. 11 показан % Tet CD8+CD4+ для клеток, трансдуцированных различными конструкциями. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля).

[0067] На ФИГ. 12 показаны значения MFI Tet (CD8+CD4+Tet+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля).

[0068] На ФИГ. 13 показаны значения MFI CD8 α (CD8+CD4+Tet+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля).

[0069] На ФИГ. 14 показан % CD8+CD4 (от CD3+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля).

[0070] На ФИГ. 15 показан % CD8+Tet+ (от CD3+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля).

[0071] На ФИГ. 16 показаны значения MFI Tet (CD8+Tet+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля).

[0072] На ФИГ. 17 показаны значения MFI CD8 α (CD8+Tet+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля).

[0073] На ФИГ. 18 показан % Tet+ (от CD3+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция

№ 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля).

[0074] На ФИГ. 19 показано VCN (верхняя панель) и CD3+Tet+/VCN (нижняя панель) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями. Конструкции представлены ниже: конструкция № 9b; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; TCR = R11KEA.WPRE^{wt} (TCR с WPRE дикого типа); NT = нетрансдуцированные Т-клетки (в качестве отрицательного контроля).

[0075] На ФИГ. 20А-20С представлены данные, показывающие, что конструкции (№ 10, № 11 и № 12) сравнимы с таковыми, включающими только TCR, в отношении опосредования цитотоксичности в отношении положительных по мишени клеточных линий, экспрессирующих антиген на разных уровнях (UACC257 при 1081 копии на клетку и A375 при 50 копиях на клетку).

[0076] На ФИГ. 21А-21В представлены данные, показывающие, что секреция IFN γ в ответ на UACC257 сравнима среди конструкций, однако в случае A375, для № 10 экспрессия является наиболее высокой среди всех конструкций. Однако, при сравнении № 9 с № 11, экспрессирующими последовательности корцептора CD8 дикого типа и модифицированного указанного рецептора соответственно, Т-клетки, трансдуцированные № 11, индуцировали более сильный цитокиновый ответ, измеряемый как IFN γ , который количественно определяли в супернатантах из планшетов Incucyte. Конструкция № 9; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; конструкция № 8 = только R11KEA TCR.

[0077] На ФИГ. 22 представлен иллюстративный план эксперимента для оценки созревания DC и секреции цитокинов полученным из PBMC продуктом в ответ на мишени UACC257 и A375. N=2.

[0078] На ФИГ. 23А-23В представлены данные, показывающие, что секреция IFN γ в ответ на A375 повышается в присутствии iDC. В условиях трехкомпонентных совместных культур с iDC, секреция IFN γ выше в случае конструкции № 10, по сравнению с другими конструкциями. Однако, при сравнении конструкции № 9 с конструкцией № 11, экспрессирующими последовательности корцептора CD8 дикого типа и модифицированного указанного рецептора соответственно, Т-клетки, трансдуцированные № 11, индуцировали более сильный цитокиновый ответ, измеряемый как IFN γ , который количественно определяли в супернатантах культуры трехкомпонентных совместных культур с использованием донора D600115, E:T:iDC::1:1/10:1/4. Конструкция № 9;

конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; конструкция № 8 = только R11KEA TCR.

[0079] На ФИГ. 24А-24В представлены данные, показывающие, что секреция IFN γ в ответ на A375 повышается в присутствии iDC. В условиях трехкомпонентных совместных культур с iDC, секреция IFN γ была выше в случае конструкции № 10, по сравнению с другими конструкциями. IFN γ количественно определяли в супернатантах культур для трехкомпонентных совместных культур с использованием донора D150081, E:T:iDC::1:1/10:1/4. Конструкция № 9; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; конструкция № 8 = только R11KEA TCR.

[0080] На ФИГ. 25А-25В представлены данные, показывающие, что секреция IFN γ в ответ на UACC257 повышается в присутствии iDC. В условиях трехкомпонентных совместных культур с iDC, секреция IFN γ выше в случае конструкции № 10, по сравнению с другими конструкциями. Однако, при сравнении конструкции № 9 с конструкцией № 11, экспрессирующими последовательности корцептора CD8 дикого типа и модифицированного указанного рецептора соответственно, Т-клетки, трансдуцированные конструкцией № 11, индуцировали более сильный цитокиновый ответ, измеряемый как IFN γ , который количественно определяли в супернатантах культуры трехкомпонентных совместных культур с использованием донора D600115, E:T:iDC::1:1/10:1/4. Конструкция № 9; конструкция № 10; конструкция № 11; конструкция № 12; конструкция № 1; конструкция № 2; конструкция № 8 = только R11KEA TCR.

[0081] На ФИГ. 26 показано производство Т-клеток в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0082] На ФИГ. 27А показана экспрессия маркеров активации до и после активации CD3+CD8⁺ клеток.

[0083] На ФИГ. 27В показана экспрессия маркеров активации до и после активации CD3+CD4⁺ клеток в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0084] На ФИГ. 28 показана кратность размножения клеток, трансдуцированных различными конструкциями.

[0085] На ФИГ. 29А и 29В показан % CD8+CD4⁺ для клеток, трансдуцированных различными конструкциями, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0086] На ФИГ. 30А и 30В показан % Tet CD8+CD4⁺ для клеток, трансдуцированных различными конструкциями, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

- [0087]** На ФИГ. 31А и 31В показаны значения MFI Tet (CD8+CD4+Tet+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.
- [0088]** На ФИГ. 32А и 32В показан % CD8+CD4- (от CD3+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.
- [0089]** На ФИГ. 33А и 33В показан % CD8+Tet+ (от CD3+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.
- [0090]** На ФИГ. 34А и 34В показаны значения MFI Tet (CD8+Tet+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.
- [0091]** На ФИГ. 35А и 35В показан % Tet+ (от CD3+) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.
- [0092]** На ФИГ. 36А и 36В показано VCN для клеток, трансдуцированных различными конструкциями, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.
- [0093]** На ФИГ. 37 показано производство Т-клеток в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.
- [0094]** На ФИГ. 38 показан % Tet CD8+CD4+ для клеток, трансдуцированных различными конструкциями.
- [0095]** На ФИГ. 39 показаны значения MFI Tet для CD8+CD4+Tet+ клеток, трансдуцированных различными конструкциями.
- [0096]** На ФИГ. 40 показаны значения MFI Tet для CD8+Tet+ клеток, трансдуцированных различными конструкциями.
- [0097]** На ФИГ. 41 показан % Tet+ CD3+ клеток, трансдуцированных различными конструкциями.
- [0098]** На ФИГ. 42 показано число копий вектора (VCN) для клеток, трансдуцированных различными конструкциями.
- [0099]** На ФИГ. 43 показан % субпопуляций Т-клеток в случае клеток, трансдуцированных различными конструкциями. В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении CD3+TCR+.
- [00100]** На ФИГ. 44А и ФИГ. 44В показан % субпопуляций Т-клеток в случае клеток, трансдуцированных различными конструкциями. В FACS-анализе клетки гейтировали в

отношении CD4+CD8+, что касается ФИГ. 44А, и в отношении CD4-CD8+TCR+, что касается ФИГ. 44В.

[00101] На ФИГ. 45А и 45В представлены данные, показывающие, что конструкции № 13 и № 10 сравнимы с таковыми, включающими только TCR, в отношении опосредования цитотоксичности в отношении положительных по мишени клеточных линий UACC257, экспрессирующих антиген на высоких уровнях (1081 копия на клетку). Конструкция № 15 также была эффективной, но обеспечивала более медленное уничтожение по сравнению с конструкциями № 13 и № 10. Соотношение эффектор:мишень, используемое для получения этих результатов, составляло 4:1.

[00102] На ФИГ. 46 показано, что секреция IFN γ в ответ на клеточную линию UACC257 была выше в случае конструкции № 13, по сравнению с конструкцией № 10. IFN γ определяли количественно в супернатантах с планшетов Incucyte. Соотношение эффектор:мишень, используемое для получения этих результатов, составляло 4:1.

[0101] На ФИГ. 47 показана частота маркера ICI (2B4, 41BB, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3, CD39+CD69+ и CD39-CD69-).

[0102] На ФИГ. 48А – 48G показан повышенный уровень экспрессии IFN γ , IL-2 и TNF α в случае CD4+CD8+ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 (сигнальный пептид WT, CD8 β 1), по сравнению с другими конструкциями. В FACS-анализе клетки гейтировали по CD3+CD4+CD8+ клеткам в отношении UACC257, E:T 4:1.

[0103] На ФИГ. 49А-49G показан повышенный уровень экспрессии IFN γ , IL-2, MIP-1 β и TNF α в случае CD4-CD8+ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 (сигнальный пептид WT, CD8 β 1), по сравнению с другими конструкциями. В FACS-анализе клетки гейтировали по CD3+CD4-CD8+ клеткам в отношении UACC257, E:T 4:1.

[0104] На ФИГ. 50А-50G показан повышенный уровень экспрессии IL-2 и TNF α в случае CD3+TCR+ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 (сигнальный пептид WT, CD8 β 1), по сравнению с другими конструкциями. В FACS-анализе клетки гейтировали по CD3+TCR+ клеткам в отношении UACC257, E:T 4:1.

[0105] На ФИГ. 51А-51С показаны результаты из FACS-анализа, в котором клетки гейтировали по CD4+CD8+ клеткам в отношении A375, E:T 4:1.

[0106] На ФИГ. 52А-52С показаны результаты из FACS-анализа, в котором клетки гейтировали по CD4-CD8+ клеткам в отношении A375, E:T 4:1.

[0107] На ФИГ. 53А-53С показаны результаты из FACS-анализа, в котором клетки гейтировали по CD3+TCR+ клеткам в отношении A375, E:T 4:1.

[0108] На ФИГ. 54 показано производство Т-клеток в соответствии с одним из

вариантов реализации данного изобретения.

[0109] На ФИГ. 55А-55С показано взаимодействие между комплексом пептид/МНС антигенпредставляющей клетки (АРС) с Т-клеткой за счет связывания комплекса ТСР и гетеродимера CD8 $\alpha\beta$ (ФИГ. 55А, например, полученного путем трансдуцирования Т-клеток конструкциями № 2, № 3, № 4, № 10, № 13, № 14, № 15, № 16, № 17, № 18 или № 21), комплекса ТСР и гомодимера CD8 α , в котором его «стеблевая» область замещена «стеблевой» областью CD8 β (CD8 $\alpha\alpha^*$) (ФИГ. 55В, например, полученного путем трансдуцирования Т-клеток конструкцией № 11, № 12 или № 19) и комплекса ТСР и гомодимера CD8 α (ФИГ. 55С, например, полученного путем трансдуцирования Т-клеток конструкциями № 1, № 5, № 6, № 7 или № 9).

[0110] На ФИГ. 56 показаны уровни секреции IL-12 дендритными клетками (DC) в присутствии CD4⁺ Т-клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 или № 11, и незрелыми дендритными клетками (iDC), в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0111] На ФИГ. 57 показаны уровни секреции TNF- α дендритными клетками (DC) в присутствии CD4⁺ Т-клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 или № 11, и незрелыми дендритными клетками (iDC), в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0112] На ФИГ. 58 показаны уровни секреции IL-6 дендритными клетками (DC) в присутствии CD4⁺ Т-клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 или № 11, и незрелыми дендритными клетками (iDC), в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0113] На ФИГ. 59 показана схема определения уровней секреции цитокинов дендритными клетками (DC) в присутствии РВМС, трансдуцированных различными конструкциями, и клеток-мишеней, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0114] На ФИГ. 60 показаны уровни секреции IL-12 дендритными клетками (DC) в присутствии РВМС, трансдуцированных различными конструкциями, и клеток-мишеней, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0115] На ФИГ. 61 показаны уровни секреции TNF- α дендритными клетками (DC) в присутствии РВМС, трансдуцированных различными конструкциями, и клеток-мишеней, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения

[0116] На ФИГ. 62 показаны уровни секреции IL-6 дендритными клетками (DC) в присутствии РВМС, трансдуцированных различными конструкциями, и клеток-мишеней,

в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0117] На ФИГ. 63А-63С показана продукция $IFN\gamma$ трансдуцированными отобранными по $CD4+$ Т-клетками, полученными от донора № 1 (ФИГ. 63А), донора № 2 (ФИГ. 63В) и донора № 3 (ФИГ. 63С), в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0118] На ФИГ. 63D показаны значения $EC50$ (нг/мл) на ФИГ. 63А-63С.

[0119] На ФИГ. 64А-64С показана продукция $IFN\gamma$ трансдуцированными РВМС, полученными от донора № 4 (ФИГ. 64А), донора № 1 (ФИГ. 64В) и донора № 3 (ФИГ. 64С), и их соответствующие значения $EC50$ (нг/мл), в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

[0120] На ФИГ. 64D показано сравнение значений $EC50$ (нг/мл) среди разных доноров на ФИГ. 64А-64С.

[0121] На ФИГ. 65А-65С показана продукция $IFN\gamma$ трансдуцированными РВМС (ФИГ. 65А), отобранными по $CD8+$ Т-клетками (ФИГ. 65В) и отобранными по $CD4+$ Т-клетками (ФИГ. 65С), и их соответствующие значения $EC50$ (нг/мл), от одного донора, в соответствии с одним из вариантов реализации данного изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Модифицированные полипептиды CD8

[0117] Описанные в данном документе полипептиды CD8 могут включать общую структуру из N-концевого сигнального пептида (необязательного), иммуноглобулин- (Ig)-подобного домена $CD8\alpha$, $CD8\beta$ -области (домена), трансмембранного домена $CD8\alpha$ и цитоплазматического домена $CD8\alpha$. Описанные в данном документе модифицированные полипептиды CD8 показали неожиданное улучшение функциональности Т-клеток, совместно трансдуцированных вектором, экспрессирующим TCR и полипептид CD8.

[0118] Описанные в данном документе полипептиды CD8 могут включать общую структуру из N-концевого сигнального пептида (необязательного), иммуноглобулин- (Ig)-подобного домена $CD8\alpha$, «стеблевого» домена или области, трансмембранного домена $CD8\alpha$ и цитоплазматического домена $CD8\alpha$.

[0119] В одном варианте реализации изобретения описанные в данном документе полипептиды CD8 могут содержать (а) иммуноглобулин- (Ig)-подобный домен, включающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1;

(b) область, включающую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2; (c) трансмембранный домен, включающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, и (d) цитоплазматический домен, включающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4. Описанные в данном документе полипептиды CD8 могут коэкспрессироваться с Т-клеточным рецептором или CAR-T в Т-клетке и использоваться в способах терапии с использованием адоптивного переноса клеток (АСТ). Т-клетка может представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетку или $\gamma\delta$ -Т-клетку.

[0120] В другом варианте реализации изобретения описанные в данном документе полипептиды CD8 могут включать (a) по меньшей мере около 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1; (b) по меньшей мере около 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2; (c) по меньшей мере около 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3 и (d) по меньшей мере около 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4. Описанные в данном документе полипептиды CD8 могут коэкспрессироваться с Т-клеточным рецептором или CAR-T в Т-клетке и использоваться в способах терапии с использованием адоптивного переноса клеток (АСТ). Т-клетка может представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетку или $\gamma\delta$ -Т-клетку.

[0121] В другом варианте реализации изобретения описанные в данном документе полипептиды CD8 могут содержать (a) SEQ ID NO: 1, включающую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен; (b) SEQ ID NO: 2, включающую одну, две, три, четыре

или пять аминокислотных замен; (с) SEQ ID NO: 3, включающую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, и (d) SEQ ID NO: 4, включающую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен. В одном варианте реализации изобретения замены являются консервативными аминокислотными заменами. Описанные в данном документе полипептиды CD8 могут коэкспрессироваться с Т-клеточным рецептором или CAR-T в Т-клетке и использоваться в способах терапии с использованием адоптивного переноса клеток (ACT). Т-клетка может представлять собой $\gamma\delta$ -Т-клетку или $\gamma\delta$ -Т-клетку.

[0122] CD8 представляет собой заякоренный в мембране гликопротеин, который выполняет функцию корецептора для антигенного распознавания комплексов пептид/МНС класса I Т-клеточными рецепторами (TCR) и играет важную роль в развитии Т-клеток в тимусе и активации Т-клеток на периферии. Функциональный CD8 представляет собой димерный белок, состоящий либо из двух α -цепей (CD8 $\alpha\alpha$), либо из α -цепи и β -цепи (CD8 $\alpha\beta$), и для поверхностной экспрессии β -цепи может быть необходимо ее связывание с коэкспрессированной α -цепью с образованием гетеродимера CD8 $\alpha\beta$. CD8 $\alpha\alpha$ и CD8 $\alpha\beta$ могут по-разному экспрессироваться на поверхности различных лимфоцитов. CD8 $\alpha\beta$ экспрессируется главным образом на поверхности $\alpha\beta$ TCR⁺ Т-клеток и тимоцитов, а CD8 $\alpha\alpha$ на субпопуляции $\alpha\beta$ TCR⁺, $\gamma\delta$ TCR⁺ кишечных интраэпителиальных лимфоцитов, НК-клеток, дендритных клеток и небольшой фракции CD4⁺ Т-клеток.

[0123] Например, ген CD8 человека может экспрессироваться в белок размером 235 аминокислот. На ФИГ. 1 показан белок CD8 α (CD8 α 1 – SEQ ID NO: 258), который, в одном аспекте, разделен на следующие домены (начиная с amino-конца и заканчивая карбокси-концом полипептида): (1) сигнальный пептид (аминокислоты с -21 по -1), который может быть отщеплен в клетках человека в ходе переноса рецептора к клеточной поверхности и, таким образом, он может не быть частью зрелого активного рецептора; (2) иммуноглобулин- (Ig)-подобный домен (в данном варианте реализации изобретения, аминокислоты 1-115), который может иметь структуру, называемую иммуноглобулиновой укладкой, которая является схожей с таковой многих других молекул, вовлеченных в регулирование иммунной системы, белков семейства иммуноглобулинов.

Кристаллическая структура рецептора CD8 $\alpha\alpha$ в комплексе с молекулой HLA-A2 МНС человека продемонстрировала, как Ig-домен рецептора CD8 $\alpha\alpha$ связывает лиганд; (3) ближайшая к мембране область (в данном варианте реализации изобретения, аминокислоты 116-160), которая может представлять собой протяженную линкерную область, позволяющую рецептору CD8 $\alpha\alpha$ «протягиваться» от поверхности Т-клетки поверх МНС к α 3-домени МНС, где он связывается. «Стеблевая» область может быть

гликозилирована и может быть негибкой; (4) трансмембранный домен (в данном варианте реализации изобретения, аминокислоты 161-188), который может заякоривать рецептор CD8 α в клеточной мембране и, следовательно, не является частью растворимого рекомбинантного белка; и (5) цитоплазматический домен (в данном варианте реализации изобретения, аминокислоты 189-214), который может опосредовать сигнальную функцию в Т-клетках посредством его связывания с p56^{lck}, которая может быть вовлечена в каскад активации Т-клеток в рамках событий фосфорилирования.

[0124] Последовательности CD8 α в целом могут иметь достаточную часть иммуноглобулинового домена, чтобы иметь возможность связываться с МНС. В целом, молекулы CD8 α могут содержать весь или значительную часть иммуноглобулинового домена CD8 α , например, SEQ ID NO: 258, но, в одном аспекте, могут содержать по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 или 115 аминокислот иммуноглобулинового домена. Молекулы CD8 α по данному изобретению предпочтительно могут представлять собой димеры (например, CD8 α α или CD8 α β), хотя в объем данного изобретения может быть включен мономер CD8 α . В одном аспекте, CD8 α по данному изобретению может включать CD8 α 1 (SEQ ID NO: 258) и CD8 α 2 (SEQ ID NO: 259).

[0125] Субъединицы CD8 α и β могут иметь схожие структурные мотивы, включая Ig-подобный домен, «стеблевую» область из 30–40 аминокислот, трансмембранную область и короткий цитоплазматический домен из около 20 аминокислот. Цепи CD8 α и β имеют два и один сайт N-сцепленного гликозилирования соответственно, в Ig-подобных доменах, где они характеризуются < 20% идентичностью их аминокислотных последовательностей. «Стеблевая» область CD8 β на 10–13 аминокислот короче, чем «стебель» CD8 α , и подвергается высокой степени гликозилирования по O-сцепленным углеводам. Эти углеводы на β , но не на α -«стеблевой» области, по-видимому, весьма гетерогенны из-за сложного сиаилирования, которое может по-разному регулироваться на стадиях развития тимоцитов и при активации Т-клеток. Было показано, что аддукты гликанов играют регулируемую роль в функциях гликопротеинов и в иммунных реакциях. Гликаны, расположенные проксимальнее трансмембранных доменов, могут влиять на ориентацию соседних мотивов. Уникальные биохимические свойства «стеблевой» области цепи CD8 β могут представлять собой вероятного кандидата на модулирование функции корецептора.

[0126] Полипептид CD8 может быть модифицирован, при этом CD8 α -область, например, «стеблевая» область, может быть замещена CD8 β -областью. В другом аспекте, он может быть модифицирован для создания полипептида CD8 α -CD8 β . В одном варианте

реализации изобретения описанные в данном документе модифицированные полипептиды CD8 могут иметь область, включающую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2. Модифицированные полипептиды CD8 α , описанные в данном документе, могут иметь иммуноглобулин- (Ig)-подобный домен, имеющий по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. Модифицированные полипептиды CD8 могут иметь трансмембранный домен, включающий по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3. Описанные в данном документе модифицированные полипептиды CD8 могут иметь цитоплазматический хвост, включающий по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4. Описанные в данном документе полипептиды CD8 могут иметь по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5. Описанные в данном документе полипептиды CD8 могут содержать сигнальный пептид, включающий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 294, слитый с N-концом или слитый с C-концом полипептида mCD8 α . Описанные в данном документе полипептиды CD8 могут иметь по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7.

T-клетки

[0127] T-клетки могут экспрессировать описанные в данном документе модифицированные полипептиды CD8. Например, T-клетка может коэкспрессировать T-клеточный рецептор (TCR) и описанные в данном документе модифицированные полипептиды CD8. T-клетки могут также экспрессировать химерный антигенный рецептор (CAR), CAR-аналоги или производные CAR.

[0128] Т-клетка может представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетку, $\gamma\delta$ -Т-клетку, Т-клетку с функциями естественных киллеров или их комбинацию, если они находятся в популяции. Т-клетка может представлять собой CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или CD4+/CD8+ Т-клетку.

Т-клеточные рецепторы

[0129] Т-клетка может коэкспрессировать Т-клеточный рецептор (TCR), антигенсвязывающий белок, или как одно, так и другое, с описанными в данном документе модифицированными полипептидами CD8, включая без ограничения таковые, представленные в таблице 3 (SEQ ID NO: 15-92). Кроме того, Т-клетка может экспрессировать TCR и антигенсвязывающие белки, описанные в публикации заявки на патент США № 2017/0267738; публикации заявки на патент США № 2017/0312350; публикации заявки на патент США № 2018/0051080; публикации заявки на патент США № 2018/0164315; публикации заявки на патент США № 2018/0161396; публикации заявки на патент США № 2018/0162922; публикации заявки на патент США № 2018/0273602; публикации заявки на патент США № 2019/0016801; публикации заявки на патент США № 2019/0002556; публикации заявки на патент США № 2019/0135914; заявке на патент США 10538573; заявке на патент США 10626160; публикации заявки на патент США № 2019/0321478; публикации заявки на патент США № 2019/0256572; заявке на патент США 10550182; заявке на патент США 10526407; публикации заявки на патент США № 2019/0284276; публикации заявки на патент США № 2019/0016802; публикации заявки на патент США № 2019/0016803; публикации заявки на патент США № 2019/0016804; заявке на патент США 10583573; публикации заявки на патент США № 2020/0339652; заявке на патент США 10537624; заявке на патент США 10596242; публикации заявки на патент США № 2020/0188497; заявке на патент США 10800845; публикации заявки на патент США № 2020/0385468; заявке на патент США 10527623; заявке на патент США 10725044; публикации заявки на патент США № 2020/0249233; заявке на патент США 10702609; публикации заявки на патент США № 2020/0254106; заявке на патент США 10800832; публикации заявки на патент США № 2020/0123221; заявке на патент США 10590194; заявке на патент США 10723796; публикации заявки на патент США № 2020/0140540; заявке на патент США 10618956; публикации заявки на патент США № 2020/0207849; публикации заявки на патент США № 2020/0088726; и публикации заявки на патент США № 2020/0384028; содержание каждой из этих публикаций и перечни последовательностей, описанные в них, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Т-клетка может представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетку, $\gamma\delta$ -Т-

клетку, Т-клетку с функциями естественных киллеров, естественную клетку-киллер. В одном варианте реализации изобретения TCR, описанные в данном документе, представляют собой одноцепочечные TCR или растворимые TCR.

[0130] Кроме того, TCR, которые могут коэкспрессироваться с описанными в данном документе модифицированными полипептидами CD8 в Т-клетке, могут представлять собой TCR, состоящие из альфа-цепи (TCR α) и бета-цепи (TCR β). Цепи TCR α и цепи TCR β , которые можно использовать в TCR, могут быть выбраны из R11KEA (SEQ ID NO: 15 и 16), R20P1H7 (SEQ ID NO: 17 и 18), R7P1D5 (SEQ ID NO: 19 и 20), R10P2G12 (SEQ ID NO: 21 и 22), R10P1A7 (SEQ ID NO: 23 и 24), R4P1D10 (SEQ ID NO: 25 и 26), R4P3F9 (SEQ ID NO: 27 и 28), R4P3H3 (SEQ ID NO: 29 и 30), R36P3F9 (SEQ ID NO: 31 и 32), R52P2G11 (SEQ ID NO: 33 и 34), R53P2A9 (SEQ ID NO: 35 и 36), R26P1A9 (SEQ ID NO: 37 и 38), R26P2A6 (SEQ ID NO: 39 и 40), R26P3H1 (SEQ ID NO: 41 и 42), R35P3A4 (SEQ ID NO: 43 и 44), R37P1C9 (SEQ ID NO: 45 и 46), R37P1H1 (SEQ ID NO: 47 и 48), R42P3A9 (SEQ ID NO: 49 и 50), R43P3F2 (SEQ ID NO: 51 и 52), R43P3G5 (SEQ ID NO: 53 и 54), R59P2E7 (SEQ ID NO: 55 и 56), R11P3D3 (SEQ ID NO: 57 и 58), R16P1C10 (SEQ ID NO: 59 и 60), R16P1E8 (SEQ ID NO: 61 и 62), R17P1A9 (SEQ ID NO: 63 и 64), R17P1D7 (SEQ ID NO: 65 и 66), R17P1G3 (SEQ ID NO: 67 и 68), R17P2B6 (SEQ ID NO: 69 и 70), R11P3D3KE (SEQ ID NO: 71 и 303), R39P1C12 (SEQ ID NO: 304 и 74), R39P1F5 (SEQ ID NO: 75 и 76), R40P1C2 (SEQ ID NO: 77 и 78), R41P3E6 (SEQ ID NO: 79 и 80), R43P3G4 (SEQ ID NO: 81 и 82), R44P3B3 (SEQ ID NO: 83 и 84), R44P3E7 (SEQ ID NO: 85 и 86), R49P2B7 (SEQ ID NO: 87 и 88), R55P1G7 (SEQ ID NO: 89 и 90) или R59P2A7 (SEQ ID NO: 91 и 92). Т-клетка может представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетку, $\gamma\delta$ -Т-клетку или Т-клетку с функциями естественных киллеров.

[0131] В таблице 1 показаны примеры пептидов, с которыми связываются TCR, когда пептид находится в комплексе с молекулой МНС. (Молекулы МНС у людей могут называться HLA, антигенами лейкоцитов человека).

Таблица 1. Т-клеточный рецептор и пептиды.

Название TCR	Пептид (SEQ ID NO:)
R20P1H7, R7P1D5, R10P2G12	KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 215)
R10P1A7	KIQEILTQV (SEQ ID NO: 123)
R4P1D10, R4P3F9, R4P3H3	FLLDGSANV (SEQ ID NO: 238)
R36P3F9, R52P2G11, R53P2A9	ILQDGQFLV (SEQ ID NO: 193)

Название TCR	Пептид (SEQ ID NO:)
R26P1A9, R26P2A6, R26P3H1, R35P3A4, R37P1C9, R37P1H1, R42P3A9, R43P3F2, R43P3G5, R59P2E7	KVLEYVIKV (SEQ ID NO: 202)
R11KEA, R11P3D3, R16P1C10, R16P1E8, R17P1A9, R17P1D7, R17P1G3, R17P2B6, R11P3D3KE	SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 147)
R39P1C12, R39P1F5, R40P1C2, R41P3E6, R43P3G4, R44P3B3, R44P3E7, R49P2B7, R55P1G7, R59P2A7	ALSVLRAL (SEQ ID NO: 248)

Опухолеассоциированные антигены (ТАА)

[0132] Пептиды, являющиеся опухолеассоциированными антигенами (ТАА), можно использовать с описанными в данном документе конструкциями на основе полипептидов CD8, способами и вариантами реализации изобретения. Например, Т-клеточные рецепторы (TCR), описанные в данном документе, могут специфически связываться с ТАА-пептидом, связанным с антигеном лейкоцитов человека (HLA). Он также известен как молекула главного комплекса гистосовместимости (МНС). МНС-молекулы человека также обозначаются как антигены лейкоцитов человека (HLA).

[0133] Пептиды, являющиеся опухолеассоциированными антигенами (ТАА), которые можно использовать с описанными в данном документе полипептидами CD8, включают без ограничения таковые, представленные в таблице 3, и те ТАА-пептиды, которые описаны в публикации заявки на патент США № 2016/0187351; публикации заявки на патент США № 2017/0165335; публикации заявки на патент США № 2017/0035807; публикации заявки на патент США № 2016/0280759; публикации заявки на патент США № 2016/0287687; публикации заявки на патент США № 2016/0346371; публикации заявки на патент США № 2016/0368965; публикации заявки на патент США № 2017/0022251; публикации заявки на патент США № 2017/0002055; публикации заявки на патент США № 2017/0029486; публикации заявки на патент США № 2017/0037089; публикации заявки на патент США № 2017/0136108; публикации заявки на патент США № 2017/0101473; публикации заявки на патент США № 2017/0096461; публикации заявки на патент США № 2017/0165337; публикации заявки на патент США № 2017/0189505; публикации заявки на патент США № 2017/0173132; публикации заявки на патент США № 2017/0296640; публикации заявки на патент США № 2017/0253633; публикации заявки на патент США

№ 2017/0260249; публикации заявки на патент США № 2018/0051080; публикации заявки на патент США № 2018/0164315; публикации заявки на патент США № 2018/0291082; публикации заявки на патент США № 2018/0291083; публикации заявки на патент США № 2019/0255110; заявке на патент США № 9717774; заявке на патент США № 9895415; публикации заявки на патент США № 2019/0247433; публикации заявки на патент США № 2019/0292520; публикации заявки на патент США № 2020/0085930; заявке на патент США 10336809; заявке на патент США № 10131703; заявке на патент США № 10081664; заявке на патент США № 10081664; заявке на патент США № 10093715; заявке на патент США № 10583573; и публикации заявки на патент США № 2020/00085930; содержание каждой из этих публикаций, последовательности и перечни последовательностей, описанные в них, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Пептиды, являющиеся опухолеассоциированными антигенами (ТАА), описанные в данном документе, могут быть связаны с HLA (молекулой МНС). Пептиды, являющиеся опухолеассоциированными антигенами (ТАА), связанные с HLA, могут распознаваться TCR, описанным в данном документе, необязательно коэкспрессированным с описанными в данном документе полипептидами CD8.

[0134] Т-клетки могут быть сконструированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), содержащего лигандсвязывающий домен, происходящий из NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LLT1, AICL, CD26, NKRP1, NKp30, NKp44, NKp46, CD244 (2B4), DNAM-1 и NKp80, или противоопухолевое антитело, такое как антитело к Her2neu или антитело к EGFR, и сигнальный домен, полученный из CD3- ζ , Dap 10, CD28, 4-1BB и CD40L. В некоторых примерах химерный рецептор связывает MICA, MICB, Her2neu, EGFR, мезотелин, CD38, CD20, CD 19, PSA, RON, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, альфа-фетопротеин (AFP), эмбриональный опухолевый антиген (CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, гликолипид F77, белок, активирующий фибробласты, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, c-met, CSPG4, Nectin-4, VEGFR2, PSCA, фолат-связывающий белок/рецептор, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, тирозиназу, SSX2, SSX4, NYESO-1, антиген эпителиальных опухолей (ETA), гены семейства MAGEA (такие как MAGE3A, MAGE4A), KKL1, мутантный gas, β raf, p53, связанную с цепью МНС класса I молекулу А (MICA) или связанную с цепью МНС класса I молекулу В (MICB), HPV или CMV. Т-клетка может представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетку, $\gamma\delta$ -Т-клетку или Т-клетку с функциями естественных киллеров.

Культивирование Т-клеток

[0135] Способы активации, трансдукции и/или размножения Т-клеток, например, инфилтрирующих опухоль лимфоцитов, CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток и Т-клеток, которые можно использовать для экспрессии трансгена, описаны в данном документе. Т-клетки могут быть активированы, трансдуцированы и размножены при истощении α -и/или β -TCR-положительных клеток. Т-клетка может представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетку, $\gamma\delta$ -Т-клетку или Т-клетку с функциями естественных киллеров.

[0136] Способы *ex vivo* размножения популяции сконструированных $\gamma\delta$ -Т-клеток для терапии с использованием адоптивного переноса клеток описаны в данном документе. Сконструированные $\gamma\delta$ -Т-клетки по данному изобретению можно размножать *ex vivo*. Сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, можно размножать *in vitro* без активации APC, или без совместного культивирования с APC, и аминокислот. Способы трансдуцирования Т-клеток описаны в публикации заявки на патент США № 2019/0175650, опубликованной 13 июня 2019 года, содержание которой включено в полном объеме посредством ссылки. Можно использовать другие способы трансдукции и культивирования Т-клеток.

[0137] Т-клетки, включая $\gamma\delta$ -Т-клетки, могут быть выделены из сложного образца, который культивируется *in vitro*. В одном варианте реализации изобретения целую популяцию РВМС, без предварительного истощения конкретных популяций клеток, таких как моноциты, $\alpha\beta$ -Т-клетки, В-клетки и НК-клетки, можно активировать и размножить. В одном варианте реализации изобретения обогащенные популяции Т-клеток могут быть получены до их специфической активации и размножения. В одном варианте реализации изобретения активацию и размножение $\gamma\delta$ -Т-клеток можно осуществлять в присутствии или в отсутствие нативных или сконструированных антигенпредставляющих клеток (APC). В вариантах реализации изобретения выделение и размножение Т-клеток из образцов опухоли можно осуществлять, используя иммобилизованные митогены для Т-клеток, включая антитела, специфические в отношении $\gamma\delta$ TCR, и другие средства для активации $\gamma\delta$ TCR, включая лектины. В одном варианте реализации изобретения выделение и размножение $\gamma\delta$ -Т-клеток из образцов опухоли можно осуществлять в отсутствие митогенов для $\gamma\delta$ -Т-клеток, включая антитела, специфические в отношении $\gamma\delta$ TCR, и другие средства для активации $\gamma\delta$ TCR, включая лектины.

[0138] Т-клетки, включая $\gamma\delta$ -Т-клетки, могут быть выделены с помощью проведения лейкофереза у субъекта, например, субъекта-человека. В одном варианте реализации изобретения $\gamma\delta$ -Т-клетки не выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови

(PBMC). Т-клетки могут быть выделены с использованием антител к CD3 и CD28, необязательно с рекомбинантным интерлейкином-2 человека (rhIL-2), например, от около 50 до 150 Ед/мл rhIL-2.

[0139] Выделенные Т-клетки могут быстро размножиться в ответ на контакт с одним или несколькими антигенами. Некоторые $\gamma\delta$ -Т-клетки, такие как V γ 9V δ 2+ Т-клетки, могут быстро размножиться *in vitro* в ответ на контакт с некоторыми антигенами, такими как пренил-пирофосфаты, алкиламины и метаболиты или микробные экстракты в ходе культивирования тканей. Стимулированные Т-клетки могут характеризоваться множеством молекул, обеспечивающих представление антигенов, костимуляцию и адгезию, которые могут облегчать выделение Т-клеток из сложного образца. Т-клетки в сложном образце могут быть стимулированы *in vitro* по меньшей мере одним антигеном в течение 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 7 суток или в течение другого подходящего периода времени. Стимуляция Т-клеток подходящим антигеном может обеспечить размножение популяции Т-клеток *in vitro*.

[0140] Активацию и размножение $\gamma\delta$ -Т-клеток можно осуществлять с использованием активации и костимулирующих средств, описанных в данном документе, для запуска пролиферации специфических $\gamma\delta$ -Т-клеток и персистенции популяций. В одном варианте реализации изобретения активация и размножение $\gamma\delta$ -Т-клеток из разных культур могут привести к получению подмножеств популяции отдельных клонов или смешанных поликлональных подмножеств популяции. В одном варианте реализации изобретения разные средства-агонисты можно использовать для идентификации средств, которые обеспечивают специфические $\gamma\delta$ -активирующие сигналы. В одном варианте реализации изобретения средства, которые обеспечивают специфические $\gamma\delta$ -активирующие сигналы, могут представлять собой разные моноклональные антитела (MAb), направленные против $\gamma\delta$ TCR. В одном варианте реализации изобретения можно использовать сопутствующие костимулирующие средства для содействия запуску специфической пролиферации $\gamma\delta$ -Т-клеток без индукции клеточной энергии и апоптоза. Такие костимулирующие средства могут включать лиганды, связывающиеся с рецепторами, экспрессируемыми на поверхности $\gamma\delta$ -клеток, такие как NKG2D, CD161, CD70, JAML, вспомогательная молекула-1 DNAX (DNAM-1), ICOS, CD27, CD137, CD30, HVEM, SLAM, CD122, DAP и CD28. В одном варианте реализации изобретения костимулирующие средства могут представлять собой антитела, специфические в отношении уникальных эпитопов на CD2- и CD3-молекулах. CD2 и CD3 могут иметь разные конформационные структуры, будучи экспрессированными на поверхности $\alpha\beta$ - или $\gamma\delta$ -Т-клеток. В одном варианте реализации

изобретения специфические антитела к CD3 и CD2 могут приводить к отчетливой активации $\gamma\delta$ -Т-клеток.

[0141] Неограничивающие примеры антигенов, которые можно использовать для стимуляции размножения Т-клеток, включая $\gamma\delta$ -Т-клетки, из сложного образца *in vitro*, могут включать пренил-пирофосфаты, такие как изопентенилпирофосфат (IPP), алкиламины, метаболиты патогенных микроорганизмов человека, метаболиты комменсальных бактерий, метил-3-бутенил-1-пирофосфат (2M3B1PP), (Е)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпирофосфат (НМВ-РР), этилпирофосфат (ЕРР), фарнезилпирофосфат (FPP), диметилаллилфосфат (DMAP), диметилаллилпирофосфат (DMAPP), этиладенозинтрифосфат (EPPPA), геранилпирофосфат (GPP), геранил-геранилпирофосфат (GGPP), изопентениладенозинтрифосфат (IPPPA), моноэтилфосфат (MEP), моноэтилпирофосфат (MEPP), 3-формил-1-бутил-пирофосфат (TUBAg 1), X-пирофосфат (TUBAg 2), 3-формил-1-бутил-уридинтрифосфат (TUBAg 3), 3-формил-1-бутил-дезокситимидинтрифосфат (TUBAg 4), моноэтилалкиламины, аллилпирофосфат, кротоилпирофосфат, диметилаллил- γ -уридинтрифосфат, кротоил- γ -уридинтрифосфат, аллил- γ -уридинтрифосфат, этиламин, изобутиламин, втор-бутиламин, изоамиламин и азотсодержащие бисфосфонаты.

[0142] Популяция Т-клеток, включая $\gamma\delta$ -Т-клетки, может быть размножена *ex vivo* до конструирования Т-клеток. Неограничивающий пример реагентов, которые можно использовать для облегчения размножения популяции Т-клеток *in vitro*, может включать антитела к CD3 или к CD2, к CD27, к CD30, к CD70, к OX40, IL-2, IL-15, IL-12, IL-9, IL-33, IL-18 или IL-21, CD70 (лиганд CD27), фитогемагглютинин (РНА), конканавалин А (ConA), митоген фитолакки американской (PWM), белок-агглютинин из земляных орехов (PNA), агглютинин из сои (SBA), агглютинин из *Les Culinaris* (LCA), агглютинин из *Pisum Sativum* (PSA), агглютинин из *Helix pomatia* (HPA), лектин из *Vicia graminea* (VGA) или другой подходящий митоген, способный к стимуляции пролиферации Т-клеток. Кроме того, Т-клетки могут быть размножены с использованием MCSF, IL-6, зотаксина, IFN-альфа, IL-7, гамма-индуцированного белка 10, IFN-гамма, IL-1RA, IL-12, MIP-1 альфа, IL-2, IL-13, MIP-1 бета, IL-2R, IL-15 и их комбинаций.

[0143] Способность $\gamma\delta$ -Т-клеток распознавать широкий спектр антигенов может быть усилена с помощью генетической инженерии $\gamma\delta$ -Т-клеток. $\gamma\delta$ -Т-клетки могут быть сконструированы для обеспечения универсального аллогенного терапевтического средства, которое распознает выбранный антиген *in vivo*. Генетическая инженерия $\gamma\delta$ -Т-клеток может включать стабильную интеграцию конструкции, экспрессирующей

фрагмент, распознающий опухоль, такой как $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR, химерный антигенный рецептор (CAR), который сочетает в одном рецепторе функции как связывания антигена, так и функции активации Т-клеток, его антигенсвязывающий фрагмент или домен активации лимфоцитов, в геном выделенной(выделенных) $\gamma\delta$ -Т-клетки(клеток), цитокин (например, IL-15, IL-12, IL-2, IL-7, IL-21, IL-18, IL-19, IL-33, IL-4, IL-9, IL-23 или IL-1 β), для повышения пролиферации, выживания и функции Т-клеток *ex vivo* и *in vivo*. Генетическая инженерия выделенной $\gamma\delta$ -Т-клетки может также включать удаление или нарушение экспрессии гена из одного или нескольких эндогенных генов в геноме выделенных $\gamma\delta$ -Т-клеток, как, например, локуса (локусов) МНС.

[0144] Сконструированные (или трансдуцированные) Т-клетки, включая $\gamma\delta$ -Т-клетки, могут быть размножены *ex vivo* без стимуляции антигенпредставляющей клеткой или аминокислотом. Антигенреактивные сконструированные Т-клетки по данному изобретению могут быть размножены *ex vivo* и *in vivo*. В одном варианте реализации изобретения активная популяция сконструированных Т-клеток может быть размножена *ex vivo* без антигенной стимуляции антигенпредставляющей клеткой, антигенным пептидом, непептидной молекулой или низкомолекулярным соединением, таким как аминокислотом, но с использованием определенных антител, цитокинов, митогенов или слитых белков, таких как продукт слияния IL-17 и Fc, продукт слияния MICA и Fc и продукт слияния CD70 и Fc. Примеры антител, которые можно использовать в размножении популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, включают антитела к CD3, к CD27, к CD30, к CD70, к OX40, к NKG2D или к CD2, примеры цитокинов могут включать IL-2, IL-15, IL-12, IL-21, IL-18, IL-9, IL-7 и/или IL-33, и примеры митогенов могут включать лиганд CD70 для CD27 человека, фитогемагглютинин (PHA), конканавалин А (ConA), митоген фитолакки американской (PWM), белок-агглютинин из земляных орехов (PNA), агглютинин из сои (SBA), агглютинин из *les culinaris* (LCA), агглютинин из *pisum sativum* (PSA), агглютинин из *Helix pomatia* (HPA), лектин из *Vicia graminea* (VGA) или другой подходящий митоген, способный к стимуляции пролиферации Т-клеток.

[0145] Популяция сконструированных Т-клеток, включая $\gamma\delta$ -Т-клетки, может быть размножена менее чем за 60 суток, менее чем за 48 суток, менее чем за 36 суток, менее чем за 24 суток, менее чем за 12 суток или менее чем за 6 суток. В одном варианте реализации изобретения популяция сконструированных Т-клеток может быть размножена в течение периода времени от около 7 суток до около 49 суток, от около 7 суток до около 42 суток, от около 7 суток до около 35 суток, от около 7 суток до около 28 суток, от около 7 суток до около 21 суток или от около 7 суток до около 14 суток. Т-клетки могут быть

размножены в течение периода времени от около 1 до 21 суток. Например, Т-клетки могут быть размножены в течение около по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 суток.

[0146] В одном варианте реализации изобретения для выделения, активации и размножения $\alpha\beta$ -Т-клеток можно использовать аналогичную методику.

[0147] В одном варианте реализации изобретения для выделения, активации и размножения $\gamma\delta$ -Т-клеток можно использовать аналогичную методику.

[0148] Векторы

[0149] Сконструированные Т-клетки можно получать, используя различные способы, включая таковые, известные из литературы. Например, полинуклеотид, кодирующий кассету экспрессии, которая включает фрагмент распознавания опухоли или фрагмент другого типа распознавания, может быть стабильно введен в Т-клетку с помощью системы транспозон/транспозаза или системы переноса генов на основе вирусов, такой как лентивирусная или ретровирусная система, или с помощью другого подходящего способа, такого как трансфекция, электропорация, трансдукция, липофекция, метод с применением фосфата кальция (CaPO_4), метод с применением созданных методами нанотехнологии веществ, таких как *Orgmosil*, способы вирусной доставки, включая аденовирусы, ретровирусы, лентивирусы, аденоассоциированные вирусы, или другой подходящий способ. Для генной терапии человека использовали ряд способов на основе применения вирусов, таких как способы, описанные в WO 1993/020221, содержание которой включено в данный документ в полном объеме. Неограничивающие примеры способов на основе применения вирусов, которые можно использовать для конструирования Т-клеток, могут включать способы на основе применения γ -ретровируса, аденовируса, лентивируса, вируса простого герпеса, вируса осповакцины, поксвируса или аденоассоциированного вируса. Т-клетки могут представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки.

[0150] Вирусы, используемые для трансфекции Т-клеток, включают встречающиеся в природе вирусы, а также искусственные вирусы. Вирусы могут представлять собой вирус с оболочкой или без оболочки. Парвовирусы (такие как AAV) являются примерами вирусов без оболочки. Вирусы могут представлять собой оболочечные вирусы. Вирусы, используемые для трансфекции Т-клеток, могут представлять собой ретровирусы и, в частности, лентивирусы. Белки вирусной оболочки, которые могут способствовать вирусной инфекции эукариотических клеток, могут включать лентивирусные векторы (LV), происходящие из ВИЧ-1, псевдотипированные гликопротеинами оболочки (GP) из

вируса везикулярного стоматита (VSV-G), модифицированного эндогенного ретровируса кошек (RD114TR) (SEQ ID NO: 97) и модифицированного вируса лейкоза гиббонов (GALVTR). Эти белки оболочки могут способствовать эффективному проникновению других вирусов, таких как парвовирусы, включая аденоассоциированные вирусы (AAV), тем самым демонстрируя их широкую эффективность. Например, можно использовать другие белки вирусной оболочки, включая 4070 env вируса лейкоза мышей Молони (MLV) (такой как описанный в Merten et al., *J. Virol.* 79:834-840, 2005; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки), RD114 env, химерный белок оболочки RD114pro или RDpro (который является химерой RD114-ВИЧ, сконструированной путем замещения последовательности расщепления R-пептида RD114 последовательностью расщепления матричного/капсидного (MA/CA) белка ВИЧ-1, как, например, описано в Bell et al. *Experimental Biology and Medicine* 2010; 235: 1269–1276; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки), GP64 env бакуловируса (такой как описанный в Wang et al. *J. Virol.* 81:10869-10878, 2007; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки) или GALV env (такой как описанный в Merten et al., *J. Virol.* 79:834-840, 2005; содержание которой включено в данный документ посредством ссылки) или их производные.

[0151] Одну лентивирусную кассету можно использовать для создания единого лентивирусного вектора, экспрессирующего по меньшей мере четыре отдельных мономерных белка двух различных димеров из одной полицистронной мРНК с целью коэкспрессии димеров на клеточной поверхности. Например, интеграция одной копии лентивирусного вектора была достаточной для трансформации Т-клеток с целью коэкспрессии TCR $\alpha\beta$ и CD8 $\alpha\beta$, необязательно $\alpha\beta$ -Т-клеток или $\gamma\delta$ -Т-клеток.

[0152] Векторы могут включать полицистронную кассету в пределах одного вектора, способную экспрессировать более одного, более двух, более трех, более четырех генов, более пяти генов или более шести генов, при этом полипептиды, кодируемые этими генами, могут взаимодействовать друг с другом или могут образовывать димеры. Димеры могут представлять собой гомодимеры, например, два идентичных белка, образующих димер, или гетеродимеры, например, два структурно различных белка, образующих димер.

[0153] Кроме того, для трансфекции клеток конструкциями и последовательностями, описанными в данном документе, можно использовать несколько векторов. Например, трансген TCR может находиться на одном векторе, а трансген CD8, кодирующий описанный в данном документе полипептид, может находиться на втором векторе,

которые трансфицируют либо одновременно, либо последовательно, используя известные способы. Линия Т-клеток может быть стабильно трансфицирована трансгеном CD8, кодирующим полипептид CD8, описанный в данном документе, а затем последовательно трансфицирована трансгеном TCR, или *visa versa*.

[0154] В некоторых вариантах реализации изобретения трансген может дополнительно включать один или несколько полицистронных элементов, и полицистронный(полицистронные) элемент(элементы) может(могут) быть расположен(расположены), например, между последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей TCR α или его часть, и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей TCR β или его часть; между последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей CD8 α или его часть, и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей CD8 β или его часть, или между любыми двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими TCR α , TCR β , CD8 α и CD8 β . В некоторых вариантах реализации изобретения полицистронный(полицистронные) элемент(элементы) может(могут) включать последовательность, кодирующую элемент «проскока» рибосомы, выбранный из T2A, P2A, E2A или F2A, или сайт внутренней посадки рибосомы (IRES).

[00155] В контексте данного документа термин «саморасщепляющийся 2A-пептид» относится к относительно коротким пептидам (длиной порядка 20 аминокислот, в зависимости от происхождения вируса), действующим котрансляционно, предотвращая образование нормальной пептидной связи между глицином и последним пролином, что приводит к «проскоку» рибосомы к следующему кодону и расщеплению образующегося пептида между Gly и Pro. После расщепления короткий 2A-пептид остается слитым с С-концом вышерасположенного белка, тогда как пролин добавляется к N-концу нижерасположенного белка. Саморасщепляющийся 2A-пептид может быть выбран из тешовируса-1 свиней (P2A), вируса А ринита лошадей (E2A), вируса *Thosea asigna* (T2A), вируса ящура (F2A) или любой их комбинации (см., например, Kim et al., PLOS One 6:e18556, 2011, содержание которой, включая последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности 2A, включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Путем добавления линкерных последовательностей (GSG или SGSG (SEQ ID NO: 266)) перед саморасщепляющейся последовательностью 2A, это может способствовать эффективному синтезу биологически активных белков, например, TCR.

[0156] В контексте данного документа термин «сайт внутренней посадки рибосомы (IRES)» относится к нуклеотидной последовательности, расположенной в последовательности матричной РНК (мРНК), которая может инициировать трансляцию,

не полагаясь на 5'-кэп-структуру. IRES обычно расположен в 5'-нетранслируемой области (5'UTR), но может также находиться в других положениях мРНК. В одном варианте реализации изобретения IRES может быть выбран из IRES вирусов, IRES из клеточных мРНК, в частности, IRES из пикорнавируса, такого как полиовирус, EMCV и FMDV, флавивируса, такого как вирус гепатита С (HCV), пестивируса, такого как вирус классической чумы свиней (CSFV), ретровируса, такого как вирус лейкоза мышей (MLV), лентивируса, такого как вирус иммунодефицита обезьян (SIV), и РНК-вируса насекомых, такого как вирус паралича сверчка (CRPV), и IRES из клеточных мРНК, например, факторов инициации трансляции, таких как eIF4G и DAP5, факторов транскрипции, таких как с-Мус и NF-κB-подавляющий фактор (NRF), факторов роста, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор 2 роста фибробластов (FGF-2), тромбоцитарный фактор роста В (PDGF-B), гомеостазисных генов, таких как *antennapedia*, белков выживаемости, таких как X-сцепленный ингибитор апоптоза (XIAP) и Araf-1, и других клеточных мРНК, таких как *βiP*.

[0157] Конструкции и векторы, описанные в данном документе, используют вместе с методикой, описанной в публикации заявки на патент США № 2019/0175650, опубликованной 13 июня 2019 года, содержание которой включено в полном объеме посредством ссылки.

[0158] Векторы, отличные от вирусных, также можно использовать с последовательностями, конструкциями и клетками, описанными в данном документе.

[0159] Клетки можно трансфицировать с помощью других средств, известных в данной области техники, включая липофекцию (трансфекцию на основе липосом), электропорацию, трансфекцию с использованием фосфата кальция, биолистическую доставку частиц (например, генные пушки), микроинъекцию или их комбинации. Различные способы трансфекции клеток известны в данной области техники. См., например, Sambrook & Russell (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-е издание) тома 1–3 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ramamoorth & Narvekar “Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview.” J Clin Diagn Res. (2015) 9(1): GE01–GE06.

[0160] Композиции

[0161] Композиции могут содержать описанные в данном документе модифицированные полипептиды CD8. Кроме того, описанные в данном документе композиции могут содержать Т-клетку, экспрессирующую описанные в данном документе полипептиды CD8. Описанные в данном документе композиции могут содержать Т-клетку, экспрессирующую описанные в данном документе полипептиды CD8 и Т-

клеточный рецептор (TCR), необязательно TCR, который специфически связывает один из ТАА, описанных в данном документе, в комплексе с антигенпредставляющим белком, например, МНС, у людей обозначаемым как HLA, то есть антигеном лейкоцитов человека.

[0162] Для облегчения введения, Т-клетки, описанные в данном документе, могут быть составлены в фармацевтическую композицию или имплант, подходящий для введения *in vivo*, с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями. Способы получения такой композиции или импланта описаны в данной области техники. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. (1980).

[0163] Т-клетки, описанные в данном документе, можно составлять в препарат в мягкой или жидкой форме, такой как капсула, раствор, инфузионный раствор или инъекционный раствор. Для предотвращения или сведения к минимуму высвобождения и всасывания композиции до того, как она достигнет целевой ткани или мишени, или для обеспечения высвобождения композиции по времени, можно использовать средства, известные в данной области техники. Однако желательно использовать фармацевтически приемлемую форму, которая не мешает клеткам экспрессировать CAR или TCR. Таким образом, желательно, чтобы описанные в данном документе Т-клетки можно было превратить в фармацевтическую композицию, содержащую носитель. Т-клетки, описанные в данном документе, можно составлять с физиологически приемлемым носителем или вспомогательным веществом с получением фармацевтической композиции. Носитель и композиция могут быть стерильными. Предпочтительные носители включают, например, сбалансированный солевой раствор, предпочтительно сбалансированный солевой раствор Хенкса, или физиологический раствор. Состав должен соответствовать способу введения. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения воду, солевые растворы (например, NaCl), физиологический раствор, забуференный солевой раствор, а также их комбинации. Фармацевтические препараты, при необходимости, можно смешивать со вспомогательными средствами, например, смазывающими средствами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для воздействия на осмотическое давление, буферами, которые не реагируют негативным образом с Т-клетками. Т-клетки могут представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые экспрессируют описанные в данном документе полипептиды CD8, необязательно TCR, описанный в данном документе.

[0164] Композиция по данному изобретению может быть представлена в виде единичной лекарственной формы, причем каждая единица дозы, например, для инъекции,

содержит заданное количество композиции, отдельно или в соответствующей комбинации с другими активными средствами.

[0165] Описанные в данном документе композиции могут представлять собой фармацевтическую композицию. Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может дополнительно содержать адъювант, выбранный из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, включая без ограничения гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF, сарграмостим), циклофосфамида, имиквимода, резиквимода, интерферона-альфа или их комбинации.

[0166] Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может содержать адъювант, выбранный из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, например, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF, сарграмостима), циклофосфамида, имиквимода и резиквимода.

[0167] Предпочтительные адъюванты включают без ограничения циклофосфамид, имиквимод или резиквимод. Еще более предпочтительные адъюванты представляют собой Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, поли-ICLC (Hiltonol®) и mAB к CD40 или их комбинации.

[0168] Другие примеры пригодных адъювантов включают без ограничения химически модифицированные CpG (например, CpR, Idera), аналоги dsRNA, такие как поли(I:C) и их производные (например, AmpliGen®, Hiltonol®, поли-ICLC), поли(IC-R), поли(I:C12U), не относящуюся к CpG бактериальную ДНК или РНК, а также иммуноактивные малые молекулы и антитела, такие как циклофосфамид, сунитиниб, ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, включая ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб и цемиплимаб, Bevacizumab®, целебрекс, NCX-4016, силденафил, тадалафил, варденафил, сорафениб, темозоломид, темсиролимус, XL-999, CP-547632, пазопаниб, белок-ловушку для VEGF, ZD2171, AZD2171, антитело к CTLA4, другие антитела, нацеленные на ключевые структуры иммунной системы (например, антитело к CD40, антитело к TGF-бета, антитело к рецептору TNF-альфа) и SC58175, которые могут действовать терапевтически и/или в качестве адъюванта. Количества и концентрации адъювантов и добавок, пригодных в контексте данного изобретения, могут быть без труда определены специалистом в данной области техники без излишнего проведения экспериментов.

[0169] Другие адъюванты включают без ограничения антитело к CD40, имиквимод, резиквимод, GM-CSF, циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб, атезолизумаб, интерферон-альфа, интерферон-бета, CpG-олигонуклеотиды и производные, поли-(I:C) и

производные, РНК, силденафил и составы на основе частиц сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLG), полиинозиновую-полицитидиловую кислоту с поли-*l*-лизином и карбоксиметилцеллюлозой (поли-ICLC), виросомы и/или интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21 и IL-23. См., например, Narayanan *et al.* J. Med. Chem. (2003) 46(23): 5031–5044; Pohar *et al.* Scientific Reports 7 14598 (2017); Grajkowski *et al.* Nucleic Acids Research (2005) 33(11): 3550–3560; Martins *et al.* Expert Rev Vaccines (2015) 14(3): 447–59.

[0170] Композиция, описанная в данном документе, может также включать один или несколько адъювантов. Адъюванты представляют собой вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные CD8-положительными Т-клетками и хелперными Т-клетками (ТН)) на антиген, и поэтому могут считаться пригодными в лекарственном препарате по данному изобретению. Подходящие адъюванты включают без ограничения 1018 ISS, соли алюминия, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, СуаА, dSLIM, флагеллин или лиганды TLR5, происходящие из флагеллина, лиганд FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA®), резиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как IL-2, IL-13, IL-21, интерферон-альфа или -бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфорил-липид А, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, эмульсии типа «вода в масле» и «масло в воде», ОК-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторную систему PepTel®, микрочастицы на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот [PLG] и декстрана, талактоферрин SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, белок-ловушку для VEGF, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, QS21 Stimulon от Aquila, полученный из сапонины, микобактериальные экстракты и синтетические миметики бактериальной клеточной стенки и другие запатентованные адъюванты, такие как Ribi Detox, Quil или Superfos. Адъюванты, такие как адъювант Фрейнда или GM-CSF, являются предпочтительными. Несколько иммунологических адъювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее. Также можно использовать цитокины. Некоторые цитокины напрямую связаны с влиянием на миграцию дендритных клеток в лимфоидные ткани (например, TNF-), ускоряя созревание дендритных клеток в эффективные антигенпредставляющие клетки для Т-лимфоцитов (например, GM-CSF, IL-1 и IL-4) (заявка на патент США № 5849589, включенная в данный документ в полном объеме посредством ссылки) и действующие как иммуoadъюванты (например, IL-12, IL-

15, IL-23, IL-7, IFN-альфа, IFN-бета).

[0171] Сообщалось также, что иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды усиливают эффекты адъювантов в условиях вакцины. Не вдаваясь в теорию, CpG-олигонуклеотиды действуют путем активации врожденной (не адаптивной) иммунной системы посредством Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном TLR9. Запущенная CpG активация TLR9 усиливает антигенспецифические гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины на основе дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и конъюгаты полисахаридов как в профилактических, так и в терапевтических вакцинах. Что еще более важно, он усиливает созревание и дифференцировку дендритных клеток, что приводит к усиленной активации клеток TH1 и сильному образованию цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) даже в отсутствие помощи CD4 Т-клеток. Смещение TH1, вызванное стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как алюминий или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют смещению TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют еще большую адъювантную активность при составлении или совместном введении с другими адъювантами или в таких составах, как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или подобные составы, которые особенно необходимы для индукции сильного ответа, когда антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунный ответ и позволяют снизить дозы антигена примерно на два порядка, при этом в некоторых экспериментах наблюдаются сравнимые ответы антител на полную дозу вакцины без CpG (Krieg, 2006). В US 6406705 B1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, отличных от нуклеиновых кислот, и антигена для индукции антигенспецифического иммунного ответа. Антагонист CpG TLR9 представляет собой dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двуцепочечный стебель-петля) производства Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом фармацевтической композиции по данному изобретению. Другие TLR-связывающие молекулы, такие как РНК, связывающая TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9, также можно использовать.

[0172] Способы лечения и получение

[0173] Сконструированные Т-клетки могут экспрессировать описанные в данном документе модифицированные полипептиды CD8. Кроме того, сконструированные Т-клетки могут экспрессировать TCR, описанный в данном документе. TCR, экспрессируемый сконструированными Т-клетками, может распознавать ТАА, связанный

с HLA, как описано в данном документе. Сконструированные Т-клетки по данному изобретению можно использовать для лечения субъекта, нуждающегося в лечении состояния, например, описанного в данном документе рака. Т-клетки могут представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые экспрессируют модифицированный полипептид CD8, необязательно TCR, описанный в данном документе.

[0174] Способ лечения состояния (например, болезни) у субъекта с помощью Т-клеток, описанных в данном документе, может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества сконструированных Т-клеток, описанных в данном документе, необязательно $\gamma\delta$ -Т-клеток. Т-клетки, описанные в данном документе, можно вводить с использованием различных схем (например, временных характеристик, концентрации, дозировки, промежутка между лечением и/или состава). Субъект также может предварительно проходить лечение, например, с помощью химиотерапии, лучевой терапии или их комбинации, до получения сконструированных Т-клеток по данному изобретению. Популяция сконструированных Т-клеток также может быть заморожена или подвергнута криоконсервации до введения субъекту. Популяция сконструированных Т-клеток может включать две или более клеток, которые экспрессируют идентичные, разные или комбинацию идентичных и разных фрагментов распознавания опухоли. К примеру, популяция сконструированных Т-клеток может включать несколько отдельных сконструированных Т-клеток, предназначенных для распознавания разных антигенов или разных эпитопов одного и того же антигена. Т-клетки могут представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые экспрессируют полипептид CD8, описанный в данном документе, необязательно TCR, описанный в данном документе.

[0175] Т-клетки, описанные в данном документе, включая $\alpha\beta$ -Т-клетки и $\gamma\delta$ -Т-клетки, можно использовать для лечения различных состояний. Т-клетки могут представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые экспрессируют полипептид CD8, необязательно TCR, описанный в данном документе. Т-клетки, описанные в данном документе, можно использовать для лечения рака, включая солидные опухоли и злокачественные заболевания системы крови. Неограничивающие примеры форм рака включают: острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз; аденокарциномы; формы рака, связанные со СПИДом; лимфому, связанную со СПИДом; анальный рак; рак аппендикса; формы астроцитомы, нейробластомы, базальноклеточную карциному, рак желчевыводящих путей, рак мочевого пузыря, формы рака кости, опухоли головного мозга, такие как мозжечковая астроцитомы, церебральная астроцитомы/злокачественная глиома, эпендимомы, медуллобластома,

супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, глиому зрительного пути и гипоталамическую глиому, рак молочной железы, бронхиальные аденомы, лимфому Беркитта, карциному неизвестного первичного происхождения, лимфому центральной нервной системы, мозжечковую астроцитому, рак шейки матки, формы рака у детей, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелолейкоз, хронические миелопролиферативные нарушения, рак толстой кишки, кожную Т-клеточную лимфому, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга, герминогенные опухоли, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта, формы глиомы, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак (печени), лимфому Ходжкина, гипофарингеальный рак, внутриглазную меланому, карциному островковых клеток, саркому Капоши, рак почки, рак гортани, рак губы и ротовой полости, липосаркому, рак печени, формы рака легкого, такие как немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легкого, формы лимфомы, формы лейкоза, макроглобулинемию, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости/остеосаркому, медуллобластому, формы меланомы, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным поражением, рак ротовой полости, синдром множественной эндокринной неоплазии, миелодиспластические синдромы, миелоидный лейкоз, рак полости носа и околоносовых пазух, назофарингеальную карциному; нейробластому; неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, онкологическое заболевание ротовой полости, рак ротоглотки, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рак яичника, эпителиальный рак яичника, герминогенную опухоль яичника, рак поджелудочной железы, рак из островковых клеток поджелудочной железы, рак околоносовых пазух и полости носа, рак парашитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, фарингеальный рак, феохромоцитому, пинеальную астроцитому, пинеальную герминому, аденому гипофиза, плевропульмональную бластому, плазмноклеточную неоплазию, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, ректальный рак, почечно-клеточную карциному, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, ретинобластому; рабдомиосаркому, рак слюнных желез, формы саркомы, формы рака кожи, карциному кожи из клеток Меркеля, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, злокачественное заболевание желудка, Т-клеточную лимфому, рак горла, тимому, карциному тимуса, рак щитовидной железы, трофобластическую опухоль (гестационную), формы рака неизвестной первичной

локализации, рак уретры, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса.

[0176] Т-клетки, описанные в данном документе, можно использовать для лечения инфекционного заболевания. Т-клетки, описанные в данном документе, можно использовать для лечения инфекционного заболевания, причем инфекционное заболевание может быть вызвано вирусом. Т-клетки, описанные в данном документе, можно использовать для лечения иммунопатологического заболевания, такого как аутоиммунное заболевание. Т-клетки могут представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые экспрессируют полипептид CD8, необязательно TCR, описанный в данном документе.

[0177] Лечение Т-клетками, описанными в данном документе, необязательно $\gamma\delta$ -Т-клетками, можно проводить у субъекта до, в ходе и после клинического проявления состояния. Лечение можно проводить у субъекта спустя 1 сутки, 1 неделю, 6 месяцев, 12 месяцев или 2 года после клинического проявления заболевания. Лечение можно проводить у субъекта в течение более 1 суток, 1 недели, 1 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет или больше после клинического проявления заболевания. Лечение можно проводить у субъекта в течение менее 1 суток, 1 недели, 1 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев или 2 лет после клинического проявления заболевания. Лечение также может включать лечение человека в рамках клинического испытания. Лечение может включать введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе. Т-клетки могут представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые экспрессируют полипептид CD8, необязательно TCR, описанный в данном документе.

[0178] В одном варианте реализации изобретения введение субъекту сконструированных Т-клеток по данному изобретению может обеспечивать модуляцию активности эндогенных лимфоцитов в организме субъекта. В одном варианте реализации изобретения введение субъекту сконструированных Т-клеток может обеспечивать представление антигена эндогенной Т-клетке и может усиливать иммунный ответ. В одном варианте реализации изобретения Т-клетка памяти может представлять собой CD4+ Т-клетку. В одном варианте реализации изобретения Т-клетка памяти может представлять собой CD8+ Т-клетку. В одном варианте реализации изобретения введение субъекту сконструированных Т-клеток по данному изобретению может обеспечивать активацию цитотоксичности другой иммунной клетки. В одном варианте реализации изобретения другая иммунная клетка может представлять собой CD8+ Т-клетку. В одном варианте

реализации изобретения другая иммунная клетка может представлять собой Т-клетку с функциями естественных киллеров. В одном варианте реализации изобретения введение субъекту сконструированных $\gamma\delta$ -Т-клеток по данному изобретению может обеспечивать подавление регуляторной Т-клетки. В одном варианте реализации изобретения регуляторная Т-клетка может представлять собой FOXP3+ клетку Treg. В одном варианте реализации изобретения регуляторная Т-клетка может представлять собой FOXP3- клетку Treg. Неограничивающие примеры клеток, активность которых может быть модулирована сконструированными Т-клетками по данному изобретению, могут включать:

гемопозитические стволовые клетки; В-клетки; CD4; CD8; эритроциты; белые кровяные тельца; дендритные клетки, включая дендритные антигенпредставляющие клетки; лейкоциты; макрофаги; В-клетки памяти; Т-клетки памяти; моноциты; естественные клетки-киллеры; нейтрофильные гранулоциты; Т-хелперные клетки; и киллерные Т-клетки. Т-клетки могут представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые экспрессируют полипептид CD8, необязательно TCR, описанный в данном документе.

[0179] Во время большинства трансплантаций костного мозга традиционно можно использовать комбинацию циклофосфамида с тотальным облучением организма для предотвращения отторжения гемопозитических стволовых клеток (HSC) в трансплантате иммунной системой субъекта. В одном варианте реализации изобретения можно осуществлять инкубацию донорского костного мозга с интерлейкином-2 (IL-2) *ex vivo* для усиления образования лимфоцитов-киллеров в донорском костном мозге. Интерлейкин-2 (IL-2) является цитокином, который может быть необходим для роста, пролиферации и дифференцировки лимфоцитов дикого типа. Текущие исследования адоптивного переноса $\gamma\delta$ -Т-клеток человеку могут потребовать совместного введения $\gamma\delta$ -Т-клеток и интерлейкина-2. Однако, как низкие, так и высокие дозы IL-2 могут оказывать высокотоксичные побочные эффекты. Токсичность IL-2 может проявляться во многих органах/системах, особенно в сердце, легких, почках и центральной нервной системе. В одном варианте реализации данное изобретение относится к способу введения сконструированных Т-клеток субъекту без совместного введения нативного цитокина или его модифицированных версий, как, например, IL-2, IL-15, IL-12, IL-21. В одном варианте реализации изобретения сконструированные Т-клетки можно вводить субъекту без совместного введения с IL-2. В одном варианте реализации изобретения сконструированные Т-клетки можно вводить субъекту в ходе такой процедуры, как трансплантация костного мозга, без совместного введения IL-2.

[0180] В одном варианте реализации изобретения способы могут дополнительно

включать введение химиотерапевтического средства. Дозировка химиотерапевтического средства может быть достаточной для истощения популяции Т-клеток пациента.

Химиотерапию можно применять за около 5–7 суток до введения Т-клеток.

Химиотерапевтическое средство может представлять собой циклофосфамид, флударабин или их комбинацию. Химиотерапевтическое средство может включать циклофосфамид в дозе около 400–600 мг/м²/сутки. Химиотерапевтическое средство может включать флударабин в дозе около 10–30 мг/м²/сутки.

[0181] В одном варианте реализации изобретения способы могут дополнительно включать предварительное лечение пациента с помощью лучевой терапии малой дозы до введения композиции, содержащей Т-клетки. Лучевая терапия малой дозы может включать около 1,4 Гр в течение 1–6 суток, предпочтительно около 5 суток, до введения композиции, содержащей Т-клетки.

[0182] В одном варианте реализации изобретения у пациента может наблюдаться HLA-A*02.

[0183] В одном варианте реализации изобретения у пациента может наблюдаться HLA-A*06.

[0184] В одном варианте реализации изобретения способы могут дополнительно включать введение антитела к PD1. Антитело к PD1 может представлять собой гуманизированное антитело. Антитело к PD1 может представлять собой пембролизумаб. Дозировка антитела к PD1 может составлять около 200 мг. Антитело к PD1 можно вводить каждые 3 недели после введения Т-клеток.

[0185] В одном варианте реализации изобретения дозировка Т-клеток может составлять около $0,8–1,2 \times 10^9$ Т-клеток. Дозировка Т-клеток может составлять от около $0,5 \times 10^8$ до около 10×10^9 Т-клеток. Дозировка Т-клеток может составлять около $1,2–3 \times 10^9$ Т-клеток, около $3–6 \times 10^9$ Т-клеток, около 10×10^9 Т-клеток, около 5×10^9 Т-клеток, около $0,1 \times 10^9$ Т-клеток, около 1×10^8 Т-клеток, около 5×10^8 Т-клеток, около $1,2–6 \times 10^9$ Т-клеток, около $1–6 \times 10^9$ Т-клеток или около $1–8 \times 10^9$ Т-клеток.

[0186] В одном варианте реализации изобретения Т-клетки можно вводить в 3 дозах. Дозы Т-клеток могут возрастать с каждой дозой. Т-клетки можно вводить с помощью внутривенной инфузии.

[0187] В одном варианте реализации изобретения последовательности CD8, описанные в данном документе, и ассоциированные продукты и композиции можно использовать в аутологичных или аллогенных способах терапии с использованием адоптивного переноса клеток. В другом варианте реализации изобретения

последовательности CD8, их Т-клетки и композиции можно использовать, например, в способах, описанных в публикации заявки на патент США 2019/0175650; публикации заявки на патент США 2019/0216852; публикации заявки на патент США 2019/024743; и предварительной заявке на патент США 62/980844, каждая из которых включена в полном объеме посредством ссылки.

[0188] Данное изобретение также относится к популяции модифицированных Т-клеток, которые имеют экзогенный полипептид CD8, описанный в данном документе, и Т-клеточный рецептор, причем популяция модифицированных Т-клеток является активированной и размноженной с использованием комбинации ИЛ-2 и ИЛ-15. В другом варианте реализации изобретения популяция модифицированных Т-клеток является размноженной и/или активированной с использованием комбинации ИЛ-2, ИЛ-15 и золедроната. В еще одном варианте реализации изобретения популяция модифицированных Т-клеток является активированной с использованием комбинации ИЛ-2, ИЛ-15 и золедроната, а размноженной — с использованием комбинации ИЛ-2, ИЛ-15 и без золедроната. Данное изобретение дополнительно относится к применению других интерлейкинов в ходе активации и/или размножения, таких как ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-21 и их комбинации.

[0189] В одном аспекте, ИЛ-21, ингибитор деацетилазы гистонов (HDACi) или их комбинации можно использовать в области лечения рака вместе со способами, описанными в данном документе, и/или с АСТ-процессами, описанными в данном документе. В одном варианте реализации данное изобретение относится к способам перепрограммирования эффекторных Т-клеток в фенотип центральных клеток памяти, включающим культивирование эффекторных Т-клеток по меньшей мере с одним HDACi вместе с ИЛ-21. Репрезентативные HDACi включают, например, трихостатин А, трапоксин В, фенилбутират, вальпроевую кислоту, вориностат (суберанилогидроксамоновая кислота), белиностат, панобиностат, дациностат, энтиностат, тацедиалин и моцетиностат.

[0190] Композиции, содержащие сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, можно вводить для профилактических и/или терапевтических вариантов лечения. В случае терапевтических применений, фармацевтические композиции можно вводить субъекту, который уже страдает заболеванием или состоянием, в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичной задержки развития симптомов заболевания или состояния. Сконструированную Т-клетку также можно вводить для уменьшения вероятности развития, приобретения или ухудшения состояния. Эффективные количества популяции сконструированных Т-клеток для терапевтического

применения могут варьироваться в зависимости от тяжести и течения заболевания или состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья субъекта, массы и/или реакции на лекарственные средства и/или мнения врача. Т-клетки могут представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки, сконструированные для экспрессии описанных в данном документе модифицированных полипептидов CD8 и необязательно TCR, описанного в данном документе. Т-клеточная терапия успешно применяется при лечении различных форм рака. Li *et al.* Signal Transduction and Targeted Therapy 4(35): (2019), содержание которой включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Способы введения

[0191] Одну или несколько популяций сконструированных Т-клеток, описанных в данном документе, можно вводить субъекту в любом порядке или одновременно. В случае одновременного введения, несколько сконструированных Т-клеток могут быть представлены в одной унифицированной форме, такой как внутривенная инъекция, или в нескольких формах, например, в виде множественных внутривенных инфузий, подкожных инъекций или пилюль. Сконструированные Т-клетки могут быть упакованы вместе или отдельно, в одной упаковке или во множестве упаковок. Одну или все сконструированные Т-клетки можно вводить в многократных дозах. Если не одновременно, промежуток времени между несколькими дозами может варьироваться вплоть до около недели, месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или около года. В одном варианте реализации изобретения сконструированные Т-клетки могут быть размножены в организме субъекта, *in vivo*, после введения субъекту. Сконструированные Т-клетки можно заморозить, чтобы получить клетки для нескольких курсов лечения одним и тем же препаратом клеток. Сконструированные Т-клетки по данному изобретению и содержащие их фармацевтические композиции могут быть упакованы в виде набора. Набор может содержать инструкции (например, письменные инструкции) по применению сконструированных Т-клеток и содержащих их композиций.

[0192] Способ лечения рака может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества сконструированных Т-клеток, при этом введение обеспечивает лечение рака. В вариантах реализации изобретения, терапевтически эффективное количество сконструированных $\gamma\delta$ -Т-клеток можно вводить в течение по меньшей мере около 10 секунд, 30 секунд, 1 минуты, 10 минут, 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев,

6 месяцев или 1 года. В одном варианте реализации изобретения терапевтически эффективное количество сконструированных Т-клеток можно вводить в течение по меньшей мере одной недели. В одном варианте реализации изобретения терапевтически эффективное количество сконструированных Т-клеток можно вводить в течение по меньшей мере двух недель.

[0193] Сконструированные Т-клетки, описанные в данном документе, необязательно $\gamma\delta$ -Т-клетки, можно вводить до, в ходе или после возникновения заболевания или состояния, и временные характеристики введения фармацевтической композиции, содержащей сконструированную Т-клетку, могут варьироваться. Например, сконструированные Т-клетки можно использовать в качестве профилактики и можно вводить непрерывно субъектам с предрасположенностью к развитию состояний или заболеваний с целью уменьшения вероятности возникновения заболевания или состояния. Сконструированные Т-клетки можно вводить субъекту в ходе проявления или как можно скорее после появления симптомов. Введение сконструированных Т-клеток можно начинать сразу же при появлении симптомов, в течение первых 3 часов после появления симптомов, в течение первых 6 часов после появления симптомов, в течение первых 24 часов после появления симптомов, в течение 48 часов после появления симптомов или в течение любого периода времени после появления симптомов. Первоначальное введение может быть осуществлено любым практичным путем, таким как любой путь, описанный в данном документе, с использованием любого описанного в данном документе состава. В одном варианте реализации изобретения введение сконструированных Т-клеток по данному изобретению может представлять собой внутривенное введение. Одну или множество доз сконструированных Т-клеток можно вводить в кратчайший срок после появления рака, инфекционного заболевания, иммунопатологического заболевания, сепсиса или при трансплантации костного мозга, и в течение промежутка времени, необходимого для лечения иммунопатологического заболевания, как, например, от около 24 часов до около 48 часов, от около 48 часов до около 1 недели, от около 1 недели до около 2 недель, от около 2 недель до около 1 месяца, от около 1 месяца до около 3 месяцев. Что касается лечения рака, одну или множество доз сконструированных Т-клеток можно вводить спустя годы после появления рака и до или после других видов лечения. В одном варианте реализации изобретения сконструированные $\gamma\delta$ -Т-клетки можно вводить в течение по меньшей мере около 10 минут, 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 72 часов, по меньшей мере 96 часов, по меньшей мере 1 недели, по

меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 1 года, по меньшей мере 2 лет по меньшей мере 3 лет, по меньшей мере 4 лет или по меньшей мере 5 лет. Продолжительность лечения для каждого субъекта может варьироваться. Т-клетки могут представлять собой $\alpha\beta$ -Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые экспрессируют полипептид CD8, описанный в данном документе, необязательно TCR, описанный в данном документе.

[0194] Сконструированные Т-клетки, экспрессирующие описанные в данном документе полипептиды CD8, необязательно $\alpha\beta$ -Т-клетки или $\gamma\delta$ -Т-клетки, могут присутствовать в композиции в количестве по меньшей мере 1×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 2×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 3×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 4×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 5×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 6×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 7×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 8×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 9×10^3 клеток/мл, по меньшей мере 1×10^4 клеток/мл, по меньшей мере 2×10^4 клеток/мл, по меньшей мере 3×10^4 клеток/мл, по меньшей мере 4×10^4 клеток/мл, по меньшей мере 5×10^4 клеток/мл, по меньшей мере 6×10^4 клеток/мл, по меньшей мере 7×10^4 клеток/мл, по меньшей мере 8×10^4 клеток/мл, по меньшей мере 9×10^4 клеток/мл, по меньшей мере 1×10^5 клеток/мл, по меньшей мере 2×10^5 клеток/мл, по меньшей мере 3×10^5 клеток/мл, по меньшей мере 4×10^5 клеток/мл, по меньшей мере 5×10^5 клеток/мл, по меньшей мере 6×10^5 клеток/мл, по меньшей мере 7×10^5 клеток/мл, по меньшей мере 8×10^5 клеток/мл, по меньшей мере 9×10^5 клеток/мл, по меньшей мере 1×10^6 клеток/мл, по меньшей мере 2×10^6 клеток/мл, по меньшей мере 3×10^6 клеток/мл, по меньшей мере 4×10^6 клеток/мл, по меньшей мере 5×10^6 клеток/мл, по меньшей мере 6×10^6 клеток/мл, по меньшей мере 7×10^6 клеток/мл, по меньшей мере 8×10^6 клеток/мл, по меньшей мере 9×10^6 клеток/мл, по меньшей мере 1×10^7 клеток/мл, по меньшей мере 2×10^7 клеток/мл, по меньшей мере 3×10^7 клеток/мл, по меньшей мере 4×10^7 клеток/мл, по меньшей мере 5×10^7 клеток/мл, по меньшей мере 6×10^7 клеток/мл, по меньшей мере 7×10^7 клеток/мл, по меньшей мере 8×10^7 клеток/мл, по меньшей мере 9×10^7 клеток/мл, по меньшей мере 1×10^8 клеток/мл, по меньшей мере 2×10^8 клеток/мл, по меньшей мере 3×10^8 клеток/мл, по меньшей мере 4×10^8 клеток/мл, по меньшей мере 5×10^8 клеток/мл, по меньшей мере 6×10^8 клеток/мл, по меньшей мере 7×10^8 клеток/мл, по меньшей мере 8×10^8 клеток/мл, по меньшей мере 9×10^8

клеток/мл, по меньшей мере 1×10^9 клеток/мл или больше, от около 1×10^3 клеток/мл до около по меньшей мере 1×10^8 клеток/мл, от около 1×10^5 клеток/мл до около по меньшей мере 1×10^8 клеток/мл или от около 1×10^6 клеток/мл до около по меньшей мере 1×10^8 клеток/мл.

[0195] Последовательности

[0196] Описанные в данном документе последовательности могут включать около 80%, около 85%, около 90%, около 85%, около 96%, около 97%, около 98%, или около 99%, или 100% идентичность с последовательностью любой из SEQ ID NO: 1 – 97, 256 – 266, 293 и 294. Описанные в данном документе последовательности могут включать по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с последовательностью любой из SEQ ID NO: 1 – 97 и 256 – 266. Последовательность, «на по меньшей мере 85% идентичная эталонной последовательности», представляет собой последовательность, имеющую, по всей ее длине, 85% или больше, в частности, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности со всей длиной эталонной последовательности.

[0197] В другом варианте реализации данное изобретение относится к последовательностям, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98%, на по меньшей мере 99% или 100% идентичным WPREmut1 (SEQ ID NO: 256) или WPRE версии 2, например, WPREmut2 (SEQ ID NO: 257). В другом аспекте, данное изобретение относится к последовательностям, включающим по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20 аминокислотных замен в WPREmut1 (SEQ ID NO: 256) или WPRE версии 2, например, WPREmut2 (SEQ ID NO: 257). В еще одном аспекте, данное изобретение относится к последовательностям, включающим не более 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20 аминокислотных замен в WPREmut1 (SEQ ID NO: 256) или WPRE версии 2, например, WPREmut2 (SEQ ID NO: 257). В другом аспекте, замены в последовательности являются консервативными заменами.

[0198] Процент идентичности можно рассчитать, используя глобальное попарное выравнивание (например, две последовательности сравнивают по всей их длине). Способы сравнения идентичности двух или более последовательностей хорошо известны в данной области техники. Например, можно использовать программу «needle», в которой применяется алгоритм глобального выравнивания по Нидлману–Вуншу (Needleman and

Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) для поиска оптимального выравнивания (включая гэпы) двух последовательностей с учетом их полной длины. Программа needle, например, доступна на веб-сайте ebi.ac.uk в Интернете и более подробно описана в следующей публикации (*EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite* (2000) Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp. 276—277). Процент идентичности между двумя полипептидами в соответствии с данным изобретением рассчитывают, используя программу EMBOSS: needle (глобальное выравнивание) с параметром «штраф за открытие гэпа», равным 10,0, параметром «штраф за продолжение гэпа», равным 0,5, и матрицей Blosum62.

[0199] Белки, состоящие из аминокислотной последовательности, «на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной» эталонной последовательности, могут включать мутации, такие как делеции, вставки и/или замены, по сравнению с эталонной последовательностью. В случае замен, белок, состоящий из аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной эталонной последовательности, может соответствовать гомологичной последовательности, происходящей из вида, отличного от такового в случае эталонной последовательности.

[0200] Аминокислотные замены могут быть консервативными или неконсервативными. Предпочтительно, замены представляют собой консервативные замены, при этом одна аминокислота заменяется другой аминокислотой со схожими структурными и/или химическими свойствами.

[0201] Консервативные замены могут включать таковые, которые описаны Dayhoff в “The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5”, Natl. Biomedical Research, содержание которой включено посредством ссылки в полном объеме. Например, в одном варианте реализации изобретения аминокислоты, которые принадлежат к одной из следующих групп, могут быть заменены друг на друга, что представляет собой консервативный обмен: группа 1: аланин (A), пролин (P), глицин (G), аспарагин (N), серин (S), треонин (T); группа 2: цистеин (C), серин (S), тирозин (Y), треонин (T); группа 3: валин (V), изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), аланин (A), фенилаланин (F); группа 4: лизин (K), аргинин (R), гистидин (H); группа 5: фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W), гистидин (H); и группа 6: аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E). В одном варианте реализации изобретения консервативная аминокислотная замена может быть выбрана из следующего: T→A, G→A, A→I, T→V, A→M, T→I, A→V, T→G и/или T→S.

[0202] Консервативная аминокислотная замена может включать замену аминокислоты

другой аминокислотой того же класса, например, (1) неполярные: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) незаряженные полярные: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) кислые: Asp, Glu; и (4) основные: Lys, Arg, His. Другие консервативные аминокислотные замены также могут быть выполнены следующим образом: (1) ароматические: Phe, Tyr, His; (2) доноры протонов: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; и (3) акцепторы протонов: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (см., например, заявку на патент США № 10106805, содержание которой включено посредством ссылки в полном объеме).

[0203] Консервативные замены могут быть выполнены в соответствии с таблицей А. Способы прогнозирования толерантности к модификации белка можно найти, например, в Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210 (2004), содержание которой включено посредством ссылки в полном объеме.

[0204] **Таблица А.** Консервативная аминокислотная замена

Консервативные аминокислотные замены	
Аминокислота	Замены (другие известны из уровня техники)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

[0205] Описанные в данном документе последовательности могут включать 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 или 30 аминокислотных или нуклеотидных мутаций, замен, делеций. Любые из SEQ ID NO: 1 – 97, 256 - 266, 293 и 294 могут включать 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 или 30 мутаций, замен или делеций. В другом аспекте, любые из SEQ ID NO: 1 – 97, 256 - 266, 293 и 294 могут включать не более 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 или 30 мутаций, замен или делеций. В одном аспекте, мутации или замены могут быть консервативными

аминокислотными заменами.

[0206] Консервативные замены в полипептидах, описанных в данном документе, могут представлять собой таковые, показанные в таблице В под заголовком «консервативные замены». Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то могут быть внесены более существенные изменения, обозначенные как «примерные замены» в Таблице В, и продукты, при необходимости, могут быть подвергнуты скринингу.

[0207] **Таблица В.** Аминокислотная замена

Аминокислотные замены		
Исходный остаток (встречающаяся в природе аминокислота)	Консервативные замены	Иллюстративные замены
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин
Leu (L)	Ile	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин

[0208] Если не указано иное, все используемые в данном документе термины имеют то же значение, что и для специалиста в данной области техники.

[0209] В контексте данного описания и прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа включают определяемые объекты во множественном числе, если

контекстом явно не указано иное. Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны специалисту в области техники, к которой относится данное изобретение.

[0210] В контексте данного документа «активация» в широком смысле относится к состоянию Т-клетки, которая была достаточно стимулирована для индукции обнаруживаемой клеточной пролиферации. Активация также может быть ассоциирована с индуцированной продукцией цитокинов и обнаруживаемыми эффекторными функциями. Термин «активированные Т-клетки» относится, среди прочего, к пролиферирующим Т-клеткам.

[0211] «Антитела» в контексте данного документа в широком смысле относятся к антителам или иммуноглобулинам любого изотипа, фрагментам антител, у которых сохраняется специфическое связывание с антигеном, включая без ограничения Fab, Fab', Fab'-SH, (Fab')₂ Fv, scFv, двухвалентный scFv и Fd-фрагменты, химерные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела и слитые белки, включая антигенспецифическую нацеленную область антитела и отличного от антитела белка. Антитела подразделяются на пять классов — IgG, IgE, IgA, IgD и IgM.

[0212] «Антиген» или «антигенный» в контексте данного документа в широком смысле относится к пептиду или части пептида, способным связываться антителом, которые дополнительно способны индуцировать выработку у животного антитела, способного связывать эпитоп этого антигена. Антиген может иметь один эпитоп или имеет более одного эпитопа. Специфическая реакция, упомянутая в данном документе, указывает на то, что антиген будет реагировать высокоселективным образом со своим соответствующим антителом, но не с множеством других антител, которые могут быть вызваны другими антигенами.

[0213] «Химерный антигенный рецептор», или «CAR», или «молекулы CAR», в контексте данного документа в широком смысле относится к генетически модифицированным рецепторам, которые прививают антигенную специфичность клеткам, например Т-клеткам, NK-клеткам, макрофагам и стволовым клеткам. CAR могут включать по меньшей мере одну антигенспецифическую нацеленную область (ASTR), шарнирный или «стеблевой» домен, трансмембранный домен (TM), один или несколько костимулирующих доменов (CSD) и внутриклеточный домен активации (IAD). В определенных вариантах реализации изобретения CSD является необязательным. В другом варианте реализации изобретения CAR представляет собой биспецифический CAR, который является специфическим в отношении двух разных антигенов или

эпитопов. После того, как АSTR специфически связывается с антигеном-мишенью, IAD активирует внутриклеточную передачу сигналов. Например, IAD может перенаправлять специфичность и реакционную способность Т-клеток на выбранную мишень способом, не ограниченным МНС, используя антигенсвязывающие свойства антител. Распознавание антигена, не ограниченное МНС, придает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антиген независимо от процессинга антигена, обходя тем самым основной механизм уклонения опухоли. Более того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с альфа- и бета-цепями эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR).

[0214] «Цитотоксический Т-лимфоцит» (CTL) в контексте данного документа в широком смысле относится к Т-лимфоциту, который экспрессирует на своей поверхности CD8 (например, CD8⁺ Т-клетка). Такие клетки предпочтительно могут представлять собой Т-клетки «памяти» (Т_м-клетки), которые являются антиген-стимулированными.

[0215] «Эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или «дающее нужный эффект количество» в контексте данного документа в широком смысле относится к количеству средства или объединенным количествам двух средств, которое, при введении млекопитающему или другому субъекту для лечения заболевания, является достаточным для осуществления такого лечения заболевания. «Терапевтически эффективное количество» будет варьироваться в зависимости от средства(средств), заболевания и его тяжести и возраста, массы и т.д. подлежащего лечению субъекта.

[0216] «Генетически модифицированный» в контексте данного документа в широком смысле относится к способам введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку, независимо от того, интегрируются ли экзогенные нуклеиновые кислоты в геном клетки или не интегрируются. «Генетически модифицированный» в контексте данного документа в широком смысле относится к клеткам, которые содержат экзогенные нуклеиновые кислоты, независимо от того, интегрируются ли экзогенные нуклеиновые кислоты в геном клетки или не интегрируются.

[0217] «Иммунные клетки» в контексте данного документа в широком смысле относятся к белым кровяным тельцам (лейкоцитам), происходящим из гемопоэтических стволовых клеток (HSC), вырабатываемых в костном мозге. «Иммунные клетки» включают без ограничения лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, естественные клетки-киллеры (NK) (CD3-CD56⁺)) и клетки миелоидного ряда (нейтрофил, эозинофил, базофил, моноцит, макрофаг, дендритные клетки). «Т-клетки» включают все типы иммунных клеток, экспрессирующих CD3, включая Т-хелперные клетки (CD4⁺ клетки),

цитотоксические Т-клетки (CD8+ клетки), Т-регуляторные клетки (Treg) и гамма-дельта-Т-клетки и NK-Т-клетки (CD3+ и CD56+). Специалисту в данной области техники будет понятно, что Т-клетки и/или NK-клетки, как используется по всему данному описанию, могут включать только Т-клетки, только NK-клетки, или как Т-клетки, так и NK-клетки. В определенных иллюстративных вариантах реализации изобретения и аспектах, представленных в данном документе, Т-клетки являются активированными и трансдуцированными. Кроме того, Т-клетки представлены в определенных иллюстративных вариантах реализации композиции и аспектах, представленных в данном документе. «Цитотоксическая клетка» включает CD8+ Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), NK-Т-клетки, $\gamma\delta$ -Т-клетки и нейтрофилы, которые представляют собой клетки, способные опосредовать цитотоксические ответы.

[0218] Термины «индивидуум», «субъект», «хозяин» и «пациент», используемые взаимозаменяемо в данном документе, в широком смысле относятся к млекопитающему, включая без ограничения людей, представителей мышиных (например, крысы, мыши), зайцеобразных (например, кроликов), отличных от человека приматов, представителей псовых, представителей кошачьих и представителей копытных (например, представителей лошадиных, представителей бычьих, представителей рода бараны, представителей свинных, представителей козлиных).

[0219] «Мононуклеарные клетки периферической крови» или «РВМС» в контексте данного документа в широком смысле относятся к любой клетке периферической крови, имеющей круглое ядро. РВМС включают лимфоциты, такие как Т-клетки, В-клетки, и NK-клетки, и моноциты.

[0220] Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота», используемые взаимозаменяемо в данном документе, в широком смысле относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, этот термин включает без ограничения одно-, дву- или многонитевые ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, включающий пуриновые и пиримидиновые основания или другие естественные, химически или биохимически модифицированные, искусственные или дериватизированные основания нуклеотидов.

[0221] «Т-клетка» или «Т-лимфоцит» в контексте данного документа в широком смысле относится к тимоцитам, наивным Т-лимфоцитам, незрелым Т-лимфоцитам, зрелым Т-лимфоцитам, покоящимся Т-лимфоцитам или активированным Т-лимфоцитам. Иллюстративные популяции Т-клеток, подходящих для применения в конкретных вариантах реализации изобретения, включают без ограничения хелперные Т-клетки (HTL;

CD4+ T-клетку), цитотоксическую T-клетку (CTL; CD8+ T-клетку), CD4+CD8+ T-клетку, CD4-CD8- T-клетку, T-клетку с функциями естественных киллеров, T-клетки, экспрессирующие $\alpha\beta$ TCR ($\alpha\beta$ -T-клетки), T-клетки, экспрессирующие $\gamma\delta$ TCR ($\gamma\delta$ -T-клетки), или любую другую субпопуляцию T-клеток. Другие иллюстративные популяции T-клеток, подходящих для применения в конкретных вариантах реализации изобретения, включают без ограничения T-клетки, экспрессирующие один или несколько из следующих маркеров: CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD197 и HLA-DR, и, при необходимости, они могут быть дополнительно выделены с помощью методик положительного или отрицательного отбора.

[0222] В данном изобретении термин «гомологичный» относится к степени идентичности (см. процентную идентичность выше) между последовательностями двух аминокислотных последовательностей, например, пептидных или полипептидных последовательностей. Вышеупомянутая «гомология» определяется путем сравнения двух последовательностей, выровненных в оптимальных условиях, с последовательностями, подлежащими сравнению. Такая гомология последовательностей может быть рассчитана с помощью создания выравнивания с использованием, например, алгоритма ClustalW. Общедоступное программное обеспечение для анализа последовательностей, в частности, Vector NTI, GENETYX, или другие инструменты предоставлены в общедоступных базах данных.

[0223] Термины «гомология последовательностей» или «идентичность последовательности» в данном документе используются взаимозаменяемо. Для целей данного изобретения, в данном случае определено, что с целью определения процента гомологии последовательностей или идентичности последовательностей для двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей, последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения. Для оптимизации выравнивания двух последовательностей, могут быть введены гэпы в любую из двух последовательностей, которые сравнивают. Такое выравнивание можно осуществлять по всей длине сравниваемых последовательностей. В альтернативном варианте, выравнивание можно осуществлять по более короткому отрезку, например, по около 5, около 10, около 20, около 50, около 100 или более нуклеотидам или аминокислотам. Идентичность последовательностей представляет собой процент идентичных совпадений между двумя последовательностями в заданной выровненной области.

[0224] Сравнение последовательностей и определение процента идентичности последовательности для двух последовательностей можно осуществлять с применением

математического алгоритма. Специалисту в данной области техники известно, что доступно несколько различных компьютерных программ для выравнивания двух последовательностей и определения идентичности между двумя последовательностями (Kruskal, J. B. (1983), обзор сравнения последовательностей в D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), *Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison*, Addison Wesley). Процент идентичности последовательности для двух аминокислотных последовательностей или для двух нуклеотидных последовательностей можно определять с использованием алгоритма по Нидлману–Вуншу для выравнивания двух последовательностей. (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). С помощью указанного алгоритма можно выравнивать как аминокислотные последовательности, так и нуклеотидные последовательности. Алгоритм по Нидлману–Вуншу реализован в компьютерной программе NEEDLE. Для целей данного изобретения использовали программу NEEDLE из пакета EMBOSS (версия 2.8.0 или новее, EMBOSS: *The European Molecular Biology Open Software Suite* (2000) Rice, Longden, and Bleasby, *Trends in Genetics* 16, (6) 276-277, emboss.bioinformatics.nl/). Для аминокислотных последовательностей в качестве матрицы замен используется EBLOSUM62. Для нуклеотидной последовательности используется EDNAFULL. Используемые необязательные параметры представляют собой штраф за открытие гэпа, равный 10, и штраф за продление гэпа, равный 0,5. Специалисту в данной области техники будет понятно, что все эти разные параметры будут давать несколько различные результаты, но что общая процентная идентичность двух последовательностей при использовании разных алгоритмов значимо не меняется.

[0225] После выравнивания с помощью программы NEEDLE, как описано выше, процент идентичности последовательности между заданной последовательностью и последовательностью по данному изобретению рассчитывают следующим образом: Число соответствующих положений в выравнивании, показывающих идентичную аминокислоту или идентичный нуклеотид в обеих последовательностях, делится на общую длину выравнивания после вычитания общего числа гэпов в выравнивании. Идентичность, определяемая согласно данному документу, можно получить из NEEDLE, используя опцию NOBRIEF, и она обозначена в выходных данных программы как «наиболее длинная идентичность». Нуклеотидные и аминокислотные последовательности по данному изобретению могут дополнительно использоваться в качестве «заданной последовательности» для выполнения поиска по базам данных последовательностей, например, для идентификации других представителей семейства или родственных

последовательностей. Такие поиски можно выполнять, используя программы NBLAST и XBLAST (версии 2.0) согласно Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Поиски нуклеотидных последовательностей с помощью BLAST можно выполнять с применением программы NBLAST, вес выравнивания = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных полинуклеотидам по данному изобретению. Поиски белковых последовательностей с помощью BLAST можно выполнять с применением программы XBLAST, вес выравнивания = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных полипептидам по данному изобретению. Для получения выравниваний с гэпами в целях сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

[0226] «Т-клеточный рецептор (TCR)» в контексте данного документа в широком смысле относится к рецепторному белку на поверхности Т-клеток, который состоит из гетеродимера альфа- (α) и бета- (β) цепей, хотя в некоторых клетках TCR состоит из гамма- и дельта- (γ/δ) цепей. TCR может быть модифицирован на любой клетке, содержащей TCR, включая хелперную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку, Т-клетку памяти, регуляторную Т-клетку, Т-клетку с функциями естественных киллеров или гамма-дельта-Т-клетку.

[0227] TCR в целом находится на поверхности Т-лимфоцитов (или Т-клеток), которые в целом отвечают за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Он представляет собой гетеродимер, состоящий из альфа- и бета-цепей в 95% Т-клеток, тогда как 5% Т-клеток имеют TCR, состоящие из гамма- и дельта-цепей. Взаимодействие TCR с антигеном и МНС приводит к активации его Т-лимфоцита посредством ряда биохимических событий, опосредованных ассоциированными ферментами, корецепторами и специализированными вспомогательными молекулами. В иммунологии антиген CD3 (CD обозначает кластер дифференцировки) представляет собой белковый комплекс, состоящий из четырех различных цепей (CD3- γ , CD3 δ и дважды CD3 ϵ) у млекопитающих, которые связываются с молекулами, известными как Т-клеточный рецептор (TCR) и ζ -цепь для генерации сигнала активации в Т-лимфоцитах. TCR, ζ -цепь и молекулы CD3 вместе образуют TCR-комплекс. Цепи CD3- γ , CD3 δ и CD3 ϵ представляют собой высокородственные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащие один внеклеточный иммуноглобулиновый домен. Трансмембранная область цепей CD3

заряжена отрицательно, что позволяет этим цепям связываться с положительно заряженными цепями TCR (TCR α и TCR β). Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один консервативный мотив, известный как активирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина или сокращенно ITAM, который необходим для сигнальной способности TCR.

[0228] «Лечение», «осуществление лечения» и т.п. в контексте данного документа в широком смысле относится к получению требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим в контексте полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим в контексте частичного или полного излечения заболевания и/или нежелательного эффекта, приписываемого заболеванию. «Лечение» в контексте данного документа охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, например, у человека, и включает: (а) предупреждение возникновения заболевания у субъекта, у которого имеется предрасположенность к развитию заболевания, но у которого указанное заболевание еще не было диагностировано; (б) ингибирование заболевания, например, приостановку его развития; и (с) ослабление тяжести заболевания, например, содействие регрессии заболевания.

[0229] Способность дендритных клеток (DC) к активации и стимуляции размножения антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток может зависеть от стадии созревания DC, и таким DC может потребоваться получение «одобряющего» сигнала, ассоциированного с продукцией IL-12, чтобы вызвать цитолитическую иммунную реакцию. В частности, обеспечение сигналов посредством взаимодействий лиганд CD40 (CD40L)-CD40 на поверхности CD4⁺ Т-клеток и DC, соответственно, может считаться важным для «одобрения» DC и индукции цитотоксических CD8⁺ Т-клеток. «Одобрение» DC может приводить к положительной регуляции костимулирующих молекул, повышению выживаемости и лучшим возможностям перекрестного представления DC. Этот процесс может быть опосредован взаимодействием CD40/CD40L [S. R. Bennet et al., “Help for cytotoxic T-cell responses is mediated by CD40 signalling,” *Nature* 393(6684):478-480 (1998); S. P. Schoenberger et al., “T-cell help for cytotoxic T-cell help is mediated by CD40-CD40L interactions,” *Nature* 393(6684):480-483 (1998)], но CD40/CD40L-независимые механизмы также существуют (CD70, LT β R). Кроме того, также предполагалось прямое взаимодействие между CD40L, экспрессируемым на поверхности DC, и CD40, экспрессируемым на поверхности CD8⁺ Т-клеток, что обеспечивает возможное объяснение образования независимых от хелперов CTL-ответов [S. Johnson et al., “Selected

Toll-like receptor ligands and viruses promote helper-independent cytotoxic T-cell priming by upregulating CD40L on dendritic cells,” Immunity 30(2):218-227 (2009)].

ПРИМЕР 1

Иллюстративные последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности

Таблица 2. Конструкции CD8-TCR

№ конструкции	Нуклеиновая кислота (SEQ ID NO)	Аминокислота (SEQ ID NO)
1	295	296
2	297	298
8	299	300
9	287	288
9b	287	288
10	291	292
10n	291	292
11	285	286
11n	285	286
12	301	302
13	267	268
14	269	270
15	271	272
16	273	274
17	275	276
18	277	278
19	279	280
21	281	282
22	283	284
25	289	290

[0230] Авторы данного изобретения обнаружили, что различные элементы CD8 в векторе обеспечивают неожиданное повышение экспрессии и активности. Например, несмотря на наблюдение, что конструкция № 10 имеет более низкие вирусные титры, чем

конструкции № 9b, № 11 и № 12 (ФИГ. 5А), среди Т-клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, экспрессирующей гетеродимер CD8 α β и TCR в наиболее низкой объемной концентрации вируса, например, 1,25 мкл/10⁶ клеток, наблюдалось более высокое образование CD8+CD4+TCR+ клеток (56,7%, ФИГ. 9В), чем в случае клеток, трансдуцированных конструкцией № 9b, экспрессирующей CD8 α и TCR (42,3%, ФИГ. 9А), конструкцией № 11, экспрессирующей CD8 α CD8 β стебель с трансмембранным и внутриклеточным доменом CD8 α и TCR (51,6%, ФИГ. 9С), и конструкцией № 12, экспрессирующей CD8 α CD8 β стебель с трансмембранным и внутриклеточным доменом молекулы адгезии нервных клеток 1 (NCAM1) и TCR (14,9%, ФИГ. 9D).

[0231] Вектор может содержать любую из последовательностей нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 295, 297, 299 или 301.

[0232] Т-клетка может быть трансдуцирована для экспрессии нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 295, 297, 299 или 301.

[0233] Несколько элементов конструкций в таблице 2 описаны в таблице 3.

Таблица 3. Репрезентативные белковые и ДНК-последовательности.

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Ig-подобный домен-1 CD8 α	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQ PRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTRQFSGKRLGDT FVLTLSDFRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPA
2	CD8 β -область	SVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSP
3	Трансмембранный домен CD8 α	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
4	Цитоплазматический хвост CD8 α	LYCNHRNRRRVCKCPRPVVKS GDKPSLSARYV
5	m1CD8 α (без сигнальной последовательности)	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQ PRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTRQFSGKRLGDT FVLTLSDFRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAS VVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKS SGDKPSLSARYV
6	Сигнальный пептид CD8 α	MALPVTALLPLALLHAARP
7	m1CD8 α	MALPVTALLPLALLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGET VELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNK PKAAEGLDTRQFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYF CSALSNSIMYFSHFVPVFLPASVVDFLPTTAQPTKKSTL KKRVCRLPRPETQKGPLCSPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCNHRNRRRVCKCPRPVVKS GDKPSLSARYV
8	CD8 β 1	MRPRLWLLLAQLTVLHGNSVLQQTTPAYIKVQTNKMOV MLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDS AKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYF CMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRV CRLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHL CCRRRRARLRFMKQPQGEGISGTFVPQCLHGYYSNNTTT SQLLNPWILKT

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
9	CD8β2	MRPRLWLLLAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMLV MLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDS AKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYF CMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRV CRLPRPETQKGLKGVYQEPLSPNACMDTTAILQPHRS CLTHGS
10	CD8β3	LQQTPAYIKVQTNKMLVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQ APSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASR FILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFL PTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLV AGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQFYK
11	CD8β4	LQQTPAYIKVQTNKMLVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQ APSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASR FILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFL PTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLV AGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQLRLHPLEK CSRMDY
12	CD8β5	LQQTPAYIKVQTNKMLVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQ APSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASR FILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFL PTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLV AGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQKFNIVCLK ISGFTTCCCFQILQISREYGFVLLQKDIGQ
13	CD8β6	LQQTPAYIKVQTNKMLVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQ APSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASR FILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFL PTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLV AGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQKFNIVCLK ISGFTTCCCFQILQISREYGFVLLQKDIGQ

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
14	CD8 β 7	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQ APSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASR FILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFL PTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLV AGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQPQGEGISG TFVPQCLHGYYSNTTTSQKLLNPWILKT
15	Альфа-цепь R11KEA	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGD STNFTCSFPSSNFYALHWYRKETAKSPEALFVMTLNGD EKKKGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCALYN NNDMRFAGGTRLTVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRL WSS
16	Бета-цепь R11KE	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV TLRCKPISGHNSLFWYRETMMRGLELLIYFNNNPIDDS GMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSPG STDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQ PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR KDSRG
17	Альфа-цепь R20P1H7	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEG ESSSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGE EKEKERLKA TLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCVQGEN SGYSTLTFGKGTMLLVSPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKS VCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKS NSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVK LVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLR LWSS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
18	Бета-цепь R20P1H7	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKL TVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVT DKGDVPEGYKVS RKEKRNFLILESPSPNQTSLYFCASS LGPGLAAAYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPS EAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHS GVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRN HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRA DCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVL MAMVKRKDSRG
19	Альфа-цепь R7P1D5	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFSLVREGDS SVINCTYTDSSSTYLWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDM KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYS SASKIIFGSGTRLSIRPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNS AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLW SS
20	Бета-цепь R7P1D5	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV TLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGGLELLIYFNNNVPIDD SGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRA NTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQ PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR KDSRG

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
21	Альфа-цепь R10P2G12	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKED VTLDCVYETRDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRRNSFDE QNEISGRYSWNFQKSTSSFNFTITASQVVDSAVYFCALS EGNSGNTPLVFGKGRSLSVIANIQNPDPAVYQLRDSKSS DKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMD FKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCD VKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMT LRLWSS
22	Бета-цепь R10P2G12	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKV FLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKE KGDIPGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSLS SGSHQETQYFGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAE ISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVS TDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCG FTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMA MVKRKDSRG
23	Альфа-цепь R10P1A7	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDS SVINCTYTDSSSTYLWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDM KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAESK ETRLMFGDGTQLVVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRL WSS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
24	Бета-цепь R10P1A7	MLLLLLLLGPGISLLLPGSLAGSGLGAWSQHPSVWICKS GTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEG SKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYI CSARAGGHEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD CGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLM AMVKRKDSRG
25	Альфа-цепь R4P1D10	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEG AIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVNF HDKIIFGKGTRLHILPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCL FTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKNSNA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVE KSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTRLRLWS S
26	Бета-цепь R4P1D10	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRV TLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIHYYNGEERAK GNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVAS AYGYTFGSGTRLTVVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQ PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSV SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR KDF

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
27	Альфа-цепь R4P3F9	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEG AIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYS GAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDK SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDV KLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTL RLWSS
28	Бета-цепь R4P3F9	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRV TLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAK GNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVES SYGYTFGSGTRLTVVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQ PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSV SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKR KDF
29	Альфа-цепь R4P3H3	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEG AIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAVKA GNQFYFGTGTSLTVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNS AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLW SS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
30	Бета-цепь R4P3H3	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVVSQSPRYKVAKRGG DVALRCDPISGHVSLFWYQQALGQGPEFLTYFQNEAQL DKSGLPSDRFFAERPEGSVSTLKIQRTQQEDSAVYLCAS SLLTSGGDNEQFFGPGTRTLVLEDLKNVFPPEVAVFEPS EAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHS GVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRN HFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRA DCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVL MAMVKRKDSRG
31	Альфа-цепь R36P3F9	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGEN ATMNCSYKTSINNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREK HSGRLRVTLDTSKKSSLLITASRAADTASYFCATVSNY QLIWGAGTKLIKPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLF TDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAV AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKS FETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
32	Бета-цепь R36P3F9	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQTQNPRLITVTGKKL TVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVT DKGDVPEGYKVS RKEKRNFLILESPSPNQTSLYFCASS STSGGLSGETQYFGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPS EAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHS GVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRN HFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRA DCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVL MAMVKRKDSRG

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
33	Альфа-цепь R52P2G11	MKKHLTFLVILWLYFYRGNGKNQVEQSPQSLIILEGK NCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSEN TKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSA YGKLQFGAGTQVVVTPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRL WSS
34	Бета-цепь R52P2G11	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV TLRCKPISGHNSLFWYRQTMMRGGLELLIYFNNNVPIDDS GMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSLG SPDGNQPQHFGDGTRLSILEDLNKVFPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFC QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGF TSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDF
35	Альфа-цепь R53P2A9	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAET VTLSCITYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQ QNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAY NSYAGGTSYGKLTFGQGTLTVHPNIQNPDPAVYQLRD SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDM RSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGF NLLMTLRLWSS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
36	Бета-цепь R53P2A9	MGPGLLCWVLLCLLGAGPVDAGVTQSPHLLIKTRGQQ VTLRCSPISGHKSVSWYQQVLGQGPQFIFQYYEKEERG RGNFPDRFSARQFPNYSELNVNALLGDSALYLCASSL DGTSEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTD PQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQC VQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT SESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDSRG
37	Альфа-цепь R26P1A9	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGEN ATMNC SYKTSINNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREK HSGRLRVTLDTSKKSSLLITASRAADTASYFCLIGASGS RLTFGEGTQLTVNPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLF TDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAV AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKS FETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
38	Бета-цепь R26P1A9	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV TLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDD SGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSY FGWNEKLFFGSGTQLSVLEDLNK VFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQC QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGF TSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDF

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
39	Альфа-цепь R26P2A6	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPE GAIVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSS GNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAMS DVSGGYNKLIFGAGTRLAVHPYIQNPDPAVYQLRDSKS SDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSM DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSC DVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLM TLRLWSS
40	Бета-цепь R26P2A6	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKL TVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVT DKGDVPEGYKVS RKEKRNFP LILESPSPNQTSLYFCAST TPDGTDEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFC QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGF TSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG
41	Альфа-цепь R26P3H1	MASAPISMLAMLFTLSGLRAQSVAQPEDQVNVAEGNPL TVKCTYSVSGNPYLFWYVQYPNRGLQFLLYITGDNLV KGSYGFEAEFNKSQTSFHLKKPSALVSDSALYFC AVR D MNRDDKIIFGKGTRLHILPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDK SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDV KLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTL RLWSS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
42	Бета-цепь R26P3H1	MSNQVLCCVVLCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQN VTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDF QKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASS RAEGGEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGF TSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG
43	Альфа-цепь R35P3A4	MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSA VIKCTYS DSASNYFPWYKQELGKRPQLIIDIRSNVGEKK DQRIAVTLNKTAKHFS LHITETQPEDSAVYFCAASPTGG YNKLIFGAGTRLAVHPYIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRL WSS
44	Бета-цепь R35P3A4	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQS MTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGI TDQGEVPNGYNVSRSTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCAS SLGGASQEYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGV STDQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADC GFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM MVKRKDSRG

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
45	Альфа-цепь R37P1C9	MKLVTSITVLLSLGIMGDAKTTQPNSMESNEEEPVHLPC NHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGLTSNVNNRMA SLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILFNFNKIFYFGS GTKLVNKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFETD TNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
46	Бета-цепь R37P1C9	MGPGLLHWMALCLLGTGHGDAMVIQNPRYQVTQFGK PVTLSQSQTNLHNVMYWYQQKSSQAPKLLFHYYDKDF NNEADTPDNFQSRPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYLC TSSGETNEKLFFGSGTQLSVLEDLNKVPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD CGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLM AMVKKRDF
47	Альфа-цепь R37P1H1	MTRVSLWAVVVSTCLESGMAQTVTQSQPEMSVQEAE TVTLSCYDTSESNYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYK QQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFCA FGYSGGGADGLTFGKGTHLIIQPYIQNPDPAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRS MDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNL LMTLRLWSS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
48	Бета-цепь R37P1H1	MGPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPHLLIKTRGQQ VTLRCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQ RGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLGDSALYLCASS NEGQGWAEAEFFGQGTRLTVVEDLNKVPPEVAVFEP EAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD CGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLM AMVKRKDF
49	Альфа-цепь R42P3A9	MKRILGALLGLLSAQVCCVRGIQVEQSPDLILQEGANS TLRCNFSDSVNNLQWFHQNPWGQLINLFYIPSGTKQNG RLSATTVATERYSLLYISSQTTDSGVYFCVHNFNKFY FGSGTKLVNPKNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFE TDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
50	Бета-цепь R42P3A9	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPR HLIKEKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLIS FYEKMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSLELGDS ALYFCASSLLGQGYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVPPEV AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNG KEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFW QNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAE AWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL VSALVLMAMVKRKDSRG

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
51	Альфа-цепь R43P3F2	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKED VTLDCVYETRDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRRNSFDE QNEISGRYSWNFQKSTSSFNFTITASQVVDSAVYFCALS NNNAGNMLTFGGGTRLMVKPHIQNPDPVYQLRDSKS SDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSM DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSC DVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLM TLRLWSS
52	Бета-цепь R43P3F2	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPR HLIKEKRETATLKCYPHRHDTVYWYQQGPGQDPQFLIS FYEKMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSLELGDS ALYFCASSPTGTSGYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPE VAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVN GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAF WQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSA EAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAV LVSALVLMAMVKRKDSRG
53	Альфа-цепь R43P3G5	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGD STNFTCSFPSSNFYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGD EKKKGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCALNR DDKIIFGKGTRLHILPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCL FTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVE KSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWS S

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
54	Бета-цепь R43P3G5	MGIRLLCRVAFCFLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKV FLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKE KGDIPGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASRLP SRTYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTD PQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQC VQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT SESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDSRG
55	Альфа-цепь R59P2E7	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTPAALSVPEGENL VLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQT SGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCVNSDY KLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCL FTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNVA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVE KSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTRLRLWS S
56	Бета-цепь R59P2E7	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPR HLIKEKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLIS FYEKMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSLELGDS ALYFCASSLGLGTGDYGYTFGSGTRLTVVEDLNKVFPP EVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWW NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVS AEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYA VLVSALVLMAMVKRKDF

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
57	Альфа-цепь R11P3D3	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGD STNFTCSFPSSNFYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGD EKKKGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCALYN NNDMRFAGAGTRLTVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRL WSS
58	Бета-цепь R11P3D3	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV TLRCKPISGHNSLFWYRQTMMRGGLELLIYFNNNVPIDDS GMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSPG STDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQ PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRK DSRG
59	Альфа-цепь R16P1C10	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEG AIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAVIS NFGNEKLTFGTGTRLTIIPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKS VCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKS NSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVK LVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLR LWSS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
60	Бета-цепь R16P1C10	MGSRLLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQTPRYLIKTRGQQ VTLSCSPISGHRVSVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNK GNFPGRFSGRQFSNSRSEMNVSTLELGDSALYLCASSP WDSPNEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGF TSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG
61	Альфа-цепь R16P1E8	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPE GAIVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSS GNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAMS EAAGNKLTFGGGTRVLVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDF KSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCD VKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMT LRLWSS
62	Бета-цепь R16P1E8	MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIKRQSV AFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDD SQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSY TNQGEAFFGQGTRLTVVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTD PQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT SVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
63	Альфа-цепь R17P1A9	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEG AIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAVLN QAGTALIFGKGTTLSVSSNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKS VCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKS NSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVK LVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMLTLR LWSS
64	Бета-цепь R17P1A9	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRV TLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAK GNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSAET GPWLGNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAE ISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVS TDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCG FTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMA MVKRKDSRG
65	Альфа-цепь R17P1D7	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAET VTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQ QNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAY RWAQGGSEKLVFGKGTKLTVNPYIQKPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMR SMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPE SSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFN LLMLTLRLWSS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
66	Бета-цепь R17P1D7	MTIRLLCYMGFYFLGAGLMEADYQTPRYLVIGTGKKIT LECSQTMGHDKMYWYQQDPGMELHLIHYSYGVNSTE KGDLSSESTVSRIRTEHFPLTLESARPSHTSQYLCATELW SSGGTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGF TSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG
67	Альфа-цепь R17P1G3	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEG AIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAVGPS GTYKYIFGTGTRLKVLANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKS VCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKS NSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVK LVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMLTR LWSS
68	Бета-цепь R17P1G3	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKL TVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVT DKGDVPEGYK VSRKEKRNFP LILESPSPNQTSLYFCASS PGGSGNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAE ISHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWWVNGKEVHSGVS TDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCG FTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM MVKRKDSRG

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
69	Альфа-цепь R17P2B6	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEG AIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVVV GGGADGLTFGKGTHLIQPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDK SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDV KLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTL RLWSS
70	Бета-цепь R17P2B6	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPR HLIKEKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLIS FYEKMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSLELGDS ALYFCASSLGRGGQPQHFGDGTRLSELEDLNKVFPEVA VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQ NPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDF
71	Альфа-цепь R11P3D3KE	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGD STNFTCSFPSSNFYALHWYRKETAKSPEALFVMTLNGD EKKKGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCALYN NNDMRFGAGTRLTVKPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRL WSS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
72	Бета-цепь R11P3D3KE	NNNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSA VYFCASSPGSTDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVF EPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEV HSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWG RADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAL VLMAMVKKRSDSRG
73	Альфа-цепь R39P1C12	TYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLN KKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEIDNQQGKLIFFGQGT ELSVKPNIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNL NFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
74	Бета-цепь R39P1C12	MGPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPHLLIKTRGQQ VTLRCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQ RGNFPDRFSGHQFPNYSELNVNALLGDSALYLCASS QLNTEAFFGQGTRLTVVEDLNK VFPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTD PQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNP RNHFRCQ VQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT SVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF
75	Альфа-цепь R39P1F5	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEG AIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLC AVNN ARLMFGDGTQLVVKPNIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNS AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLW SS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
76	Бета-цепь R39P1F5	MDTWLVCWAIFSLLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQE VILRCVPISNHL YFYWYRQILGQKVEFLVSFYNN EISEKS EIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSGQ GANEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTS ESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVK RKDSRG
77	Альфа-цепь R40P1C2	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAET VTLSC TYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQ QNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAY LNYQLIWGAGTKLIKPDIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFPSP ESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRL WSS
78	Бета-цепь R40P1C2	MDTWLVCWAIFSLLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQE VILRCVPISNHL YFYWYRQILGQKVEFLVSFYNN EISEKS EIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSEM TAVGQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTS ESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVK RKDSRG

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
79	Альфа-цепь R41P3E6	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEG AIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFT AQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAFSGYALNFG KGTSLLVTPHIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVKESFETD TNLNFQNLSVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
80	Бета-цепь R41P3E6	MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQE VILRCVPISNHL YFYWYRQILGQKVEFLVSYFNNEISEKS EIFDDQFSVERPDGSNFTL KIRSTKLEDSAMYFCASSQY TGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR KDSRG
81	Альфа-цепь R43P3G4	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEG AIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLC AVNG GDMRFGAGTRLTVKPNIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNS AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLW SS

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
82	Бета-цепь R43P3G4	MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQE VILRCVPISNHL YFYWYRQILGQKVEFLVSFYNN EISEKS EIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSGQ GALEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVA VFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTS ESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVK RKDSRG
83	Альфа-цепь R44P3B3	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPS LSVQEGRISILNCDYTNMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISI SSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYF CAASGLYNQGGKLIFGQGTELSVKPNIQNPDP AVYQLR DSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS PESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGF NLLMTLRLWSS
84	Бета-цепь R44P3B3	MGCRLCCVVFCLLQAGPLDTAVSQT PKYLVTQMGND KSIKCEQNLGHDTMYWYKQDSKKFLKIMFSYNNKELII NETVPNRFS PKSPDKAHLNLHINSLELGDSAVYFCASSL GDRGYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVA VFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR C QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGF TSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
85	Альфа-цепь R44P3E7	MKTFLAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDS SVINCTYTDSSSTYLWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDM KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEINN NARLMFGDGTQLVVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRL WSS
86	Бета-цепь R44P3E7	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPR HLIKEKRETATLKCYPHRHDTVYWYQQGPGQDPQFLIS FYEKMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSLELGDS ALYFCASSPPDQNTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVA VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQ NPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
87	Альфа-цепь R49P2B7	MLLLLVPVLEVIFTLGGTRAQSVTQLGSHVSVSEGALVL LRCNYSSSVPPYLFWYVQYPNQGLQLLLKYTTGATLVK GINGFEAEFKKSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFC AVRIFG NEKLTFGTGTRLTIIPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCL FTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVE KSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWS S

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
88	Бета-цепь R49P2B7	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKV FLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKE KGDIPGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSL MGELTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAE ISHTQKATLVCLATGFYDPHVELSWWVNGKEVHSGVS TDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCG FTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV MVKRKDSRG
89	Альфа-цепь R55P1G7	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPE GAIVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSS GNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAM MGDTGTASKLTFGTGTRLQVTLDIQNPDPVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRS MDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNL LMTLRLWSS
90	Бета-цепь R55P1G7	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKV FLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKE KGDIPGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFG GYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYDPHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQ PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV MVKRKDSRG

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
91	Альфа-цепь R59P2A7	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEG AIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVQP HDMRFGAGTRLTVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNS AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRW SS
92	Бета-цепь R59P2A7	MLCSLLALLGTFFGVRSQTIHQWPATLVQPVGSPLSLE CTVEGTSNPNLYWYRQAAGRGLQLLFYVGVGQISSEV PQNLSASRPQDRQFILSSKLLLSDSGFYLCAWSGLVAE QFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDS RG
93	P2A	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
94	T2A	EGRGSLTTCGDVEENPGP
95	E2A	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
96	F2A	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
97	RD114TR	MKLPTGMVILCSLIIVRAGFDDPRKAIALVQKQHGKPC CSGGQVSEAPPNSIQVTC PGKTAYLMTNQKWKCRVT PKISPSGGELQNCPCNTFQDSMHSSCYTEYRQCRRINKT YYTATLLKIRSGSLNEVQILQNP NQLLQSPCRGSINQPVC WSATAPIHISDGGG PLDTKR VWTVQKRLEQIHKAMTPE LQYHPLALPKVRDDL SLDARTFDILNTTFRLLQMSNFSL AQDCWLCLKLGTPTPLA IPTPSLTYSLADSLANASCQIIP PLLVQPMQFSNSSCLSSPFINDTEQIDLGA VTF TNCTSVA NVSSPLCALNGSVFLCGNNMAYTYLPQNWTRLCVQAS LLPDIDINPGDEPVPIPAIDHYIHRPKRAVQFIPLLAGLGI TAAFTTGATGLGVSVTQYTKLSHQLISDVQVLSGTIQDL QDQVDSLAEVVLQNRRLDLLTAEQGGICLALQEKCCF YANKSGIVRNKIRTLQEELQKRRESLASNPLWTGLQGFL PYLLPLLGPLL TLLLILTIGPCVFNRLVQFVKDRISVVQA LVL TQQYHQLKPL
256	WPREmut1	cagtctgacgtacgcgtaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtatt cttactatgttgctccttttacgctatgtggatacgcctttaatgcctttgtatcatgctatt gcttcccgtatggctttcattttctcctccttgataaatcctggtgctgtctctttatgagga gttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccc cactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctcc ctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttggccgctgtggacaggggctcg gctgttgggactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgtcctttccttggtgc tcgctgtgttccacctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttccggcct caatccagcggaccttcttcccggcctgctgccggctctgcggccttctccgcgtct tcgcttgcctcagacgagtcggatctcctttggggcgcctccccgcc

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
257	WPREmut2	Gagcatcttaccgccatttatacccatattgttctgttttcttgattgggtatacatttaaat gtaataaaacaaaatggggggcaatcattacatttttgggatatgaataactagttcag gtgtattgccacaagacaaaactgttaagaaacttcccgttatttacgctctgttctctgtaa tcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactgatattcttaactttgttgcctctttac gctgtgtggatttctgtctttattgctctgtatcttctgattgctcccgtacggcttctgttt ctctccttgataaatcctgggtgctgtctcttttgaggagtgtggcccgttgcctgcaa cgtggcgtgggtgctctgtgtttgctgacgcaacccccactggctggggcattgccacc acctgtcaactccttctgggacttctgcttccccctcccgatgccacggcagaactcat cgccgctgcctgcccgtctggacaggggctaggtgctgggcactgataattccg tggtgtgctc
258	CD8 α 1	MALPVTALLLPLALLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGET VELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQN KPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYF CSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLS ARYV
259	CD8 α 2	MALPVTALLLPLALLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGET VELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQN KPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGCFYF CSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLS ARYV
260	«Стебель» CD8 α	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD
261	Ig-подобный домен-2 CD8 α	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQ PRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDT FVLTLSDFRRENEGCFYFCS2ALSNSIMYFSHFVPVFLPA

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
262	m2CD8 α	MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGET VELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQN KPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGCYF CSALSNSIMYFSHFVPVFLPASVVDLPTTAQPTKKSTL KKRVCRLPRPETQKGPLCSPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKS GDKPSLSARYV
263	Промотор MSCV	Tgaaagaccccactgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggcat ggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaacagagagacag cagaatatgggccaacaggatatctgtgtaagcagttcctgccccggctcagggcca agaacagatggccccagatgcggtcccgcctcagcagtttctagagaacctcagat gttccaggggcccccaaggacctgaaaatgacctgtgccttattgaactaaccaatca gttcgcttctcgttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataaaagagcccacaa cccctcact
264	WPRE	cagtctgacgtacgcgtaatacaacctctggattacaaaatttgtaaagattgactggatt cttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgcttaatgcctttgatcatgctatt gcttcccgtatggctttcattttctcctcctgtataaatcctggtgctgtctctttatgagga gttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgttgctgacgcaacccc cactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgtttccccctcc ctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttcccgcctgctggacaggggctcg gctgttgggactgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctg ctcgctgtgttccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccc tcaatccagcggaccttcctcccgcggcctgctgccggctctgcggccttcccgctc ttcgcttcgccctcagacgagtcggatctccctttggccgctccccgcc
265	Консенсусная последовательно сть фурина	RXXR
266	Линкер	SGSG
293	Сигнальный пептид CD8 β	MRPRLWLLLAQLTVLHGNSV

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
294	Сигнальный пептид S19	MEFGLSWLFLVAILKGVQC
303	Бета-цепь R11P3D3KE	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV TLRCKPISGHNSLFWYRETMMRGGLELLIYFNNNVPIDDS GMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSPG STDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQ PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQQ FYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR KDSRG
304	Альфа-цепь R39P1C12	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDS SVINCTYTDSSSTYLWYKQEPGAGLQLLYIFSNMDM KQDQRLTVLLNKKDKHL SLRIADTQTGDSAIYFCAEIDN QGGKLIFGQGTLSVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKL VEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRL WSS

[0234] Конструкции в таблице 2 могут представлять собой сборки отдельных компонентов, описанных в таблице 3. Авторы данного изобретения обнаружили, что комбинация, порядок и включение энхансеров транскрипции из таблицы 3, как описано в таблице 2, обеспечивали неожиданные улучшения в отношении эффективности трансфекции, уровней экспрессии и индукции видов активности цитотоксических Т-клеток, например, секреции IL-12, секреции IFN- γ , секреции TNF- α , секреции гранзима А, секреции MIP-1a, секреции IP-10, секреции гранзима В и комбинаций вышеприведенного.

[0235] *Опухолеассоциированные антигены (ТАА)*

[0236] В рамках иммунной реакции, зависимой от МНС класса I, пептиды не только должны быть способны связываться с определенными молекулами МНС класса I, экспрессируемыми опухолевыми клетками, но впоследствии они также должны распознаваться Т-клетками, несущими специфические Т-клеточные рецепторы (TCR).

[0237] Для того чтобы белки распознавались Т-лимфоцитами как

опухолеспецифические или -ассоциированные антигены и использовались в терапии, должны быть выполнены определенные предпосылки. Антиген должен экспрессироваться главным образом опухолевыми клетками, а не нормальными здоровыми тканями, или нормальными здоровыми тканями в сравнительно небольших количествах. В предпочтительном варианте реализации изобретения пептид должен быть представлен опухолевыми клетками в избытке по сравнению с нормальными здоровыми тканями. Кроме того, желательно, чтобы соответствующий антиген присутствовал не только в определенном типе опухоли, но и в высоких концентрациях (например, число копий соответствующего пептида на клетку). Опухолеспецифические и опухолеассоциированные антигены зачастую происходят из белков, напрямую вовлеченных в процесс трансформации нормальной клетки в опухолевую клетку, за счет их функции, например, в контроле клеточного цикла или подавлении апоптоза. Кроме того, нисходящие мишени белков, непосредственно вызывающих трансформацию, могут подвергаться положительной регуляции, и, следовательно, они могут быть косвенно ассоциированы с опухолью. Такие косвенные опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями подхода на основе вакцинации. Singh-Jasuja *et al.* Cancer Immunol. Immunother. 53 (2004): 187-195. Эпитопы присутствуют в аминокислотной последовательности антигена, что делает пептид «иммуногенным пептидом», и будучи происходящим из опухолеассоциированного антигена, он обуславливает Т-клеточный ответ как *in vitro*, так и *in vivo*.

[0238] Любой пептид, способный связываться с молекулой МНС, может выполнять функцию эпитопа для Т-клетки. Для индукции Т-клеточного ответа, ТАА должен быть представлен Т-клетке с соответствующим TCR и у хозяина не должна наблюдаться иммунологическая толерантность к такому конкретному эпитопу. Иллюстративные опухолеассоциированные антигены (ТАА), которые можно использовать с описанными в данном документе полипептидами CD8, описаны в данном документе.

[0239] **Таблица 4. Пептидные последовательности ТАА.**

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
98	YLYDSETKNA	151	LLWGHPRVALA	204	SLLNQPKAV
99	HLMDQPLSV	152	VLDGKVAVV	205	KMSELQTYV

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
100	GLLKKINSV	153	GLLGKVTSV	206	ALLEQTGDMSL
101	FLVDGSSAL	154	KMISAIPTL	207	VIIKGLEEITV
102	FLFDGSANLV	155	GLLETTGLLAT	208	KQFEGTVEI
103	FLYKIIDEL	156	TLNTLDINL	209	KLQEEIPVL
104	FILDSAETTTL	157	VIIKGLEEI	210	GLAEFQENV
105	SVDVSPPKV	158	YLEDGFAYV	211	NVAEIVIHI
106	VADKIHSV	159	KIWEELSVLEV	212	ALAGIVTNV
107	IVDDLTINL	160	LLIPFTIFM	213	NLLIDDKGTIKL
108	GLLEELVTV	161	ISLDEVAVSL	214	VLMQDSRLYL
109	TLDGAAVNQV	162	KISDFGLATV	215	KVLEHVVRV
110	SVLEKEIYSI	163	KLIGNIHGNEV	216	LLWGNLPEI
111	LLDPKTIFL	164	ILLSVLHQL	217	SLMEKNQSL
112	YTFSGDVQL	165	LDSEALLTL	218	KLLAVIHEL
113	YLMDDFSSL	166	VLQENSSDYQSNL	219	ALGDKFLLRV
114	KVWSDVTPL	167	HLLGEGAFQV	220	FLMKNSDLYGA
115	LLWGHPRVALA	168	SLVENIHVL	221	KLIDHQGLYL
116	KIWEELSVLEV	169	YTFSGDVQL	222	GPGIFPPPPQP
117	LLIPFTIFM	170	SLSEKSPEV	223	ALNESLVEC
118	FLIENLLAA	171	AMFPDTIPRV	224	GLAALAVHL
119	LLWGHPRVALA	172	FLIENLLAA	225	LLLEAVWHL
120	FLLEREQLL	173	FTAEFLEKV	226	SIIEYLPTL
121	SLAETIFIV	174	ALYGNVQQV	227	TLHDQVHLL
122	TLLEGISRA	175	LFQSRIAGV	228	SLLMWITQC

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
123	KIQEILTQV	176	ILAEPIYIRV	229	FLLDKPQDLSI
124	VIFEGEPMYL	177	FLLEREQLL	230	YLLDMPLWYL
125	SLFESLEYL	178	LLLPLELSLA	231	GLLDCPIFL
126	SLLNQPKAV	179	SLAETIFIV	232	VLIEYNFSI
127	GLAEFQENV	180	AILNVDEKNQV	233	TLYNPERTITV
128	KLLAVIHEL	181	RLFEEVLGV	234	AVPPPPSSV
129	TLHDQVHLL	182	YLDEVAFML	235	KLQEELNKV
130	TLYNPERTITV	183	KLIDEDEPLFL	236	KLMDPGSLPPL
131	KLQEKIQEL	184	KLFEKSTGL	237	ALIVSLPYL
132	SVLEKEIYSI	185	SLLEVNEASSV	238	FLLDGSANV
133	RVIDDSL VVG V	186	GVYDGREHTV	239	ALDPSGNQLI
134	VLFGELPAL	187	GLYPVTLVGV	240	ILIKHLVKV
135	GLVDIMVHL	188	ALLSSVAEA	241	VLLDTILQL
136	FLNAIETAL	189	TLLEGISRA	242	HLIAEIHTA
137	ALLQALMEL	190	SLIEESEEL	243	SMNGGVFAV
138	ALSSSQAEV	191	ALYVQAPTV	244	MLAEKLLQA
139	SLITGQDLLSV	192	KLIYKDLVSV	245	YMLDIFHEV
140	QLIEKNWLL	193	ILQDGQFLV	246	ALWLPTDSATV
141	LLDPKTIFL	194	SLLDYEVSI	247	GLASRILDA
142	RLHDENILL	195	LLGDSSFFL	248	ALSVLRLAL
143	YTFSGDVQL	196	VIFEGEPMYL	249	SYVKVLHHL
144	GLPSATTTV	197	ALSYILPYL	250	VYLPKIPSW
145	GLLPSAESIKL	198	FLFVDPELV	251	NYEDHFPLL

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
146	KTASINQNV	199	SEWGSPHAAVP	252	VYIAELEKI
147	SLLQHLIGL	200	ALSELERVL	253	VHFEDTGKTLF
148	YLMDDFSSL	201	SLFESLEYL	254	VLSPFILTL
149	LMYPYIYHV	202	KVLEYVIKV	255	HLLEGSVGV
150	KVWSDVTPL	203	VLLNEILEQV		

ПРИМЕР 2

Молекулы CD8 α

[0240] Гомодимер CD8 α (CD8 $\alpha\alpha$) может состоять из двух субъединиц α , удерживаемых вместе двумя дисульфидными связями в «стеблевых» областях. На ФИГ. 1 показан полипептид CD8 α , например, SEQ ID NO: 258 (CD8 α 1), который включает пять доменов: (1) один сигнальный пептид (с -21 по -1), например, SEQ ID NO: 6, (2) один Ig-подобный домен-1 (с 1 по 115), например, SEQ ID NO: 1, (3) одну «стеблевую» область (с 116 по 160), например, SEQ ID NO: 260, (4) один трансмембранный (ТМ) домен (161-188), например, SEQ ID NO: 3, и (5) один цитоплазматический хвост (Cyto), содержащий *lck*-связывающий мотив (с 189 по 214), например, SEQ ID NO: 4. Другой пример субъединицы CD8 α , например, CD8 α 2 (SEQ ID NO: 259), отличается от CD8 α 1 в положении 112, в котором CD8 α 2 содержит цистеин (С), тогда как CD8 α 1 содержит тирозин (Y).

Модифицированные полипептиды CD8

[0241] В отличие от полипептида CD8 α , например, CD8 α 1 (SEQ ID NO: 258) и CD8 α 2 (SEQ ID NO: 259), модифицированный полипептид CD8 α , например, m1CD8 α (SEQ ID NO: 7) и m2CD8 α (SEQ ID NO: 262), может содержать дополнительные области, такие как отрезки последовательностей из полипептида CD8 β . В одном варианте реализации изобретения SEQ ID NO: 2 или ее варианты используют с полипептидом CD8 α . В других вариантах реализации изобретения часть полипептида CD8 α , например, SEQ ID NO: 260, удалена или не включена в описанные в данном документе модифицированные полипептиды CD8. На ФИГ. 2 показано выравнивание последовательностей CD8 α 1 (SEQ ID NO: 258) и m1CD8 α (SEQ ID NO: 7). На ФИГ. 3 показано выравнивание

последовательностей CD8 α 2 (SEQ ID NO: 259) и m2CD8 α (SEQ ID NO: 262), в котором цистеиновая замена обозначена стрелкой. «Стеблевые» области показаны внутри прямоугольников.

[0242] Клетки, экспрессирующие модифицированные CD8, показали улучшенные функциональные свойства в контексте цитотоксичности и цитокинового ответа, по сравнению с исходными CD8-экспрессирующими Т-клетками, трансдуцированными TCR.

ПРИМЕР 3

Вирусные векторы на основе лентивирусов

[0243] Лентивирусные векторы, используемые в данном документе, содержат несколько элементов, которые усиливают функции вектора, включая центральный полипуриновый тракт (сРРТ) для улучшенной репликации и импорта в ядро, промотор из вируса стволовых клеток мышей (MSCV) (SEQ ID NO: 263), который уменьшает сайленсинг вектора в некоторых типах клеток, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE) (SEQ ID NO: 264) для улучшенной терминации транскрипции, и остов представлял собой конструкцию самоинактивирующегося (SIN) вектора с удаленной 3'-LTR, которая обеспечивает улучшение в отношении безопасности, устойчивой экспрессии гена и анти-сайленсинговых свойств. Yang *et al. Gene Therapy* (2008) 15, 1411–1423.

[0244] В одном варианте реализации изобретения векторы, конструкции или описанные в данном документе последовательности включают мутантные формы WPRE. В одном варианте реализации изобретения последовательности или векторы, описанные в данном документе, включают мутации в WPRE версии 1, например, WPREmut1 (SEQ ID NO: 256) или WPRE версии 2, например, WPREmut2 (SEQ ID NO: 257). Конструкция № 9 и конструкция № 9b являются двумя сериями LV-продукции с одинаковой конструкцией, содержащей SEQ ID NO: 257 в качестве WPREmut2, при этом разница между конструкцией № 9 и конструкцией № 9b заключается в титре, согласно таблице 4. В одном варианте реализации изобретения WPRE-мутанты включают не более одной мутации, не более двух мутаций, не более трех мутаций, по меньшей мере четыре мутации или не более пяти мутаций. В одном варианте реализации изобретения векторы, конструкции или последовательности, описанные в данном документе, не содержат WPRE. В одном аспекте, последовательности WPRE, описанные в U.S. 2021/0285011, содержание которой включено в полном объеме посредством ссылки, можно использовать вместе с векторами, последовательностями или конструкциями, описанными в данном документе.

[0245] В одном варианте реализации изобретения векторы, конструкции или последовательности, описанные в данном документе, не включают промотор гена белка X. WPRE-мутанты, описанные в данном документе, не экспрессируют белок X. WPRE способствует накоплению мРНК, предположительно способствует экспорту мРНК из нуклеосомы в цитоплазму для содействия трансляции мРНК трансгена.

[0246] Для получения оптимальных уровней коэкспрессии TCR $\alpha\beta$, mCD8 α (например, m1CD8 α (SEQ ID NO: 7) и m2CD8 α (SEQ ID NO: 262)), и CD8 β (например, любого из CD8 β 1-7 (SEQ ID NO: 8-14)) в трансдуцированных CD4⁺ Т-клетках, CD8⁺ Т-клетках и/или $\gamma\delta$ -Т-клетках, были получены лентивирусные векторы различной конструкции. Т-клетки можно трансдуцировать двумя отдельными лентивирусными векторами (2-в-1), например, одним, экспрессирующим TCR α и TCR β , и другим, экспрессирующим mCD8 α и CD8 β , для коэкспрессии TCR $\alpha\beta$ и гетеродимера CD8 $\alpha\beta$, или одним, экспрессирующим TCR α и TCR β , и другим, экспрессирующим mCD8 α , для коэкспрессии TCR $\alpha\beta$ и гомодимера mCD8 α . В альтернативном варианте, Т-клетки можно трансдуцировать одним лентивирусным вектором (4-в-1), коэкспрессирующим TCR α , TCR β , mCD8 α и CD8 β , для коэкспрессии TCR $\alpha\beta$ и гетеродимера CD8 $\alpha\beta$. В векторе 4-в-1 нуклеотиды, кодирующие цепь TCR α , цепь TCR β , цепь mCD8 α и цепь CD8 β , могут быть перетасованы в различном порядке, например, в направлении от 5' к 3', TCR α -TCR β -mCD8 α -CD8 β , TCR α -TCR β -CD8 β -mCD8 α , TCR β -TCR α -mCD8 α -CD8 β , TCR β -TCR α -CD8 β -mCD8 α , mCD8 α -CD8 β -TCR α -TCR β , mCD8 α -CD8 β -TCR β -TCR α , CD8 β -mCD8 α -TCR α -TCR β и CD8 β -mCD8 α -TCR β -TCR α . Различные векторы 4-в-1, полученные таким образом, можно использовать для трансдукции CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток и/или $\gamma\delta$ -Т-клеток, с последующим измерением уровней коэкспрессии TCR $\alpha\beta$ /mCD8 α /CD8 β трансдуцированных клеток с использованием методик, известных в данной области техники, например, проточной цитометрии. Аналогично, Т-клетки можно трансдуцировать одним лентивирусным вектором (3-в-1), коэкспрессирующим TCR α , TCR β и mCD8 α (например, m1CD8 α и m2CD8 α), для коэкспрессии TCR $\alpha\beta$ и гомодимера mCD8 α . В векторе 3-в-1, нуклеотиды, кодирующие цепь TCR α , цепь TCR β , цепь mCD8 α могут быть перетасованы в различном порядке, например, TCR α -TCR β -mCD8 α , TCR β -TCR α -mCD8 α , mCD8 α -TCR α -TCR β и mCD8 α -TCR β -TCR α . Различные векторы 3-в-1, полученные таким образом, можно использовать для трансдукции CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток и/или $\gamma\delta$ -Т-клеток, с последующим измерением уровней коэкспрессии TCR $\alpha\beta$ /mCD8 α трансдуцированных клеток с использованием методик, известных в данной области техники.

[0247] Для получения лентивирусных векторов, коэкспрессирующих TCR $\alpha\beta$ и mCD8 α

и/или CD8 β , нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин-линкер- (GSG или SGSG (SEQ ID NO: 266))-2A-пептид, может быть расположена между цепью TCR α и цепью TCR β , между цепью mCD8 α и цепью CD8 β и между цепью TCR и цепью CD8 для обеспечения высокоэффективной экспрессии гена. 2A-пептид может быть выбран из P2A (SEQ ID NO: 93), T2A (SEQ ID NO: 94), E2A (SEQ ID NO: 95) или F2A (SEQ ID NO: 96).

[0248] Вирусные векторы на основе лентивирусов могут также содержать посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE), такой как WPRE (SEQ ID NO: 264), WPREmut1 (SEQ ID NO: 256) или WPREmut2 (SEQ ID NO: 257), для усиления экспрессии трансгена за счет повышения уровней как ядерной, так и цитоплазматической мРНК. Также можно использовать один или несколько регуляторных элементов, включая элемент транспорта РНК (RTE) мыши, конститутивный транспортный элемент (СТЕ) ретровируса обезьян 1 типа (SRV-1) и 5'-нетранслируемую область белка теплового шока 70 человека (Hsp70 5'UTR), и/или в комбинации с WPRE, для повышения уровня экспрессии трансгена. WPREmut1 и WPREmut2 не экспрессируют белок X, но все же усиливают трансляцию мРНК трансгена.

[0249] Лентивирусные векторы могут быть псевдотипированы RD114TR (например, SEQ ID NO: 97), который является химерным гликопротеином, содержащим внеклеточный и трансмембранный домен эндогенного вируса кошек (RD114), слитые с цитоплазматическим хвостом (TR) вируса лейкоза мышей. Другие вирусные белки оболочки, такие как VSV-G env, MLV 4070A env, RD114 env, химерный белок оболочки RD114pro, GP64 env бакуловируса или GALV env, или их производные, также можно использовать. Также представлены варианты RD114TR, включающие по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 97.

[0250] Например, на ФИГ. 4 показаны иллюстративные векторы, которые включают два вектора 4-в-1, например, конструкции № 10 и № 2, коэкспрессирующие TCR (цепь TCR α и цепь TCR β), CD8 α и CD8 β ; три вектора 3-в-1, экспрессирующие TCR и CD8 α , например, конструкции № 1 и № 9, два вектора 3-в-1, экспрессирующие TCR и m1CD8 α (SEQ ID NO: 7), например, конструкции № 11 и № 12, и конструкцию № 8, экспрессирующую только TCR. Для улучшения терминации транскрипции, WPRE дикого типа (WPRE) (SEQ ID NO: 264) включен в конструкции № 1, № 2 и № 8; WPREmut (SEQ ID NO: 257) включен в конструкции № 9, № 10, № 11 и № 12.

[0251] Дополнительно иллюстративные конструкции (конструкции № 13-№ 19 и № 21-№ 26) описаны в таблице 2 выше. В частности, конструкции № 13, № 14 и № 16

представляют собой конструкции 4-в-1, коэкспрессирующие TCR, CD8 α и CD8 β 3 с различными комбинациями сигнальных пептидов (SEQ ID NO: 6 [сигнальный пептид CD8 α WT]; SEQ ID NO: 293 [сигнальный пептид CD8 β WT]; и SEQ ID NO: 294 [сигнальный пептид S19]) и разным порядком элементов. Конструкции № 15 и № 17 представляют собой конструкции 4-в-1, коэкспрессирующие TCR, CD8 α и CD8 β 5. Конструкция № 15 содержит сигнальный пептид CD8 α WT (SEQ ID NO: 6) и сигнальный пептид CD8 β WT (SEQ ID NO: 293), тогда как конструкция № 17 содержит сигнальный пептид S19 (SEQ ID NO: 294) на N-конце как CD8 α , так и CD8 β 5. Конструкция № 21 представляет собой конструкцию 4-в-1, коэкспрессирующую TCR, CD8 α и CD8 β 2, содержащую сигнальный пептид CD8 α WT (SEQ ID NO: 6) и сигнальный пептид CD8 β WT (SEQ ID NO: 293). Конструкция № 18 является вариантом конструкции № 10, в которой сигнальные пептиды WT для CD8 α и CD8 β 1 (SEQ ID NO: 6 и 293 соответственно) были замещены сигнальным пептидом S19 (SEQ ID NO: 294). Конструкция № 19 является вариантом конструкции № 11, в которой сигнальный пептид CD8 α WT (SEQ ID NO: 6) был замещен сигнальным пептидом S19 (SEQ ID NO: 294). Конструкция № 22 является вариантом конструкции № 11, в которой трансмембранный и внутриклеточный домены CD4 слиты с C-концом «стеблевой» последовательности CD8 β , вместо трансмембранного и внутриклеточного доменов CD8 α . Конструкция № 25 является вариантом конструкции № 22, в которой «стеблевая» последовательность CD8 β (SEQ ID NO: 2) замещена «стеблевой» последовательностью CD8 α (SEQ ID NO: 260).

ПРИМЕР 4

Скрининг векторов (конструкции № 1, № 2, № 8, № 9, № 10, № 11 и № 12)

Вирусные титры

[0252] На ФИГ. 5А показан вирусный титр конструкций № 1, № 2, № 8, № 9, № 10, № 11 и № 12. В таблице 5 показаны вирусные титры и данные ELISA по P24 лентивируса для конструкций № 9, № 10, № 11 и № 12.

[0253] **Таблица 5**

№ конструкции	Титр	P24 лентивируса
9	$5,40 \times 10^9$	6556
9b	$9,80 \times 10^9$	16196

10	$6,40 \times 10^9$	9525
11	$1,30 \times 10^{10}$	16797
12	$1,20 \times 10^{10}$	17996

[0254] Что касается конструкции 12, NCAMfu относится к конструкции для слитого белка на основе NCAM, экспрессирующей модифицированный внеклеточный домен CD8a и внутриклеточный домен молекулы адгезии нервных клеток 1 (CD56).

[0255] Что касается таблицы 5, часть WPREmut2 относится к SEQ ID NO: 257.

Производство Т-клеток

Активация

[0256] На ФИГ. 6 показано, что на +0-е сутки РВМС (около 9×10^8 клеток), полученные от двух доноров (донор № 1 и донор № 2), размораживали и оставляли в состоянии покоя. Клетки активировали в мешках (AC290), покрытых антителами к CD3 и к CD28 в присутствии сыворотки крови. Затем в CD8+ и CD4+ клетках измеряли маркеры активации, например, CD25, CD69 и рецептор липопротеина низкой плотности человека (H-LDL-R). На ФИГ. 7А показано, что % CD3+CD8+CD25+ клеток, % CD3+CD8+CD69+ клеток и % CD3+CD8+H-LDL-R+ клеток повышается после активации (после-А), по сравнению с таковым до активации (до-А). Аналогично, на ФИГ. 7В показано, что % CD3+CD4+CD25+ клеток, % CD3+CD4+CD69+ клеток и % CD3+CD4+H-LDL-R+ клеток повышается после активации (после-А), по сравнению с таковым до активации (до-А). Эти результаты подтверждают активацию РВМС.

[0257] Трансдукция

[0258] На ФИГ. 6 показано, что на +1-е сутки активированные РВМС были трансдуцированы вирусными векторами, например, конструкциями № 1, № 2, № 8, № 9, № 10, № 11 и № 12 в 6-луночных планшетах G-Rex® при около 5×10^6 клеток/луночка в отсутствие сыворотки крови. Количества вируса, используемые для трансдукции, показаны в таблице 6.

[0259] Таблица 6

Конструкции	Объем вируса/ 1×10^6 клеток
-------------	--------------------------------------

№ 9, № 10, № 11, № 12	1,25 мкл, 2,5 мкл, 5 мкл
№ 1	1,25 мкл
№ 2	5 мкл
№ 8 (TCR)	2,5 мкл

[0260] Размножение

[0261] На ФИГ. 6 показано, что, на +2-е сутки, трансдуцированные РВМС были размножены в присутствии сыворотки крови. На +6-е сутки клетки собирали для последующего анализа, например, FACS-Dextramer, и в отношении числа копий вектора (VCN), и подвергали криоконсервации. На ФИГ. 8А и 8В показана кратность размножения на +6-е сутки продуктов в виде трансдуцированных Т-клеток, полученных от донора № 1 и донора № 2 соответственно. Показатели жизнеспособности клеток превышают 90% на +6-е сутки.

[0262] Определение характеристик продуктов в виде Т-клеток

[0263] Определяли количества клеток, показатели в FACS-Dextramer и число копий вектора (VCN). Панели тетрамеров могут включать живые/мертвые клетки, тетрамеры CD3, CD8 α , CD8 β , CD4 и пептид/МНС, например, тетрамеры PRAME-004 (SLLQHLIGL) (SEQ ID NO: 147)/МНС. В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3⁺, после чего в отношении CD4⁺CD8⁺, после чего в отношении CD4⁺CD8⁺тетрамер(Tet)⁺ и CD8⁺Tet⁺.

[0264] На фигурах 9А, 9В, 9С и 9D показаны репрезентативные графики проточной цитометрии для клеток, полученных от донора № 1, на которых показан % CD8, CD4 и тетрамера (Tet) PRAME-004/МНС клеток, трансдуцированных конструкцией № 9b, № 10, № 11 или № 12 соответственно.

[0265] На ФИГ. 10 показан % CD8⁺CD4⁺ клеток от донора № 1 (верхняя панель) и донора № 2 (нижняя панель), трансдуцированных конструкцией № 1, № 2, № 8 (TCR), № 9, № 10, № 11 или № 12 при 1,25 мкл, 2,5 мкл или 5 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают, что более высокий % CD8⁺CD4⁺ клеток получали при трансдукции векторами, экспрессирующими CD8 α и TCR с WPRE дикого типа (конструкция № 1) и WPREmut2 (конструкция № 9), по сравнению с клетками, трансдуцированными конструкциями № 10, № 11 или № 12. Конструкция № 8 (только

TCR) служит в качестве отрицательного контроля. На ФИГ. 11 показан % Tet CD8+CD4+ клеток от донора № 1 (верхняя панель) и донора № 2 (нижняя панель), трансдуцированных конструкциями № 1, № 2, № 8 (TCR), № 9, № 10, № 11 и № 12 при 1,25 мкл, 2,5 мкл или 5 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают, что % Tet CD8+CD4+ клеток оказывается сравнимым среди клеток, трансдуцированных конструкциями № 9, № 10 и № 11, и, по-видимому, превышает таковой у клеток, трансдуцированных конструкцией № 12. В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, после чего в отношении CD4+CD8+, и после чего в отношении CD4+CD8+Tet+.

[0266] На ФИГ. 12 показаны значения MFI Tet для CD8+CD4+Tet+ клеток от донора № 1 (верхняя панель) и донора № 2 (нижняя панель), трансдуцированных конструкцией № 1, № 2, № 8 (TCR), № 9, № 10, № 11 или № 12 при 1,25 мкл, 2,5 мкл или 5 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают, что MFI тетрамера в отношении CD4+CD8+Tet+ варьирует среди доноров. На ФИГ. 13 показаны значения MFI CD8 α для CD8+CD4+Tet+ клеток от донора № 1 (верхняя панель) и донора № 2 (нижняя панель), трансдуцированных конструкцией № 1, № 2, № 8 (TCR), № 9, № 10, № 11 или № 12 при 1,25 мкл, 2,5 мкл или 5 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают более высокую MFI CD8 α у клеток, трансдуцированных векторами, экспрессирующими CD8 α и TCR с WPRE дикого типа (конструкция № 1) и WPREmut2 (конструкция № 9), по сравнению с клетками, трансдуцированными другими конструкциями. Объем раствора для трансдукции 5 мкл/ 10^6 дает лучшие результаты, чем 1,25 мкл/ 10^6 и 2,5 мкл/ 10^6 . В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, после чего в отношении CD4+CD8+, после чего в отношении CD4+CD8+Tet+ и после чего в отношении MFI Tet/MFI CD8 α .

[0267] На ФИГ. 14 показаны значения частоты CD8 (% CD8+CD4- от CD3+) среди клеток от донора № 1 (верхняя панель) и донора № 2 (нижняя панель), трансдуцированных конструкцией № 1, № 2, № 8 (TCR), № 9, № 10, № 11 или № 12 при 1,25 мкл, 2,5 мкл или 5 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты не показывают различий в значениях частоты CD8 среди конструкций. Клетки без трансдукции (NT) служат в качестве отрицательного контроля. На ФИГ. 15 показан % CD8+Tet+ (от CD3+) клеток от донора № 1 (верхняя панель) и донора № 2 (нижняя панель), трансдуцированных конструкцией № 1, № 2, № 8 (TCR), № 9, № 10, № 11 или № 12 при 1,25 мкл, 2,5 мкл или 5 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают более высокие значения частоты CD8+Tet+ (от CD3+) среди клеток, трансдуцированных конструкциями № 9, № 11 и № 12,

чем у клеток, трансдуцированных конструкцией № 10. В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, после чего в отношении CD8+CD4-, и после чего в отношении CD8+Tet+.

[0268] На ФИГ. 16 показаны значения MFI Tet для CD8+Tet+ клеток от донора № 1 (верхняя панель) и донора № 2 (нижняя панель), трансдуцированных конструкцией № 1, № 2, № 8 (TCR), № 9, № 10, № 11 или № 12 при 1,25 мкл, 2,5 мкл или 5 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают, что MFI тетрамера в отношении CD8+tet+ клеток варьирует среди доноров. На ФИГ. 17 показаны значения MFI CD8 α для CD8+Tet+ клеток от донора № 1 (верхняя панель) и донора № 2 (нижняя панель), трансдуцированных конструкцией № 1, № 2, № 8 (TCR), № 9, № 10, № 11 или № 12 при 1,25 мкл, 2,5 мкл или 5 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают, что MFI CD8 α для CD8+Tet+ являются сравнимыми среди клеток, трансдуцированных разными конструкциями. В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, после чего в отношении CD4+CD8+, после чего в отношении CD4+CD8+Tet+ и после чего в отношении MFI Tet/MFI CD8 α .

[0269] На ФИГ. 18 показан % Tet+ для CD3+ клеток от донора № 1 (верхняя панель) и донора № 2 (нижняя панель), трансдуцированных конструкцией № 1, № 2, № 8 (TCR), № 9, № 10, № 11 или № 12 при 1,25 мкл, 2,5 мкл или 5 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают более высокие значения частоты CD3+Tet+ среди клеток, трансдуцированных конструкцией № 9 или № 11, чем у клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 или № 12. Среди клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 (WPREmut2), оказывается больше % Tet+CD3+ клеток, чем среди клеток, трансдуцированных конструкцией № 2 (WPRE дикого типа) при 5 мкл на 1×10^6 клеток. В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, после чего в отношении CD3+, и после чего в отношении Tet+.

[0270] На ФИГ. 19 (верхняя панель) показано число копий вектора (VCN) для клеток от донора № 1, трансдуцированных конструкцией № 1, № 2, № 8 (TCR), № 9, № 10, № 11 или № 12 при 1,25 мкл, 2,5 мкл или 5 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают большее VCN для клеток, трансдуцированных конструкциями № 11 или № 12 (может быть обусловлено более высокими титрами), чем таковое для клеток, трансдуцированных конструкцией № 9 или № 10. На ФИГ. 19 (нижняя панель) показано CD3+Tet+/VCN для клеток от донора № 1, трансдуцированных конструкцией № 1, № 2, № 8 (TCR), № 9, № 10, № 11 или № 12 при 1,25 мкл, 2,5 мкл или 5 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают более высокое CD3+Tet+/VCN среди клеток, трансдуцированных

конструкцией № 9, чем таковое для клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 11 или № 12.

[0271] В совокупности, эти результаты показывают следующее: (1) более высокий % CD8+CD4+ клеток, полученных путем трансдуцирования клеток векторами, экспрессирующими CD8 α и TCR с WPRE дикого типа (конструкция № 1) и WPREmut2 (конструкция № 9), чем в случае клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 11 или № 12; (2) % CD8+CD4+Tet+ клеток был сравним среди клеток, трансдуцированных разными конструкциями; (3) дозозависимое повышение % тетрамера, например, для 5 мкл на 1×10^6 клеток были показаны лучшие результаты, чем для 1,25 мкл и 2,5 мкл на 1×10^6 клеток; (4) % CD8+ клеток сравним среди клеток, трансдуцированных разными конструкциями; (5) более высокие значения частоты CD8+Tet+ среди клеток, трансдуцированных конструкцией № 9, № 11 или № 12, чем у клеток, трансдуцированных конструкцией № 10; (6) более высокие значения частоты CD3+Tet+ среди клеток, трансдуцированных конструкцией № 9 или № 11, чем у клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 или № 12; (7) большее VCN среди клеток, трансдуцированных конструкцией № 11 или № 12, чем таковое для клеток, трансдуцированных конструкцией № 9 или № 10; и (8) более высокое CD3+tet+/VCN среди клеток, трансдуцированных конструкцией № 9, чем таковое для клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 11 или № 12.

[0272] Продукты в виде Т-клеток, трансдуцированных вирусным вектором, экспрессирующим трансгенный TCR и модифицированный корецептор CD8, показали превосходную цитотоксичность и повышенную продукцию цитокинов в отношении положительных по мишени клеточных линий.

ПРИМЕР 5

Анализ гибели опухоли

[0273] На ФИГ. 20А-С представлены данные, показывающие, что конструкции (№ 10, № 11 и № 12) сравнимы с таковыми, включающими только TCR, в отношении опосредования цитотоксичности в отношении положительных по мишени клеточных линий, экспрессирующих антиген на разных уровнях (UACC257 при 1081 копии на клетку и A375 при 50 копиях на клетку).

[0274] Таблица 7

Опухолевая клеточная линия	Положительный в отношении антигена статус
UACC257	Высокий

A375	Низкий
MCF7	Отрицательный

[0275] Конструкция № 9 со временем теряет способность контролировать опухоль в отношении клеточной линии A375 с низким уровнем экспрессии антигена-мишени.

ПРИМЕР 6

Анализ секреции IFN γ

[0276] Секрецию IFN γ измеряли в клеточных линиях UACC257 и A375. Секреция IFN γ в ответ на клеточную линию UACC257 была сравнимой среди конструкций. Однако, в случае клеточной линии A375, для конструкции № 10 была показана более высокая секреция IFN γ , чем для других конструкций. IFN γ определяли количественно в супернатантах с планшетов Incucyte. ФИГ. 21А-В.

[0277] На ФИГ. 22 представлен иллюстративный план эксперимента для оценки созревания дендритных клеток (DC) и секреции цитокинов полученными из РВМС продуктами в виде Т-клеток в ответ на воздействие положительных по мишени линий опухолевых клеток UACC257 и A375.

[0278] Секреция IFN γ в ответ на A375 повышается в присутствии незрелых DC (iDC). В условиях трех совместных культур с iDC, секреция IFN γ выше в случае конструкции № 10, по сравнению с другими конструкциями. Однако, при сравнении конструкции № 9 с конструкцией № 11, экспрессирующими последовательности корцептора CD8 дикого типа и модифицированного указанного рецептора соответственно, Т-клетки, трансдуцированные № 11, индуцировали более сильный цитокиновый ответ, измеряемый как IFN γ , который количественно определяли в супернатантах культуры трехкомпонентных совместных культур с использованием донора D600115, E:T:iDC::1:1/10:1/4. ФИГ. 23А-В.

[0279] Секреция IFN γ в ответ на A375 повышается в присутствии iDC. В условиях трехкомпонентных совместных культур с iDC, секреция IFN γ была выше в случае конструкции № 10, по сравнению с другими конструкциями. IFN γ количественно определяли в супернатантах из совместных культур DC D150081, E:T:iDC::1:1/10:1/4. ФИГ. 24А-В

[0280] Секреция IFN γ в ответ на UACC257 повышается в присутствии iDC. В условиях трехкомпонентных совместных культур с iDC, секреция IFN γ выше в случае конструкции № 10, по сравнению с другими конструкциями. Однако, при сравнении конструкции № 9 с конструкцией № 11, экспрессирующими последовательности корцептора CD8 дикого

типа и модифицированного указанного рецептора соответственно, Т-клетки, трансдуцированные конструкцией № 11, индуцировали более сильный цитокиновый ответ, измеряемый как $IFN\gamma$, который количественно определяли в супернатантах культуры трехкомпонентных совместных культур с использованием донора D600115, E:T:iDC::1:1/10:1/4. ФИГ. 25А-В. Эти результаты демонстрируют, что продукты в виде Т-клеток, коэкспрессирующие трансгенный TCR и корецептор CD8 (гетеродимер $\alpha\beta$ или модифицированный гомодимер CD8 α), способны «предоставлять разрешение» DC в микроокружении посредством перекрестного представления антигена и, следовательно, обладают потенциалом для обеспечения более сильного противоопухолевого ответа и модуляции микроокружения опухоли.

ПРИМЕР 7

Скрининг векторов (конструкции № 13-№ 21)

Вирусные титры

[0281] На ФИГ. 5В показан вирусный титр для конструкций № 10, № 10n (новая партия), № 11, № 11n (новая партия), № 13 - № 21 и только TCR в качестве контроля.

Производство Т-клеток

Активация

[0282] На ФИГ. 26 показано, что на +0-е сутки РВМС, полученные от двух HLA-A02+ доноров (донор № 1 и донор № 2), размораживали и оставляли в состоянии покоя. Клетки активировали в мешках (AC290), покрытых антителами к CD3 и к CD28 в отсутствие сыворотки крови. Затем в CD8+ и CD4+ клетках измеряли маркеры активации, например, CD25, CD69 и рецептор липопротеина низкой плотности человека (H-LDL-R). На ФИГ. 27А показано, что % CD3+CD8+CD25+ клеток, % CD3+CD8+CD69+ клеток и % CD3+CD8+H-LDL-R+ клеток повышается после активации (после-А), по сравнению с таковым до активации (до-А). Аналогично, на ФИГ. 27В показано, что % CD3+CD4+CD25+ клеток, % CD3+CD4+CD69+ клеток и % CD3+CD4+H-LDL-R+ клеток повышается после активации (после-А), по сравнению с таковым до активации (до-А). Эти результаты подтверждают активацию РВМС.

Трансдукция

[0283] На ФИГ. 26 показано, что на +1-е сутки активированные РВМС были

трансдуцированы вирусными векторами, например, конструкциями № 8, № 10, № 10n, № 11, № 11n и № 13-№ 21, в 24-луночных планшетах G-Rex® при около 2×10^6 клеток/луночка в отсутствие сыворотки крови. Количества вируса, используемые для трансдукции, показаны в таблице 8.

[0284] Таблица 8

Конструкции	Объем вируса/ 1×10^6 клеток
№ 10n, № 11n, № 13-№ 21	0,3 мкл, 1,1 мкл, 3,3 мкл, 10 мкл, 30 мкл
№ 8 (TCR), № 10	2,5 мкл
№ 11	1,25 мкл
NT	-

Размножение

[0285] На ФИГ. 26 показано, что на +2-е сутки трансдуцированные РВМС были размножены в отсутствие сыворотки крови. На +6-е сутки клетки собирали для последующего анализа, например, FACS на основе использования тетрамеров, и в отношении числа копий вектора (VCN), и подвергали криоконсервации. На ФИГ. 28 показана кратность размножения на +6-е сутки трансдуцированных продуктов в виде Т-клеток. Показатели жизнеспособности клеток превышают 90% на +6-е сутки.

Определение характеристик продуктов в виде Т-клеток

[0286] Определяли количества клеток, показатели в FACS-Dextramer и число копий вектора (VCN). Панели тетрамеров могут включать живые/мертвые клетки, тетрамеры CD3, CD8 α , CD8 β , CD4 и пептид/МНС, например, тетрамеры PRAME-004 (SLLQHLIGL) (SEQ ID NO: 147)/МНС. В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, после чего в отношении CD4+CD8+, после чего в отношении CD4+CD8+тетрамер(Tet)+ и CD8+Tet+.

[0287] На ФИГ. 29А и ФИГ. 29В показан % CD8+CD4+ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 10n, № 11, № 13-№ 21 при 0,3 мкл, 1,1 мкл, 3,3 мкл, 10 мкл или 30 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают сравнимые значения частоты CD8+CD4+ клеток, полученных путем трансдукции всеми тестируемыми векторами. Конструкция № 8 (только TCR) служит в качестве отрицательного контроля. На ФИГ. 30А и ФИГ. 30В показан % Tet CD8+CD4+ клеток из числа клеток, трансдуцированных

конструкцией № 10, № 10n, № 11, № 13-№ 21 при 0,3 мкл, 1,1 мкл, 3,3 мкл, 10 мкл или 30 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают, что имела место тенденция к более высоким значениям частоты CD4+CD8+tet+ в случае изоформ CD8β1 (конструкции № 10 и № 18), по сравнению с изоформами CD8β3 (конструкция № 16) и изоформами CD8β5 (конструкции № 15 и № 17). В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, после чего в отношении CD4+CD8+, и после чего в отношении CD4+CD8+Tet+.

[0288] На ФИГ. 31А и ФИГ. 31В показаны значения MFI Tet для CD8+CD4+Tet+ клеток из числа клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 10n, № 11, № 13-№ 21 при 0,3 мкл, 1,1 мкл, 3,3 мкл, 10 мкл или 30 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают тенденцию к более высоким значениям MFI тетрамера в отношении CD4+CD8+Tet+ популяции в случае изоформ CD8β1 (конструкции № 10 и № 18), по сравнению с изоформами CD8β3 (конструкция № 16) и изоформами CD8β5 (конструкции № 15 и № 17).

[0289] На ФИГ. 32А и ФИГ. 32В показаны значения частоты CD8 (% CD8+CD4- от CD3+) в случае клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 10n, № 11, № 13-№ 21 при 0,3 мкл, 1,1 мкл, 3,3 мкл, 10 мкл или 30 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты не показывают различий в значениях частоты CD8 среди конструкций. На ФИГ. 33А и ФИГ. 33В показан % CD8+Tet+ (от CD3+) клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 10n, № 11, № 13-№ 21 при 0,3 мкл, 1,1 мкл, 3,3 мкл, 10 мкл или 30 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают несколько более высокие значения частоты CD8+Tet+ (от CD3+) среди клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, чем у клеток, трансдуцированных другими конструкциями. В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, после чего в отношении CD8+CD4-, и после чего в отношении Tet+.

[0290] На ФИГ. 34А и ФИГ. 34В показаны значения MFI Tet для CD8+Tet+ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 10n, № 11, № 13-№ 21 при 0,3 мкл, 1,1 мкл, 3,3 мкл, 10 мкл или 30 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают, что MFI тетрамера в отношении CD8+tet+ клеток было сравнимым среди изоформ CD8β1 (конструкции № 18 и № 10), CD8β5 (конструкции № 15 и № 17) и CD8β3 (конструкция № 16), тогда как для конструкции № 21 наблюдалось более низкое значение MFI тетрамера.

[0291] На ФИГ. 35А и ФИГ. 35В показан % Tet+ CD3+ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 10n, № 11, № 13-№ 21 при 0,3 мкл, 1,1 мкл, 3,3 мкл, 10 мкл или

30 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают более высокие значения частоты CD3+Tet+ среди клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 (CD8β1), по сравнению с таковыми в случае клеток, трансдуцированных CD8β3 (конструкция № 16) и CD8β5 (конструкции № 15 и № 17). В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, и после чего в отношении Tet+.

[0292] На ФИГ. 36А и ФИГ. 36В показано число копий вектора (VCN) для клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 10n, № 11, № 13-№ 21 при 0,3 мкл, 1,1 мкл, 3,3 мкл, 10 мкл или 30 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают сравнимую способность всех конструкций интегрироваться и экспрессировать гены CD8/TCR.

[0293] В совокупности, эти результаты показывают следующее: (1) вирусные векторы с изоформами CD8β1, CD8β3 и CD8β5 имели надлежащие титры трансдуцирования; (2) все конструкции были способны обеспечивать успешное производство (например, высокая жизнеспособность, кратность размножения в диапазоне 6-12); (3) значения частоты CD3+tet+ среди изоформ CD8β: CD8β1 (конструкция № 10) превышало таковое CD8β3 (конструкция № 16) и CD8β5 (конструкции № 15 и № 17), при этом конструкция №21 показала наиболее низкие значения; (4) частота CD3+tet+ в случае конструкций № 11 и № 19 (m1CD8α (SEQ ID NO: 7)) показала наиболее высокие значения; и (5) насыщение %CD3+tet+, %CD8+tet+ и %CD4+CD8+tet+ наблюдалось при 10 мкл/еб. Оптимальная доза вектора находится в диапазоне 3,3-10 мкл/еб для всех конструкций.

ПРИМЕР 7

Среднемасштабный скрининг векторов (конструкции № 13-№ 19)

Производство Т-клеток

Активация/трансдукция

[0294] На ФИГ. 37 показано, что на +0-е сутки РВМС, полученные от четырех HLA-A02+ доноров, размораживали и оставляли в состоянии покоя. Клетки активировали в мешках (AC290), покрытых антителами к CD3 и к CD28 в отсутствие сыворотки крови. На +1-е сутки активированные РВМС были трансдуцированы вирусными векторами, например, конструкциями № 8, № 10n, № 11n и № 13-№ 19, в 6-луночных планшетах G-Rex® при около 7×10^6 клеток/луночка в отсутствие сыворотки крови. Количества вируса, используемые для трансдукции, показаны в таблице 9.

[0295] Таблица 9

Конструкции	Объем вируса/ 1×10^6 клеток
-------------	--------------------------------------

№ 13-19	2,5 мкл и 5 мкл
№ 10n и № 11n	2,5 мкл и 5 мкл
№ 8 (TCR)	2,5 мкл
NT	-

Размножение

[0296] На ФИГ. 37 показано, что на +2-е сутки трансдуцированные РВМС были размножены в отсутствие сыворотки крови. На +7-е сутки клетки собирали для последующего анализа, например, FACS на основе использования тетрамеров, и в отношении числа копий вектора (VCN), и подвергали криоконсервации. Кратность размножения на +7-е сутки была сравнима для всех конструкций (примерно 30-кратное размножение). Показатели жизнеспособности клеток превышают 90% на +7-е сутки.

Определение характеристик продуктов в виде Т-клеток

[0297] Определяли количества клеток, показатели в FACS-Dextramer и число копий вектора (VCN). Панели тетрамеров могут включать живые/мертвые клетки, тетрамеры CD3, CD8 α , CD8 β , CD4 и пептид/МНС, например, тетрамеры PRAME-004 (SLLQHLIGL) (SEQ ID NO: 147)/МНС. В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3⁺, после чего в отношении CD4⁺CD8⁺, после чего в отношении CD4⁺CD8⁺тетрамер(Tet)⁺ и CD8⁺Tet⁺.

[0298] Аналогично результатам, описанным в примере 6, сравнимые значения частоты CD8⁺CD4⁺ клеток получали с помощью трансдукции конструкцией № 10n, № 11n, № 13-№ 19 при 2,5 мкл или 5,0 мкл на 1×10^6 клеток. Конструкция № 8 (только TCR) служит в качестве отрицательного контроля. На ФИГ. 38 показан % Tet CD8⁺CD4⁺ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10n, № 11n, № 13-№ 19 при 2,5 мкл или 5,0 мкл на 1×10^6 клеток. Аналогично результатам, описанным в примере 6, эти результаты показывают, что имела место тенденция к более высоким значениям частоты CD4⁺CD8⁺tet⁺ в случае изоформ CD8 β 1 (конструкция № 10n), по сравнению с изоформами CD8 β 3 (конструкции № 13, № 14, № 16) и изоформами CD8 β 5 (конструкции № 15 и № 17). В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3⁺, после чего в отношении CD4⁺CD8⁺, и после чего в отношении Tet⁺.

[0299] На ФИГ. 39 показаны значения MFI Tet для CD8+CD4+Tet+ клеток из числа клеток, трансдуцированных конструкцией № 10n, № 11n, № 13-№ 19 при 2,5 мкл или 5,0 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают более высокие значения MFI тетрамера в отношении CD4+CD8+Tet+ популяции в случае изоформ CD8 β 1 (конструкция № 10n), по сравнению с изоформами CD8 β 3 (конструкция № 13) и изоформами CD8 β 5 (конструкции № 15 и № 17).

[0300] Аналогично результатам, описанным в примере 6, эти результаты показывают отсутствие различий в значениях частоты CD8 (% CD8+CD4- от CD3+) в случае клеток, трансдуцированных конструкцией № 10n, № 11n, № 13-№ 19 при 2,5 мкл или 5,0 мкл на 1×10^6 клеток среди конструкций (данные не показаны). Наблюдали сравнимые значения частоты CD8+Tet+ (от CD3+) в случае клеток, трансдуцированных конструкцией № 10n, № 11n, № 13-№ 19 при 2,5 мкл или 5,0 мкл на 1×10^6 клеток (данные не показаны). В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, после чего в отношении CD8+CD4-, и после чего в отношении Tet+.

[0301] На ФИГ. 40 показаны значения MFI Tet для CD8+Tet+ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10n, № 11n, № 13-№ 19 при 2,5 мкл или 5,0 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают, что MFI тетрамера в отношении CD8+tet+ клеток было сравнимым среди изоформ CD8 β 1 (конструкции № 18 и № 10) и CD8 β 5 (конструкция № 15), тогда как для изоформ CD8 β 3 (конструкции № 13, № 14 и № 16) наблюдалось более низкое значение MFI тетрамера.

[0302] На ФИГ. 41 показан % Tet для CD3+ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10n, № 11n, № 13-№ 19 при 2,5 мкл или 5,0 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают несколько более высокие значения частоты CD3+Tet+ среди клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 (CD8 β 1), по сравнению с таковыми в случае клеток, трансдуцированных CD8 β 3 (конструкции № 13, № 14 и № 16) и CD8 β 5 (конструкция № 15). В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, и после чего в отношении Tet+. Несколько более высокие общие количества CD3+tet+ клеток наблюдали среди РВМС, трансдуцированных конструкцией № 10 (CD8 β 1), по сравнению с таковыми, трансдуцированными CD8 β 3 (конструкции № 13, № 14 и № 16) и CD8 β 5 (конструкция № 15) (данные не показаны).

[0303] На ФИГ. 42 показано число копий вектора (VCN) для клеток, трансдуцированных конструкцией № 10n, № 11n, № 13-№ 19 при 2,5 мкл или 5,0 мкл на 1×10^6 клеток. Эти результаты показывают, что число копий вектора на клетку оставалось ниже 5 в продукте, полученном из РВМС, с использованием каждой отдельной

конструкции при дозе вектора 2,5 мкл или 5,0 мкл на 1×10^6 клеток.

[0304] На ФИГ. 43 показан % субпопуляций Т-клеток в случае клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 11, № 13 и № 15 для каждого донора. Конструкцию № 8 (только TCR) и нетрансдуцированные клетки использовали в качестве контролей. Эти результаты показывают, что в условиях только TCR было несколько больше наивных клеток, по сравнению с другими конструкциями, что согласуется с меньшей кратностью размножения. На ФИГ. 44А и ФИГ. 44В показан % субпопуляций Т-клеток в случае клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 11, № 13 и № 15 для каждого донора. Конструкцию № 8 (только TCR) и нетрансдуцированные клетки использовали в качестве контролей. В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении CD4+CD8+, что касается ФИГ. 44А, и в отношении CD4-CD8+TCR+, что касается ФИГ. 44В. Эти результаты показывают вариабельность значений частоты субпопуляций Т-клеток памяти от донора к донору, но небольшую разницу в значениях частоты $T_{\text{наивных}}$ и $T_{\text{см}}$ между конструкциями.

[0305] В совокупности, эти результаты показывают следующее: (1) жизнеспособность и кратность размножения были сравнимы среди всех конструкций на 7-е сутки; (2) несколько более высокая частота CD3+tet+, наблюдаемая в случае CD8β1 (конструкция № 10), по сравнению с CD8β3 (конструкции № 13, № 14 и № 16) и CD8β5 (конструкции № 15 и № 17); (3) копии вектора на клетку < 5 для большинства конструкций при дозе 2,5-5 мкл/ 10^6 ; и (4) вариабельность значений частоты субпопуляций Т-клеток памяти от донора к донору, но в целом конструкция № 10 характеризуется меньшим числом наивных, но большим числом клеток $T_{\text{см}}$, по сравнению с конструкциями для других β-изоформ.

ПРИМЕР 8

Анализ гибели опухоли – конструкции № 10, № 11, № 13 и № 15

[0306] На ФИГ. 45А и 45В представлены данные, показывающие, что конструкции № 13 и № 10 сравнимы с таковыми, включающими только TCR, в отношении опосредования цитотоксичности в отношении положительных по мишени клеточных линий UACC257, экспрессирующих антиген на высоких уровнях (1081 копия на клетку). Конструкция № 15 также была эффективной, но обеспечивала более медленное уничтожение по сравнению с конструкциями № 13 и № 10. Соотношение эффектор:мишень, используемое для получения этих результатов, составляло 4:1. Схожие результаты были получены при соотношении эффектор:мишень 2:1 (данные не показаны).

ПРИМЕР 9

Анализ секреции IFN γ – конструкции № 10, № 11, № 13 и № 15

[0307] Секрецию IFN γ измеряли в клеточных линиях UACC257. На ФИГ. 46 показано, что секреция IFN γ в ответ на клеточную линию UACC257 была выше в случае конструкции № 13, по сравнению с конструкцией № 10. IFN γ определяли количественно в супернатантах с планшетов Incisute. Соотношение эффектор:мишень, используемое для получения этих результатов, составляло 4:1. Схожие результаты были получены при соотношении эффектор:мишень 2:1 (данные не показаны).

ПРИМЕР 10

Экспрессия маркера ICI – конструкции № 10, № 11, № 13 и № 15

[0308] Измеряли частоту маркера ICI (2B4, 41BB, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3, CD39+CD69+ и CD39-CD69-). На ФИГ. 47 показано, что в случае конструкции № 15 наблюдается более высокий уровень экспрессии LAG3, PD-1 и TIGIT, по сравнению с другими конструкциями, при этом следующей по указанной величине является конструкция № 10.

ПРИМЕР 11

Экспрессия цитокинов – конструкции № 10, № 11, № 13 и № 15

[0309] Экспрессию различных цитокинов измеряли в клетках UACC257, совместно культивируемых с РВМС, трансдуцированными конструкциями № 10, № 11, № 13 и № 15, при соотношении Е:Т 4:1. На ФИГ. 48А – 48G показан повышенный уровень экспрессии IFN γ , IL-2 и TNF α в случае CD4+CD8+ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 (сигнальный пептид WT, CD8 β 1), по сравнению с другими конструкциями. В FACS-анализе клетки гейтировали по CD3+CD4+CD8+ клеткам в отношении UACC257, Е:Т 4:1. На ФИГ. 49А-49G показан повышенный уровень экспрессии IFN γ , IL-2, MIP-1 β и TNF α в случае CD4-CD8+ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 (сигнальный пептид WT, CD8 β 1), по сравнению с другими конструкциями. В FACS-анализе клетки гейтировали по CD3+CD4-CD8+ клеткам в отношении UACC257, Е:Т 4:1. На ФИГ. 50А-50G показан повышенный уровень экспрессии IL-2 и TNF α в случае CD3+TCR+ клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 (сигнальный пептид WT, CD8 β 1), по сравнению с другими конструкциями. Уровень экспрессии MIP-1 β является наиболее высоким в случае конструкции № 11 (схожие результаты при гейтировании в отношении CD4+CD8+

клеток). В FACS-анализе клетки гейтировали по CD3+TCR+ клеткам в отношении UACC257, E:T 4:1.

[0310] Экспрессию различных цитокинов измеряли в клетках A375, совместно культивируемых с РВМС, трансдуцированными конструкциями № 10, № 11, № 13 и № 15, при соотношении E:T 4:1. На ФИГ. 51А-51С показаны результаты из FACS-анализа, в котором клетки гейтировали по CD4+CD8+ клеткам в отношении A375, E:T 4:1. На ФИГ. 52А-52С показаны результаты из FACS-анализа, в котором клетки гейтировали по CD4-CD8+ клеткам в отношении A375, E:T 4:1. На ФИГ. 53А-53С показаны результаты из FACS-анализа, в котором клетки гейтировали по CD3+TCR+ клеткам в отношении A375, E:T 4:1. В целом результаты были более вариабельными при совместном культивировании клеток с A375+RFP, однако по сравнению с активацией UACC257+RFP наблюдаются схожие тенденции.

ПРИМЕР 12

Крупномасштабный скрининг векторов (конструкции № 10, № 11, № 13, № 16, № 18, № 19)

Производство Т-клеток

Активация/трансдукция

[0311] На ФИГ. 54 показано, что на +0-е сутки РВМС, полученные от трех HLA-A02+ доноров, размораживали и оставляли в состоянии покоя. Клетки активировали в мешках (AC290), покрытых антителами к CD3 и к CD28 в отсутствие сыворотки крови. На +1-е сутки активированные РВМС были трансдуцированы вирусными векторами, например, конструкциями № 8, № 10n, № 11n, № 13, № 16, № 18 и № 19, в сосудах для культивирования клеток G-Rex® 100 при около 5×10^7 клеток/сосуд в отсутствие сыворотки крови. Количества вируса, используемые для трансдукции, показаны в таблице 10.

[0312] Таблица 10

Конструкции	Объем вируса/ 1×10^6 клеток
№ 13, № 16, № 18, № 10n	5 мкл
№ 19 и № 11n	2,5 мкл
№ 8 (TCR)	2,5 мкл

NT	-
----	---

Размножение

[0313] На ФИГ. 54 показано, что на +2-е сутки трансдуцированные РВМС были размножены в отсутствие сыворотки крови. На +7-е сутки клетки собирали для последующего анализа, например, FACS на основе использования тетрамеров, и в отношении числа копий вектора (VCN), и подвергали криоконсервации. Кратность размножения на +7-е сутки была сравнима для всех конструкций (примерно 30-кратное размножение). Показатели жизнеспособности клеток превышают 90% на +7-е сутки.

Определение характеристик продуктов в виде Т-клеток

[0314] Определяли количества клеток, показатели в FACS-Dextramer и число копий вектора (VCN). Панели тетрамеров могут включать живые/мертвые клетки, тетрамеры CD3, CD8 α , CD8 β , CD4 и пептид/МНС, например, тетрамеры PRAME-004 (SLLQHLIGL) (SEQ ID NO: 147)/МНС. В FACS-анализе клетки гейтировали в отношении отдельных живых клеток, а затем в отношении CD3+, после чего в отношении CD4+CD8+, после чего в отношении CD4+CD8+тетрамер(Tet)+ и CD8+Tet+.

[0315] Также проводили анализы гибели опухоли и экспрессии цитокинов в присутствии и в отсутствие аутологичных незрелых дендритных клеток.

[0316] Результаты соответствовали предыдущим примерам и обобщены в таблице 11.

Таблица 11

	Параметры	Конструкция № 10	Конструкция № 13	Конструкция № 11	Конструкция № 19	Конструкция, включающая только TCR № 8
Производство	Показатели жизнеспособности	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%
	Кратность размножения d7	28,7±11%	28,6±11%	31,6±13%	29,6±13%	30,1±11%
	Экспрессия трансгена (%CD3+Tet+), среднее ± SD	46,9±12%	42±9,8%	41±12%	48,2±14%	22,8±8%
	Число копий вектора	3,3±0,6%	2,6±0,7%	2,0±0,8%	3,1±1,8%	1,7±0,7%

Функциональность	Несколько раундов уничтожения с UACC	+++	+++	+++	+++	+++
	Секреция цитокинов (24 ч, с UACC); IFN-g, TNF-a, IL-2	+++	+++	++	++	++
	Секреция цитокинов; CD4+CD8+TCR+ (16 ч, UACC); ICS	+++	+++	+	+	+/-
	Анализ «одобрения» DC (PBMC-продукт) IL-12, TNF-a и IL-6	+++	+++	+	+	+
	Анализ опухолевых 3D-сфероидов	+++	N/A	+++	N/A	++

ПРИМЕР 13

«Одобрение» DC CD4 клетками, экспрессирующими конструкции по данному изобретению

[0317] На ФИГ. 59 показана схема определения уровней секреции цитокинов дендритными клетками (DC) в присутствии PBMC, трансдуцированных конструкциями по данному изобретению, и в присутствии клеток-мишеней, например, клеток UACC257. Вкратце, на 0-е сутки PBMC (n = 3) размораживали и оставляли в состоянии покоя, с последующим выделением моноцитов и получением аутологичных незрелых DC (iDC) в присутствии IL-4 и GM-CSF; на 2-е сутки и на 4-5-е сутки DC подкармливали в присутствии IL-4 и GM-CSF; на 6-е сутки iDC (+DC) совместно культивировали с PBMC, трансдуцированными конструкцией № 13, № 16, № 10n, № 18, № 11n или № 19 (эффектор), и клетками UACC257 (мишень) при соотношении эффектор: мишень:iDC = 1:1/10: 1/4, или без iDC (-DC), PBMC, трансдуцированными конструкцией, включающей только TCR, PBMC без трансдукции (NT), PBMC, обработанными iDC и LPS, и при этом iDC отдельно служат в качестве контролей; и на 7-е сутки (после совместного культивирования в течение 24 часов), супернатанты из совместных культур собирали, с последующим профилированием цитокинов, включая, например, IL-12, IL-6 и TNF-α, с использованием Multiplex.

[0318] Наблюдалась повышенная секреция провоспалительных цитокинов в

трехкомпонентных совместных культурах аутологичных незрелых дендритных клеток, линии опухолевых клеток UACC257 и продукта в виде CD4+ Т-клеток, экспрессирующих гетеродимер CD8 $\alpha\beta$ и TCR (конструкция № 10), по сравнению с таковой в случае клеток, экспрессирующих гомодимер CD8 α^* , в котором «стеблевая» область замещена «стеблевой» областью CD8 β , и TCR (конструкция № 11).

[0319] Для определения способности CD4+ Т-клеток, экспрессирующих конструкции № 10 или № 11, «одобрять» DC, общий пул РВМС трансдуцировали конструкциями № 10 или № 11, с последующим отбором CD8+ и CD4+ клеток из продукта. Трехкомпонентные совместные культуры РВМС, отобранный по CD8+CD4- продукт или отобранный по CD4+CD8+ продукт с линией опухолевых клеток UACC257 в присутствии или в отсутствие аутологичных незрелых дендритных клеток (iDC) в течение 24 ч с последующим количественным определением цитокинов IL-12, TNF- α и IL-6 с использованием Multiplex; iDC отдельно или с LPS в качестве контролей, N = 4-7, среднее \pm SD, P-значения на основе 2-факторного дисперсионного анализа.

[0320] В присутствии незрелых дендритных клеток (iDC) и клеток UACC257, CD4+ Т-клетки, экспрессирующие конструкцию № 10 (CD4+CD8+ Т-клетки), показали лучшие результаты, индуцируя более высокие уровни IL-12 (ФИГ. 56), TNF- α (ФИГ. 57) и IL-6 (ФИГ. 58), секретируемые дендритными клетками (DC), чем CD4+ Т-клетки, экспрессирующие конструкцию № 11. С другой стороны, уровни IL-12, TNF- α и IL-6 были сравнимы между CD8+ Т-клетками, экспрессирующими конструкции № 10 и № 11 (CD8+CD4- Т-клетки). Эти результаты позволяют предположить, что CD4+ Т-клетки, экспрессирующие гетеродимер CD8 $\alpha\beta$ и TCR (конструкция № 10), могут представлять собой лучший продукт, чем CD4+ Т-клетки, экспрессирующие гомодимер CD8 α^* и TCR (конструкция № 11), что касается «одобрения» DC. Отрицательные контроли включают уровни цитокинов, полученные (1) в отсутствие iDC (-iDC), (2) в присутствии нетрансдуцированных Т-клеток (NT) + клетки UACC257 и (3) в присутствии Т-клеток, трансдуцированных конструкцией, включающей только TCR, (TCR) + клетки UACC257. Положительный контроль включает уровни цитокина, полученные для iDC, обработанных липополисахаридом (LPS), который может активировать DC.

ПРИМЕР 14

Оценка созревания DC и секреции цитокинов РВМС-продуктами в ответ на мишени UACC257

[0321] На ФИГ. 60 показаны уровни секреции IL-12, индуцированной совместным

культивированием РВМС, трансдуцированных конструкциями по данному изобретению, в присутствии или в отсутствие iDC, и клеток-мишеней, например, клеток UACC257.

Например, секреция IL-12 была повышена при совместном культивировании РВМС, трансдуцированных конструкциями № 10 и 13, в присутствии iDC (+DC) и UACC257, по сравнению с таковой при совместном культивировании РВМС, трансдуцированных конструкцией, включающей только TCR. Повышение секреции IL-12 предполагает (1) поляризацию в сторону иммунной реакции, опосредованной клетками Th1, включая продукцию TNF- α (см., ФИГ. 61), (2) пролиферацию Т-клеток, (3) продукцию IFN- γ и (4) цитолитическую активность цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL).

[0322] На ФИГ. 61 показаны уровни секреции TNF- α , индуцированной совместным культивированием РВМС, трансдуцированных конструкциями по данному изобретению, в присутствии или в отсутствие iDC, и клеток-мишеней, например, клеток UACC257.

Например, секреция TNF- α была повышена при совместном культивировании РВМС, трансдуцированных конструкциями № 10 и 13, в присутствии iDC (+DC) и UACC257, по сравнению с таковой при совместном культивировании РВМС, трансдуцированных конструкцией, включающей только TCR.

[0323] Повышенная секреция IL-6 (в дополнение к IL-12, TNF- α) может свидетельствовать о созревании дендритных клеток, которое может усиливаться за счет взаимодействий CD40-CD40L между CD4+ Т-клетками и DC. Созревание DC и последующая секреция цитокинов могут содействовать модуляции провоспалительного окружения.

[0324] На ФИГ. 62 показаны уровни секреции IL-6, индуцированной совместным культивированием РВМС, трансдуцированных конструкциями по данному изобретению, в присутствии или в отсутствие iDC, и клеток-мишеней, например, клеток UACC257.

Например, секреция IL-6 была повышена при совместном культивировании РВМС, трансдуцированных конструкциями № 10 и 13, в присутствии iDC (+DC) и UACC257, по сравнению с таковой при совместном культивировании РВМС, трансдуцированных конструкцией, включающей только TCR.

[0325] Эти результаты показывают, что РВМС-продукты, содержащие CD4+ Т-клетки, коэкспрессирующие трансгенный TCR и корецептор CD8 (гетеродимер CD8 $\alpha\beta$ или гомодимер CD8 α), могут «одобрять» DC в микроокружении посредством перекрестного представления антигена для модуляции микроокружения опухоли, например, за счет повышения секреции IL-12, IL-6 и TNF- α .

[0326] В таблице 12 показаны результаты сравнения конструкций по возможности

производства и функциональности.

Таблица 12

	Параметры	Конструкция	Конструкция	Конструкция	Конструкция	Только TCR
		№ 10	№ 13	№ 11	№ 19	
Возможности производства	Показатели жизнеспособности	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%
	Кратность размножения на 7-е сутки	28,7±11%	28,6±11%	31,6±13%	29,6±13%	30,1±11%
	Экспрессия трансгена (%CD3+Tet+) Среднее ± SD	46,9±12%	42±9,8%	41±12%	48,2±14%	22,8±8%
	Число копий вектора	3,3±0,6%	2,6±0,7%	2,0±0,8%	3,1±1,8%	1,7±0,7%
Функциональность	Несколько раундов уничтожения с клетками UACC257	+++	+++	+++	+++	+++
	Секреция цитокинов (24 ч, с клетками UACC257); IFN- γ , TNF- α , IL-2	+++	+++	++	++	++
	Секреция цитокинов; CD4+CD8+TCR+ (16 ч, с клетками UACC257); ICS	+++	+++	+	+	+/-
	Анализ «одобрения» DC (PBMC-продукт)	+++	+++	+	+	+

	IL-12, TNF- α и IL-6					
	Анализ опухолевых 3D-сфероидов	+++	N/A	+++	N/A	++

[0327] Примечания: “+++” = наилучший ответ; “++” = хороший ответ; “+” = средний ответ; “+/-” = плохой ответ.

[0328] В таблице 13 показаны результаты сравнения конструкций и их ранжирование (чем меньше число, тем лучше результат).

Таблица 13

Параметры	Конструкция № 10	Конструкция № 13	Конструкция № 11	Конструкция № 19
Возможности производства	1	1	1	1
Функциональность РВМС	1	1	2	2
Функциональность CD8	1	1	1	1
Функциональность CD4	1	1	3	3
Временная задержка*	1	1	1	1
Всего	5	5	8	8

*В данном случае временная задержка относится к любой задержке, связанной, например, с производством векторов в соответствии с GMP, или любой задержке из-за неполного набора данных, что может увеличить задержку внедрения конструкций в клинических испытаниях.

[0329] В совокупности, несмотря на то, что возможность производства в контексте, например, жизнеспособности, кратности размножения, экспрессии трансгена и числа копий вектора, может быть одинаково хорошей, соответствуя при ранжировании 1, среди клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, № 11, № 13 или № 19, функциональность в контексте, например, уничтожения клеток, секреции цитокинов, «одобрения» DC и

способности в отношении образования опухолевых 3D-сфероидов, в случае клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 и № 13, может быть лучше, соответствуя при ранжировании 1, чем в случае клеток, трансдуцированных конструкцией № 11 и № 19, соответствуя при ранжировании 1-3.

ПРИМЕР 15

Анализы EC50

[0330] Для определения эффективности Т-клеток, трансдуцированных конструкциями по данному изобретению, например, конструкциями № 10 и № 11, в отношении клеток-мишеней, определяли EC50 на основе уровней IFN γ , продуцируемого трансдуцированными клетками в присутствии стимулированных пептидом PRAME клеток T2.

[0331] Например, для сравнения EC50 отобранных по CD4+ Т-клеток, трансдуцированных конструкцией № 10 (CD8 $\alpha\beta$ -TCR), конструкцией № 11 (m1CD8 α -TCR) или конструкцией № 8 (только TCR), отобранные по CD4+ продукты (нормализованные по TCR+) совместно культивировали со стимулированными пептидом PRAME клетками T2 при определенных концентрациях при соотношении Е:Т 1:1 в течение 24 ч. Уровни IFN γ количественно определяли в супернатантах спустя 24 ч. На фигурах 63А-63С показаны уровни IFN γ , продуцируемого трансдуцированными отобранными по CD4+ Т-клетками, полученными от донора № 1, № 2 и № 3 соответственно. В целом, отобранные по CD4+ Т-клетки, трансдуцированные конструкцией № 10, были более чувствительными к PRAME-антигену, по сравнению с клетками, трансдуцированными конструкцией № 11 (m1CD8 α TCR+ CD4 Т-клетки), о чем свидетельствуют более низкие значения EC50 (нг/мл) отобранных по CD4+ Т-клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, чем в случае клеток, трансдуцированных конструкцией № 11 (ФИГ. 63D). Среди TCR+ CD4+ клеток ответа не наблюдалось (фигуры 63А-63D). Эти результаты позволяют предположить, что гетеродимер CD8 $\alpha\beta$ может придавать повышенную avidность CD8 $\alpha\beta$ TCR+ CD4+ Т-клеткам, по сравнению с гомодимером m1CD8 α , что приводит к лучшей эффективности в отношении клеток-мишеней.

[0332] Схожие эксперименты проводили, используя РВМС, полученные от донора № 1, № 3 и № 4. Вкратце, РВМС-продукты (не нормализованные по TCR+) совместно культивировали со стимулированными пептидом PRAME клетками T2 при определенных концентрациях при соотношении Е:Т 1:1 в течение 24 ч. Уровни IFN γ количественно

определяли в супернатантах спустя 24 ч. На фигурах 64А-64С показаны уровни $IFN\gamma$, продуцируемого трансдуцированными РВМС, полученными от донора № 4, № 1 и № 3 соответственно. Наблюдалась вариабельность значений ЕС50 от донора к донору. Например, в то время как в случае донора № 3 (фигуры 64С и 64D) показано более низкое ЕС50 РВМС, трансдуцированных конструкцией № 10, по сравнению с клетками, трансдуцированными конструкцией, включающей только ТCR, в случае доноров № 1 (ФИГ. 64В) и № 4 (ФИГ. 64А) показаны сравнимые ЕС50 между конструкцией № 10 и конструкцией, включающей только ТCR (ФИГ. 64D). Таким образом, повышенная avidность и эффективность, наблюдаемые в случае отобранных по $CD4^+$ продуктов в виде Т-клеток, экспрессирующих ТCR и гетеродимер $CD8\alpha\beta$, по сравнению с клетками, экспрессирующими только ТCR, могут быть получены, но в меньшей степени, при использовании РВМС-продуктов.

[0333] Для сравнения ЕС50 разных продуктов в виде Т-клеток, полученных от одного и того же донора, РВМС-продукты, отобранные по $CD8^+$ продукты и отобранные по $CD4^+$ продукты, полученные от одного донора, совместно культивировали со стимулированными пептидом PRAME клетками Т2 (нормализованные по ТCR+) при определенных концентрациях при соотношении Е:Т 1:1 в течение 24 ч. Уровни $IFN\gamma$ количественно определяли в супернатантах спустя 24 ч. На фигурах 65А-65С показаны уровни $IFN\gamma$, продуцируемого РВМС-продуктами (ФИГ. 65А), отобранными по $CD8^+$ продуктами (ФИГ. 65В) и отобранными по $CD4^+$ продуктами (ФИГ. 65С) соответственно. Соответственно, ЕС50 отобранных по $CD4^+$ Т-клеток, трансдуцированных конструкцией № 10, было ниже, чем в случае клеток, трансдуцированных конструкцией № 11 или конструкцией, включающей только ТCR (ФИГ. 65С), тогда как ЕС50 трансдуцированных РВМС и отобранных по $CD8^+$ Т-клеток были сравнимы между трансдукцией конструкцией № 10 и конструкцией, включающей только ТCR. Таким образом, повышенная avidность и эффективность, наблюдаемые в случае отобранных по $CD4^+$ продуктов в виде Т-клеток, экспрессирующих ТCR и гетеродимер $CD8\alpha\beta$, по сравнению с клетками, экспрессирующими ТCR и гомодимер $m1CD8\alpha$ или с клетками, экспрессирующими только ТCR, могут быть получены, но в меньшей степени, при использовании РВМС-продуктов или отобранных по $CD8^+$ продуктов в виде Т-клеток.

[0334] Все цитируемые в данном описании источники включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждый источник был конкретно и отдельно указан как включенный посредством ссылки. Цитирование любого источника предназначено для его раскрытия до даты подачи и не должно толковаться как признание

того, что данное изобретение не имеет права претендовать на первенство в подаче такого источника в силу предшествующего изобретения.

[0335] Будет понятно, что каждый из вышеописанных элементов или два или более таких элементов вместе могут также найти полезное применение в других типах способов, отличных от типа, описанного выше. Без дополнительного анализа, вышеизложенное настолько полно раскрывает суть данного изобретения, что другие могут, применяя имеющиеся знания, легко адаптировать его для различных применений, не опуская признаков, которые, с точки зрения уровня техники, объективно составляют существенные характеристики типового или конкретных вариантов реализации данного изобретения, изложенные в прилагаемой формуле изобретения. Вышеизложенные варианты реализации изобретения представлены исключительно в качестве примера; объем данного изобретения ограничивается только нижеследующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую (а) Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий выделенные α -цепь и β -цепь, и полипептид CD8, содержащий α -цепь и β -цепь, или (б) TCR, содержащий α -цепь и β -цепь, и полипептид CD8, содержащий α -цепь без β -цепи, причем α -цепь TCR и β -цепь TCR выбраны из SEQ ID NO: 15 и 16, 17 и 18, 19 и 20, 21 и 22, 23 и 24, 25 и 26, 27 и 28, 29 и 30, 31 и 32, 33 и 34, 35 и 36, 37 и 38, 39 и 40, 41 и 42, 43 и 44, 45 и 46, 47 и 48, 49 и 50, 51 и 52, 53 и 54, 55 и 56, 57 и 58, 59 и 60, 61 и 62, 63 и 64, 65 и 66, 67 и 68, 69 и 70, 71 и 303, 304 и 74, 75 и 76, 77 и 78, 79 и 80, 81 и 82, 83 и 84, 85 и 86, 87 и 88, 89 и 90 и 91 и 92, причем α -цепь CD8 представляет собой SEQ ID NO: 7, 258, 259, 262 или их вариант, и причем β -цепь CD8 представляет собой SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14.
2. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1, отличающаяся тем, что α -цепь TCR и β -цепь TCR выбраны из SEQ ID NO: 15 и 16, 57 и 58, 59 и 60, 61 и 62, 63 и 64, 65 и 66, 67 и 68, 69 и 70, и 71 и 303.
3. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновую кислоту, на по меньшей мере 80% идентичную последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 295, 297, 299 или 301.
4. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 3, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 295, 297, 299 или 301.
5. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-4, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 267.
6. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-4, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 279.
7. Выделенный полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-6.
8. Выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 296, 298, 300 или 302.

9. Выделенный полипептид по п. 8, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 296, 298, 300 или 302.
10. Выделенный полипептид по любому из пп. 7-9, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268.
11. Выделенный полипептид по любому из пп. 7-9, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 280.
12. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-6.
13. Вектор по п. 12, дополнительно содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую 2А-пептид или сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), расположенную между нуклеиновой кислотой, кодирующей α -цепь CD8, и нуклеиновой кислотой, кодирующей β -цепь CD8.
14. Вектор по п. 12 или 13, дополнительно содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую 2А-пептид или IRES, расположенную между нуклеиновой кислотой, кодирующей α -цепь TCR, и нуклеиновой кислотой, кодирующей β -цепь TCR.
15. Вектор по п. 14, отличающийся тем, что 2А-пептид представляет собой P2A (SEQ ID NO: 93), T2A (SEQ ID NO: 94), E2A (SEQ ID NO: 95) или F2A (SEQ ID NO: 96).
16. Вектор по любому из пп. 12-15, дополнительно содержащий последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента (PRE), выбранную из PRE вируса гепатита сурков (WPRE), мутанта 1 PRE вируса гепатита сурков (WPRE), мутанта 2 PRE вируса гепатита сурков (WPRE) или PRE вируса гепатита В (HBV) (HPRE).
17. Вектор по п. 16, отличающийся тем, что последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента (PRE) представляет собой мутант 1 PRE вируса гепатита сурков (WPRE), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 256.
18. Вектор по п. 16, отличающийся тем, что последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента (PRE) представляет собой мутант 2 PRE вируса гепатита сурков (WPRE), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257.
19. Вектор по любому из пп. 12-18, дополнительно содержащий промотор, выбранный из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора гена фосфоглицераткиназы (PGK), промотора гена основного белка миелина (MBP), промотора гена глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), модифицированного LTR MoMuLV, содержащего

- энхансер вируса миелопролиферативной саркомы (MNDU3), промотора гена убиквитина С, промотора гена EF-1 альфа или промотора вируса стволовых клеток мышей (MSCV).
20. Вектор по любому из пп. 12-19, который представляет собой вирусный вектор или вектор, отличный от вирусного.
 21. Вектор по п. 20, который представляет собой вирусный вектор.
 22. Вектор по п. 21, отличающийся тем, что вирусный вектор выбран из аденовирусов, поксвирусов, альфавирусов, аренавирусов, флавивирусов, рабдовирусов, ретровирусов, лентивирусов, герпесвирусов, парамиксовирусов, пикорнавирусов и их комбинаций.
 23. Вектор по п. 21 или 22, псевдотипированный белком оболочки вируса, выбранного из нативного эндогенного вируса кошек (RD114), версии RD114 (RD114TR), вируса лейкоза гиббонов (GALV), версии GALV (GALV-TR), амфотропного вируса лейкоза мышей (MLV 4070A), бакуловируса (GP64), вируса везикулярного стоматита (VSV-G), вируса чумы кур (FPV), вируса Эбола (EboV) или оболочечного гликопротеина ретровирусов бабуинов (BaEV) и вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV).
 24. Вектор по любому из пп. 12-23, который представляет собой лентивирусный вектор.
 25. Вектор по любому из пп. 12-24, дополнительно содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR).
 26. Выделенная Т-клетка, трансдуцированная нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-5.
 27. Выделенная Т-клетка, трансдуцированная для экспрессии полипептида по любому из пп. 6-10.
 28. Выделенная Т-клетка, трансдуцированная вектором по любому из пп. 12-25.
 29. Клетка по любому из пп. 26-28, которая представляет собой $\alpha\beta$ -Т-клетку, $\gamma\delta$ -Т-клетку и/или Т-клетку с функциями естественных киллеров.
 30. Клетка по п. 29, отличающаяся тем, что $\alpha\beta$ -Т-клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку.
 31. Клетка по п. 29, отличающаяся тем, что $\alpha\beta$ -Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку.
 32. Клетка по п. 29, отличающаяся тем, что $\gamma\delta$ -Т-клетка представляет собой V γ 9V δ 2⁺ Т-клетку.
 33. $\gamma\delta$ -Т-клетка, экспрессирующая полипептид по любому из пп. 6-10.
 34. $\alpha\beta$ -Т-клетка, экспрессирующая полипептид по любому из пп. 6-10.
 35. Композиция, содержащая Т-клетку по любому из пп. 26-34.
 36. Композиция по п. 35, которая представляет собой фармацевтическую композицию.

37. Композиция по п. 35 или 36, дополнительно содержащая адъювант, вспомогательное вещество, носитель, разбавитель, буфер, стабилизатор или их комбинацию.
38. Композиция по п. 35 или 36, дополнительно содержащая адъювант.
39. Композиция по п. 37 или 38, отличающаяся тем, что адъювант представляет собой антитело к CD40, имиквимод, резиквимод, GM-CSF, циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб, атезолизумаб, интерферон-альфа, интерферон-бета, CpG-олигонуклеотиды и производные, поли(I:C) и производные, РНК, силденафил, составы на основе частиц сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLG), виросомы, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-13 (IL-13), интерлейкин-15 (IL-15), интерлейкин-21 (IL-21), интерлейкин-23 (IL-23) и их комбинации.
40. Способ получения Т-клеток для иммунотерапии, включающий выделение Т-клеток из образца крови субъекта-человека, активацию выделенных Т-клеток, трансдуцирование активированных Т-клеток нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-6 или вектором по любому из пп. 12-25, и обеспечение размножения трансдуцированных Т-клеток.
41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что образец крови содержит мононуклеарные клетки периферической крови (PMBC).
42. Способ по п. 40 или 41, отличающийся тем, что активация включает приведение Т-клеток в контакт с антителом к CD3 и к CD28.
43. Способ по любому из пп. 40-42, отличающийся тем, что Т-клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку.
44. Способ по любому из пп. 40-42, отличающийся тем, что Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку.
45. Способ по п. 40 или 41, отличающийся тем, что Т-клетка представляет собой $\gamma\delta$ -Т-клетку или $\alpha\beta$ -Т-клетку.
46. Способ по любому из пп. 40-45, отличающийся тем, что этапы активации и/или обеспечения размножения осуществляют в присутствии комбинации IL-2 и IL-15 и необязательно с золедронатом.
47. Способ лечения пациента, у которого наблюдается рак, включающий введение пациенту композиции по любому из пп. 35-39, причем рак выбран из группы, состоящей из

- немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, меланомы, рака печени, рака молочной железы, рака матки, карциномы из клеток Меркеля, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака желчевыводящих путей, рака толстой и прямой кишки, рака мочевого пузыря, рака почки, лейкоза, рака яичника, рака пищевода, злокачественной опухоли головного мозга, рака желудка и рака предстательной железы.
- 48.** Способ вызова иммунного ответа у пациента, у которого наблюдается рак, включающий введение пациенту композиции по любому из пп. 35-39, причем рак выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, меланомы, рака печени, рака молочной железы, рака матки, карциномы из клеток Меркеля, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака желчевыводящих путей, рака толстой и прямой кишки, рака мочевого пузыря, рака почки, лейкоза, рака яичника, рака пищевода, злокачественной опухоли головного мозга, рака желудка и рака предстательной железы.
- 49.** Способ по п. 47 или 48, отличающийся тем, что Т-клетки уничтожают раковые клетки, которые представляют пептид в комплексе с молекулой МНС на поверхности, причем пептид состоит из аминокислотной последовательности SLLQHILIGL (SEQ ID NO: 147).
- 50.** Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-4, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 285 или 301.
- 51.** Выделенный полипептид по любому из пп. 7-9, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 286 или 302.
- 52.** Вектор по п. 14, отличающийся тем, что IRES выбран из группы, состоящей из IRES из пикорнавируса, IRES из флавивируса, IRES из пестивируса, IRES из ретровируса, IRES из лентивируса, IRES из РНК-вируса насекомых и IRES из клеточной мРНК.
- 53.** Способ по п. 40, дополнительно включающий выделение CD4+CD8+ Т-клеток из трансдуцированных Т-клеток и обеспечение размножения выделенных CD4+CD8+ трансдуцированных Т-клеток.

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLF

← Сигнальный пептид →
-21 -1 1

QPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCS

Ig-подобный домен

ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR

→ ←
115 116

«Стеблевая» область

GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARY

→ ← Трансмембранный домен → ←
160 161 188 189

Цитоплазматический домен

V

→ |
214

Фиг. 1

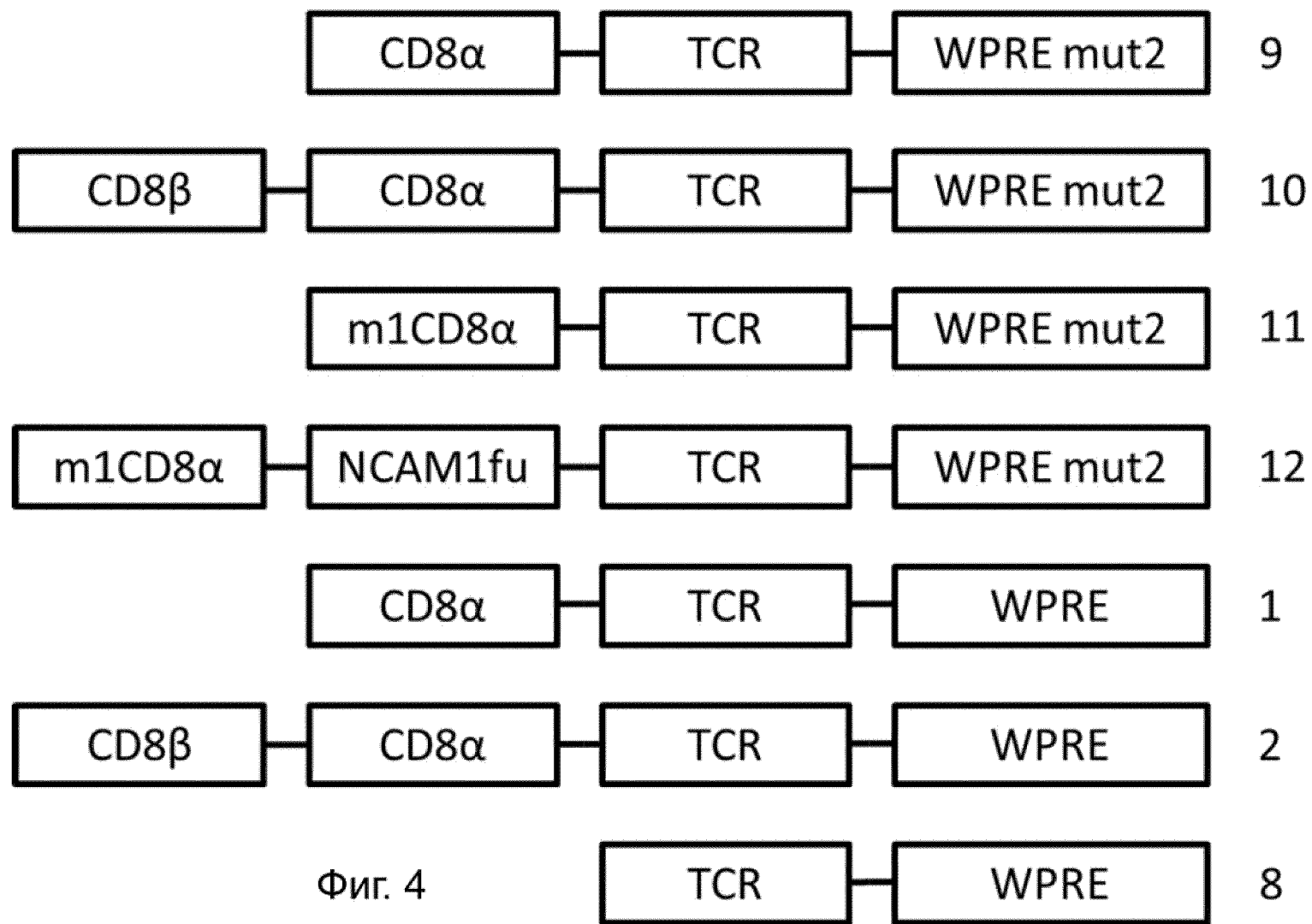
CD8 α 1	1	MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSP	LDRTWNLGETVELKQCQVLLSNPTSGCSWLFQP	60
m1CD8 α	1	MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSP	LDRTWNLGETVELKQCQVLLSNPTSGCSWLFQP	60
CD8 α 1	61	RGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLD	TQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSN	120
m1CD8 α	61	RGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLD	TQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSN	120
CD8 α 1	121	SIMYFSHFVPVFLPAKPTT-TPAPRPPTPAPT	IASQPLSL-RPEACRPAAGGAVHTRGLD	178
m1CD8 α	121	SIMYFSHFVPVFLPA	P PT T+ + L RPE T+	169
CD8 α 1	179	FACD	LYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKP	SLSARYV 235
m1CD8 α	170	LCSP	LYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKP	SLSARYV 226

Фиг. 2

CD8 α 2	1	MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKQVLLSNPTSGCSWLFQP	60
m2CD8 α	1	MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKQVLLSNPTSGCSWLFQP	60
CD8 α 2	61	RGAAASPTFLLLYLSQNKPKAAEGLDTRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEG \downarrow CYFCSALSN	120
m2CD8 α	61	RGAAASPTFLLLYLSQNKPKAAEGLDTRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEG \downarrow CYFCSALSN	120
CD8 α 2	121	SIMYFSHFVPVFLPAKPTT-TPAPRPPTPAPTIASQPLSL-RPEACRPAAGGAVHTRGLD	178
m2CD8 α	121	SIMYFSHFVPVFLPASPVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPE-----TQKGP	169
CD8 α 2	179	FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSSLARYV	235
m2CD8 α	170	LCSPDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSSLARYV	226

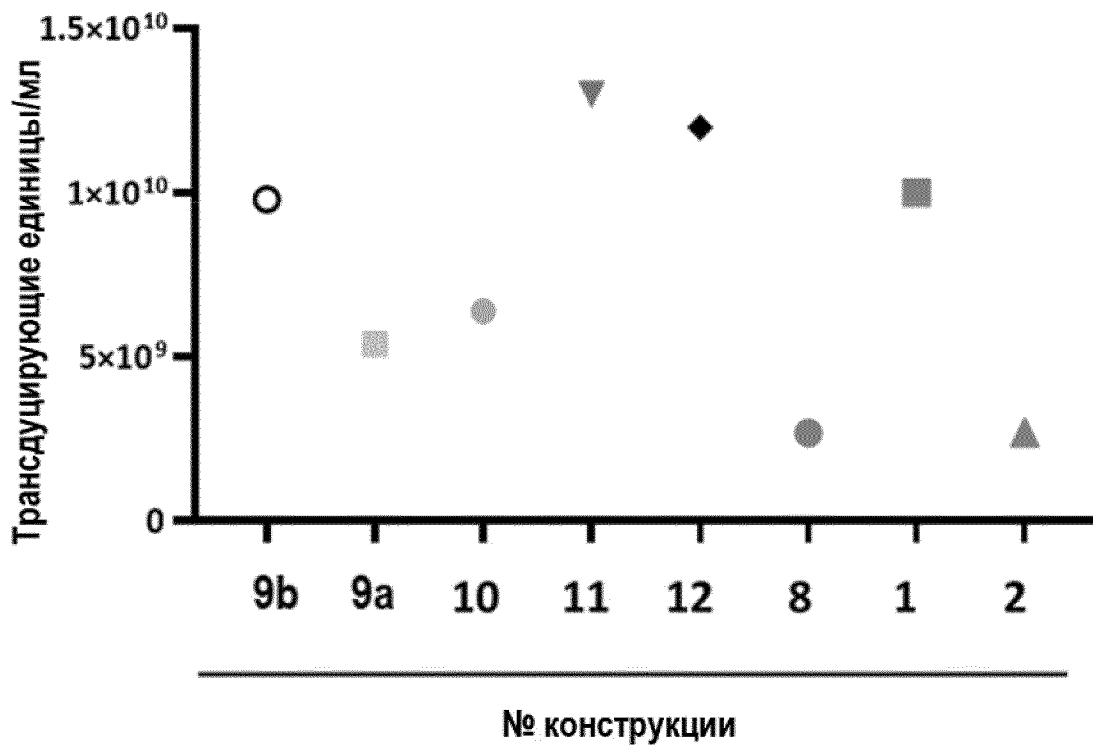
Фиг. 3

№ конструкции



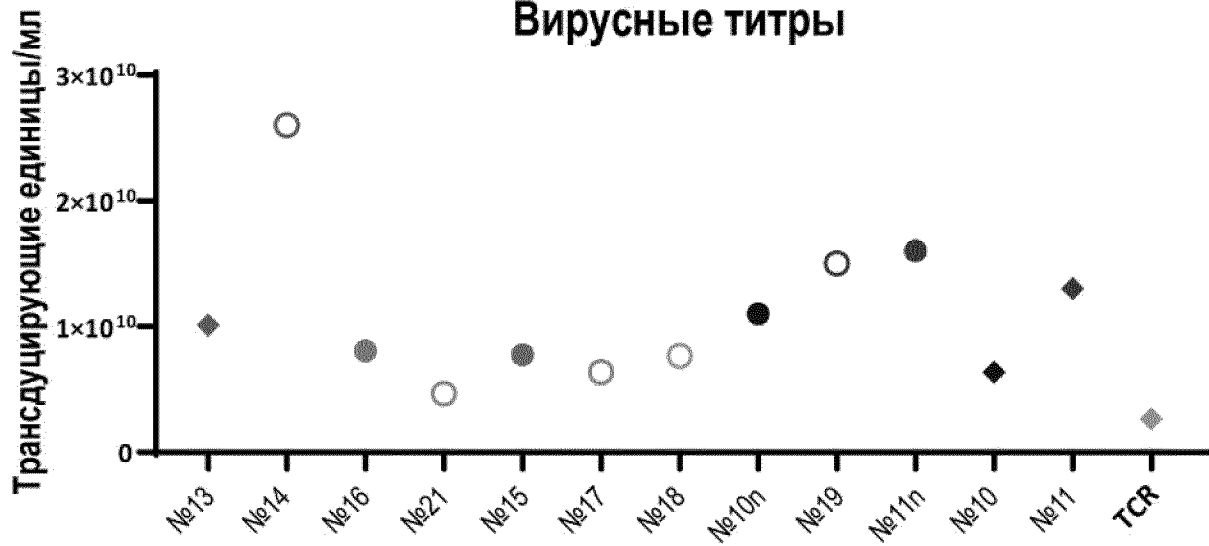
Фиг. 4

Вирусные титры

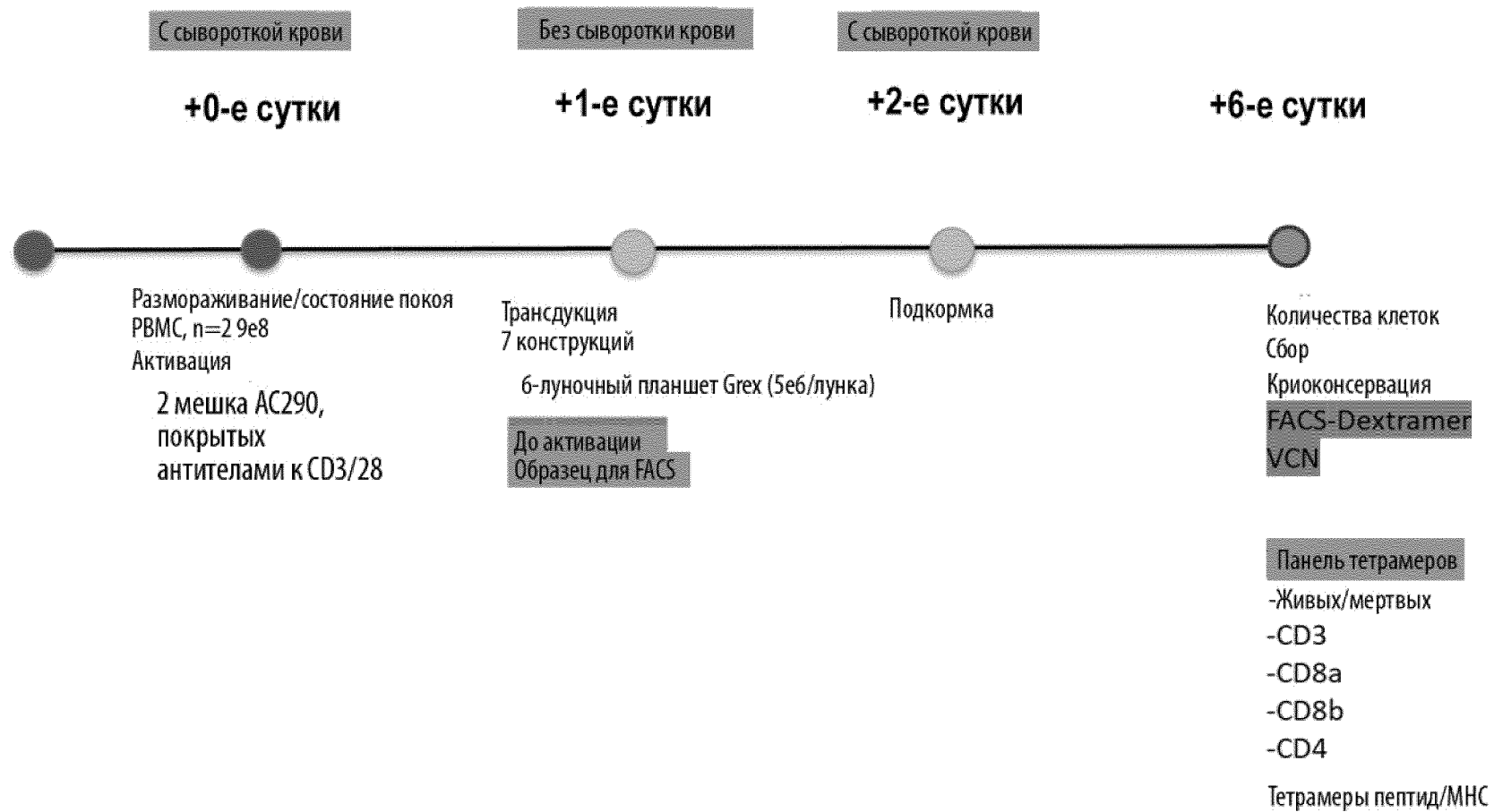


Фиг. 5А

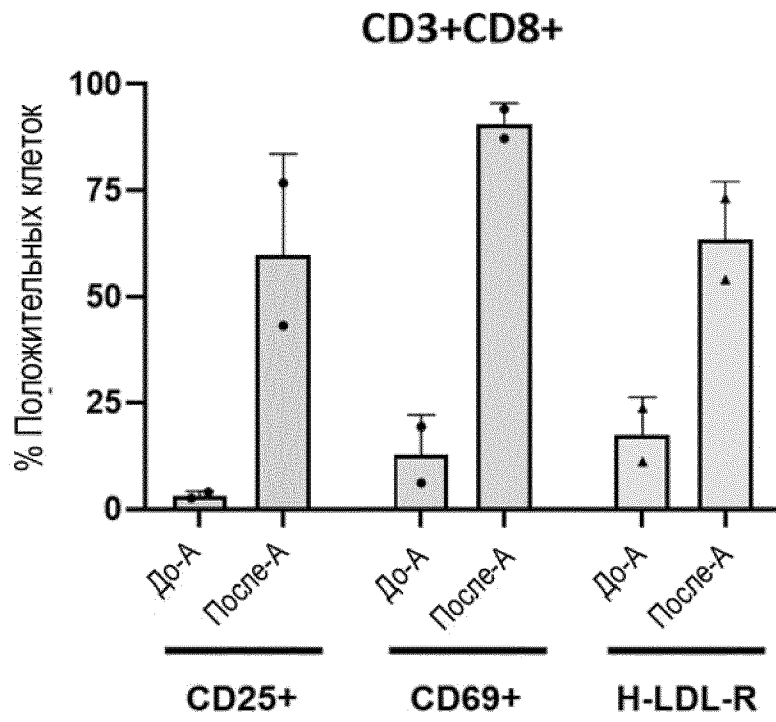
Вирусные титры



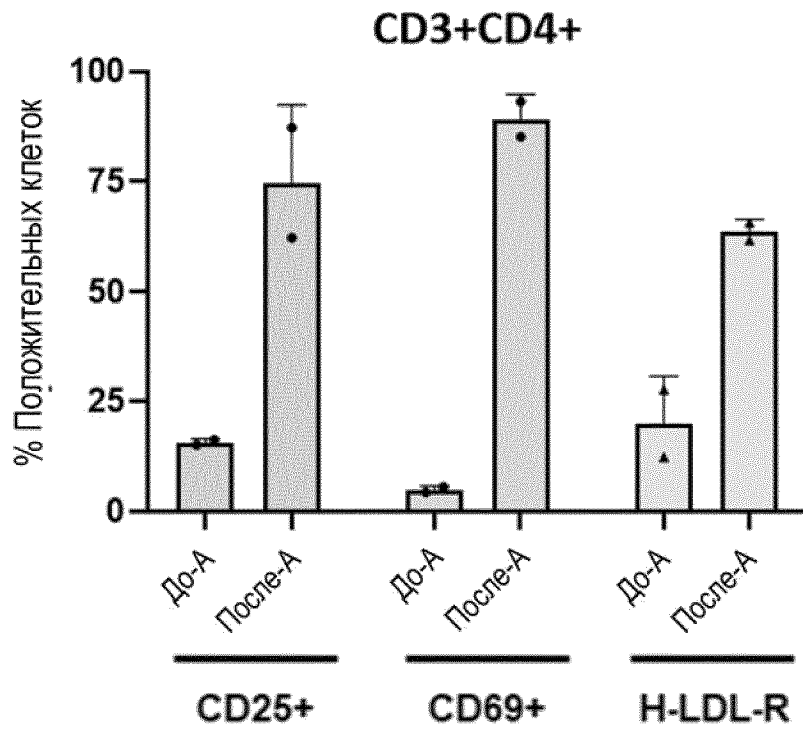
Фиг. 5В



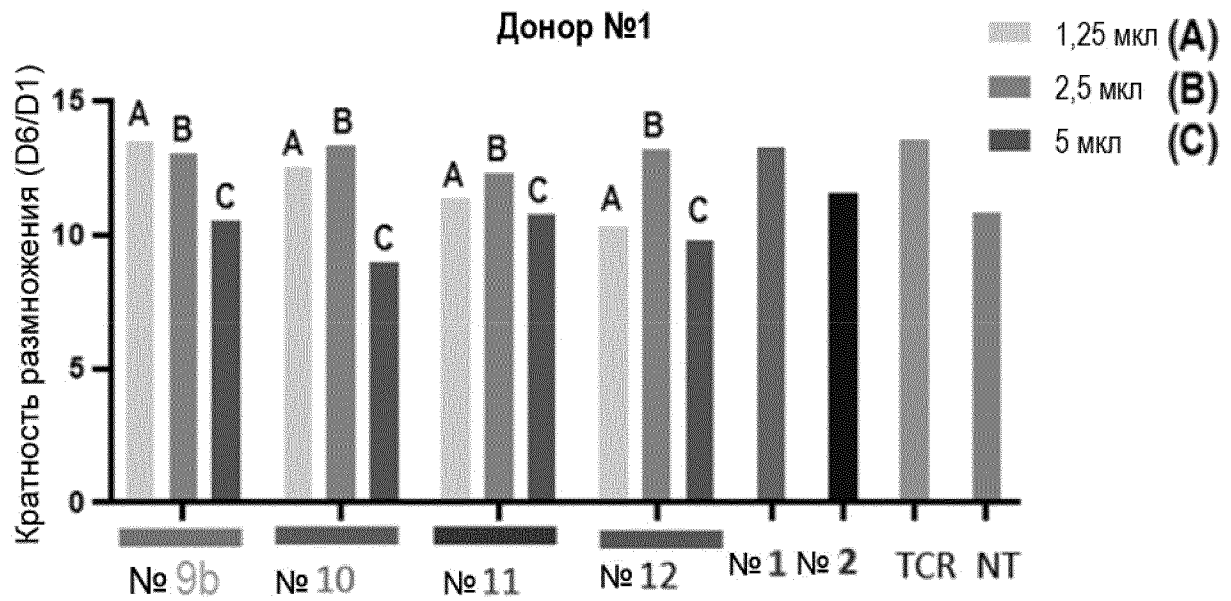
Фиг. 6



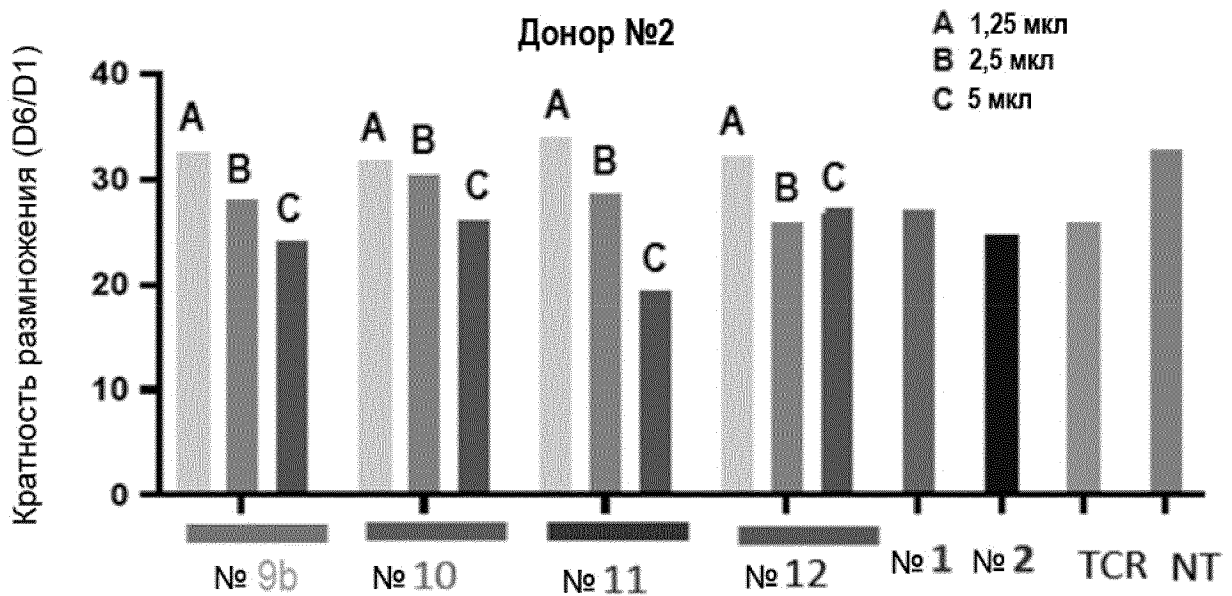
Фиг. 7А



Фиг. 7В

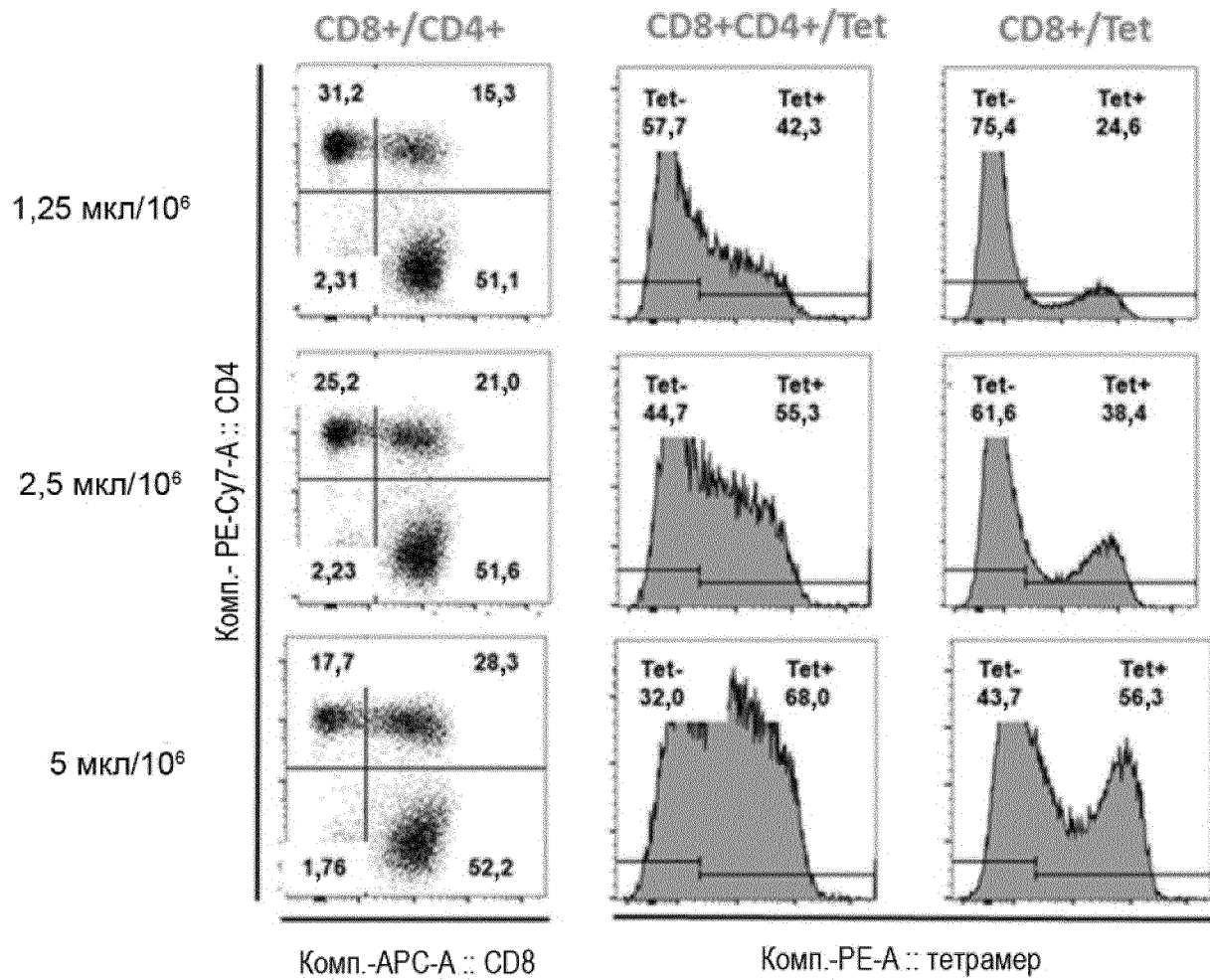


Фиг. 8А



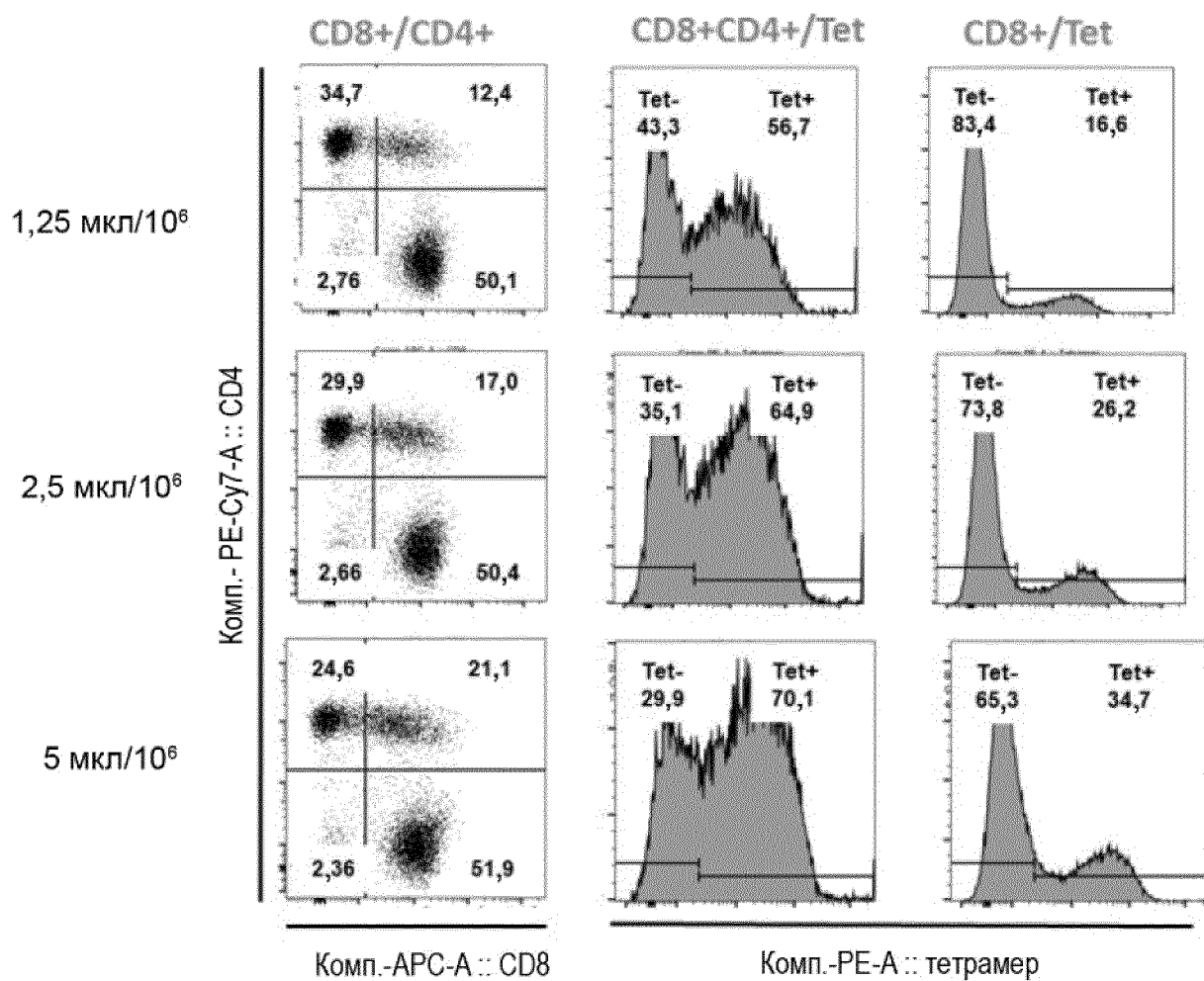
Фиг. 8В

Конструкция № 9b



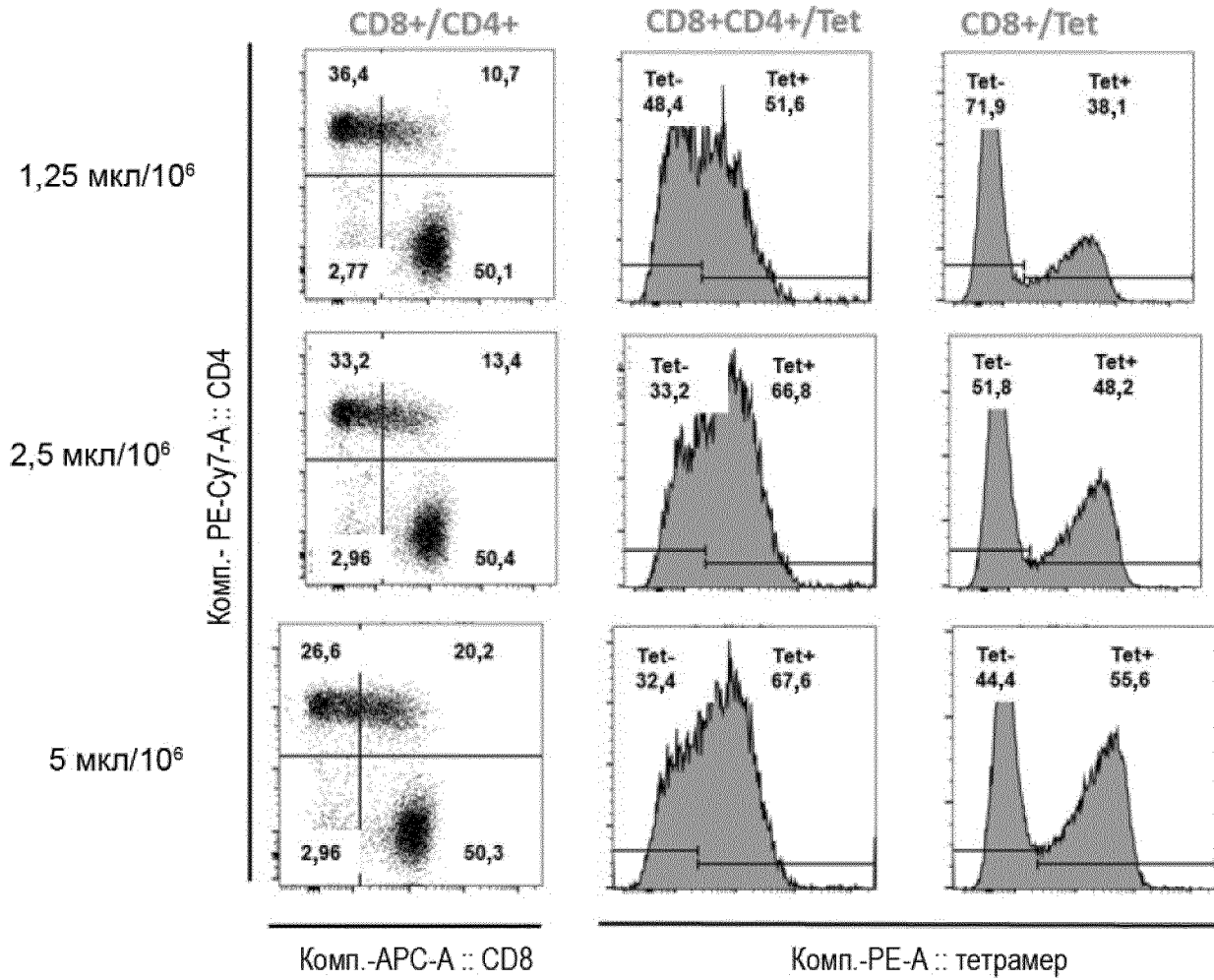
Фиг. 9А

Конструкция № 10



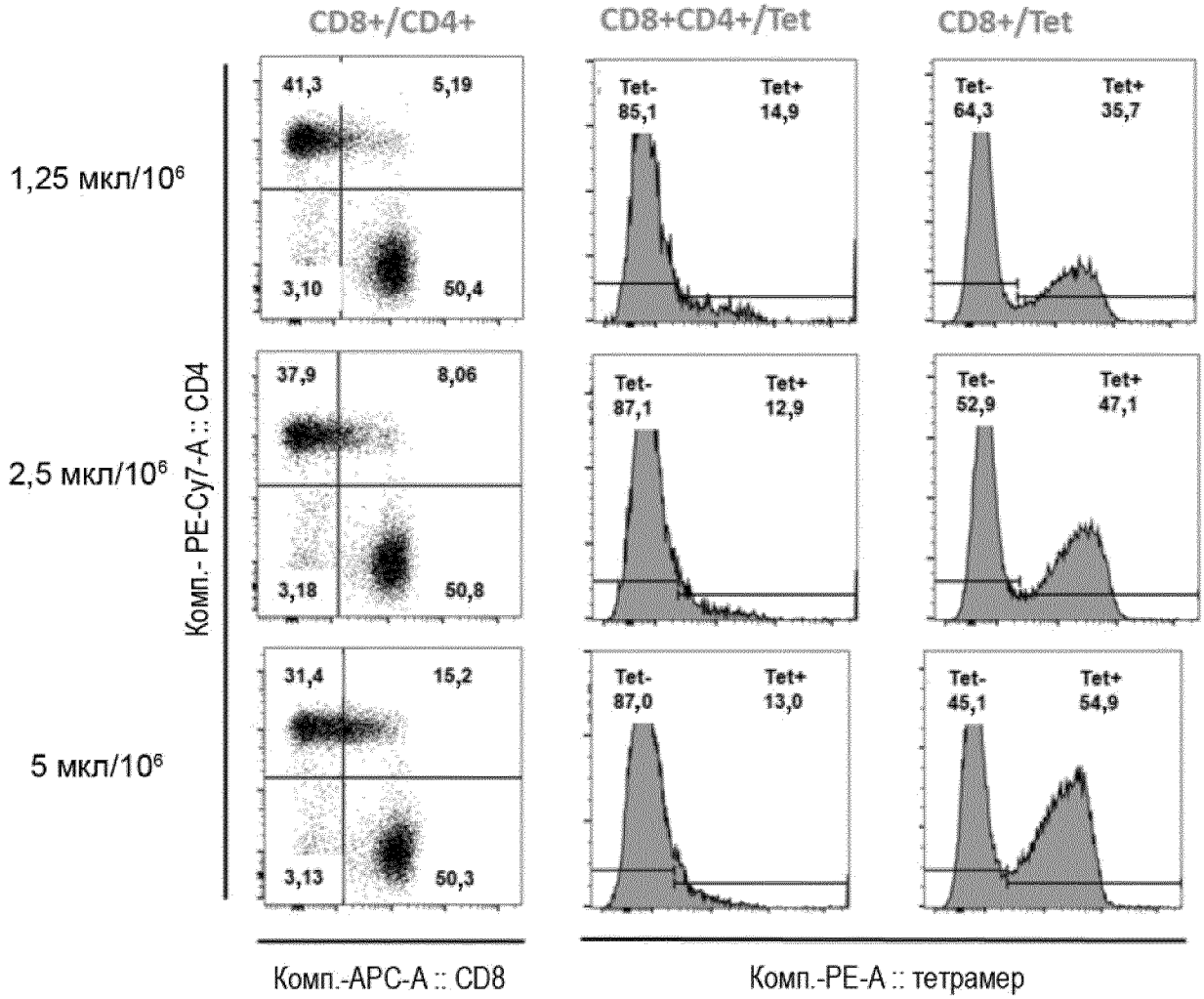
Фиг. 9В

Конструкция № 11

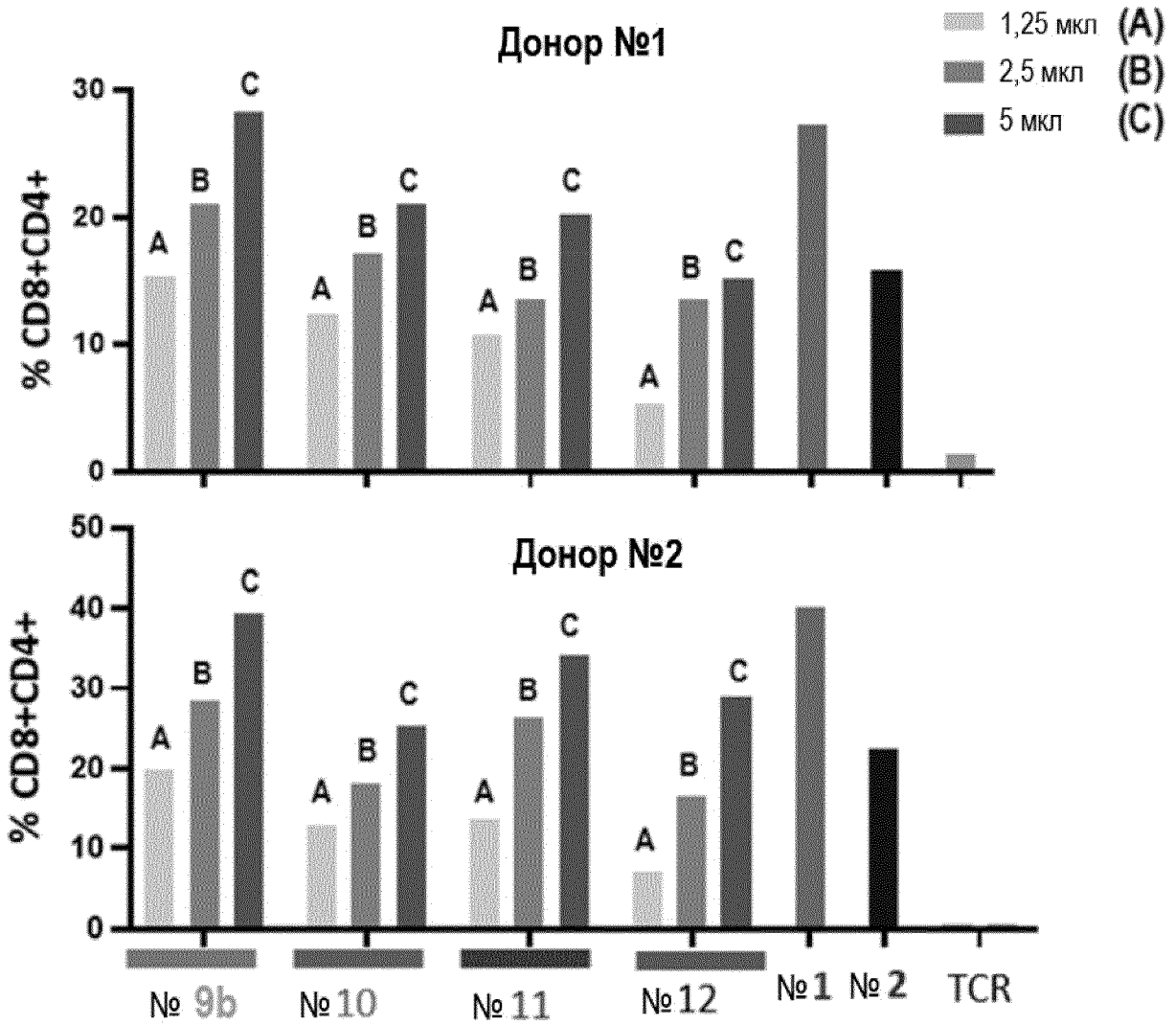


Фиг. 9С

Конструкция № 12

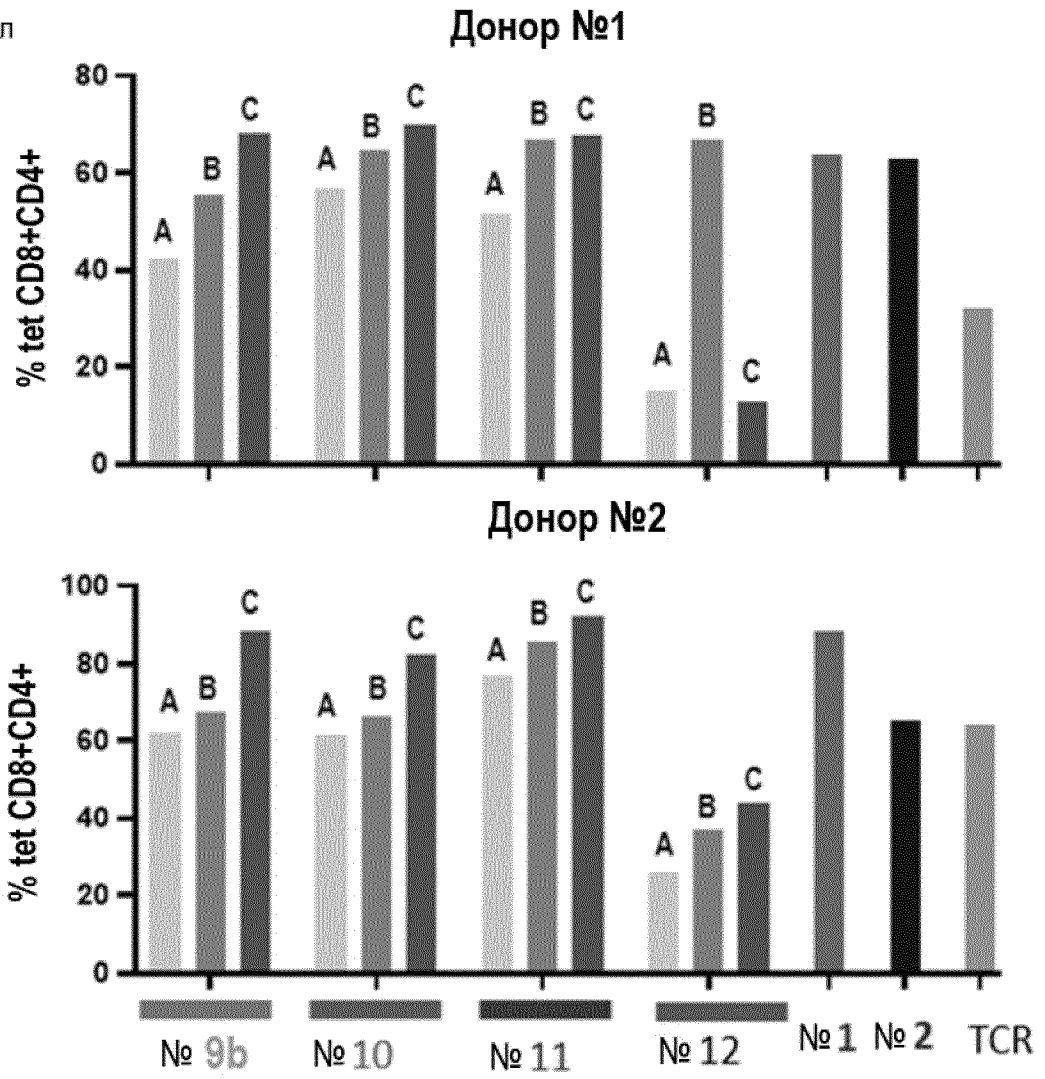


Фиг. 9D

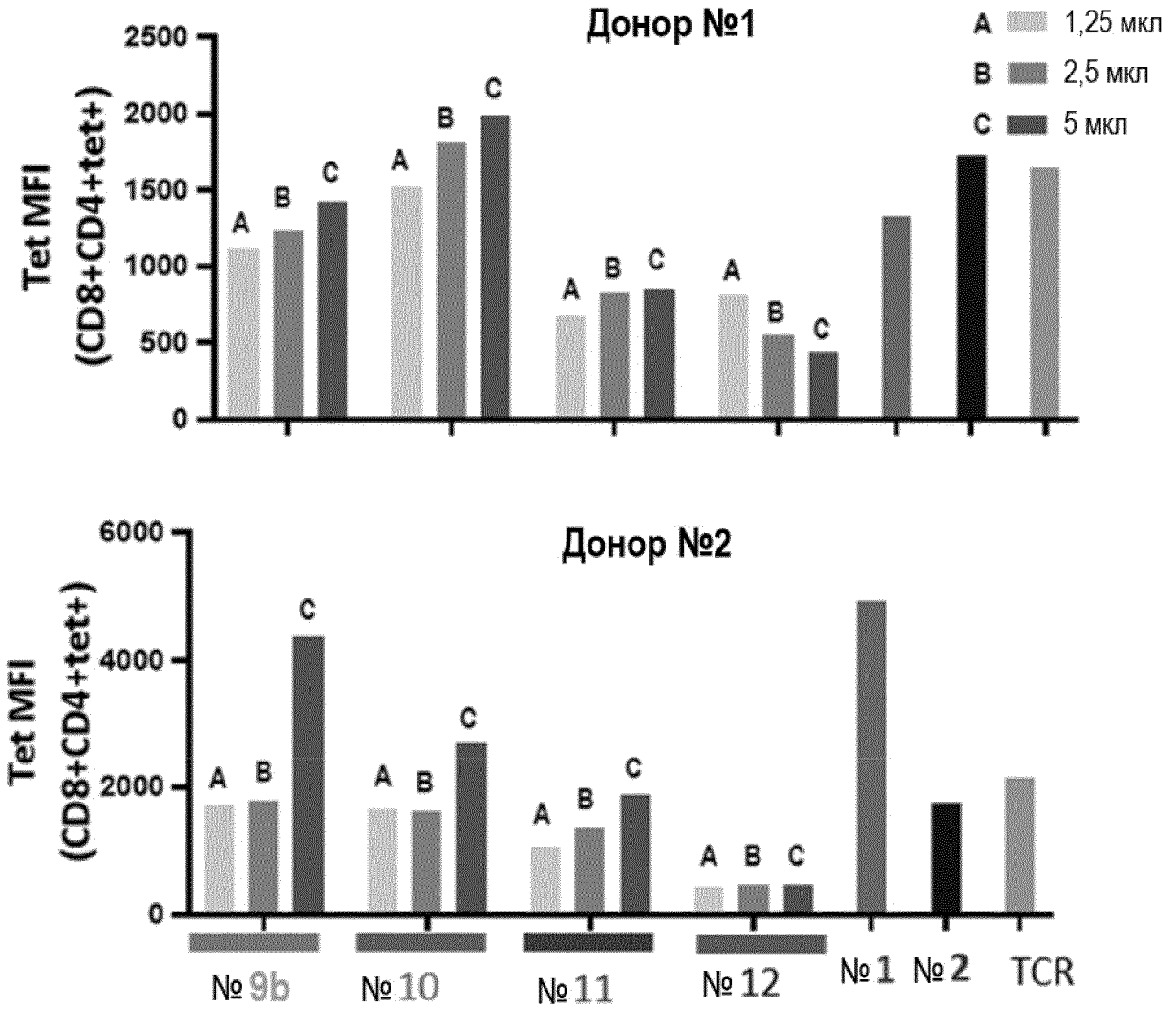


Фиг. 10

A 1,25 мкл
B 2,5 мкл
C 5 мкл

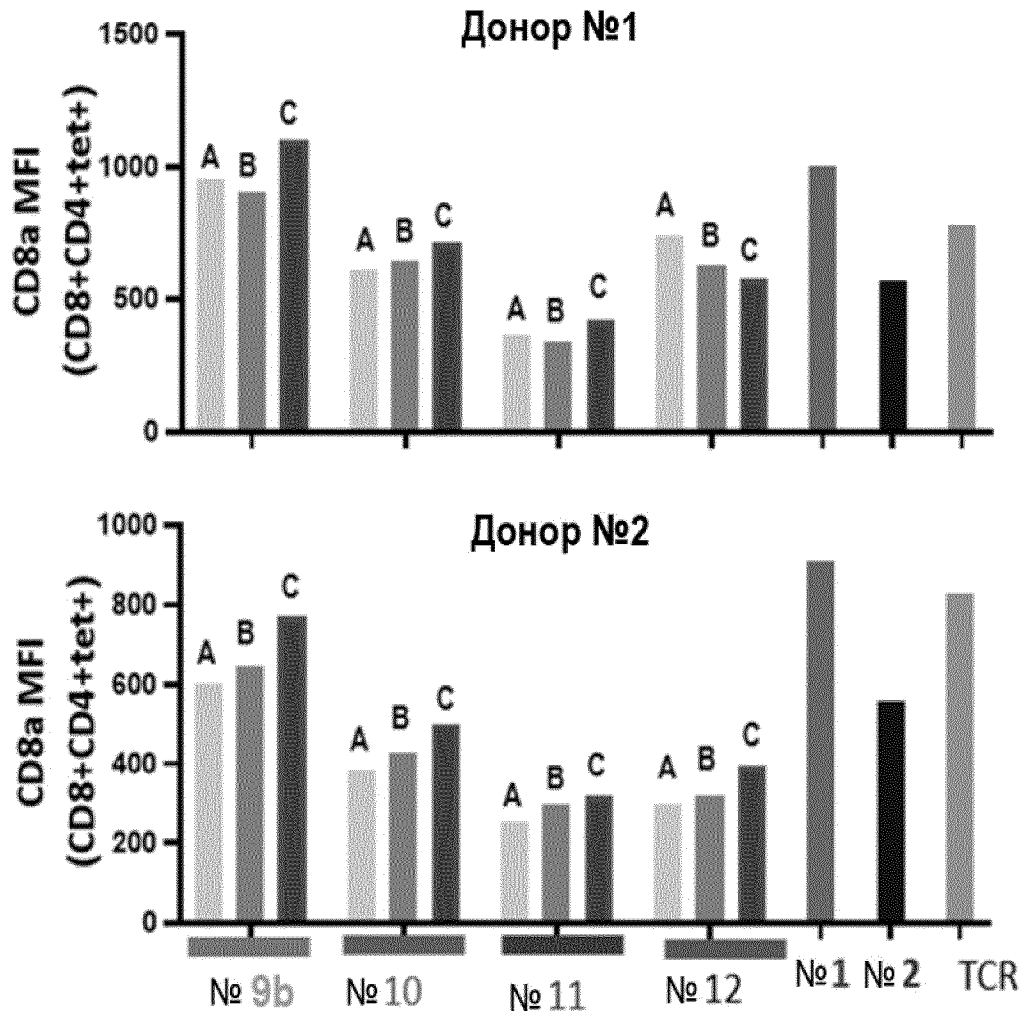


Фиг. 11

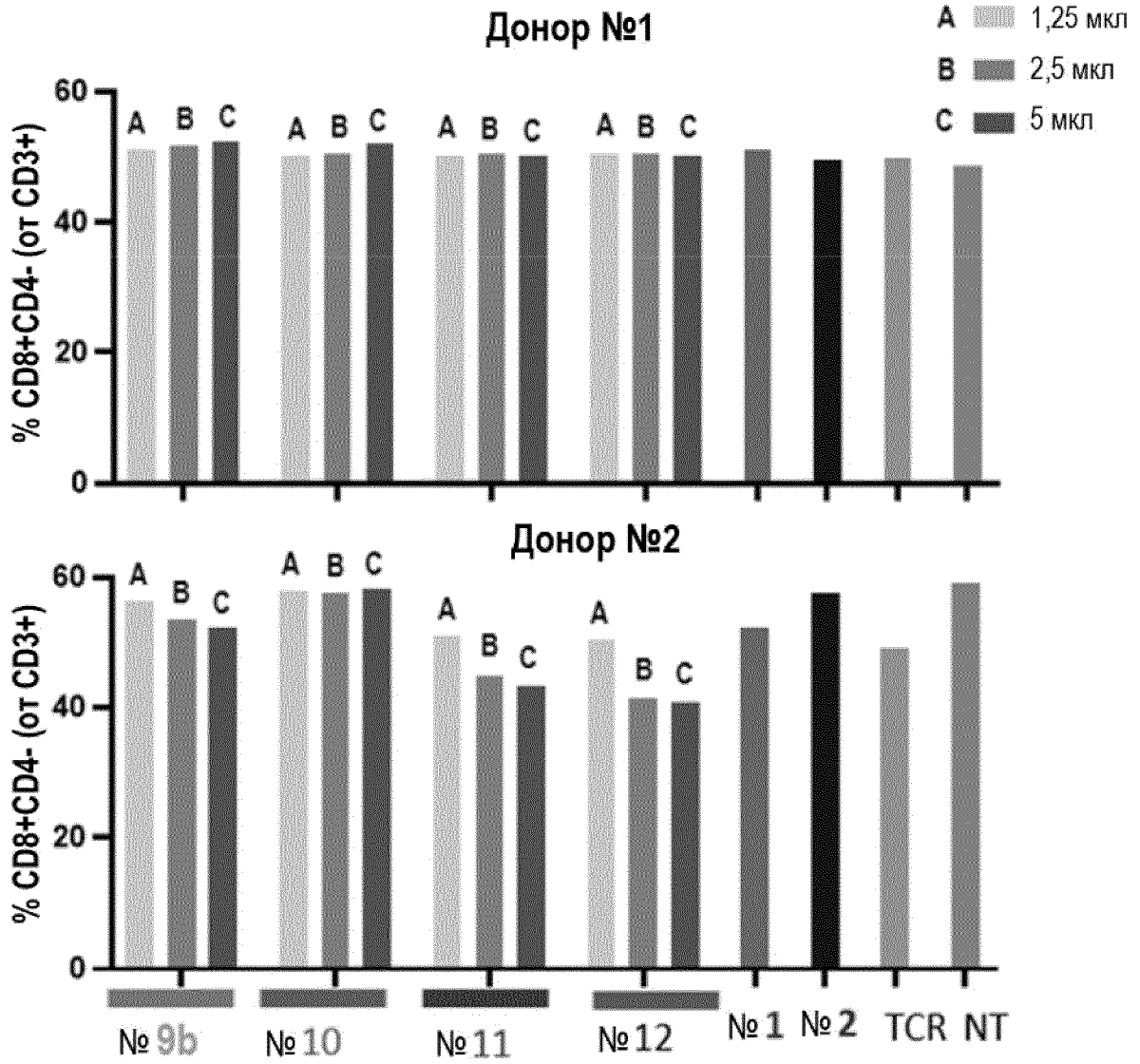


ФИГ. 12

1,25 мкл А
 2,5 мкл В
 5 мкл С

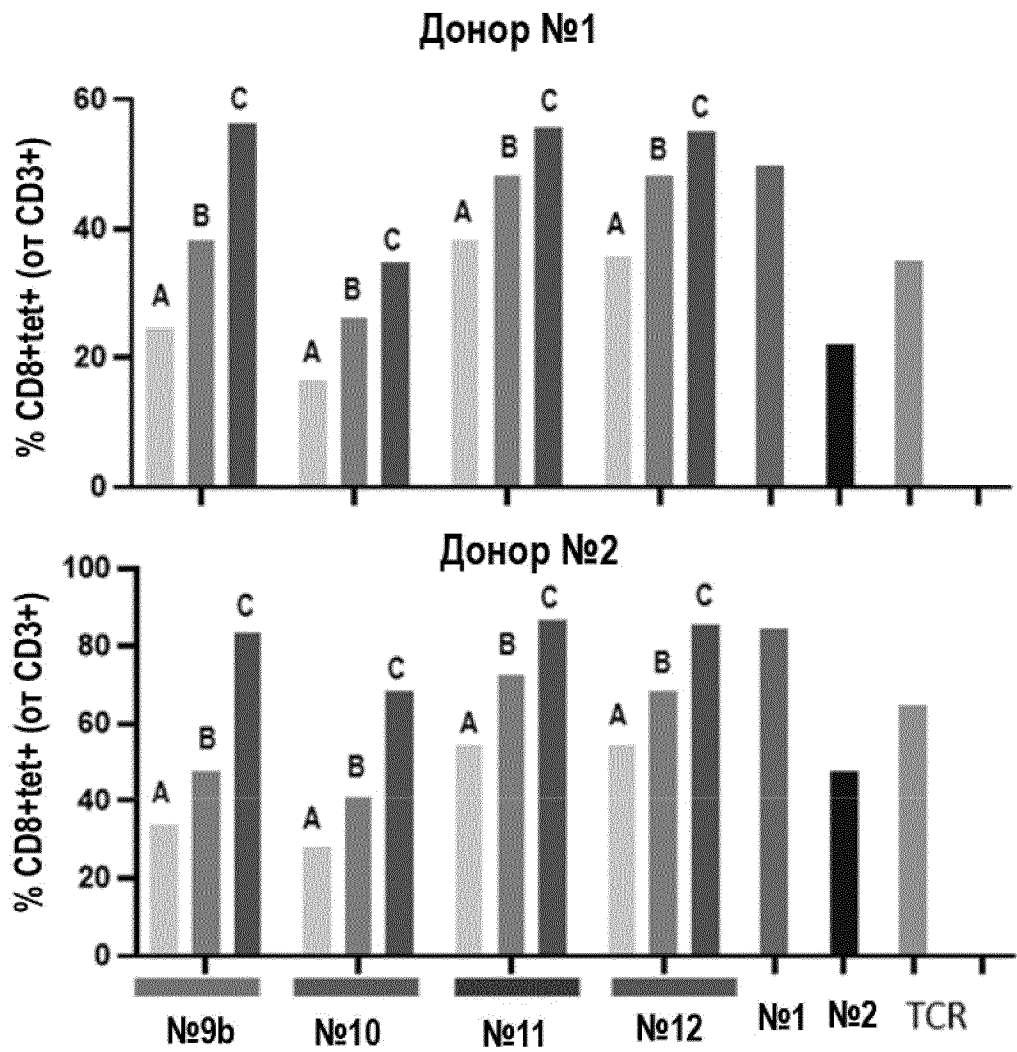


Фиг. 13

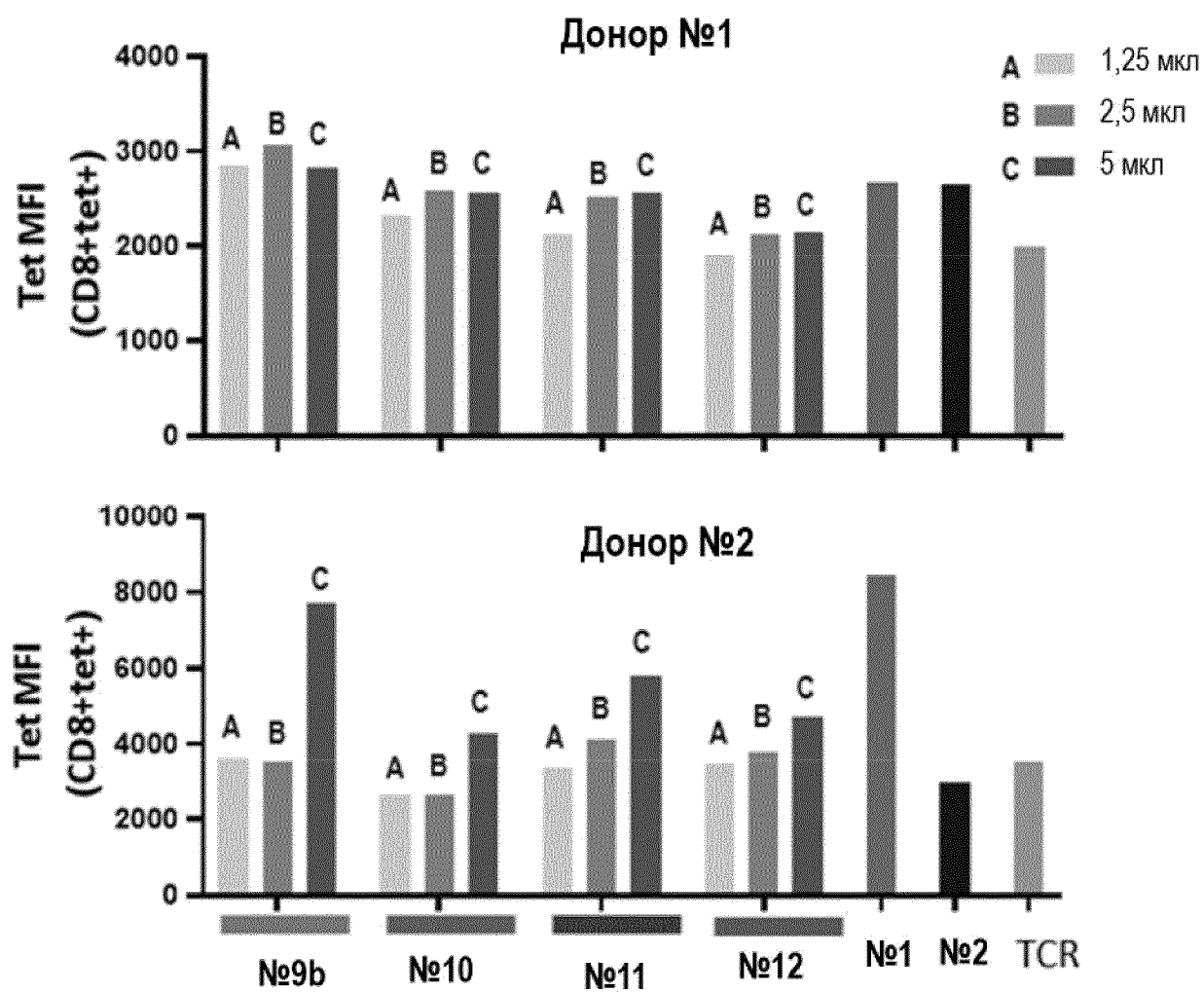


Фиг. 14

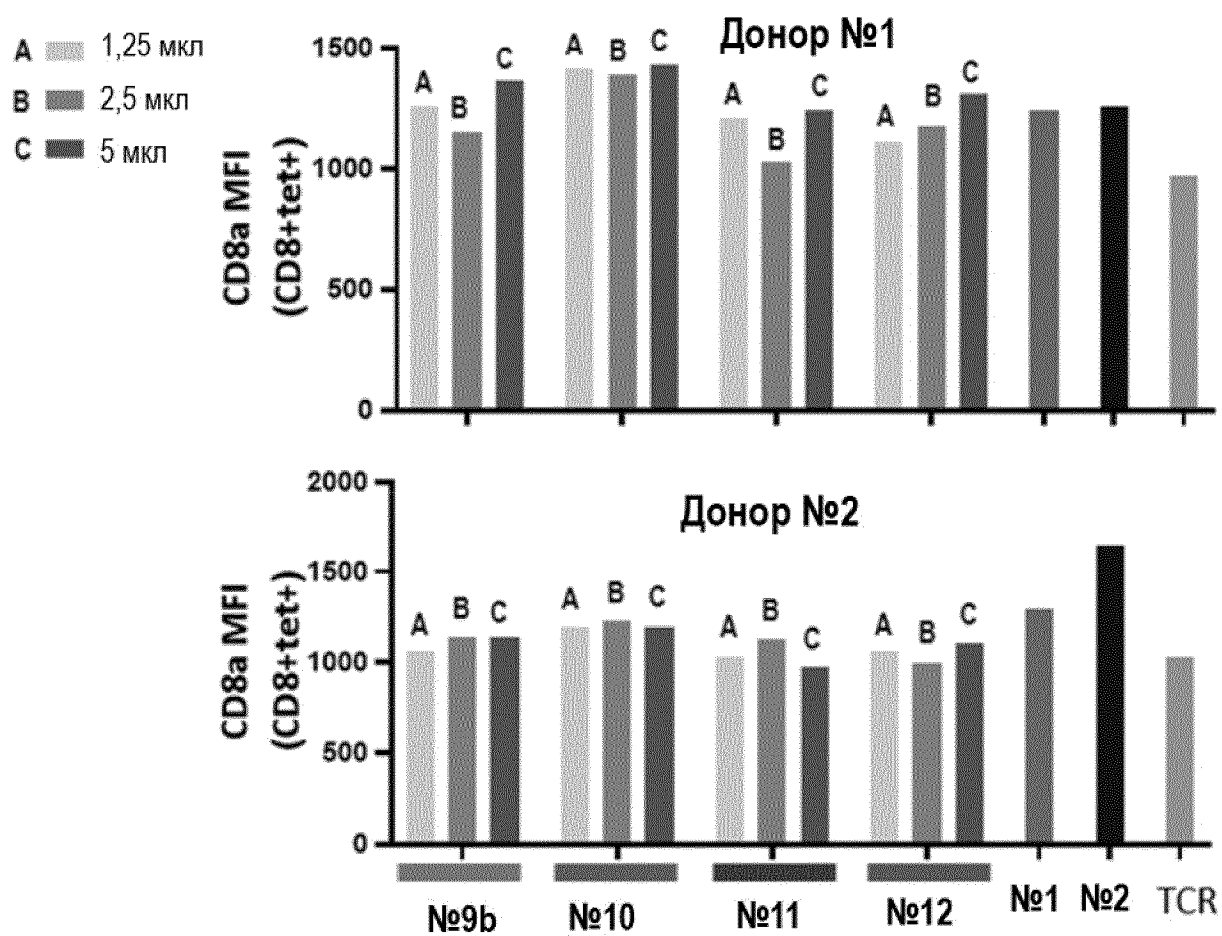
A 1,25 мкл
 B 2,5 мкл
 C 5 мкл



Фиг. 15

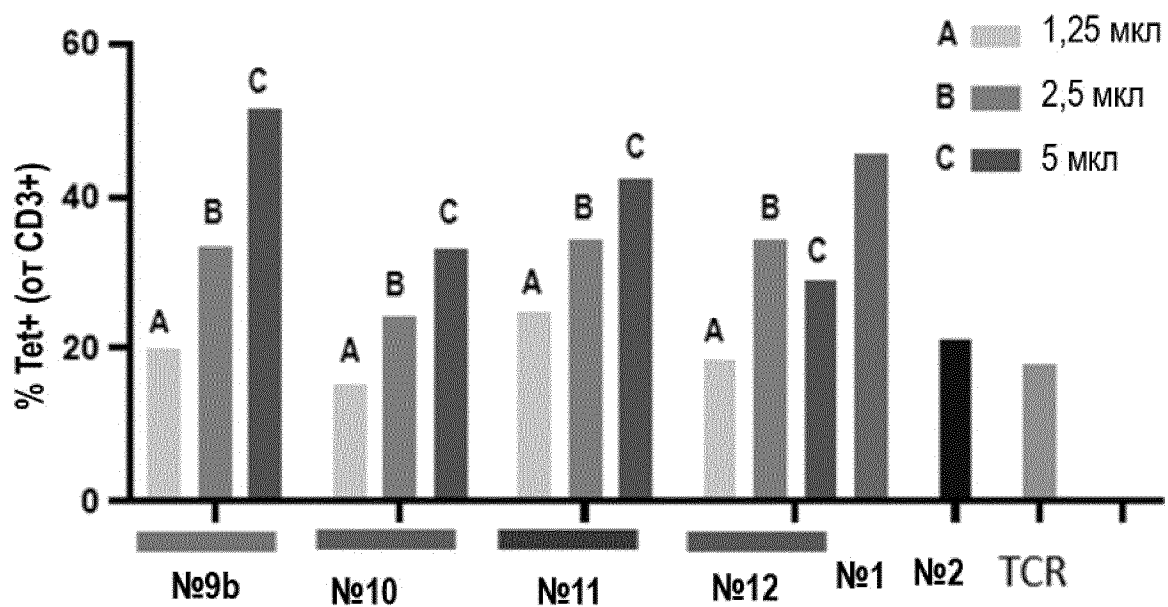


Фиг. 16

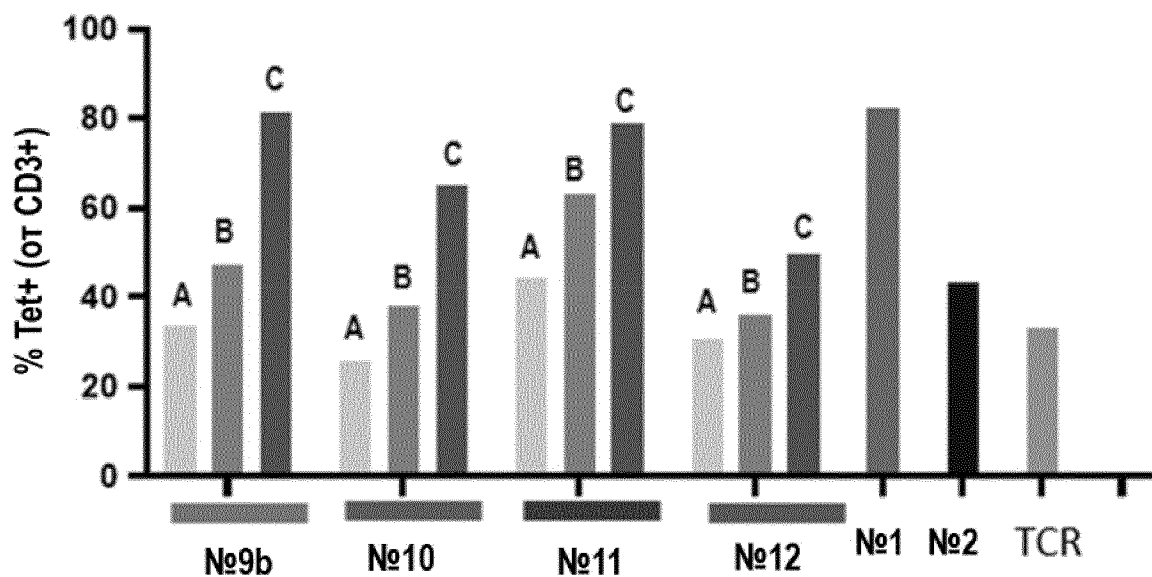


Фиг. 17

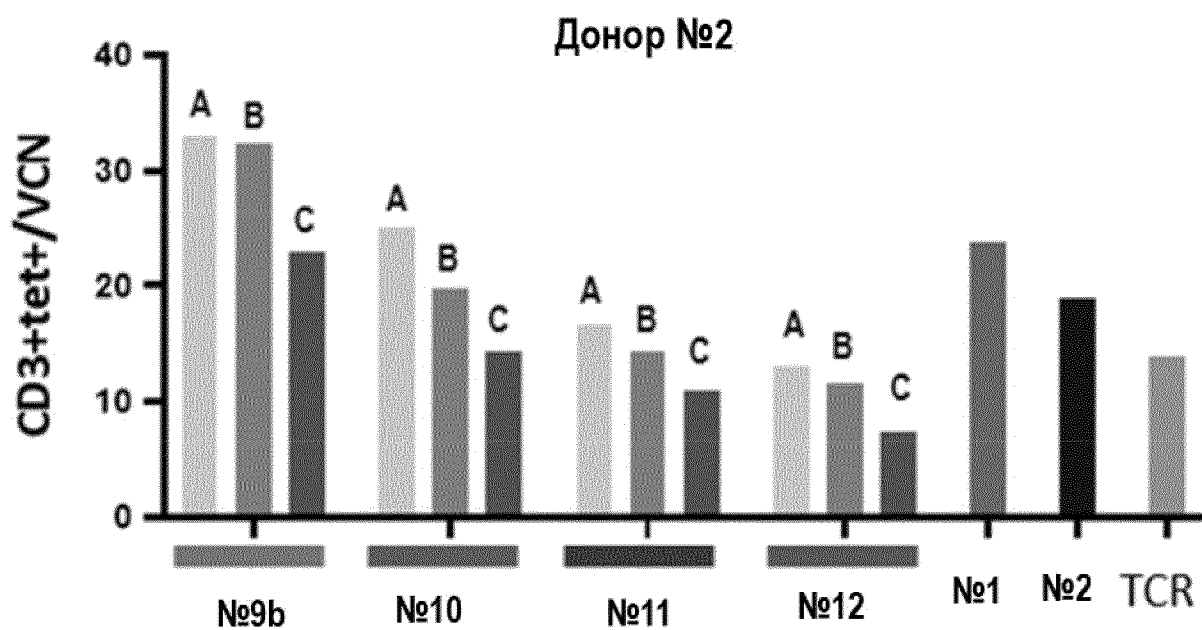
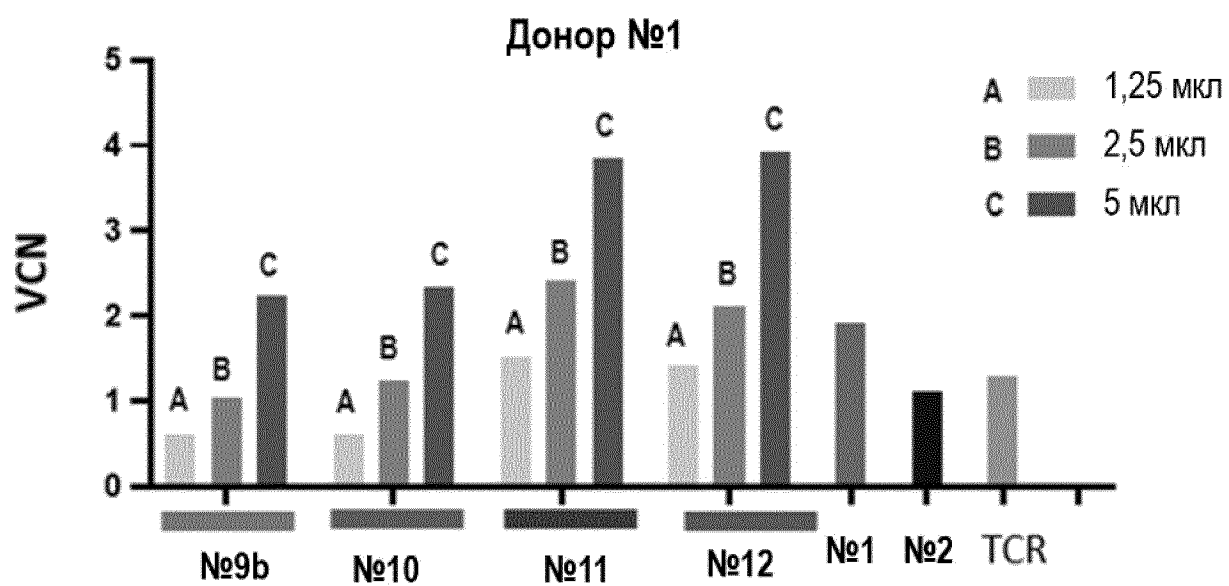
Донор №1



Донор №2

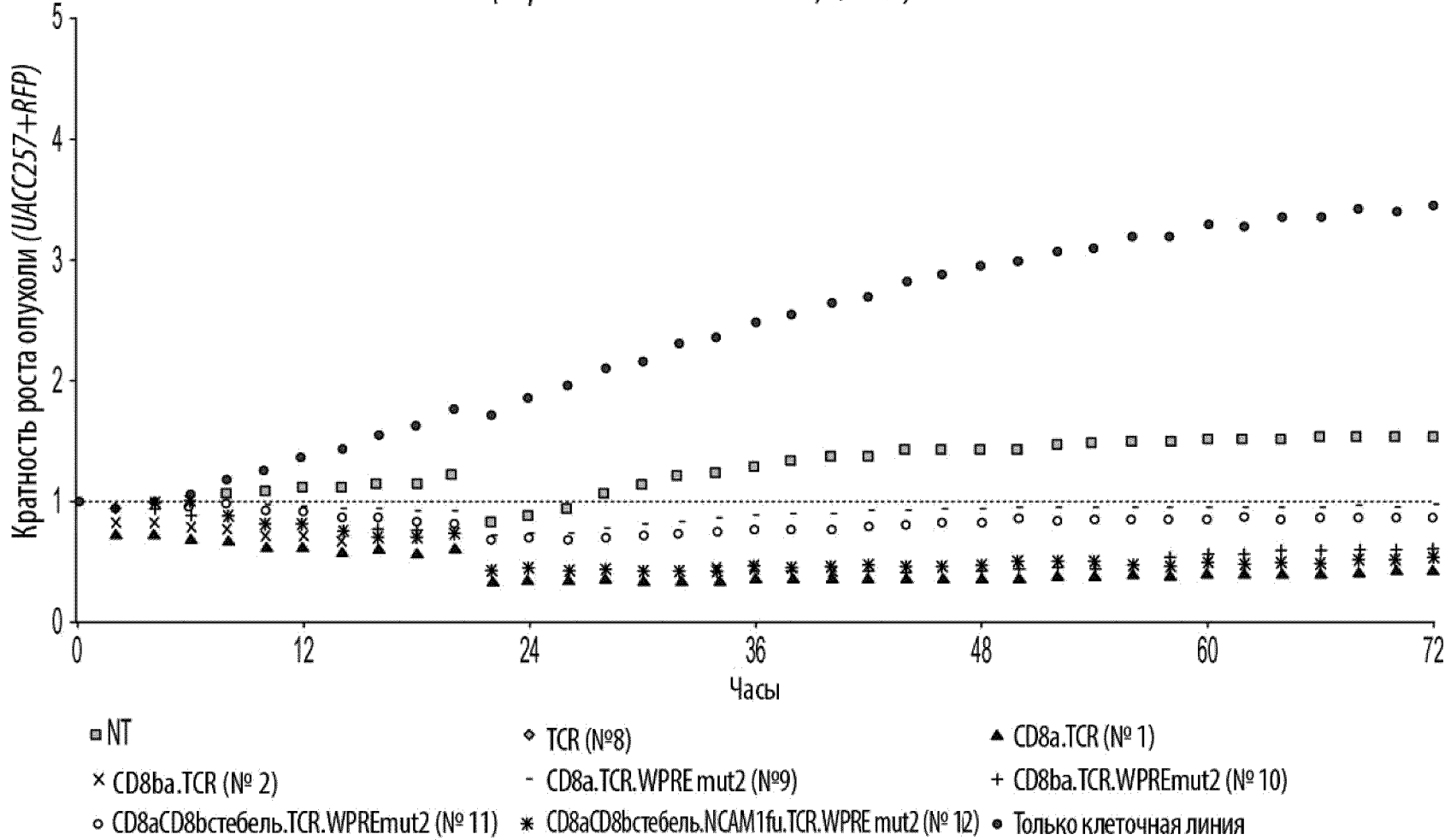


Фиг. 18



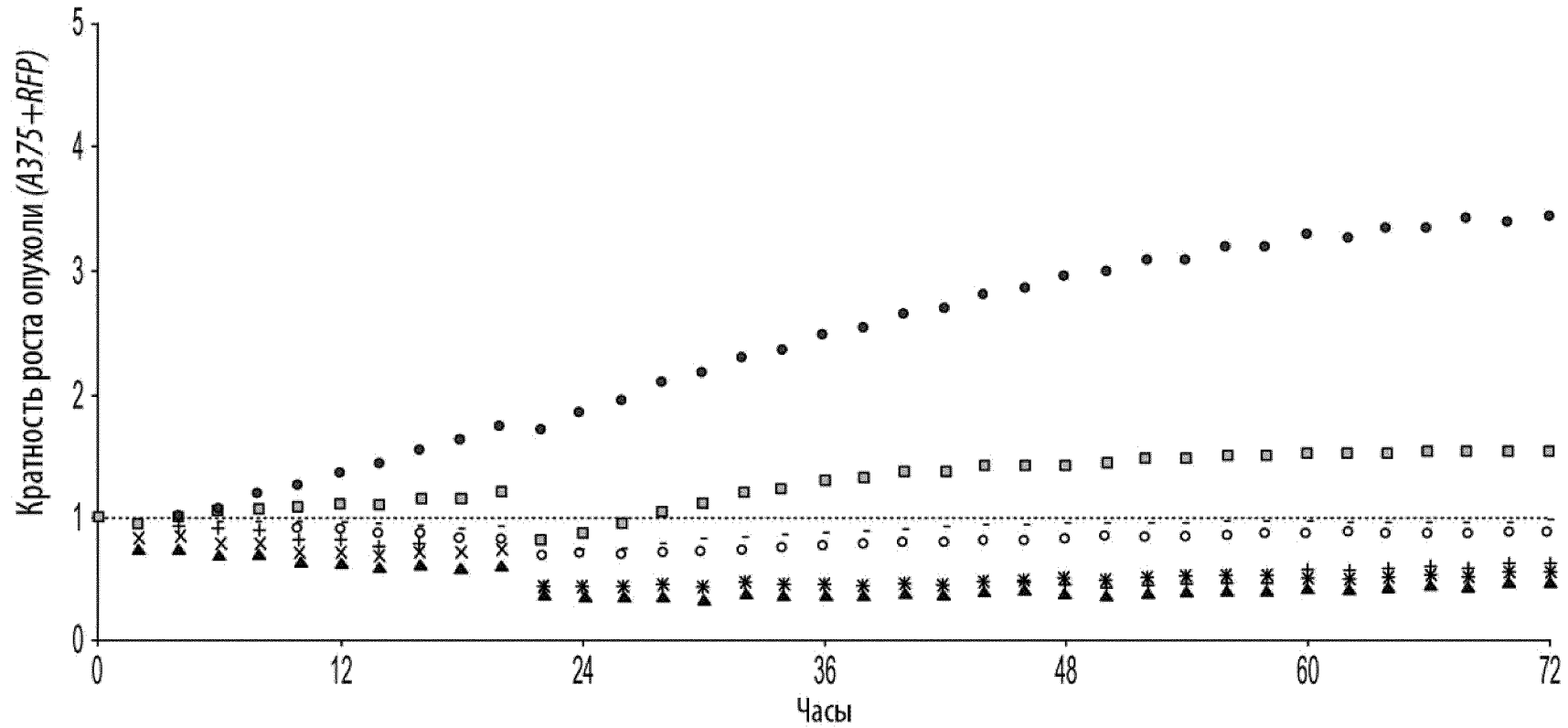
Фиг. 19

D150081 PBMС/UACC257
(нормализованные по TCR+, E/T 4:1)



Фиг. 20А

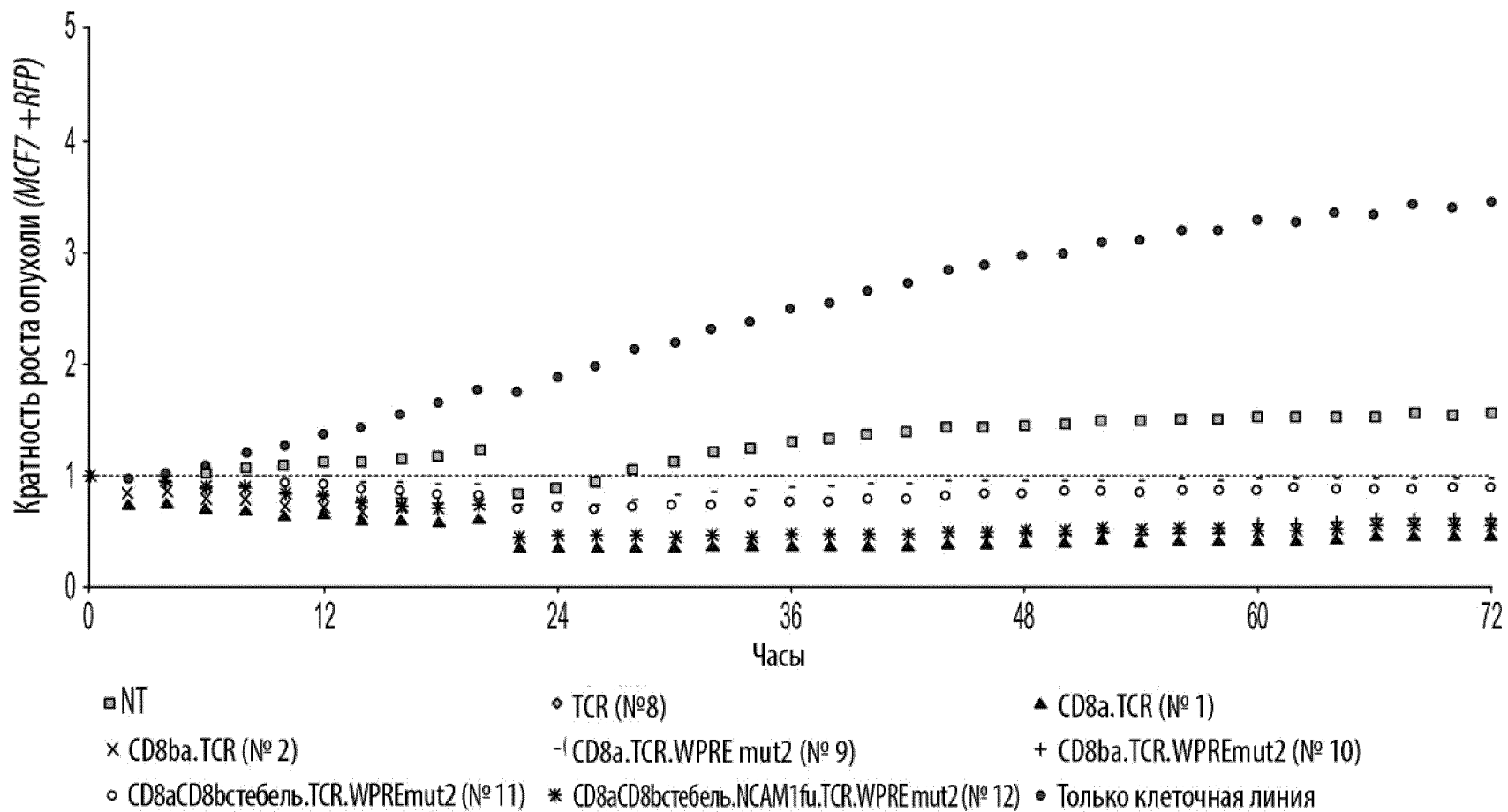
D150081 PBMС/A375
 (нормализованные по TCR+, E/T 4:1)



- NT
- × CD8ba.TCR (№ 2)
- CD8aCD8bстепель.TCR.WPRE mut2 (№ 11)
- ◇ TCR (№ 8)
- ◡ CD8a.TCR.WPRE mut2 (№ 9)
- * CD8aCD8bстепель.NCAM1fu.TCR.WPRE mut2 (№ 12)
- ▲ CD8a.TCR (№ 1)
- + CD8ba.TCR.WPRE mut2 (№ 10)
- Только клеточная линия

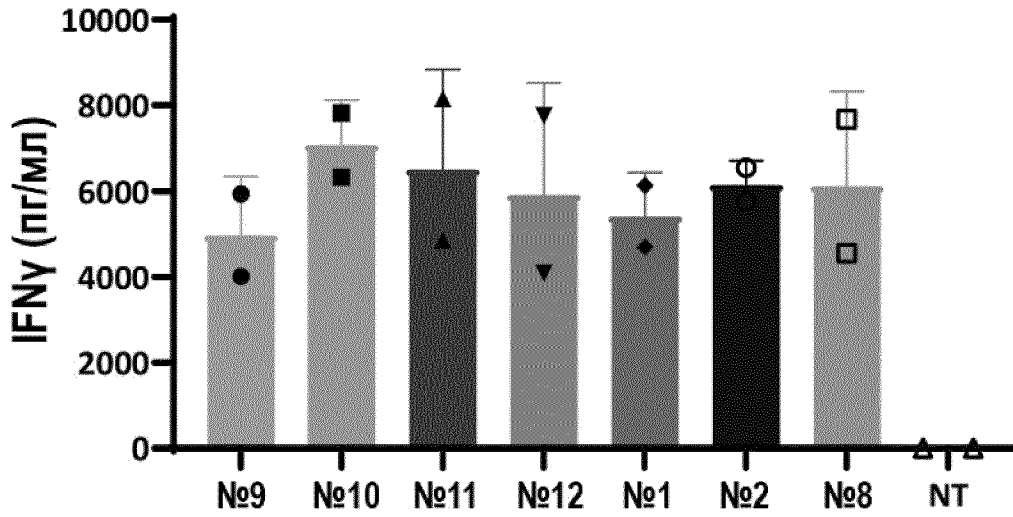
Фиг. 20B

D150081 PBMС/MCF7
 (нормализованные по TCR+, E/T 4:1)



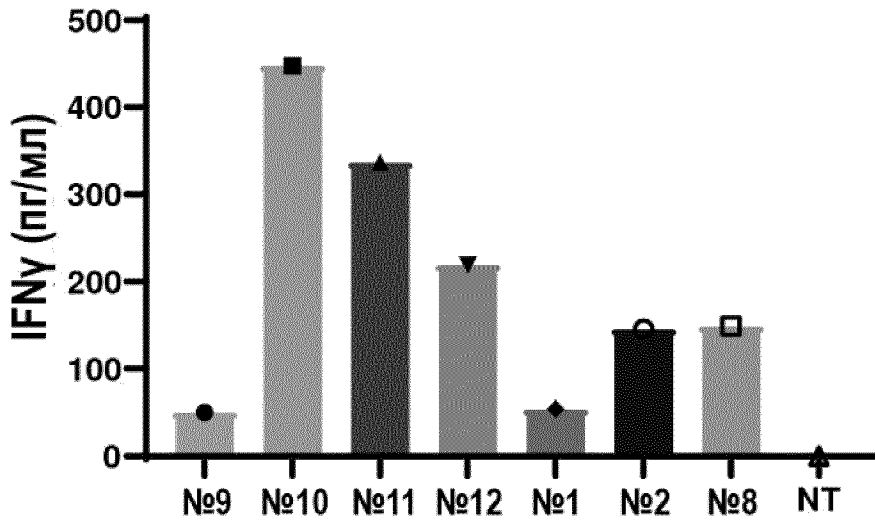
Фиг. 20С

UACC257
(E: T::4:1)

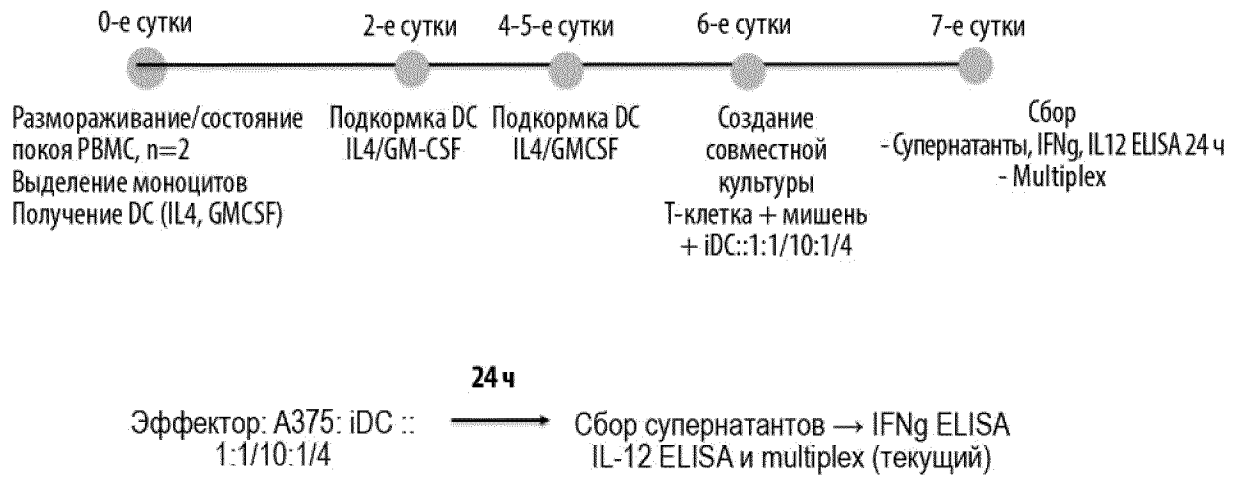


Фиг. 21А

A375
E: T::4:1

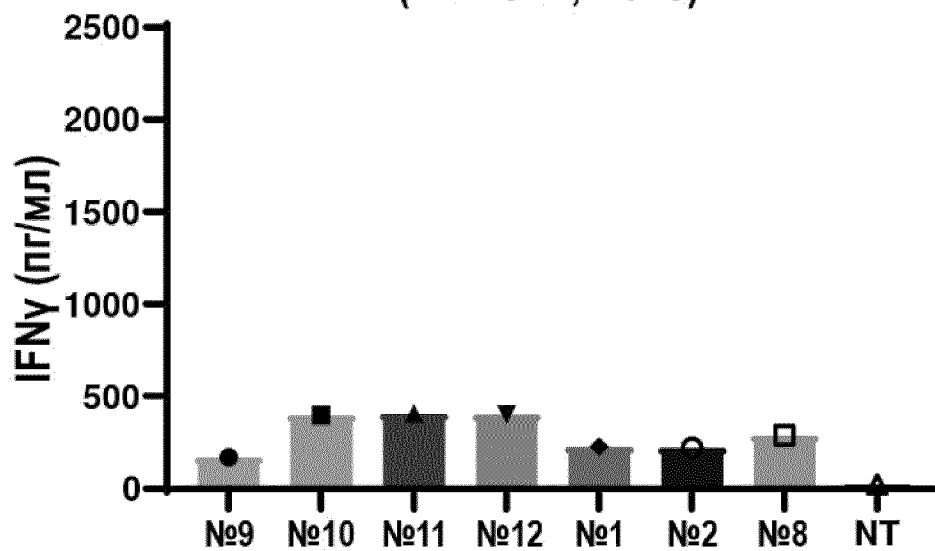


Фиг. 21В



Фиг. 22

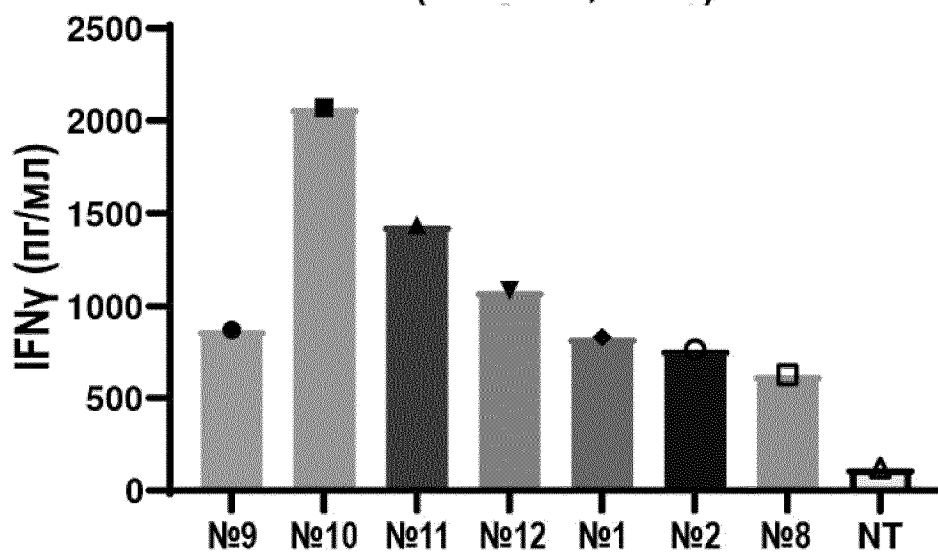
E: T ::1:1/10
(Мишень; А375)



E + T

Фиг. 23А

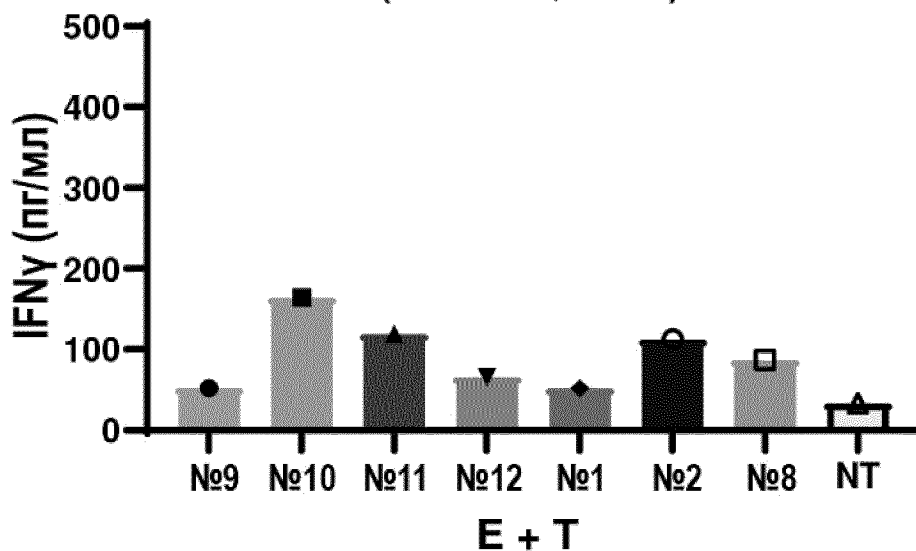
E: T:DC ::1:1/10:1/4
(Мишень; А375)



E + T + iDC

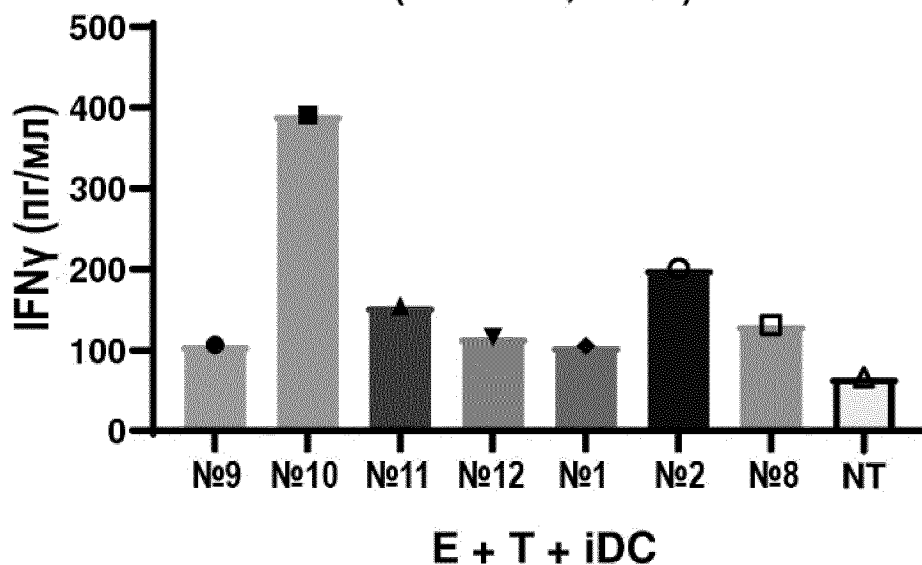
Фиг. 23В

E: T:DC ::1:1/10
(Мишень; A375)



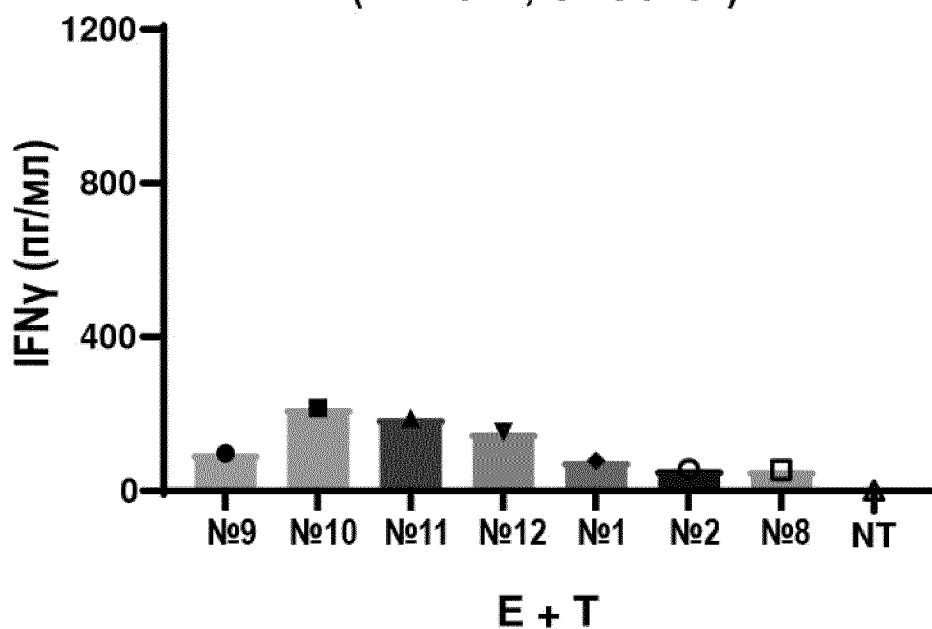
Фиг. 24А

E: T:DC ::1:1/10:1/4
(Мишень; A375)



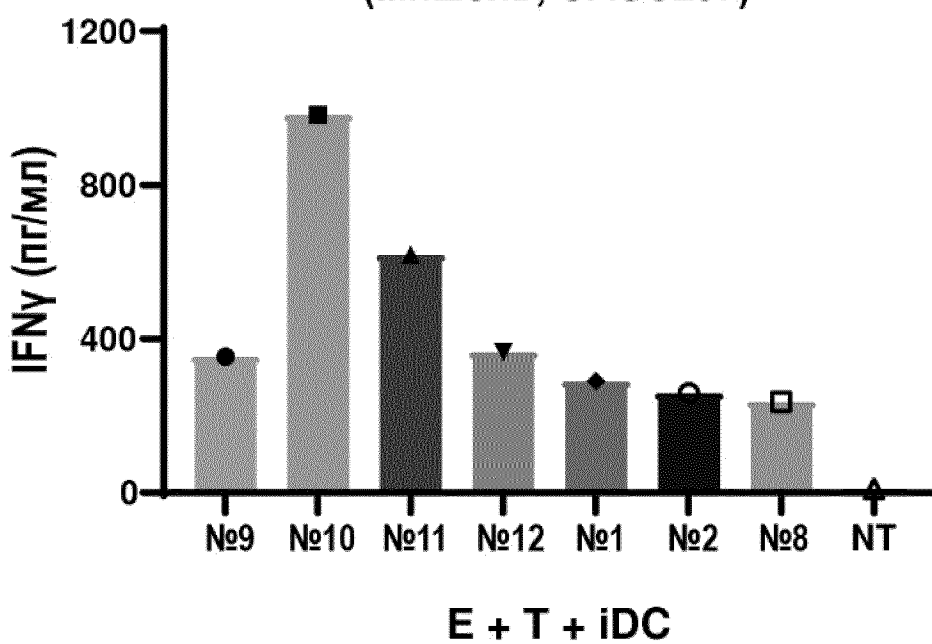
Фиг. 24В

E: T::1:1/10
(Мишень; UACC257)



Фиг. 25А

E: T:DC ::1:1/10:1/4
(Мишень; UACC257)

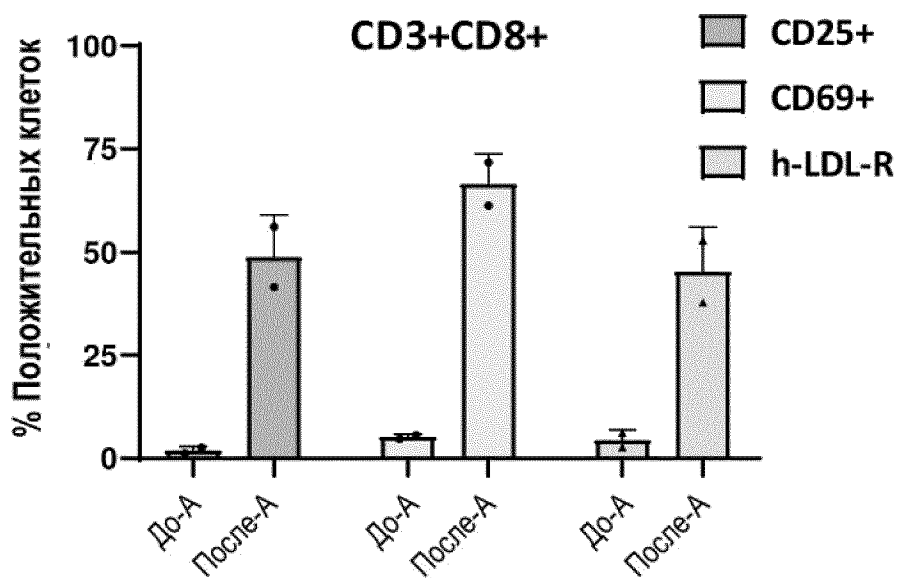


Фиг. 25В

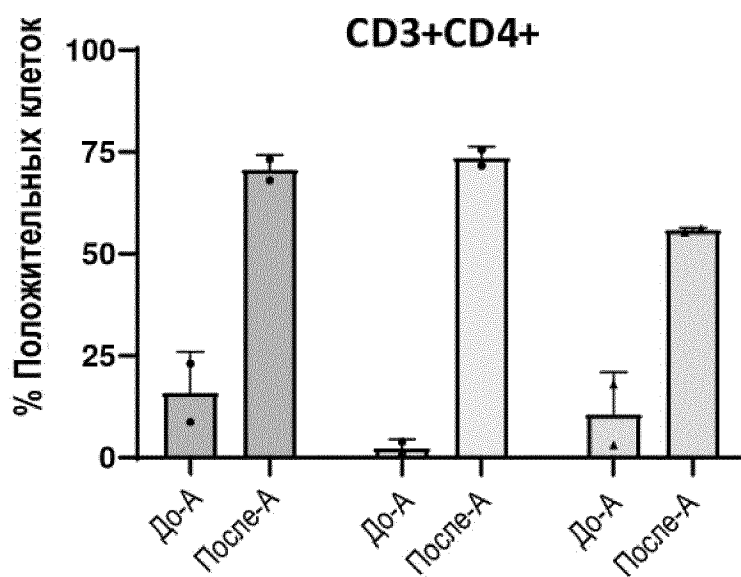


32/98

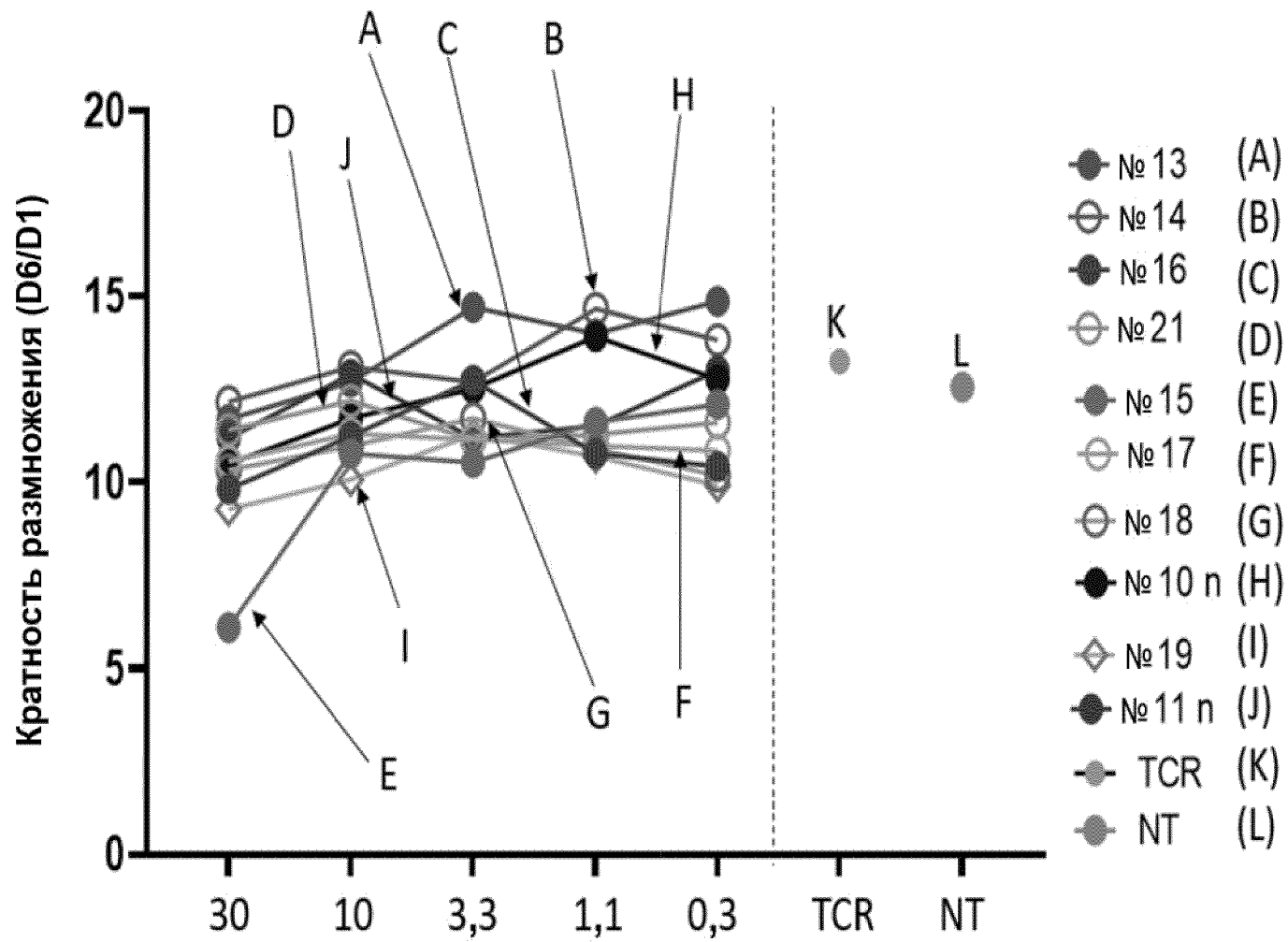
Фиг. 26



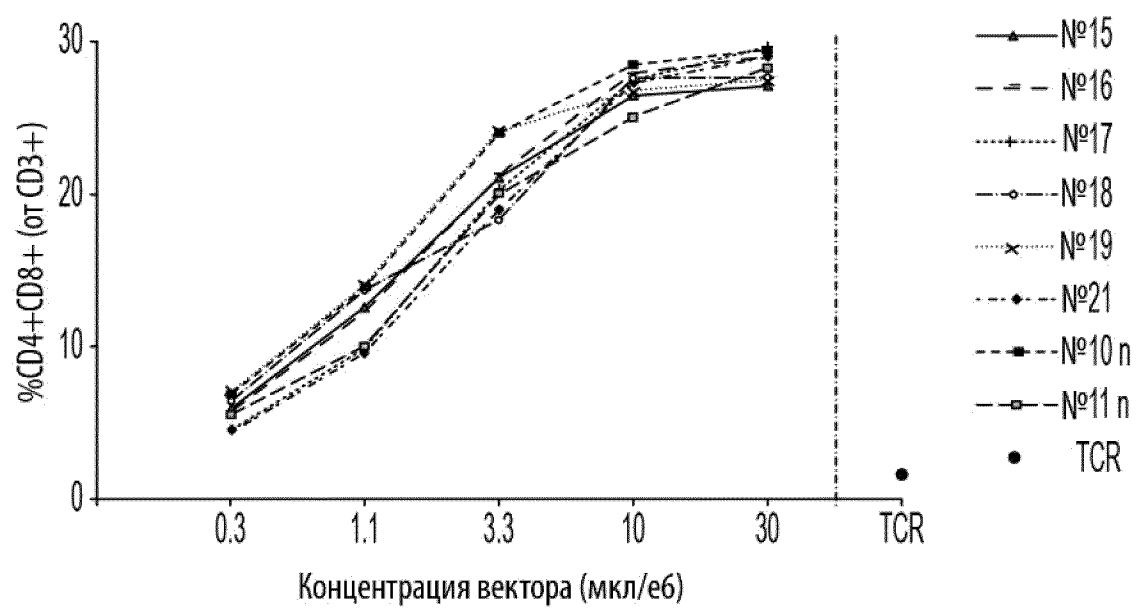
Фиг. 27А



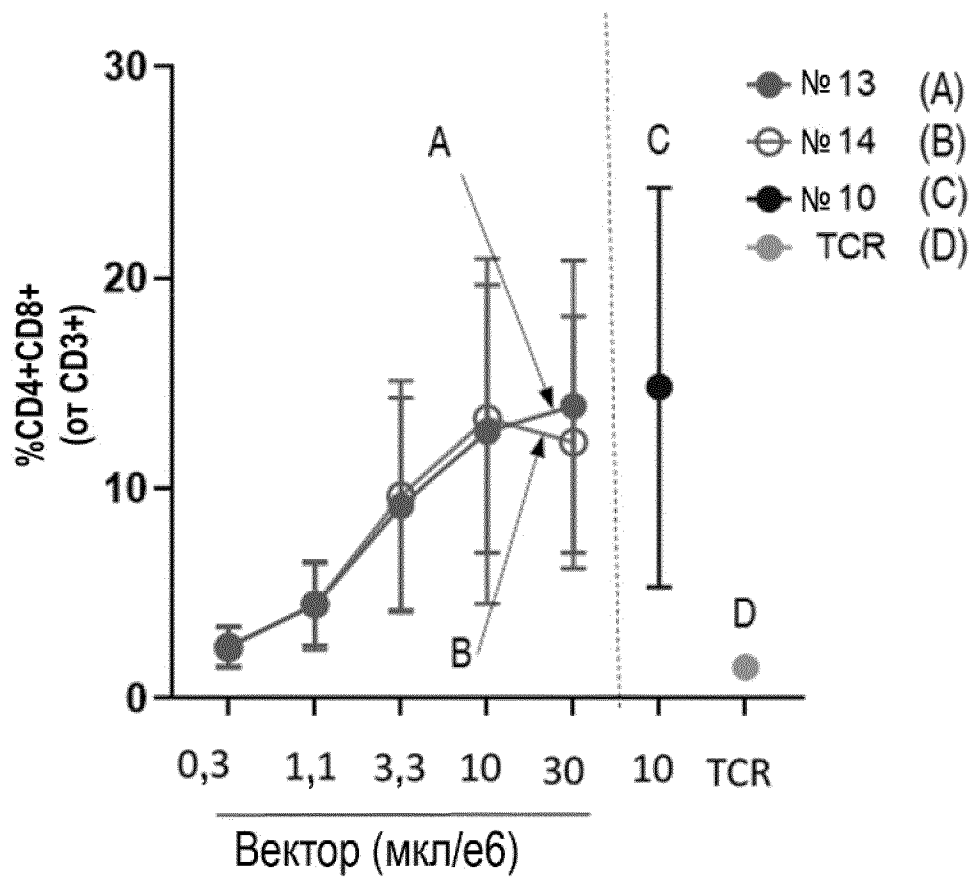
Фиг. 27В



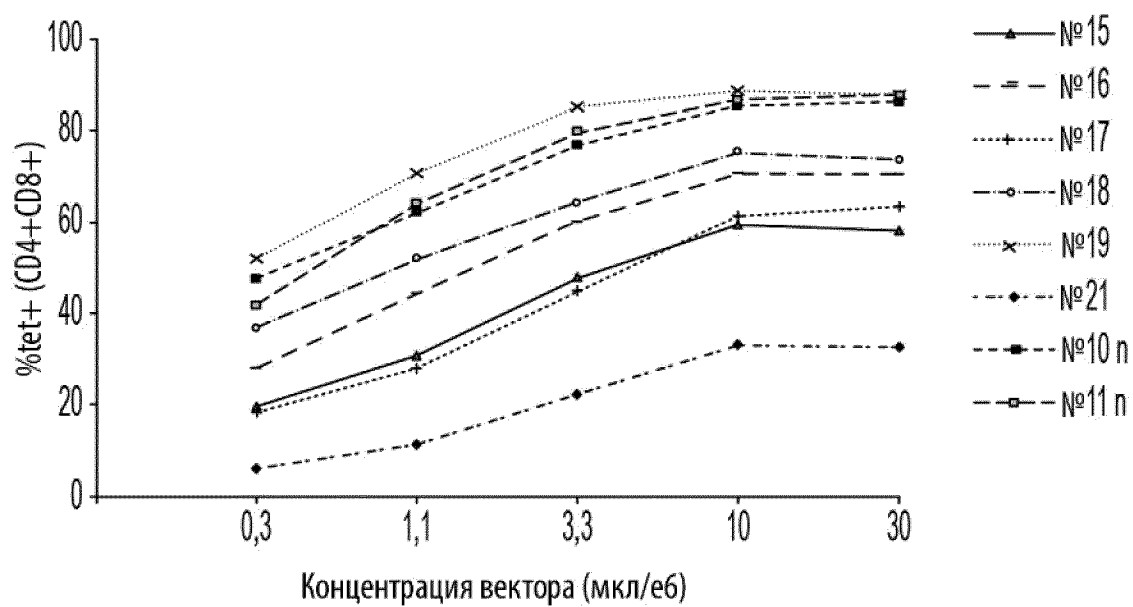
Фиг. 28



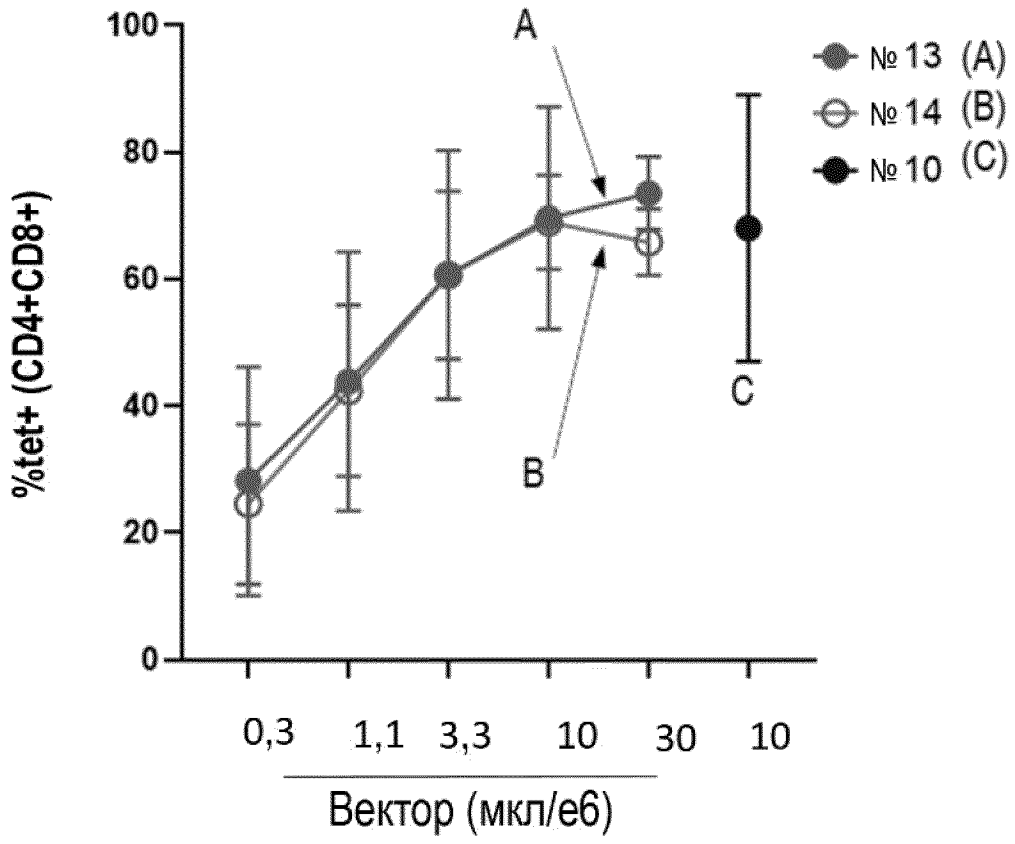
Фиг. 29А



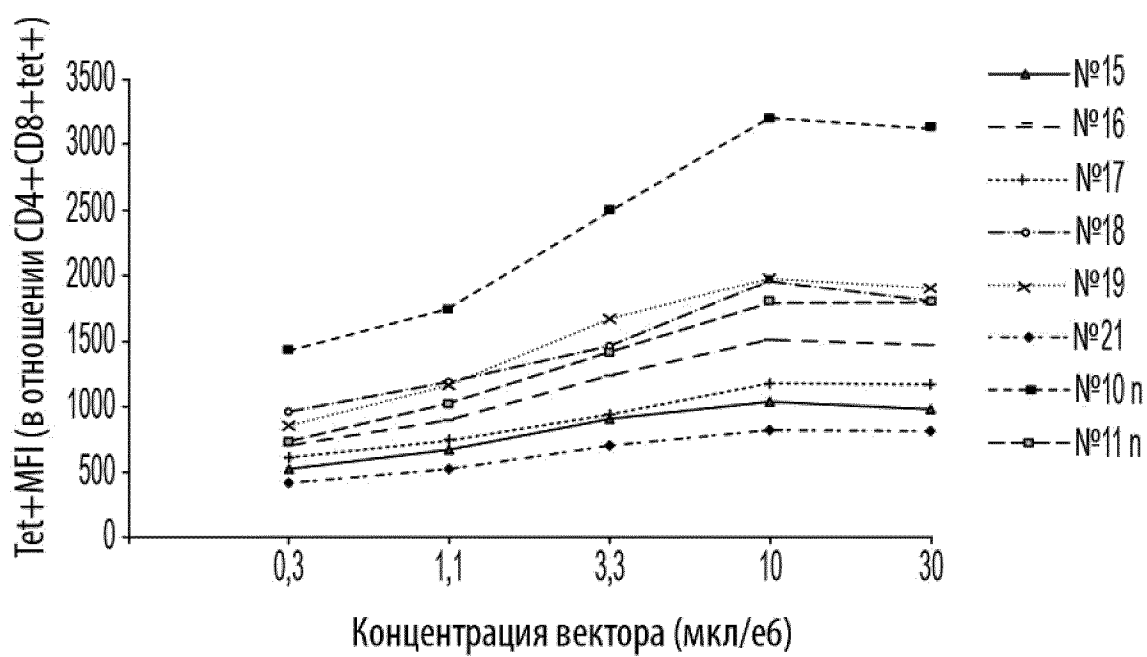
Фиг. 29В



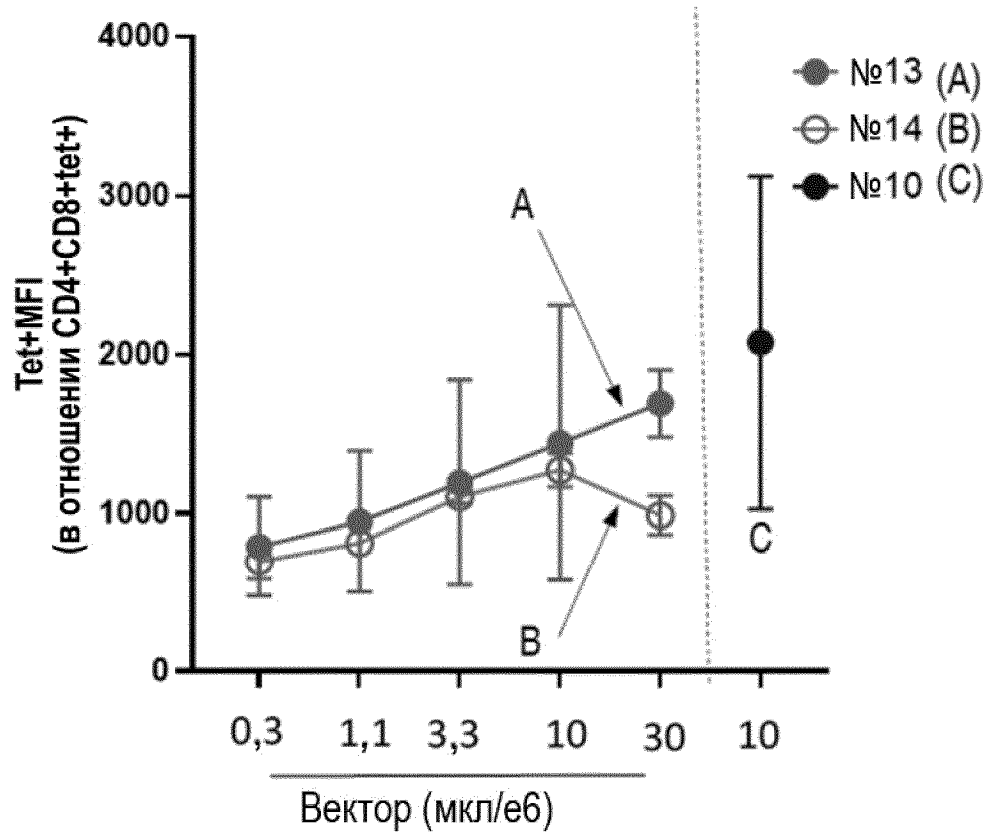
Фиг. 30А



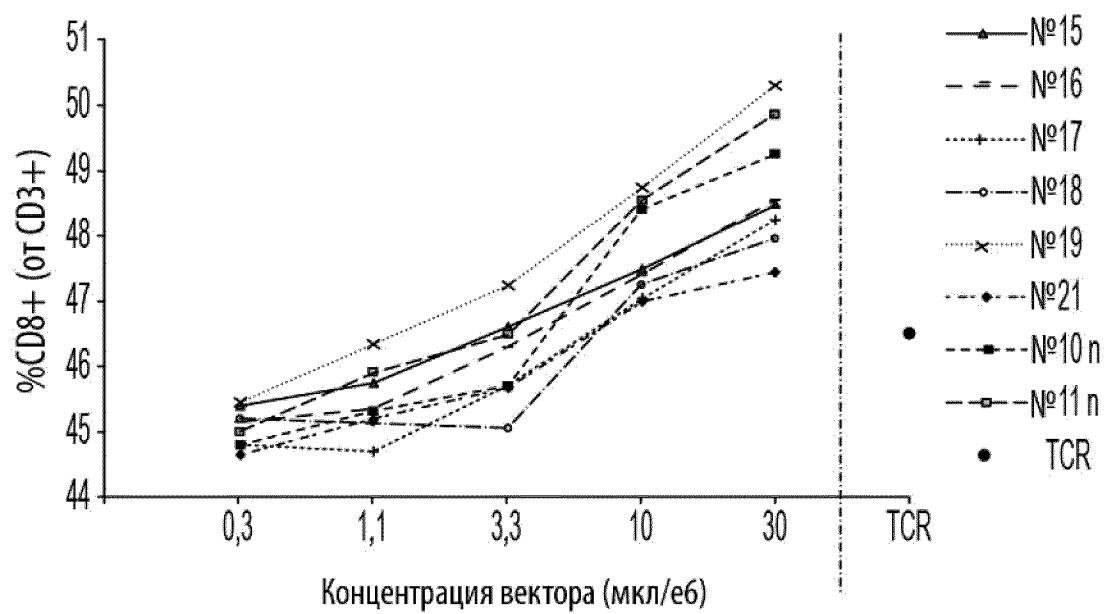
Фиг. 30В



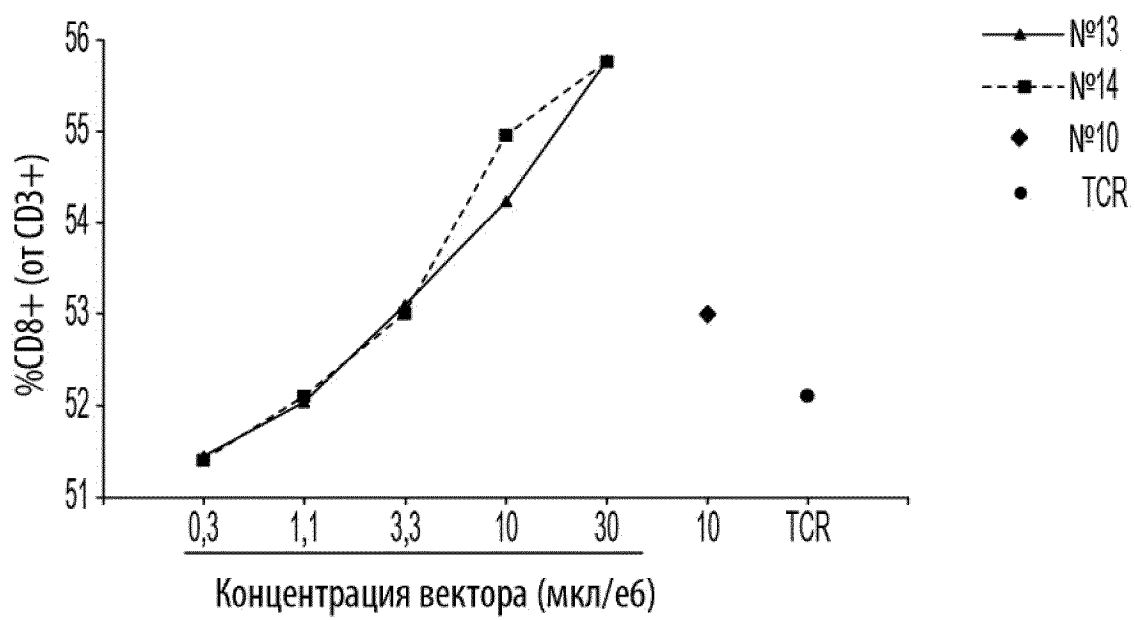
Фиг. 31А



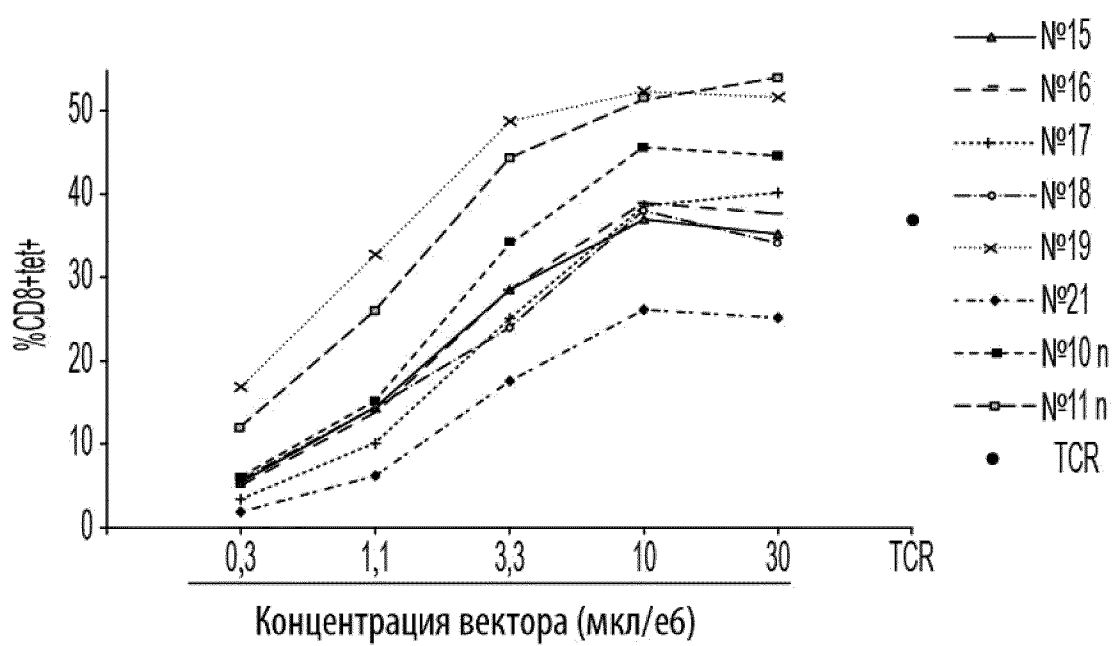
Фиг. 31В



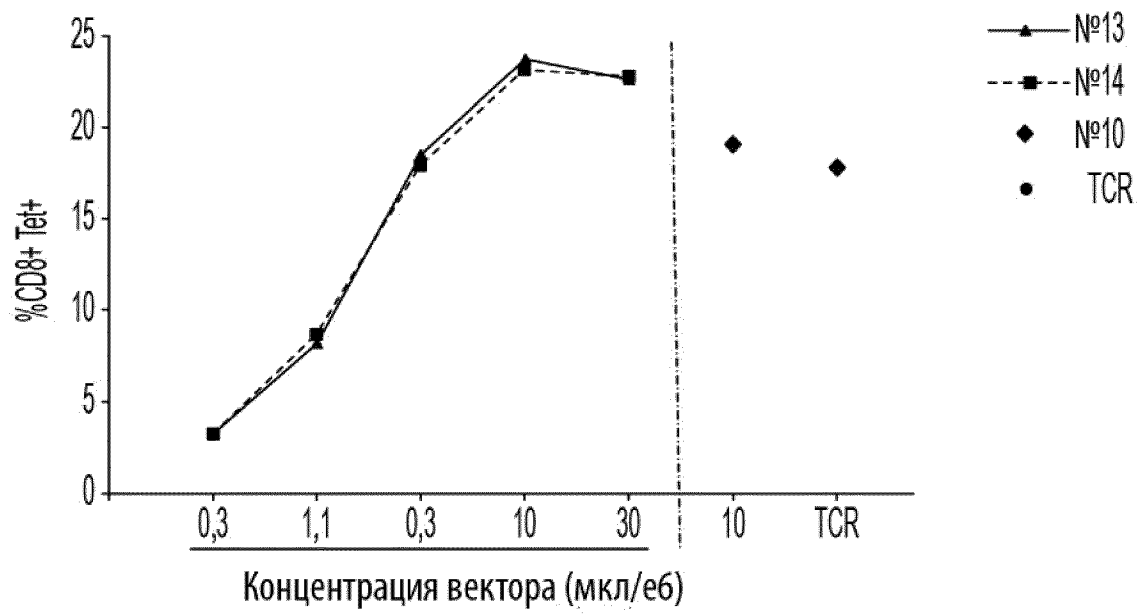
Фиг. 32А



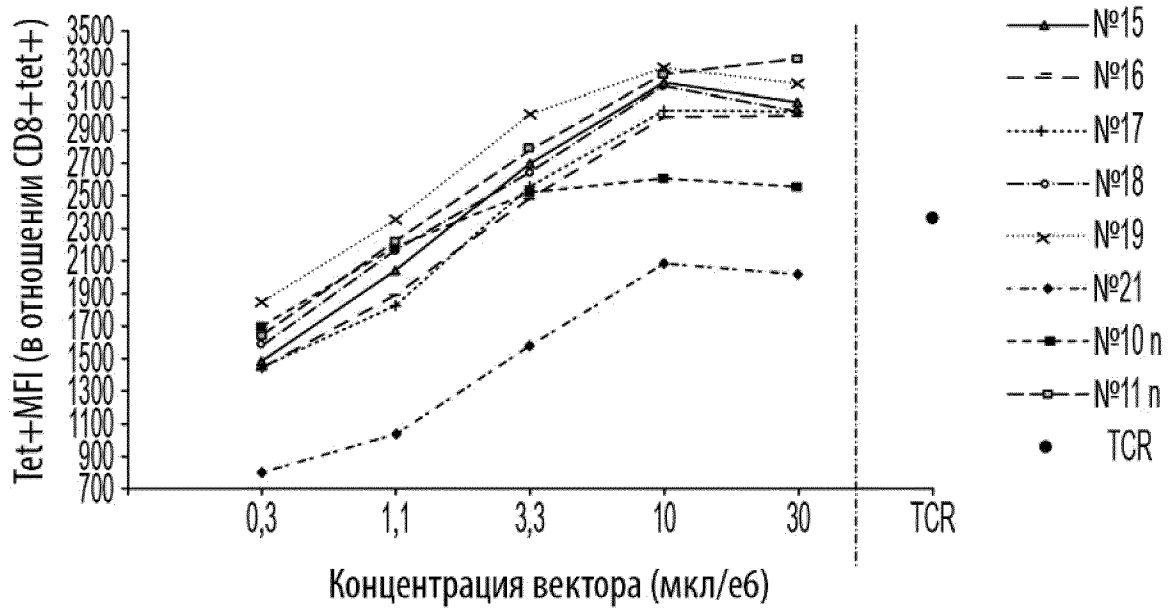
Фиг. 32В



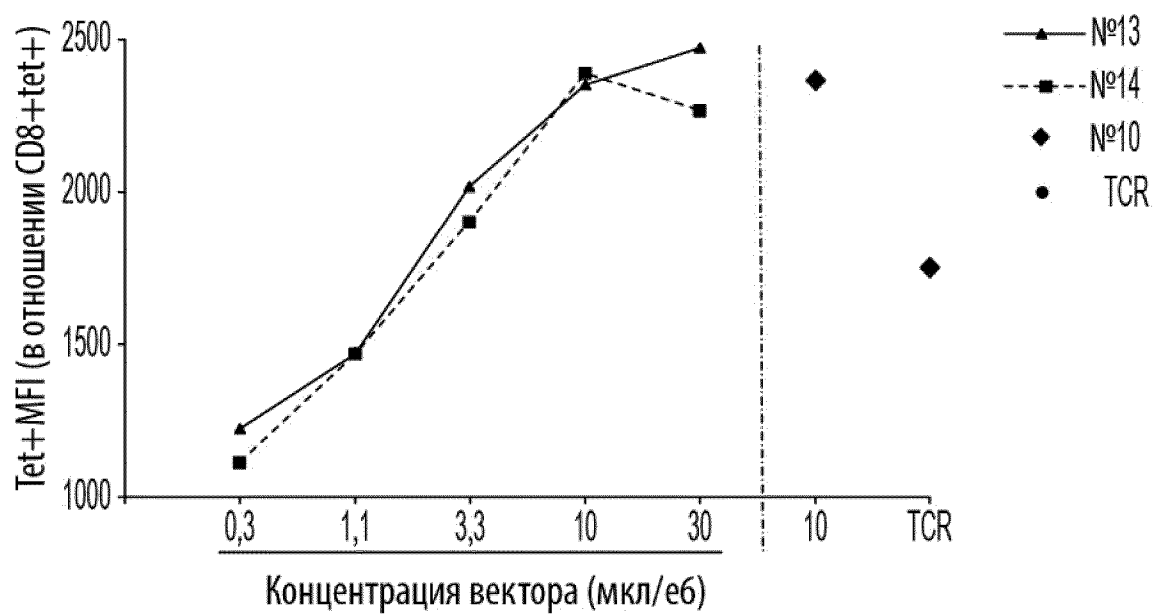
Фиг. 33А



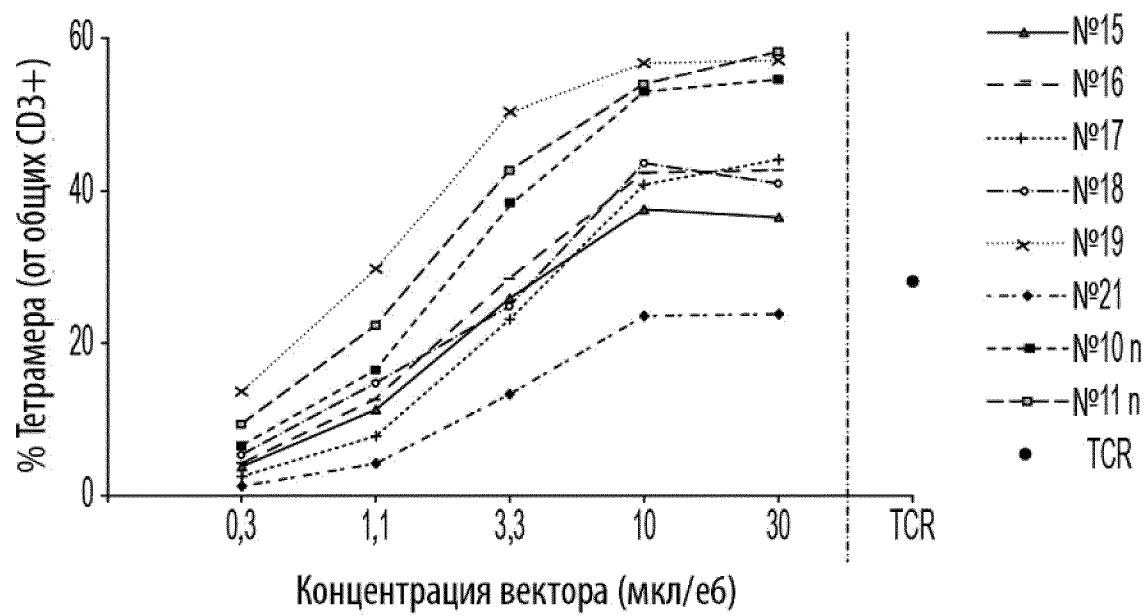
Фиг. 33В



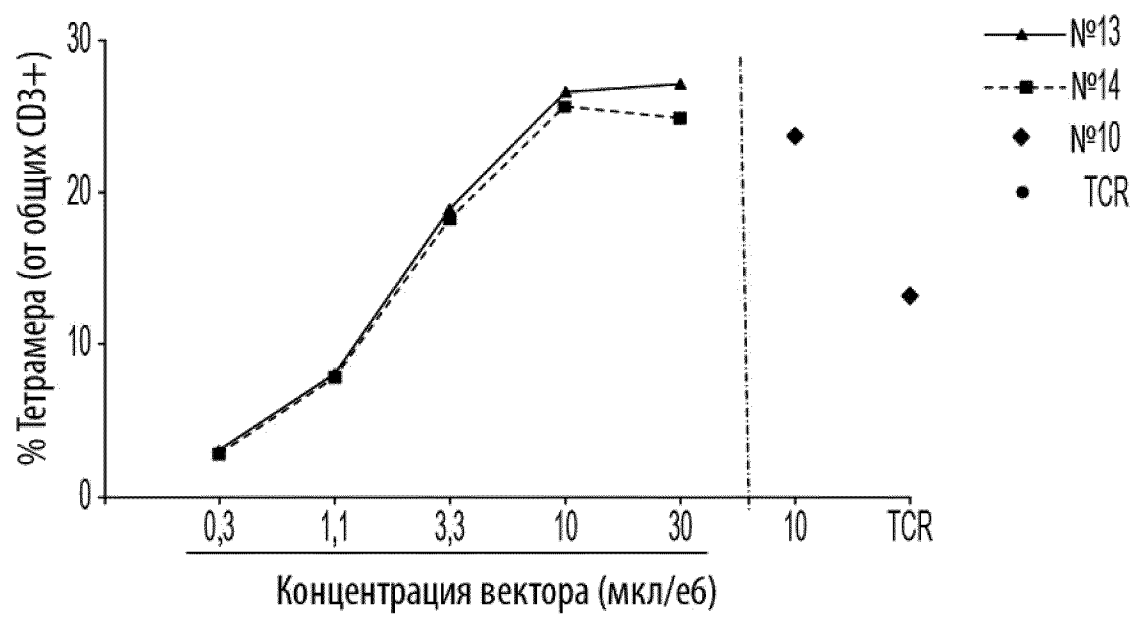
Фиг. 34А



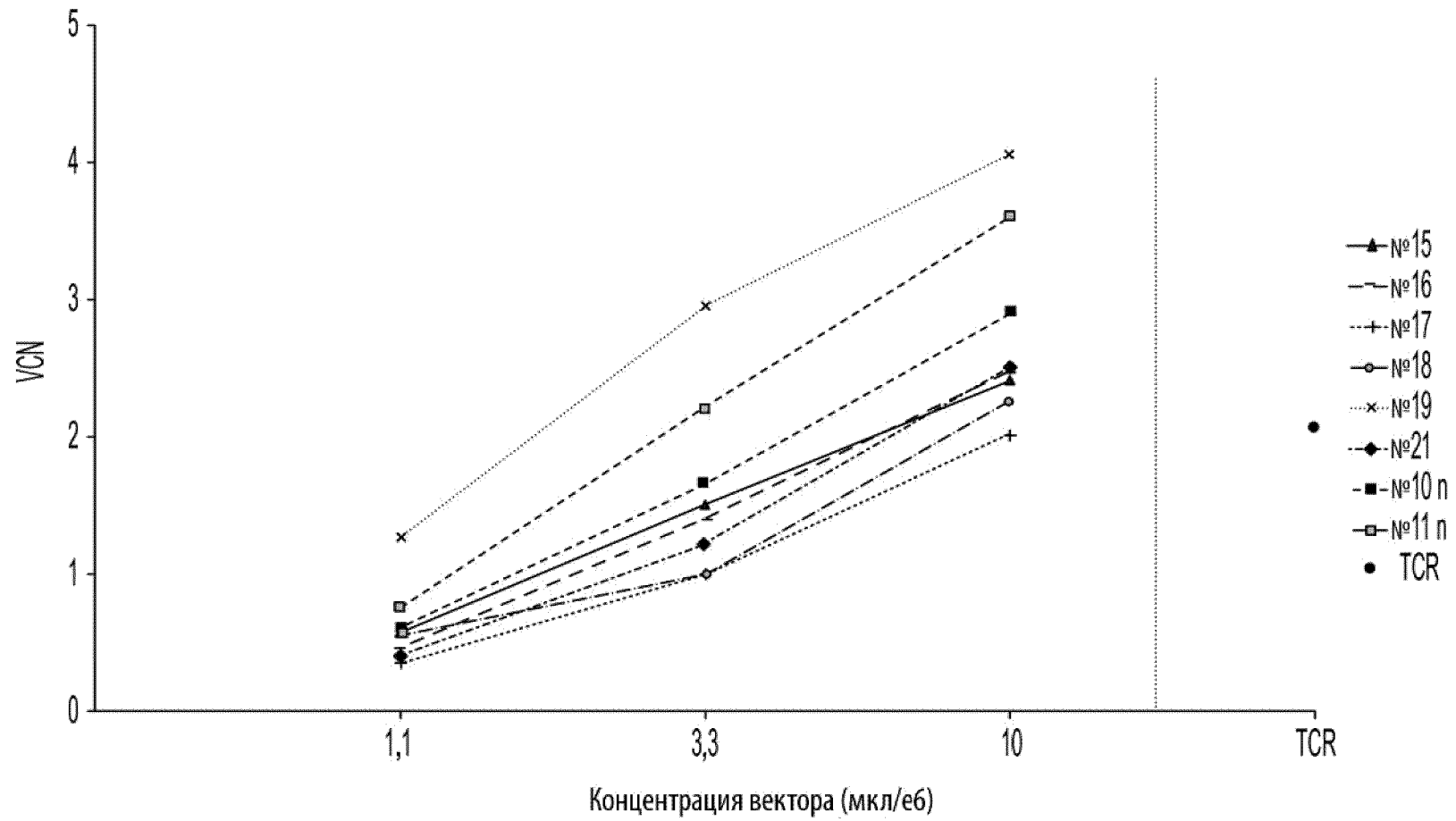
Фиг. 34В



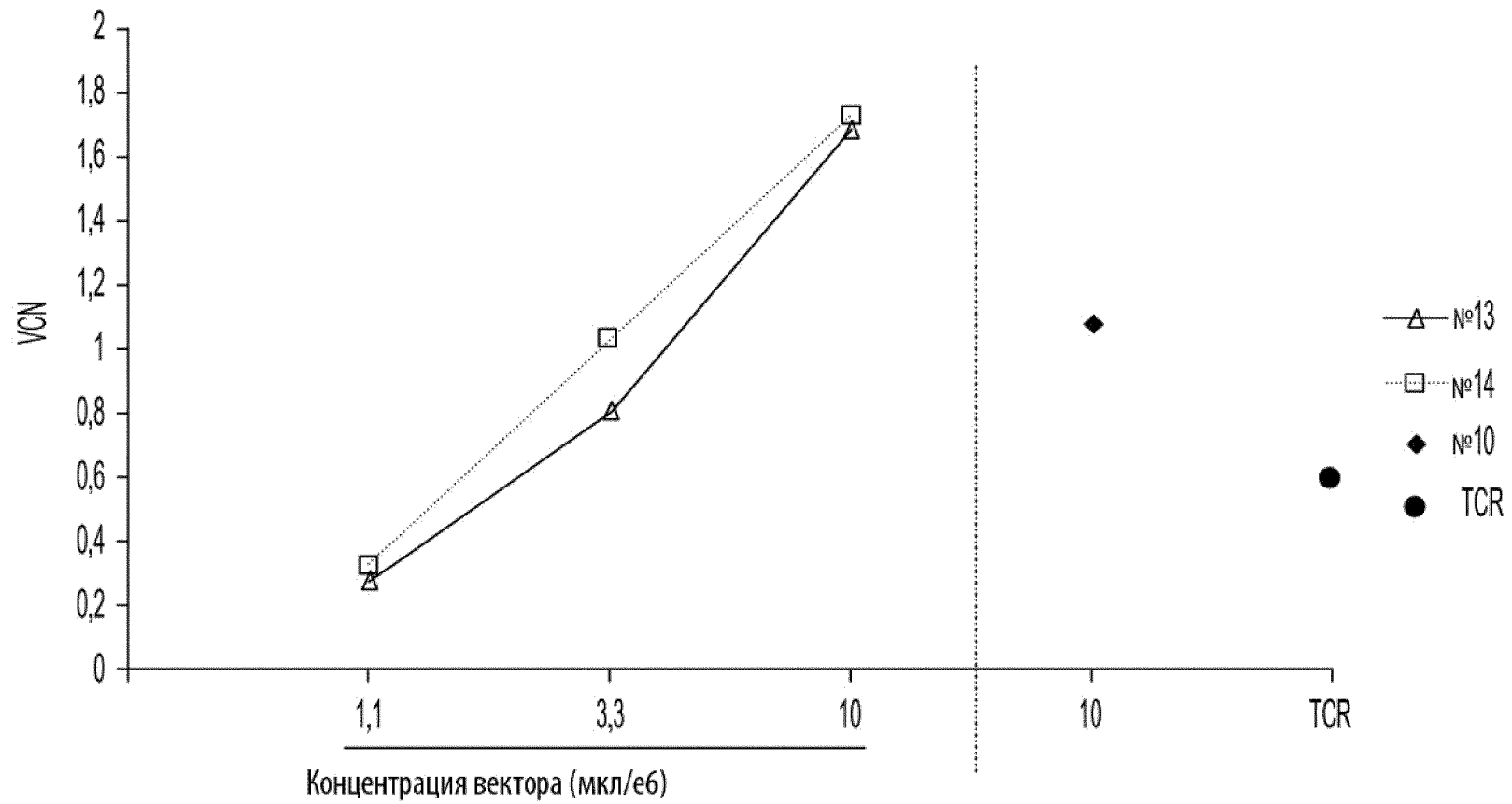
Фиг. 35А



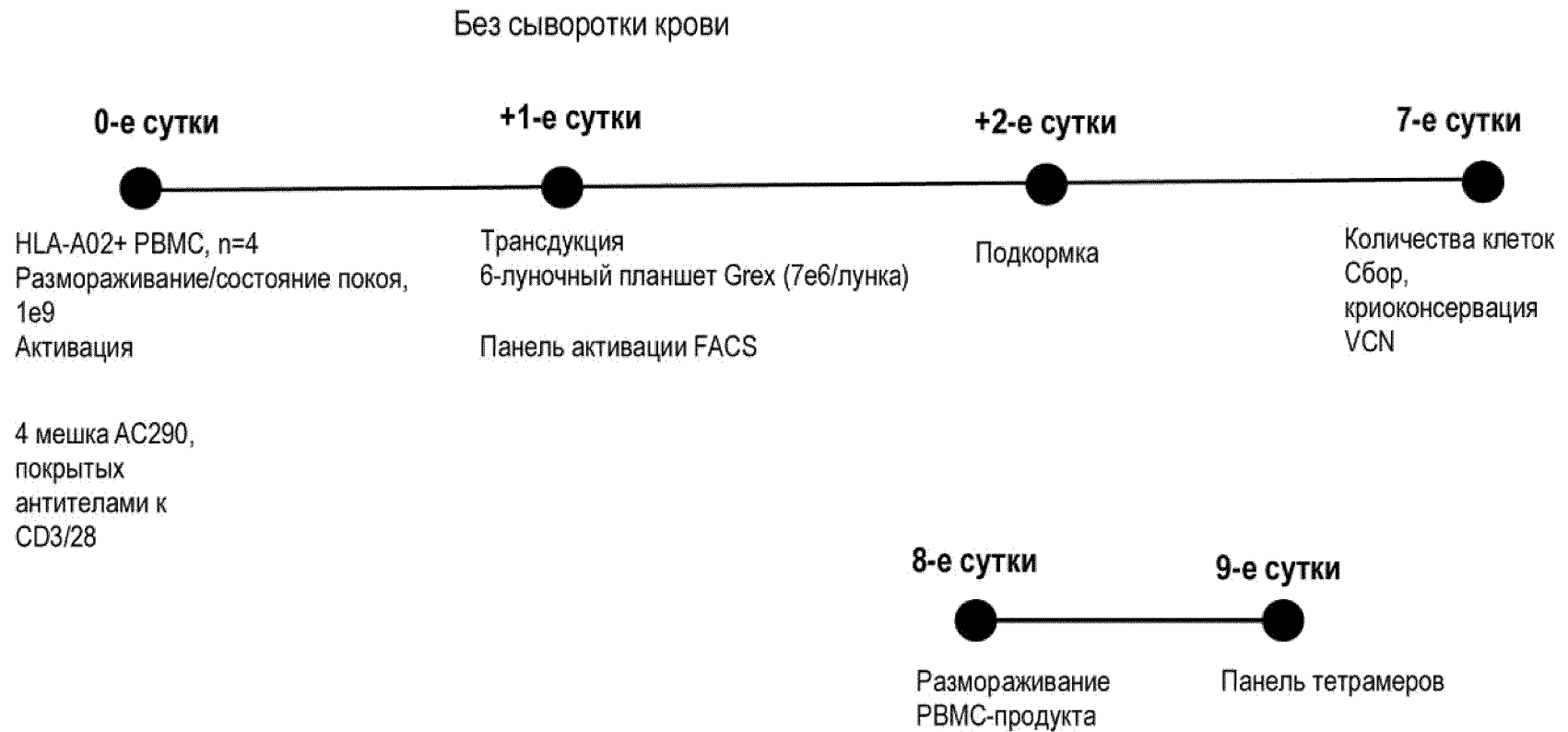
Фиг. 35В



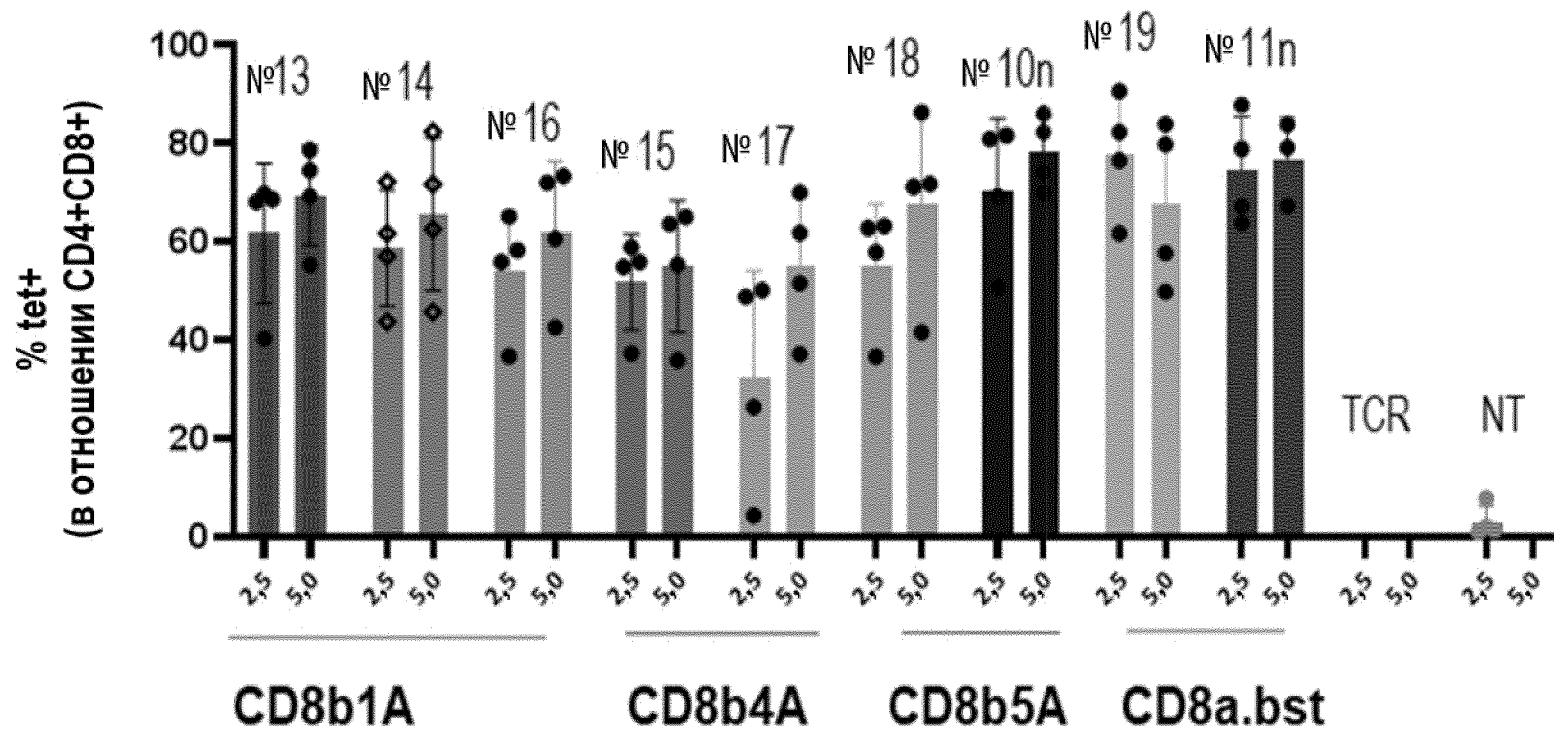
Фиг. 36А



Фиг. 36В

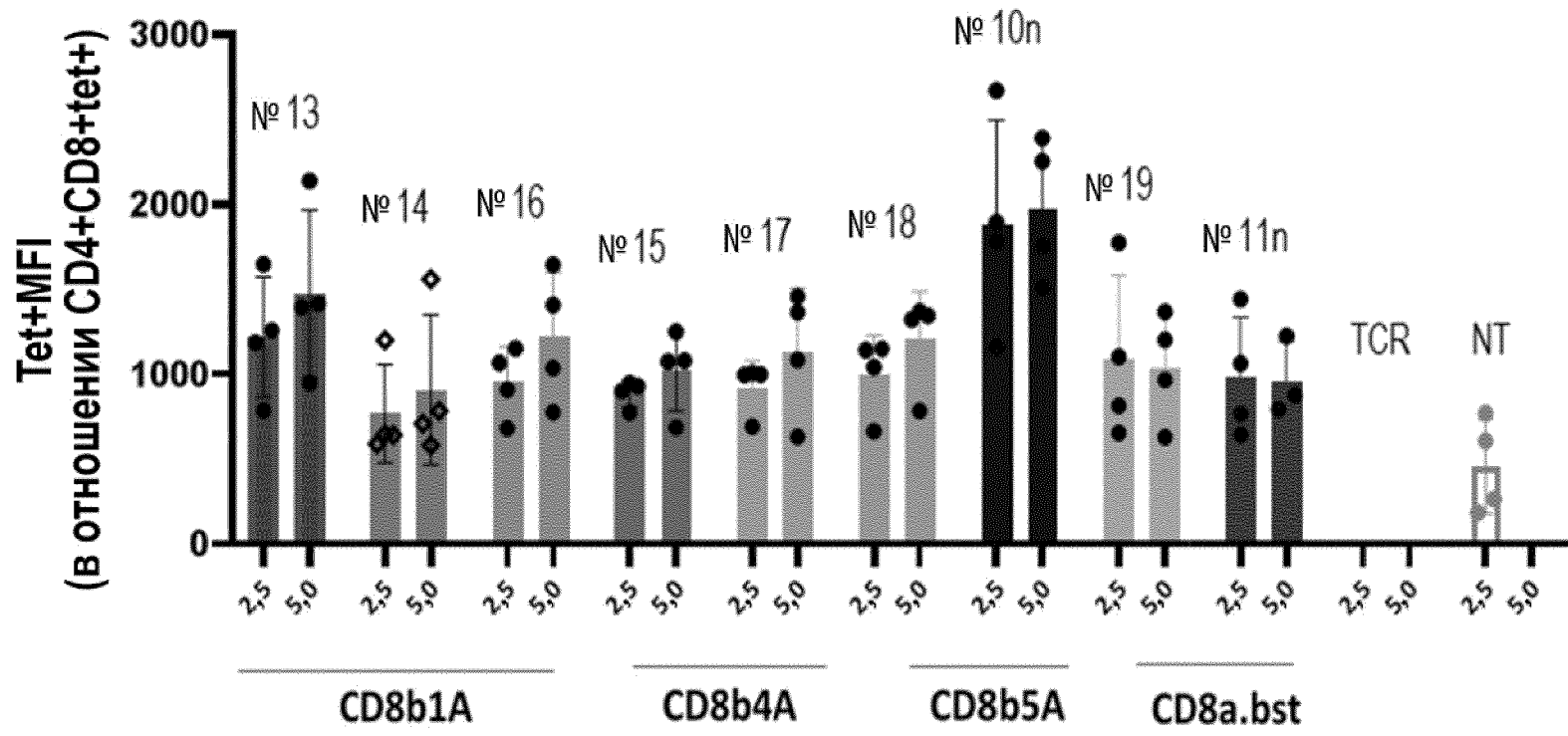


Фиг. 37



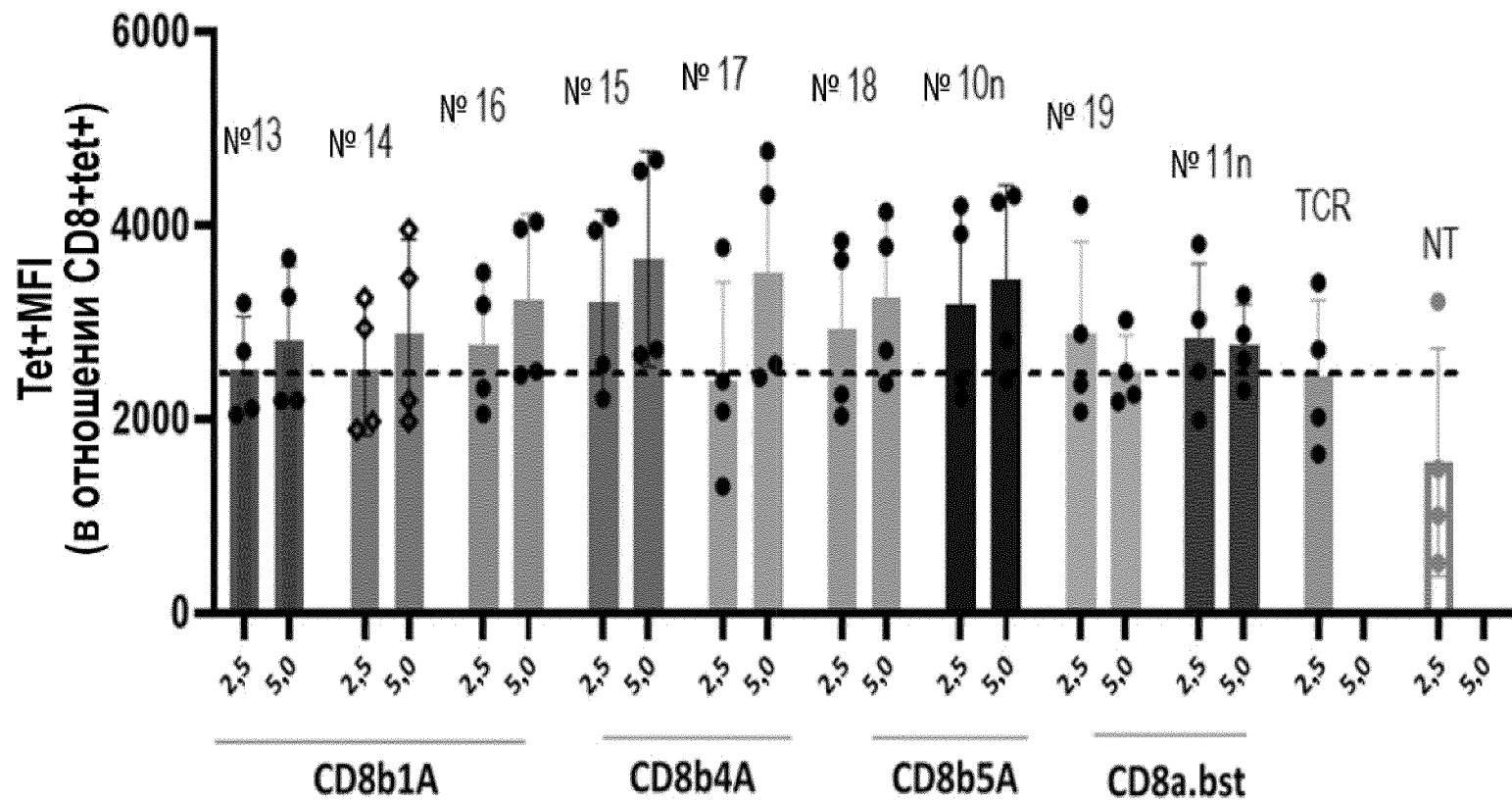
52/98

Фиг. 38

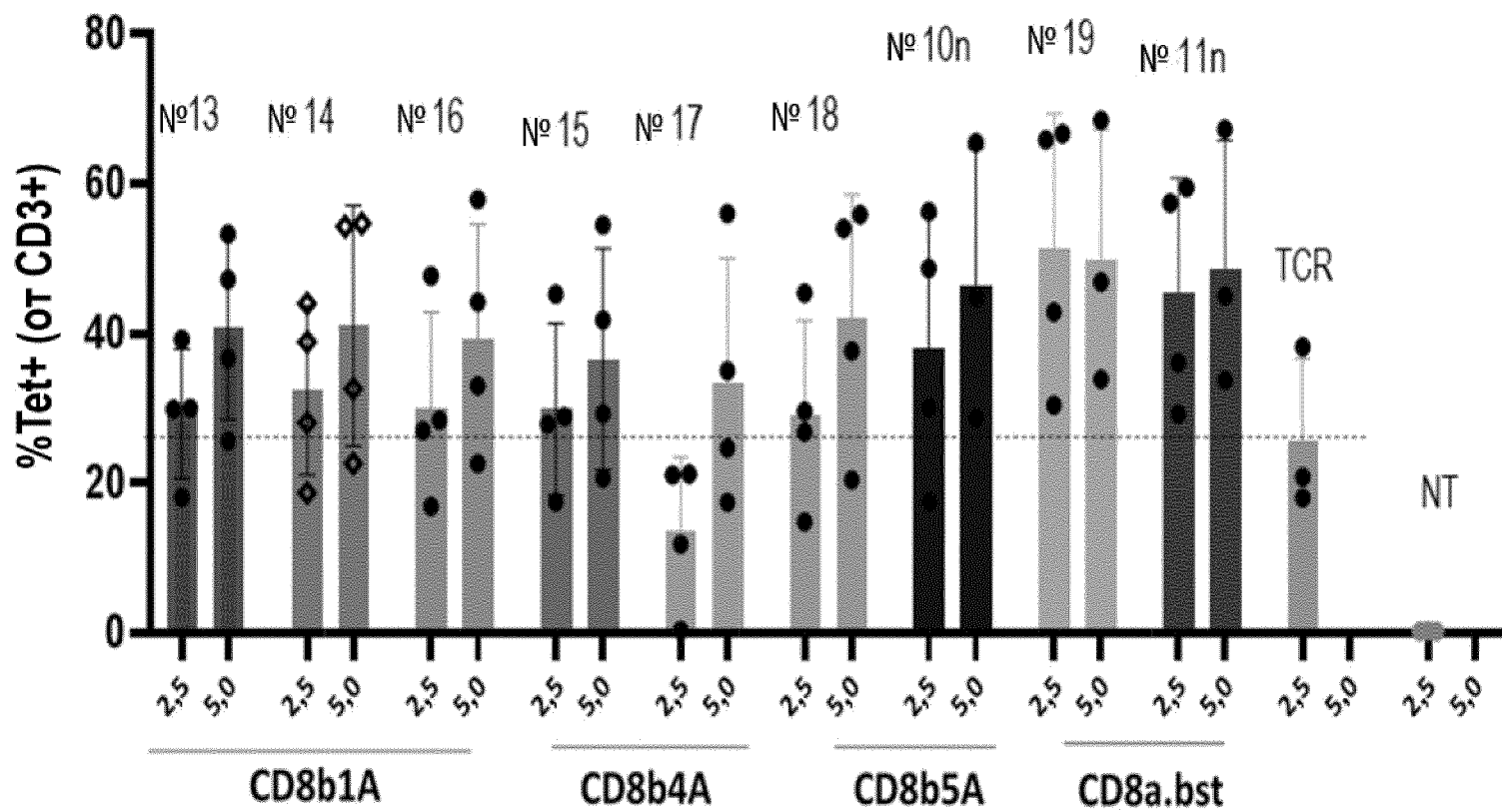


53/98

Фиг. 39

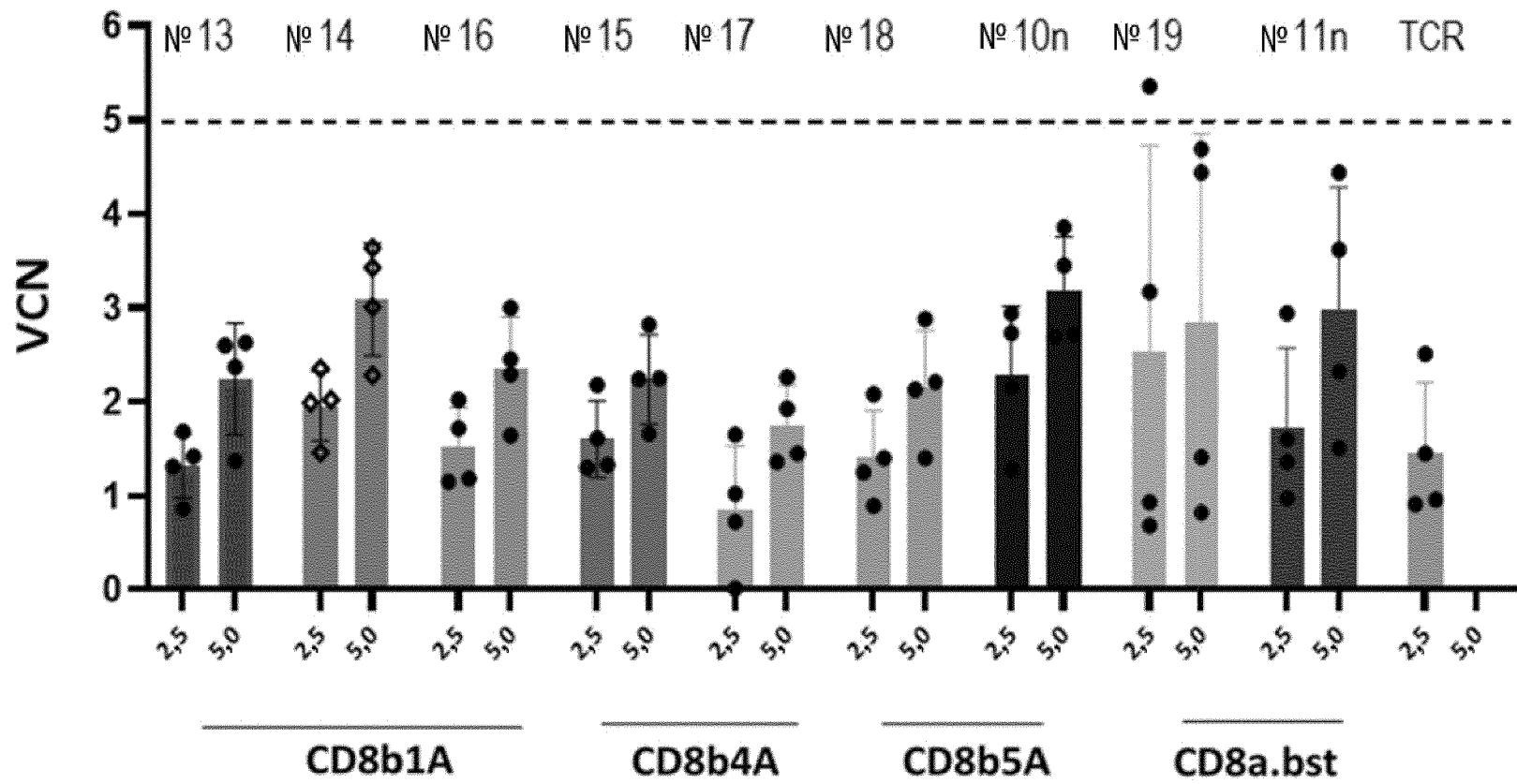


Фиг. 40



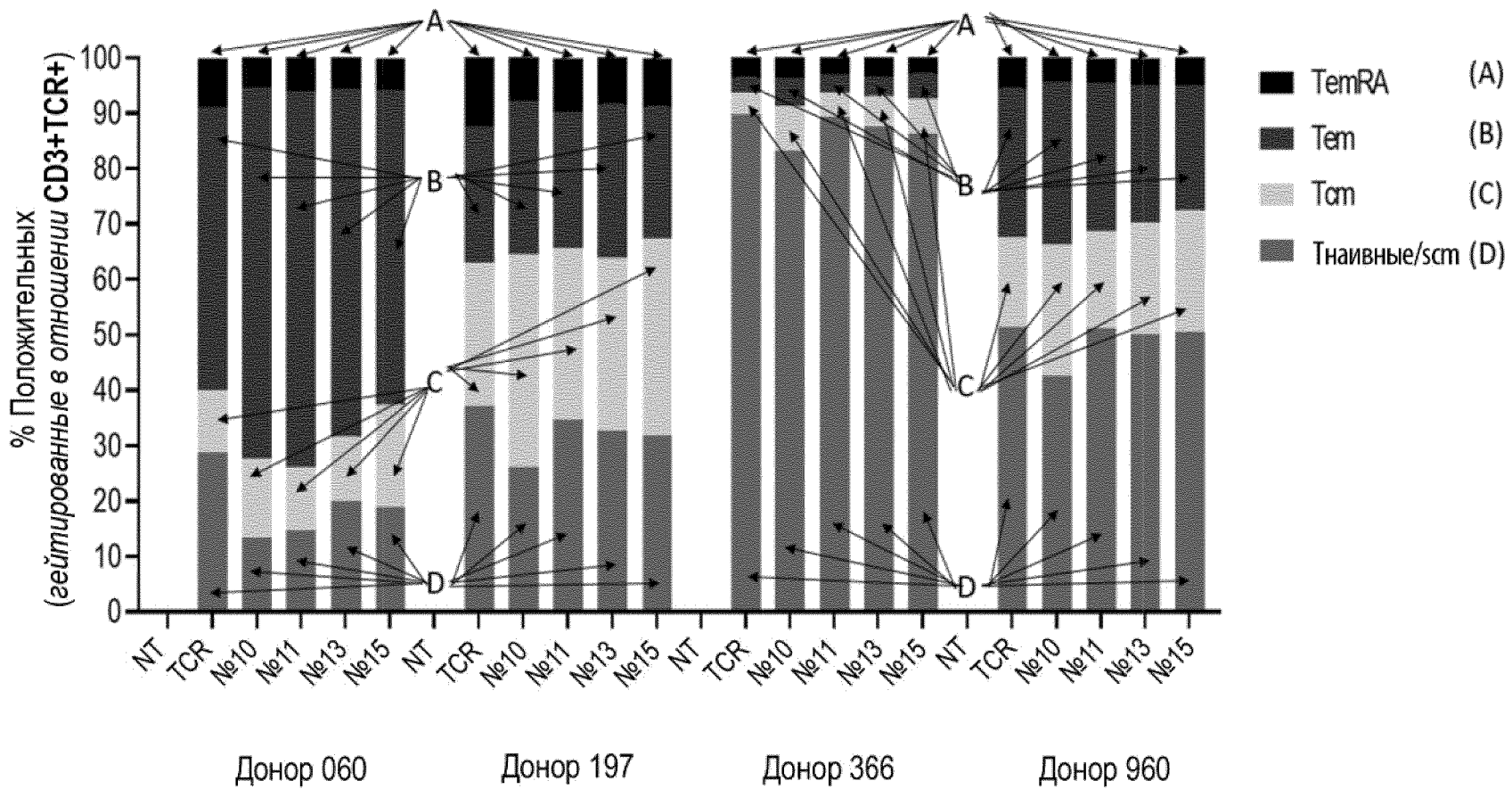
55/98

Фиг. 41

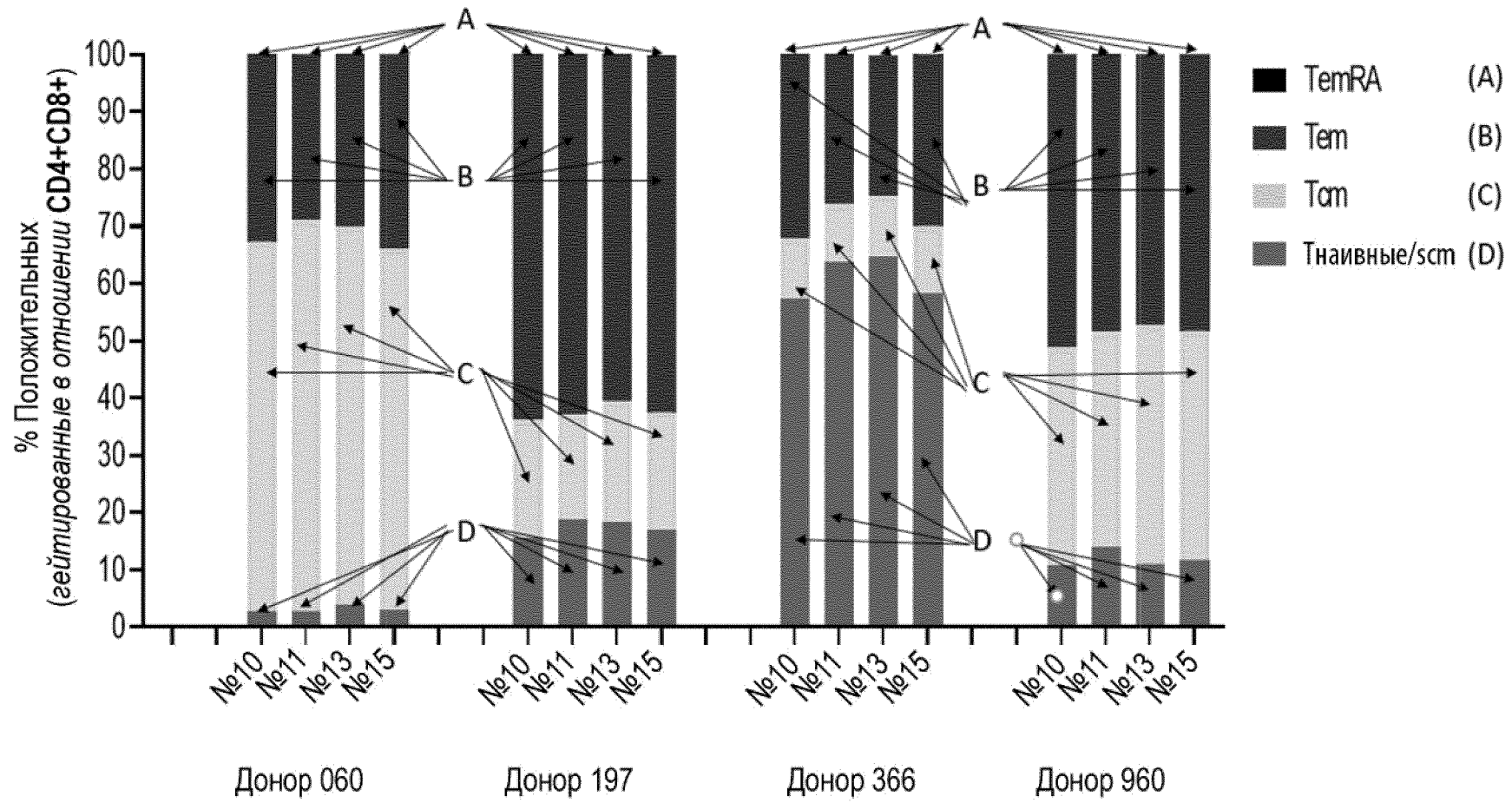


56/98

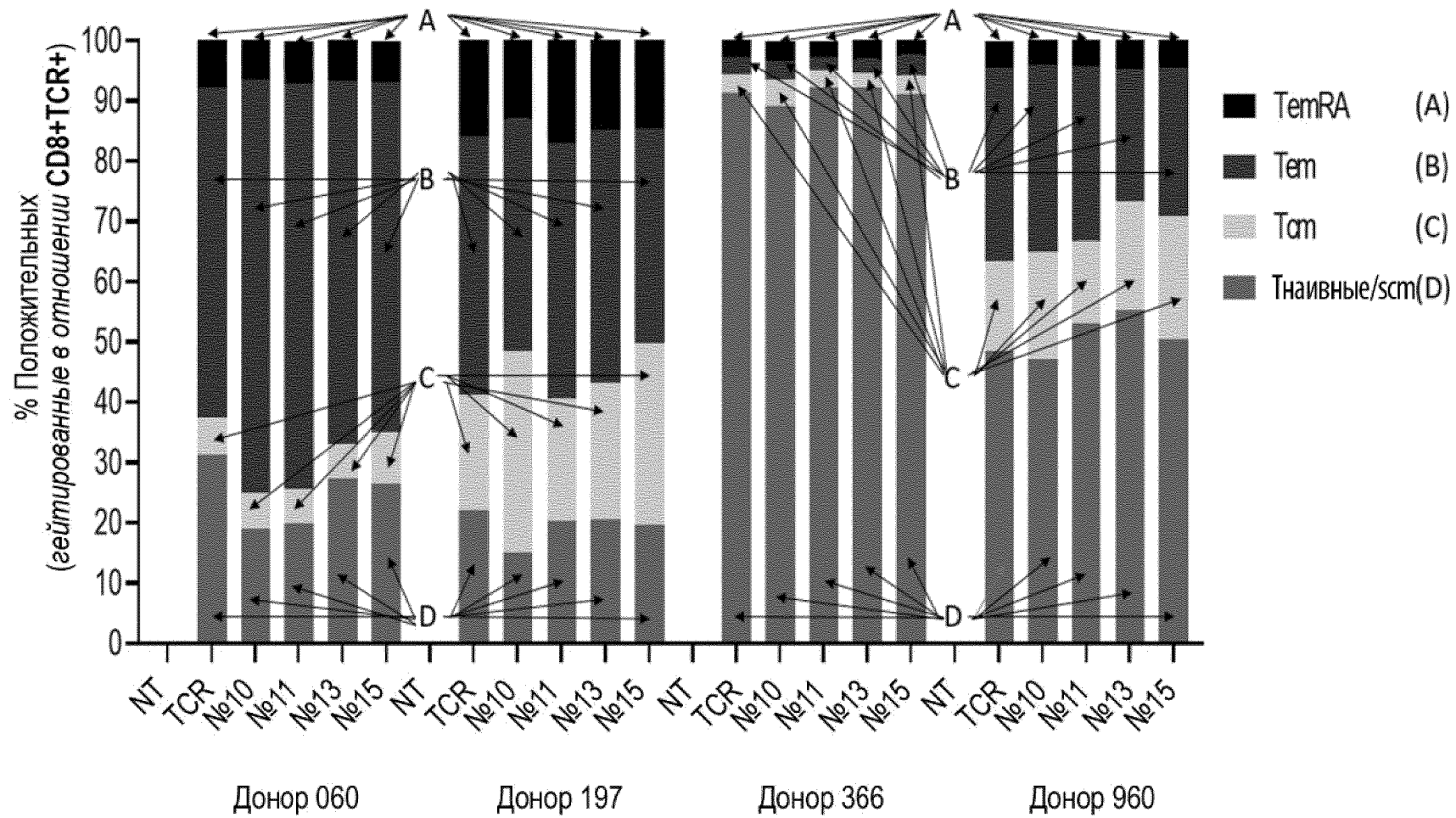
Фиг. 42



Фиг. 43



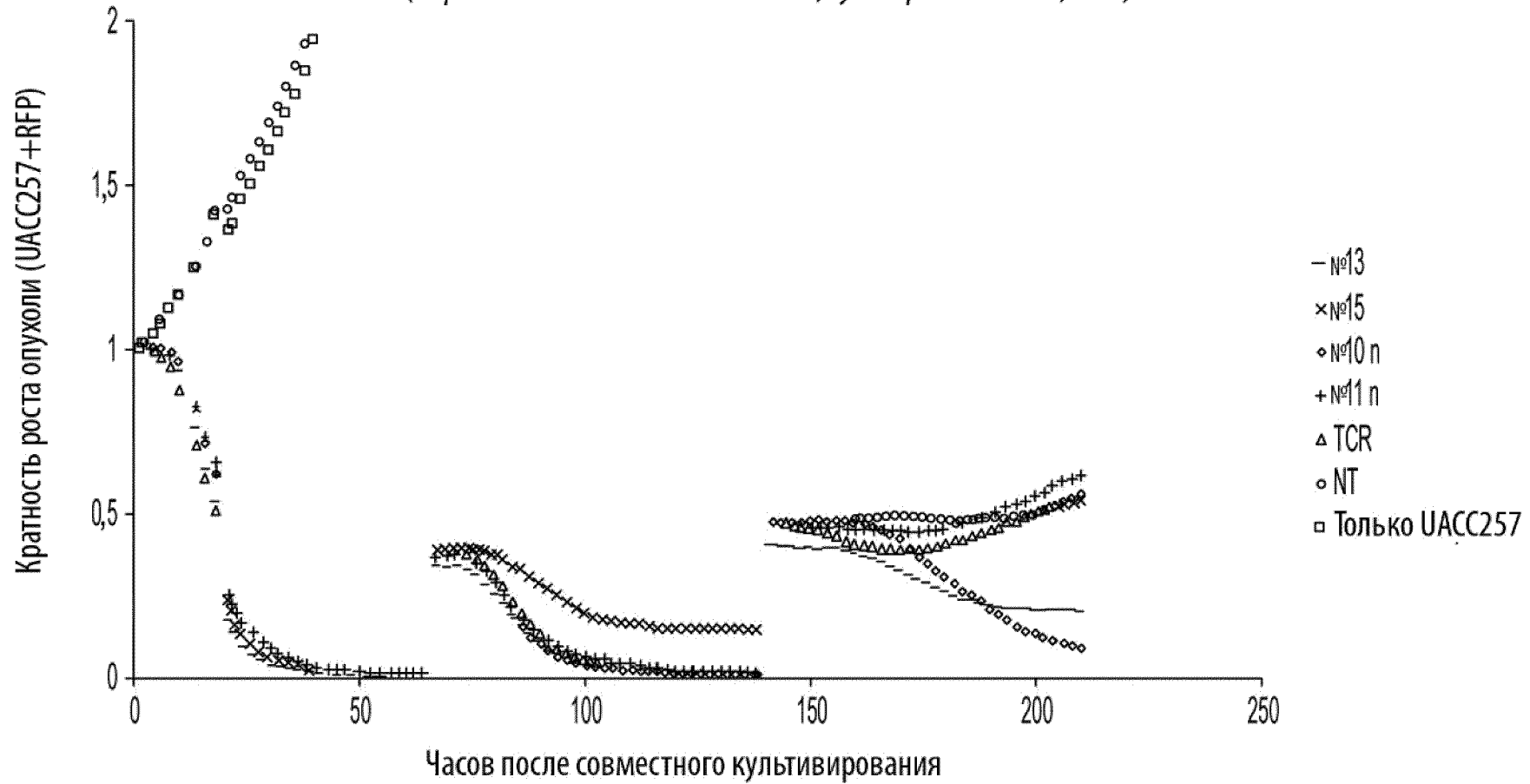
Фиг. 44А



Фиг. 44В

IMA-RND-21-020

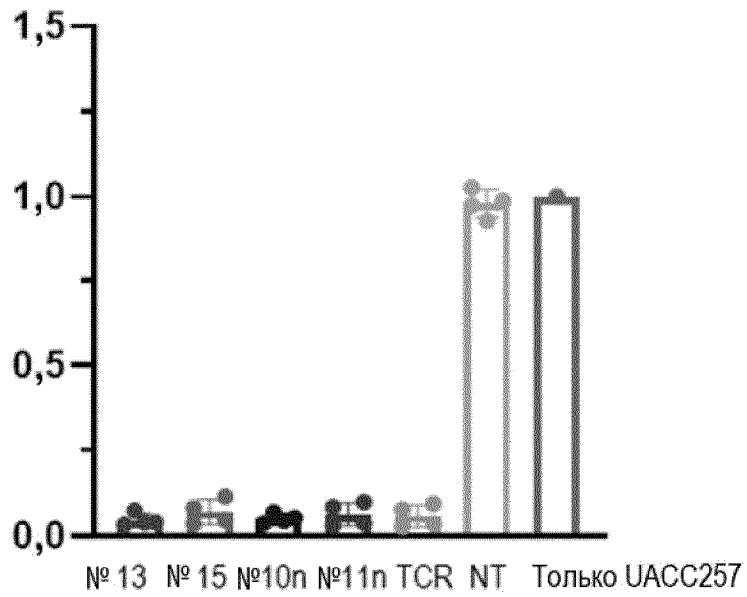
(Нормализованные по TCR+ 4:1 E/T, суммарные данные, n=4)



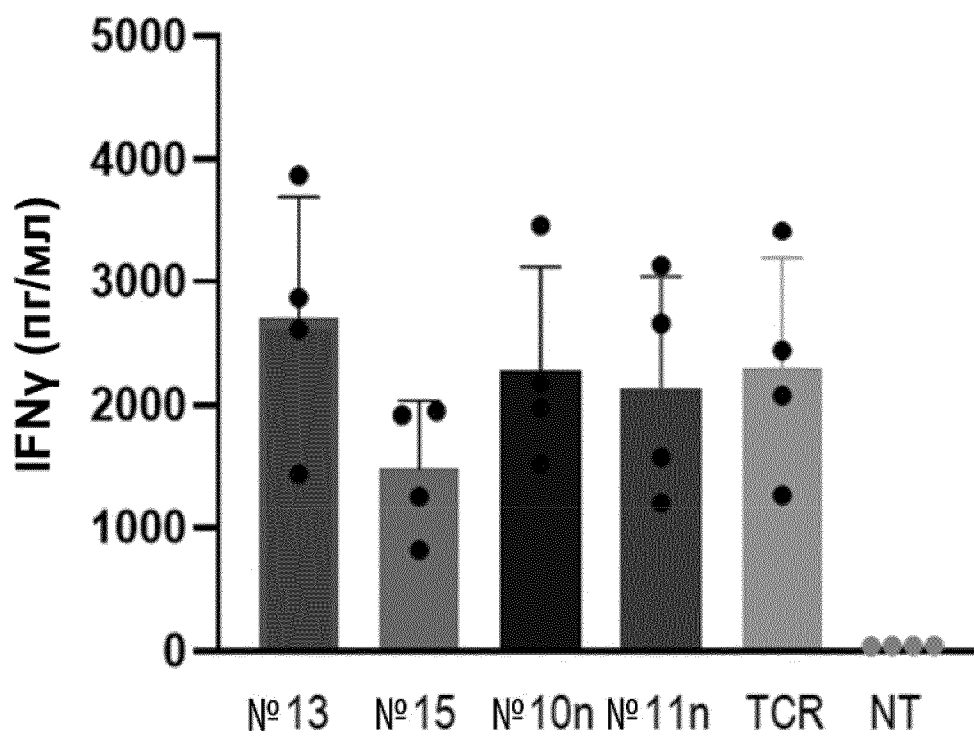
Фиг. 45А

Индекс роста опухоли

(Интегрированная AUC; нормализовано к условию опухоль_{только})



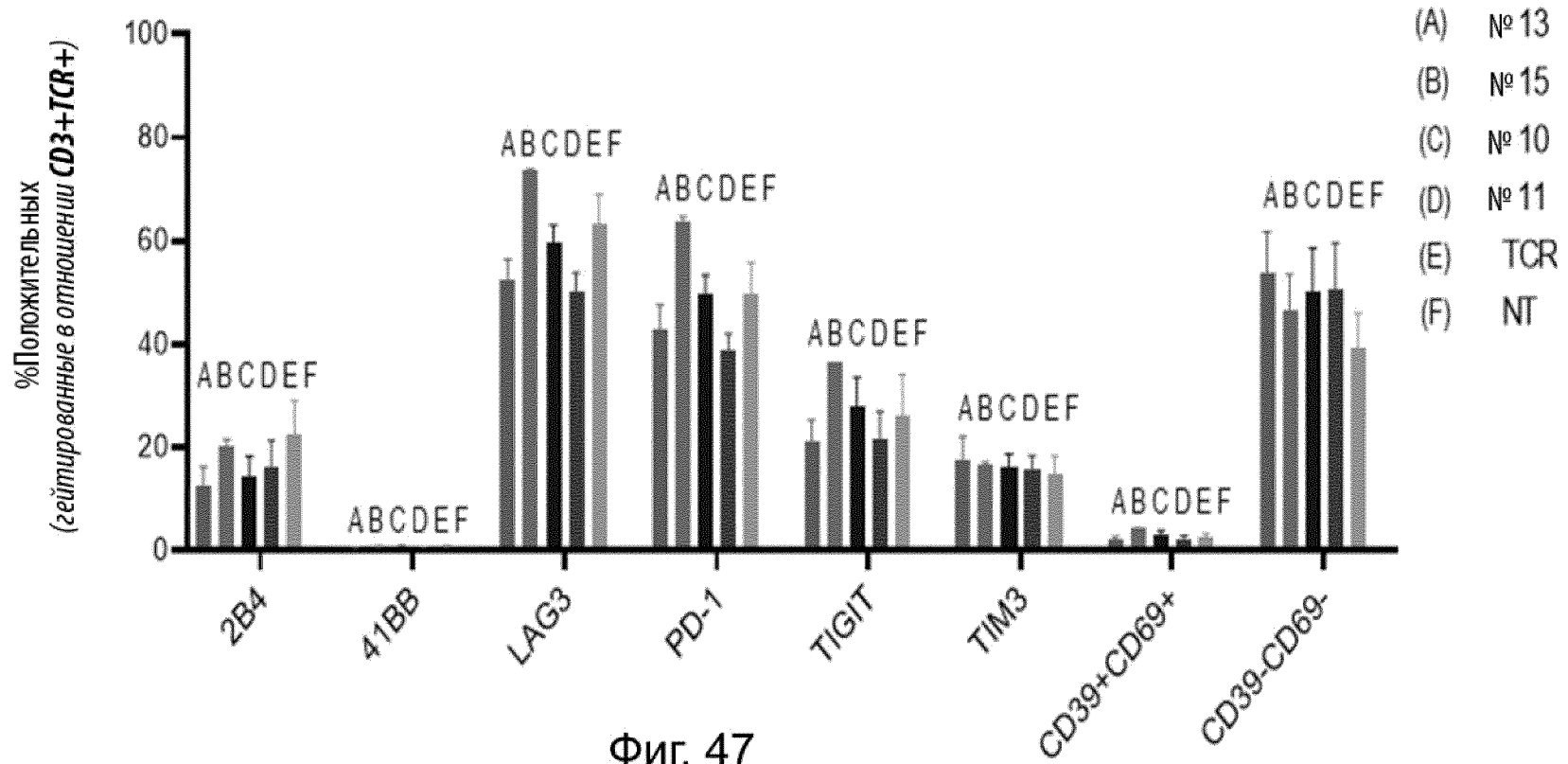
Фиг. 45В



Фиг. 46

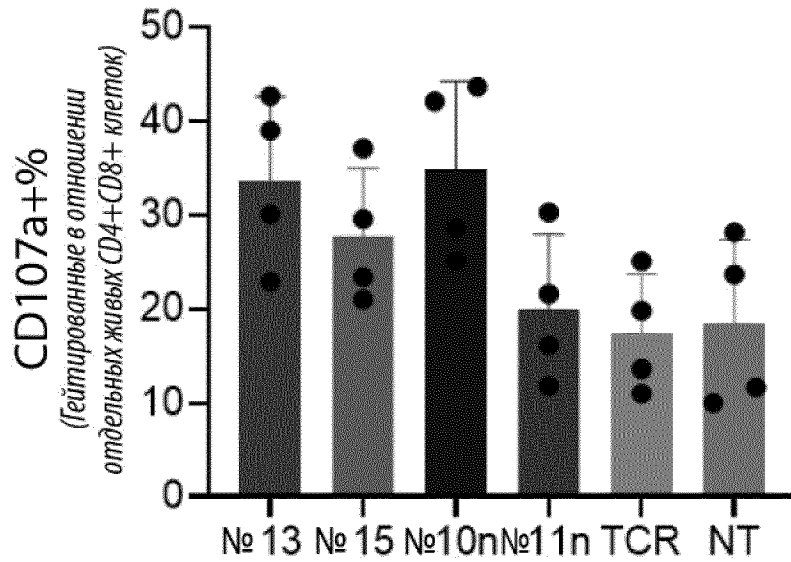
Частота маркера ICI

(Сгруппированные данные, n=4, панель ICI, до стимуляции Ag)



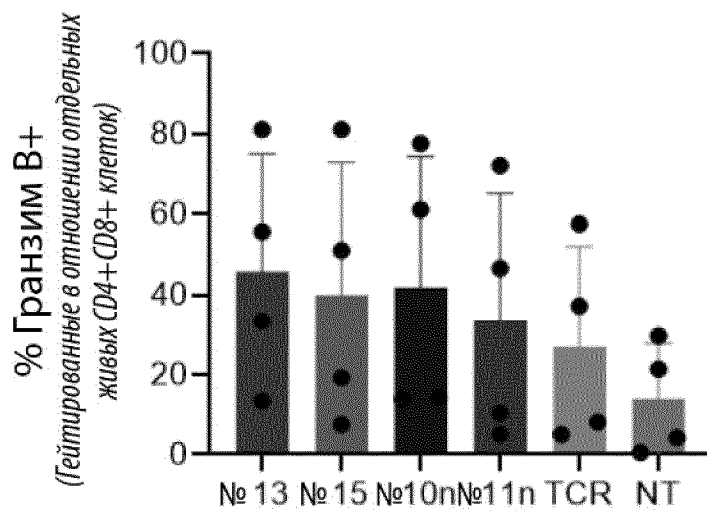
Фиг. 47

Частота CD107a+
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



Фиг. 48А

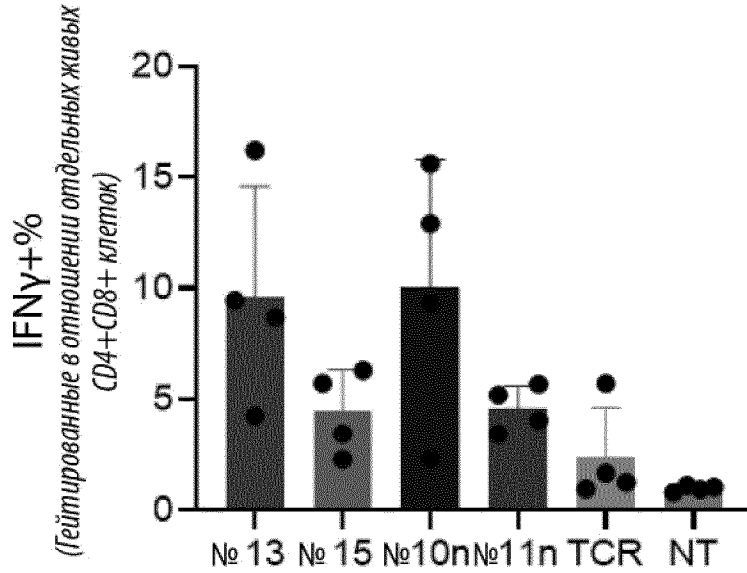
Частота гранзим В+
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



Фиг. 48В

Частота IFN γ +

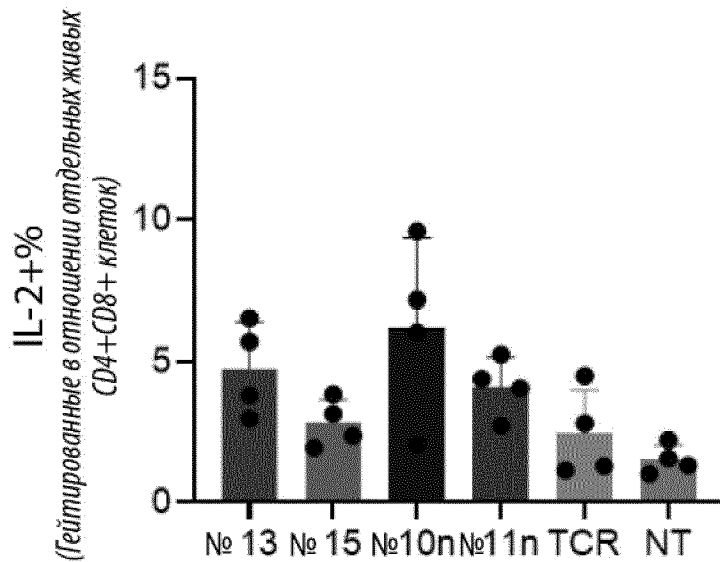
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



Фиг. 48С

Частота IL-2+

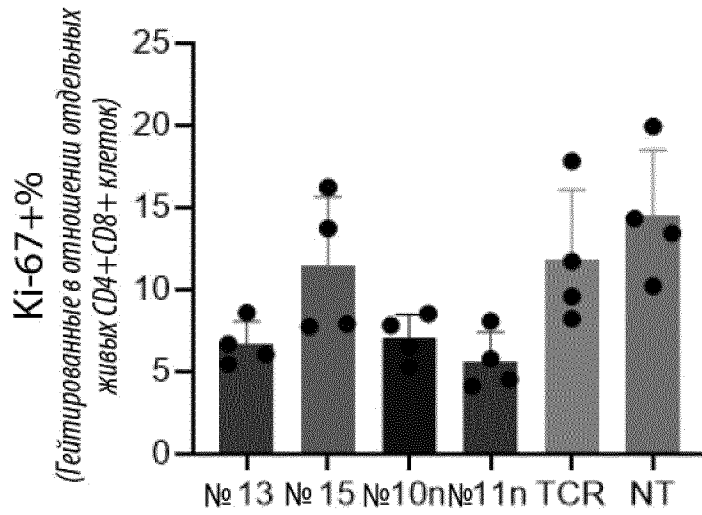
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



Фиг. 48D

Частота Ki-67+

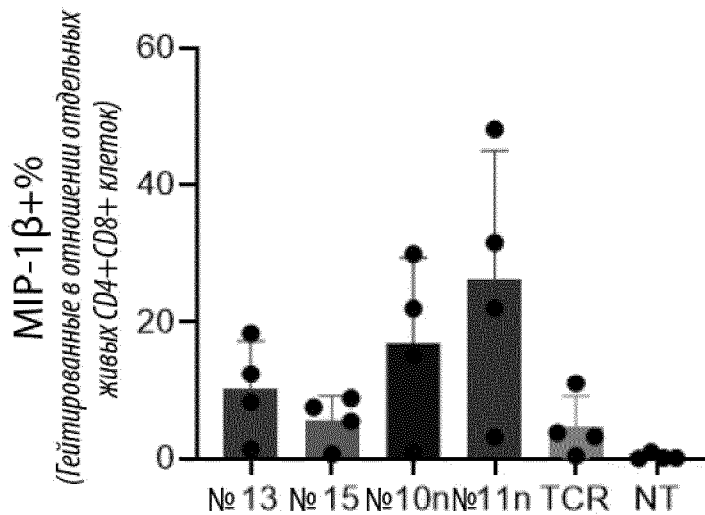
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



Фиг. 48Е

Частота MIP-1 β +

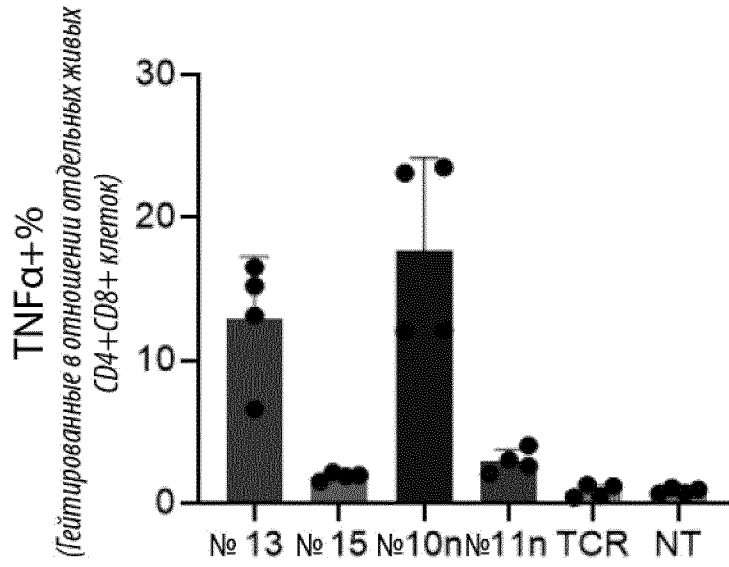
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



Фиг. 48F

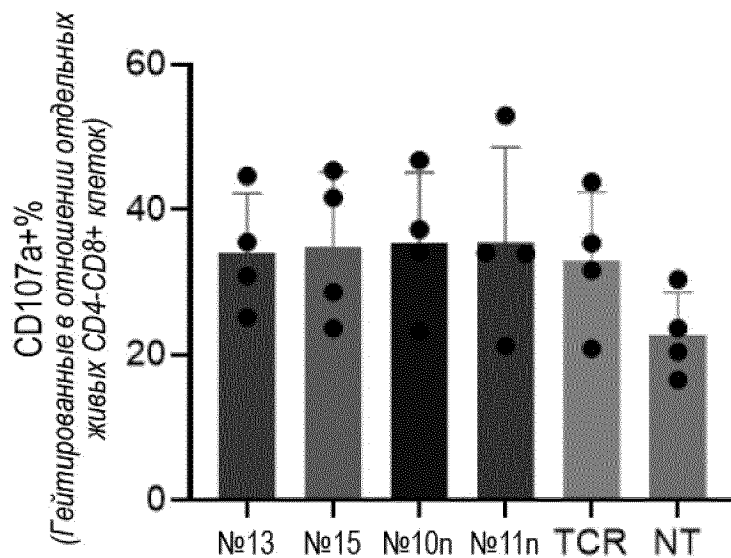
Частота TNF α +

(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



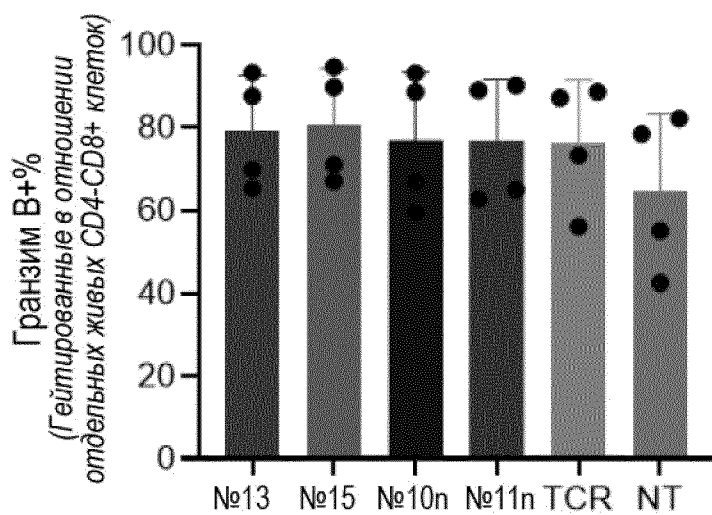
Фиг. 48G

Частота CD107a+
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении
UACC257, панель ICS)



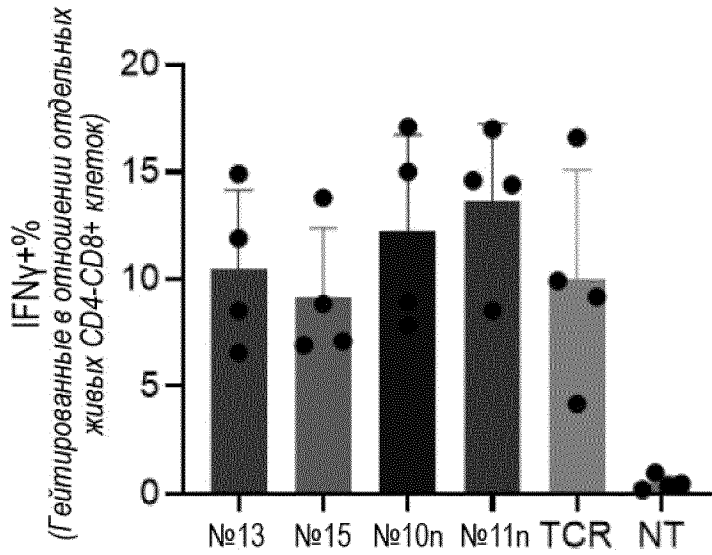
Фиг. 49А

Частота гранзим В+
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении
UACC257, панель ICS)



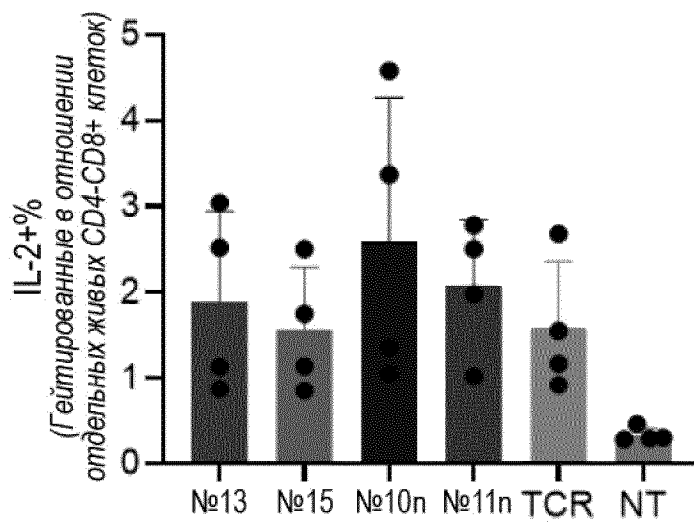
Фиг. 49В

Частота IFN γ +
 (Сгруппированные данные, n=4; в отношении
UACC257, панель ICS)



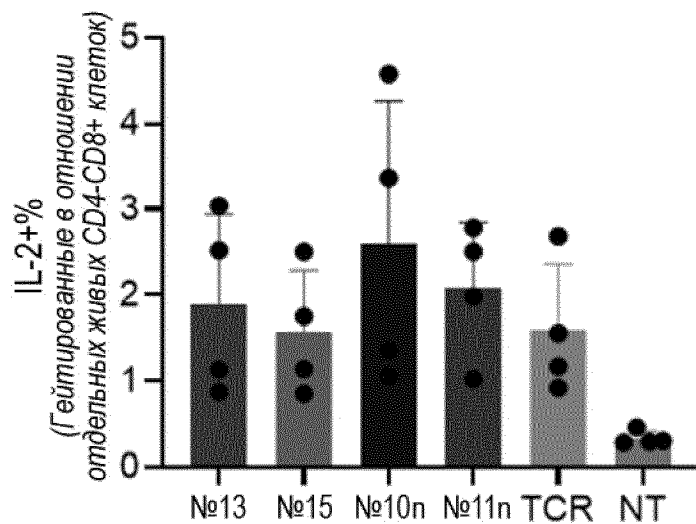
Фиг. 49C

Частота IL-2+
 (Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)

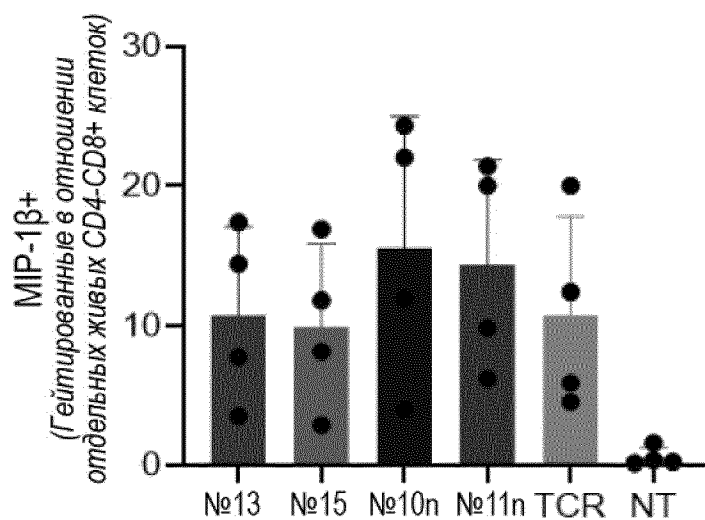


Фиг. 49D

Частота IL-2+

(Сгруппированные данные, $n=4$; в отношении UACC257, панель ICS)

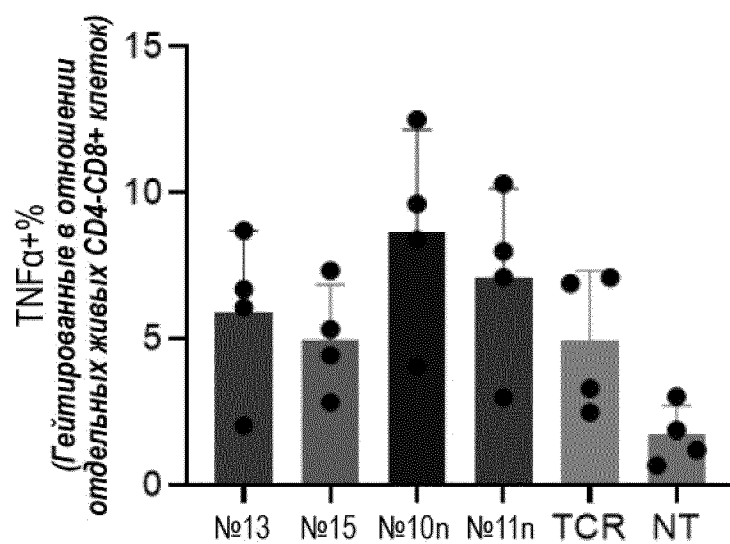
Фиг. 49Е

Частота MIP-1 β +(Сгруппированные данные, $n=4$; в отношении UACC257, панель ICS)

Фиг. 49F

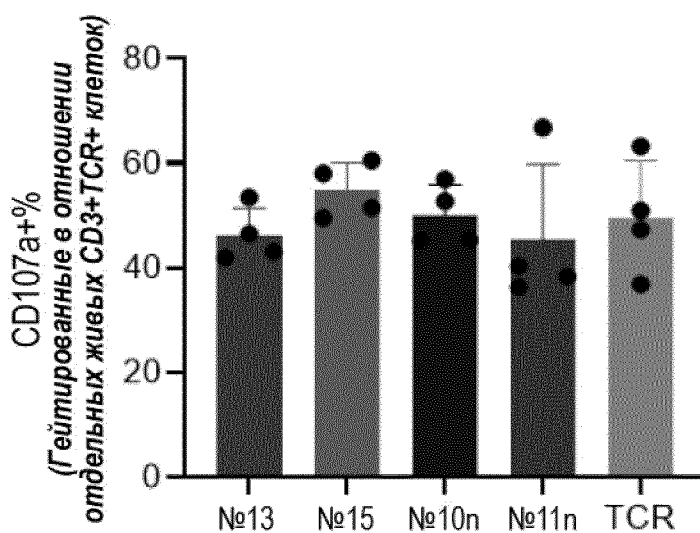
Частота TNF α +

(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



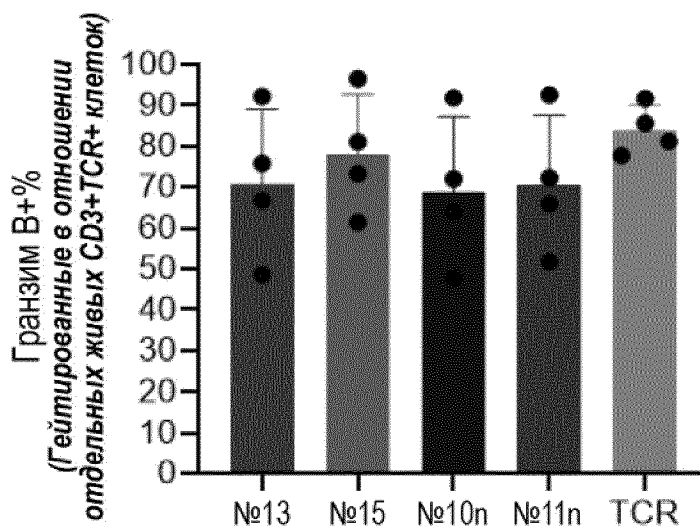
Фиг. 49G

Частота CD107a+
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



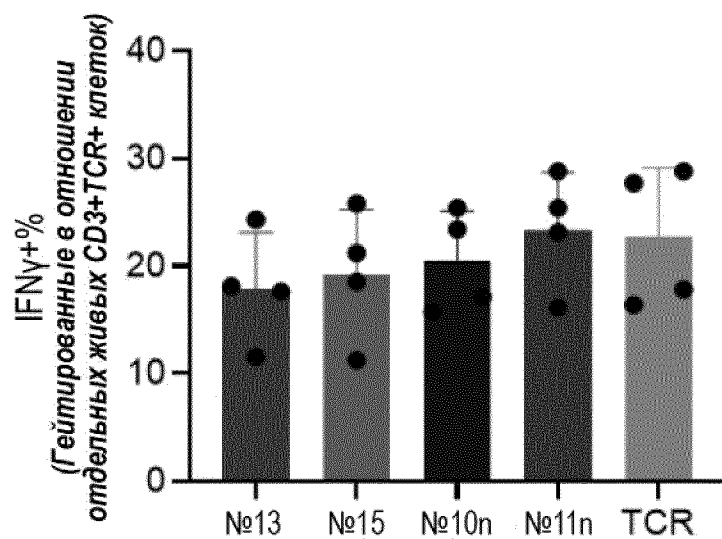
Фиг. 50А

Частота гранзим В+
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



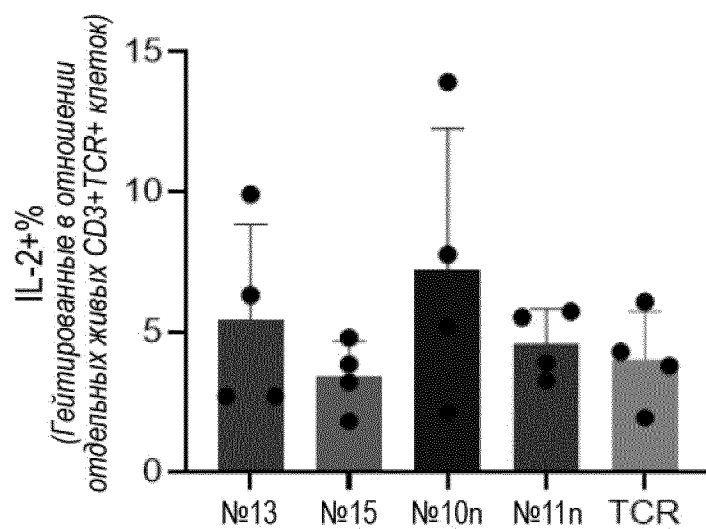
Фиг. 50В

Частота IFN γ +
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



Фиг. 50С

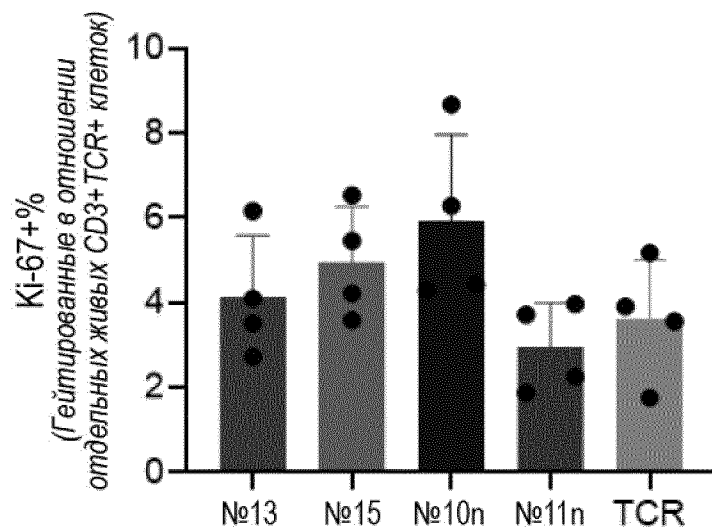
Частота IL-2+
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



Фиг. 50D

Частота Ki-67+

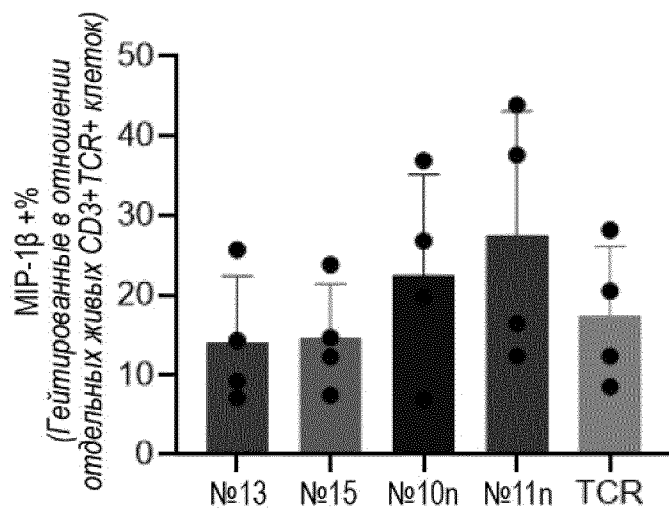
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



Фиг. 50E

Частота MIP-1 β +

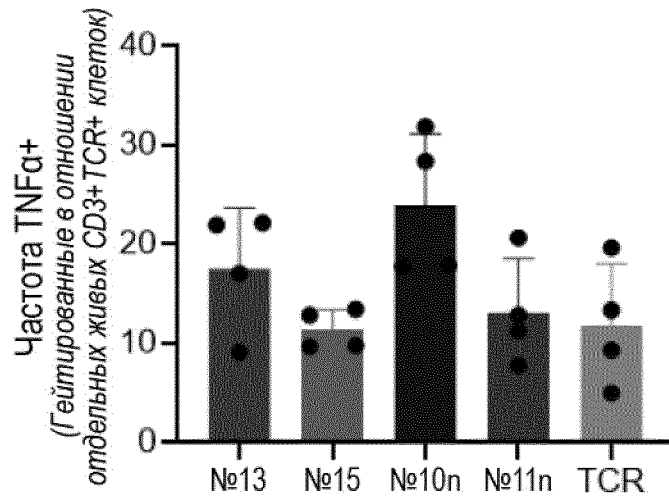
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



Фиг. 50F

Частота TNF α +

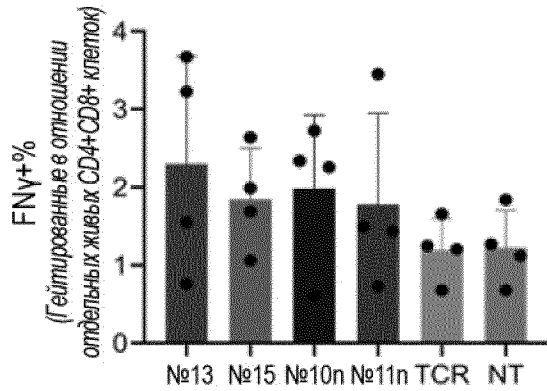
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении UACC257, панель ICS)



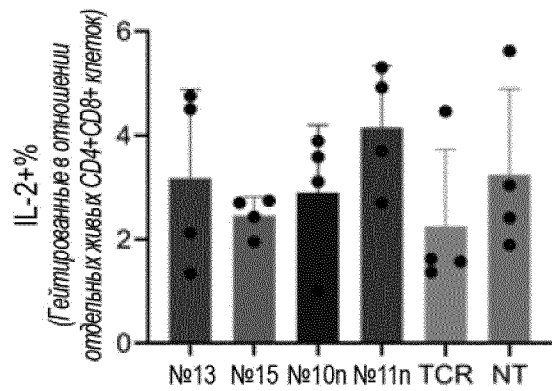
Фиг. 50G

Гейтированные в отношении CD4+CD8+

Частота IFN γ + (Сгруппированные данные, n=4; в отношении A375, панель ICS) Частота IL-2+ (Сгруппированные данные, n=4; в отношении A375, панель ICS)

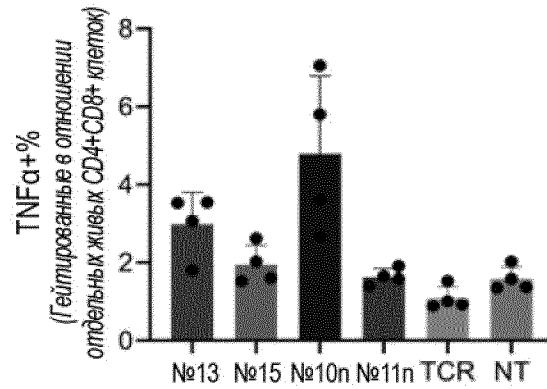


Фиг. 51А



Фиг. 51В

Частота TNF α + (Сгруппированные данные, n=4; в отношении A375, панель ICS)

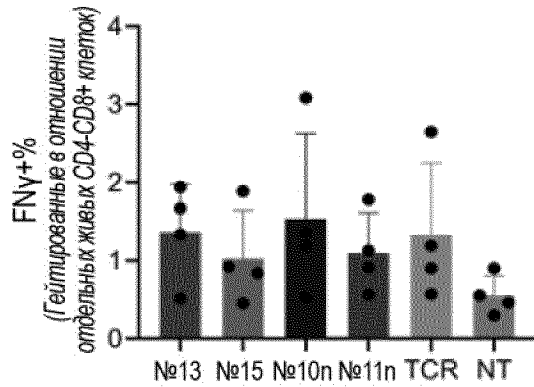


Фиг. 51С

Гейтированные в отношении CD4+CD8+

Частота IFN γ +

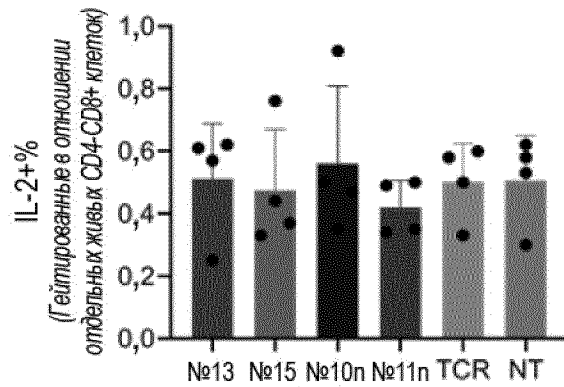
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении A375, панель ICS)



Фиг. 52А

Частота IL-2+

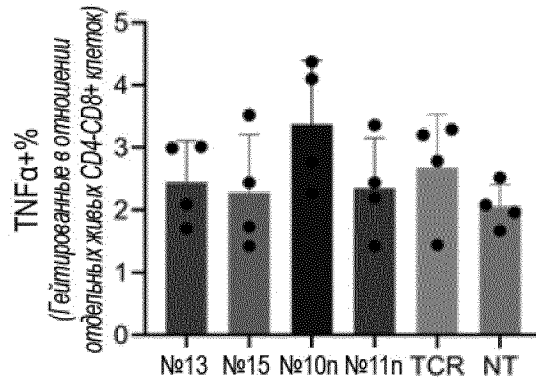
(Сгруппированные данные, n=4; в отношении A375, панель ICS)



Фиг. 52В

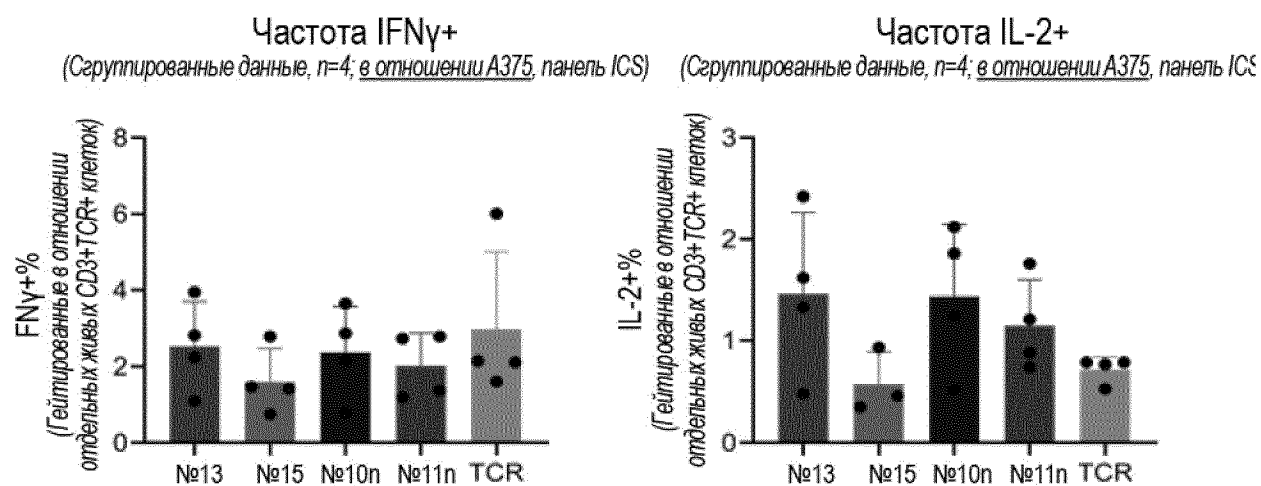
Частота TNF α +

(Сгруппированные данные, n=4; в отношении A375, панель ICS)



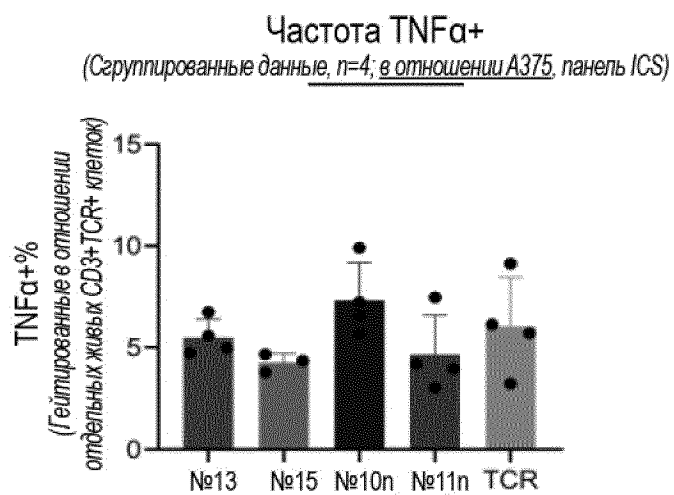
Фиг. 52С

Гейтированные в отношении CD3+TCR+

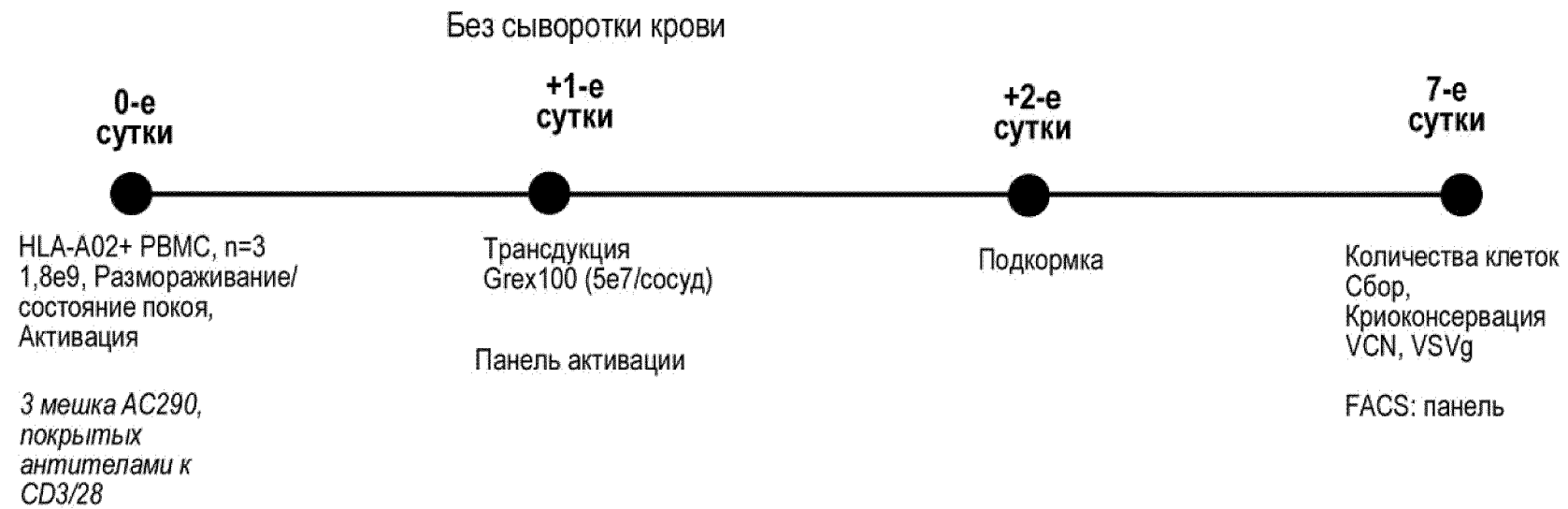


Фиг. 53А

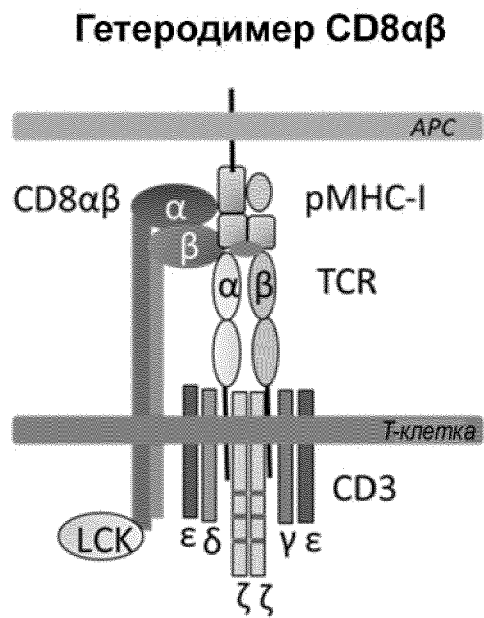
Фиг. 53В



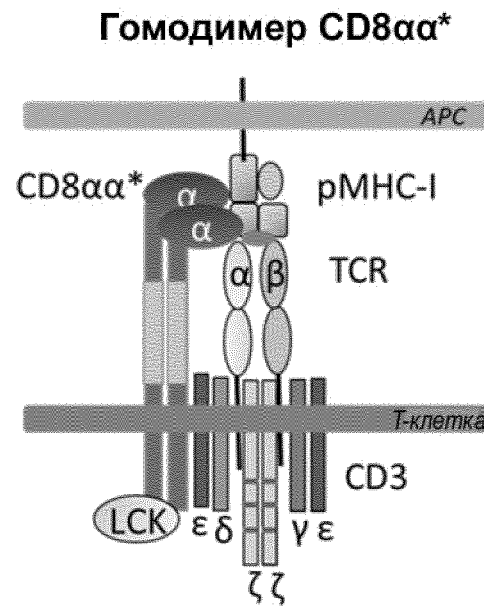
Фиг. 53С



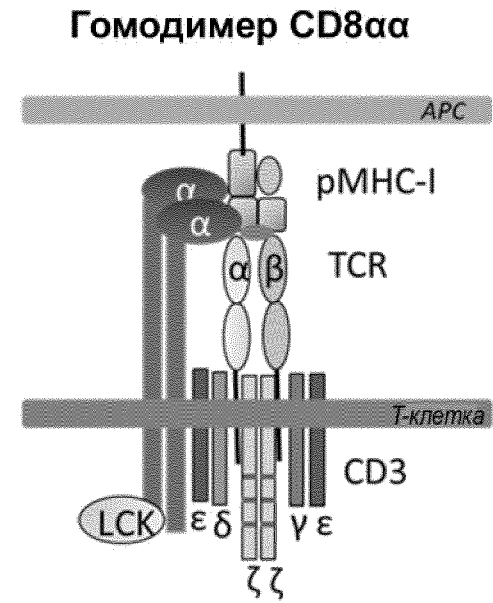
Фиг. 54



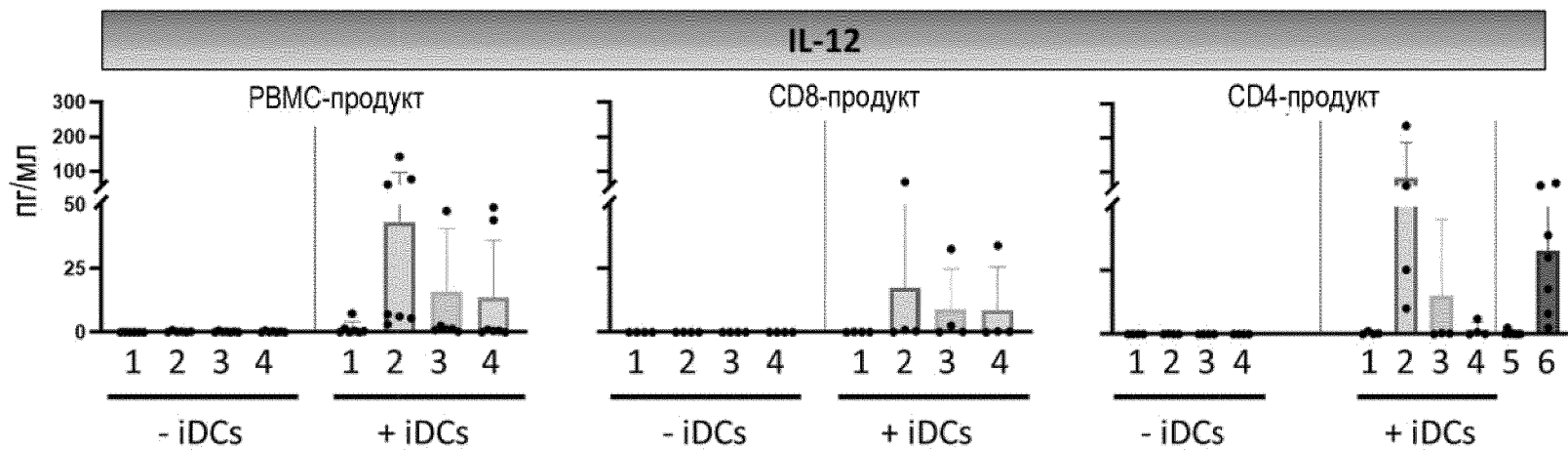
Фиг. 55А



Фиг. 55В

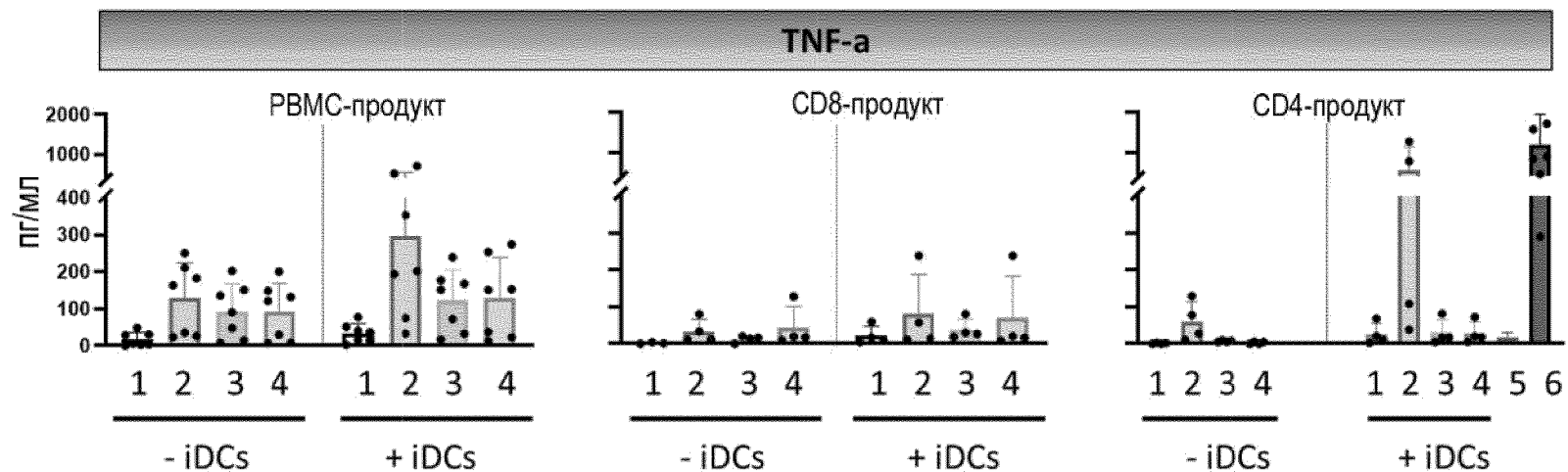


Фиг. 55С



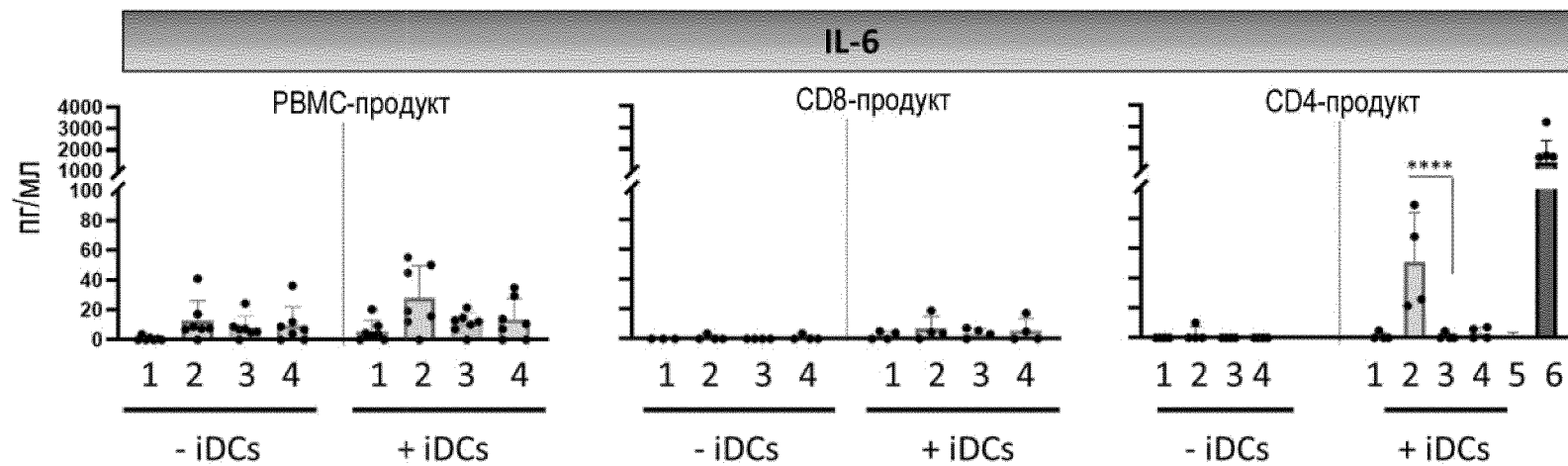
- 1 = NT
- 2 = Конструкция № 10 + UACC257
- 3 = Конструкция № 11 + UACC257
- 4 = TCR + UACC257
- 5 = Только iDC
- 6 = iDC + LPS

Фиг. 56



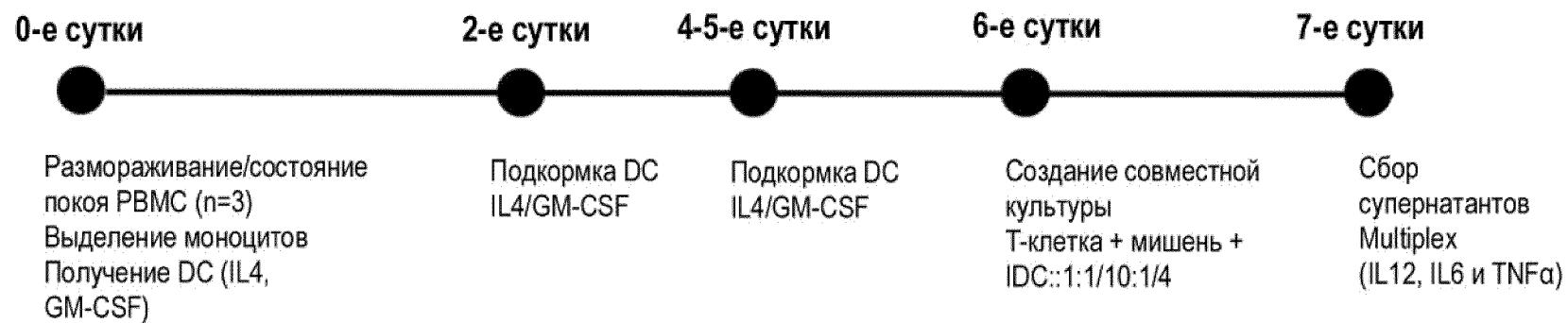
- 1 = NT
- 2 = Конструкция № 10 + UACC257
- 3 = Конструкция № 11 + UACC257
- 4 = TCR + UACC257
- 5 = Только iDC
- 6 = iDC + LPS

Фиг. 57

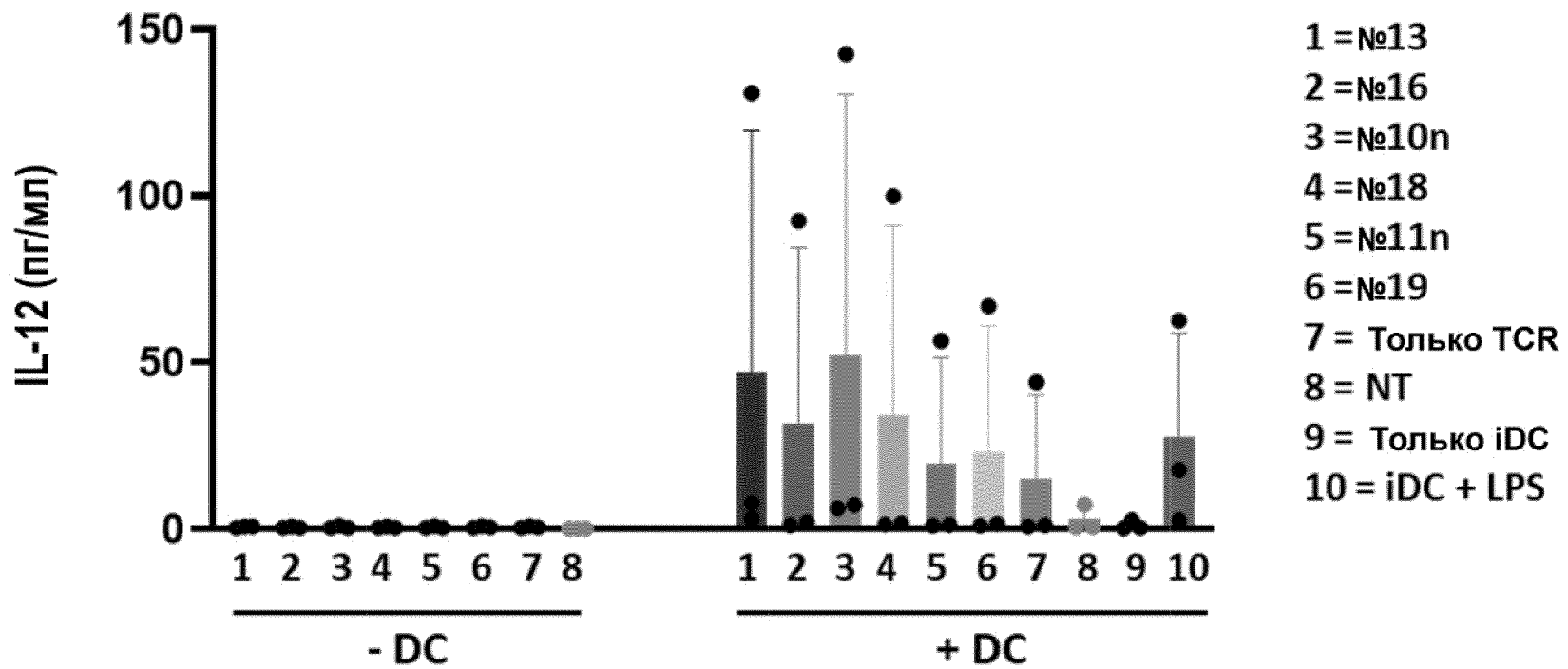


- 1 = NT
- 2 = Конструкция № 10 + UACC257
- 3 = Конструкция № 11 + UACC257
- 4 = TCR + UACC257
- 5 = Только iDC
- 6 = iDC + LPS

Фиг. 58

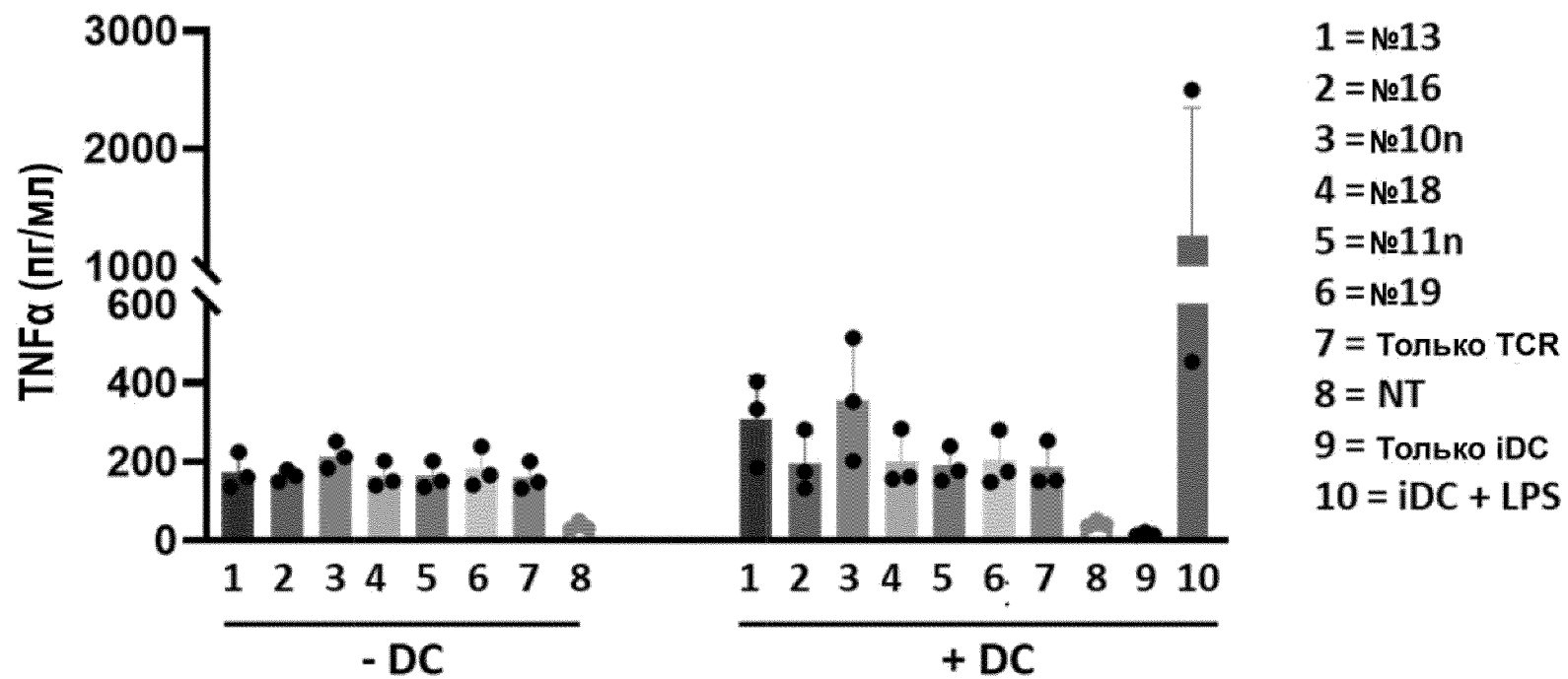


Фиг. 59

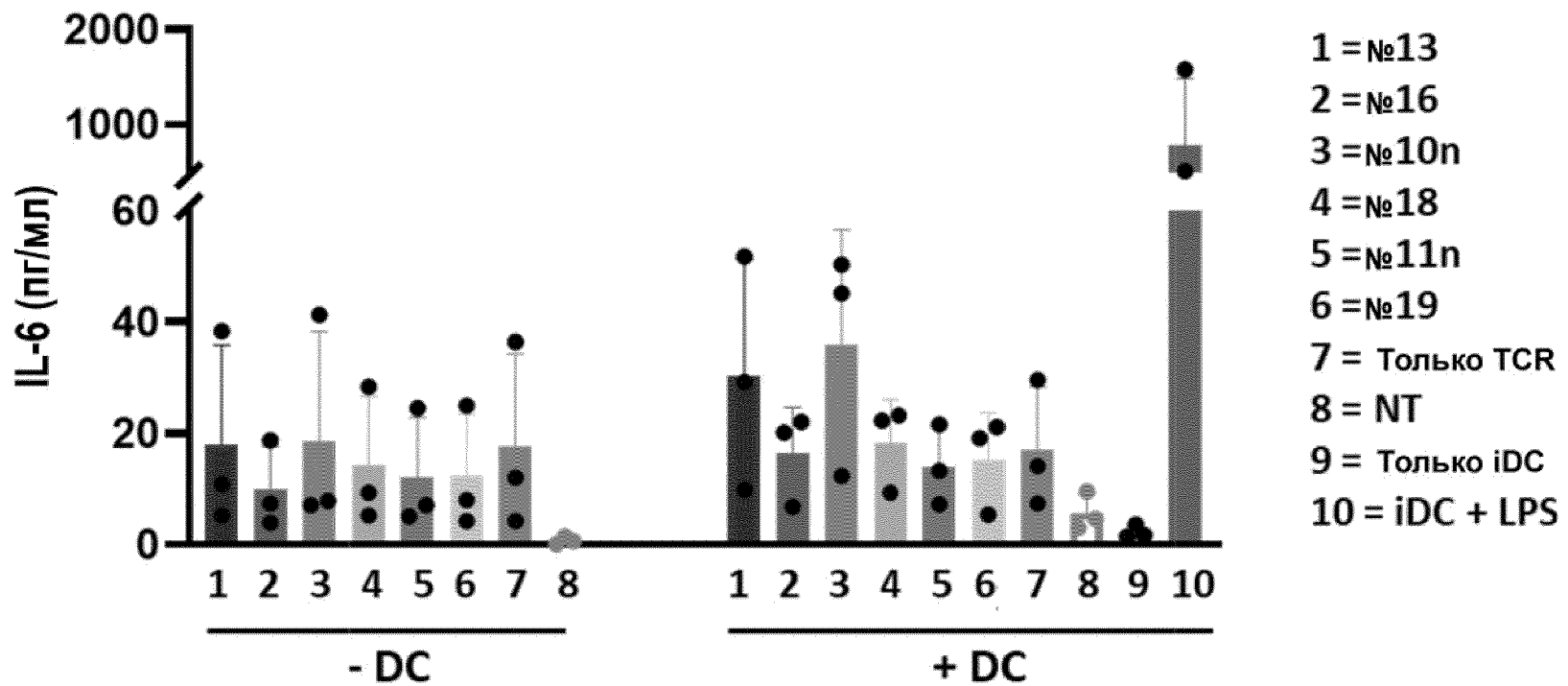


85/98

Фиг. 60



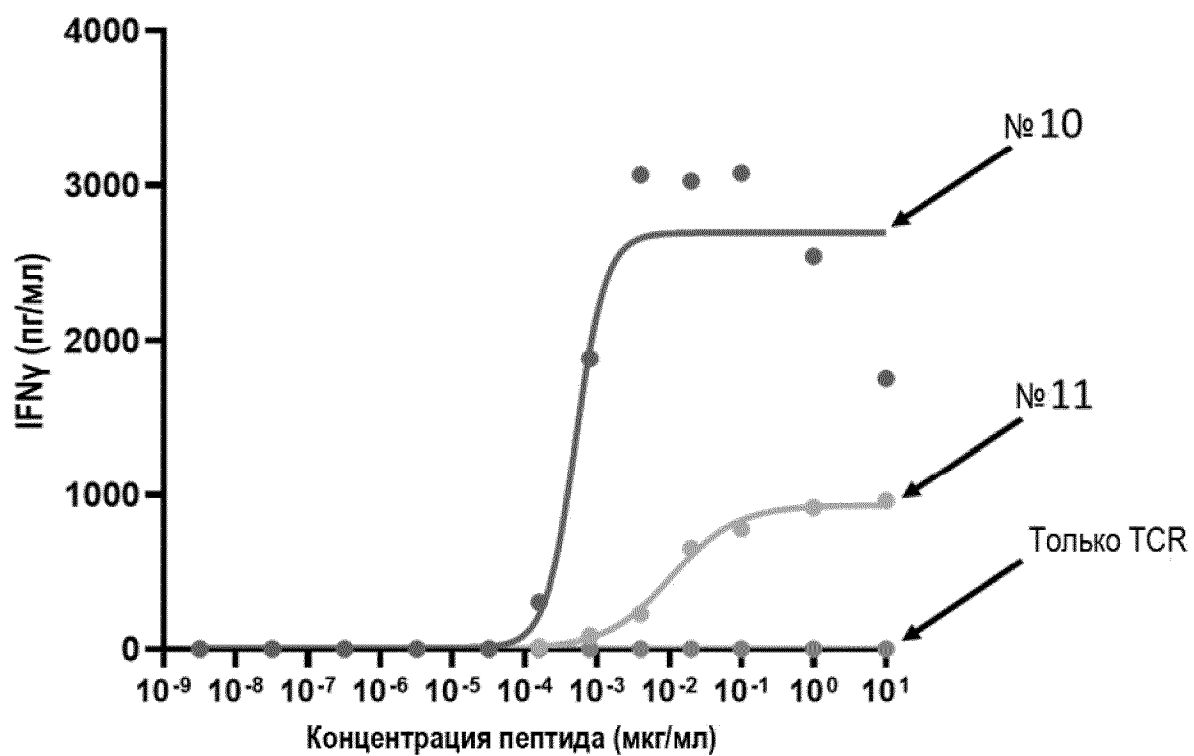
Фиг. 61



87/98

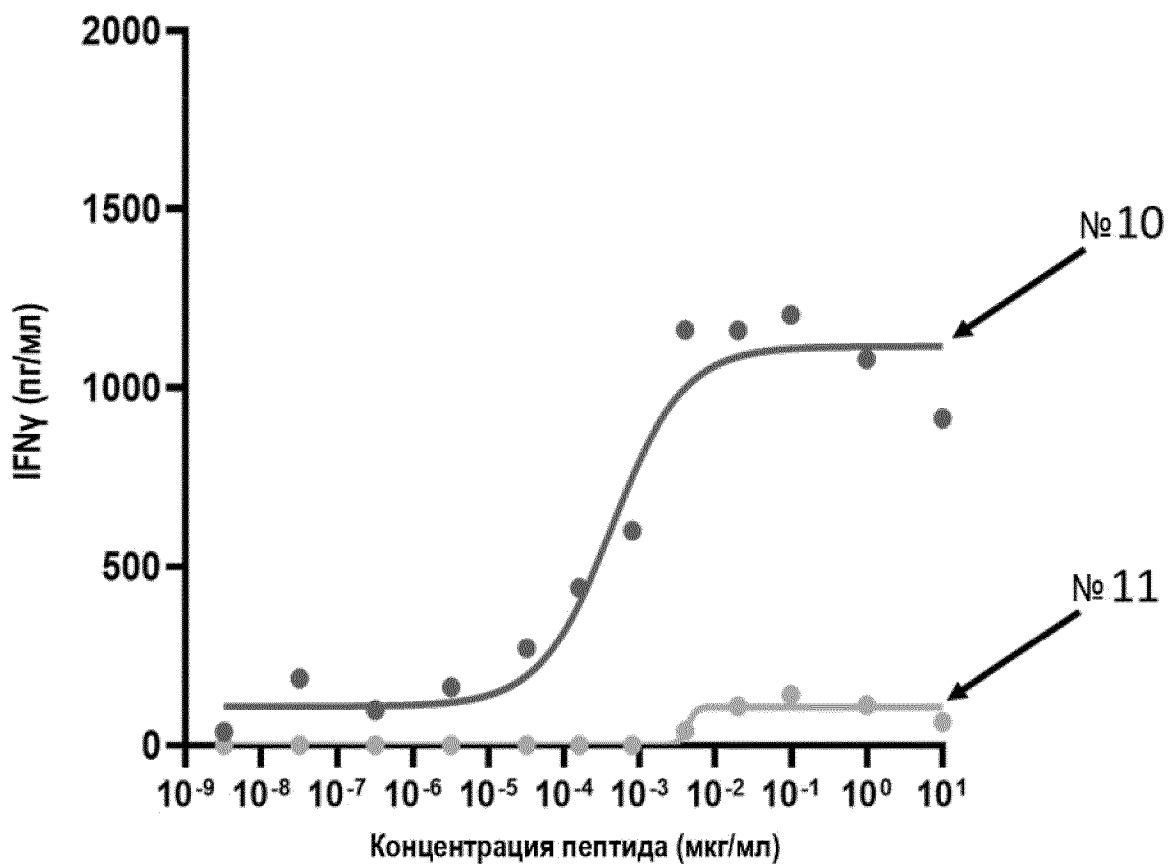
Фиг. 62

Донор № 1, отобранный по CD4+ продукт



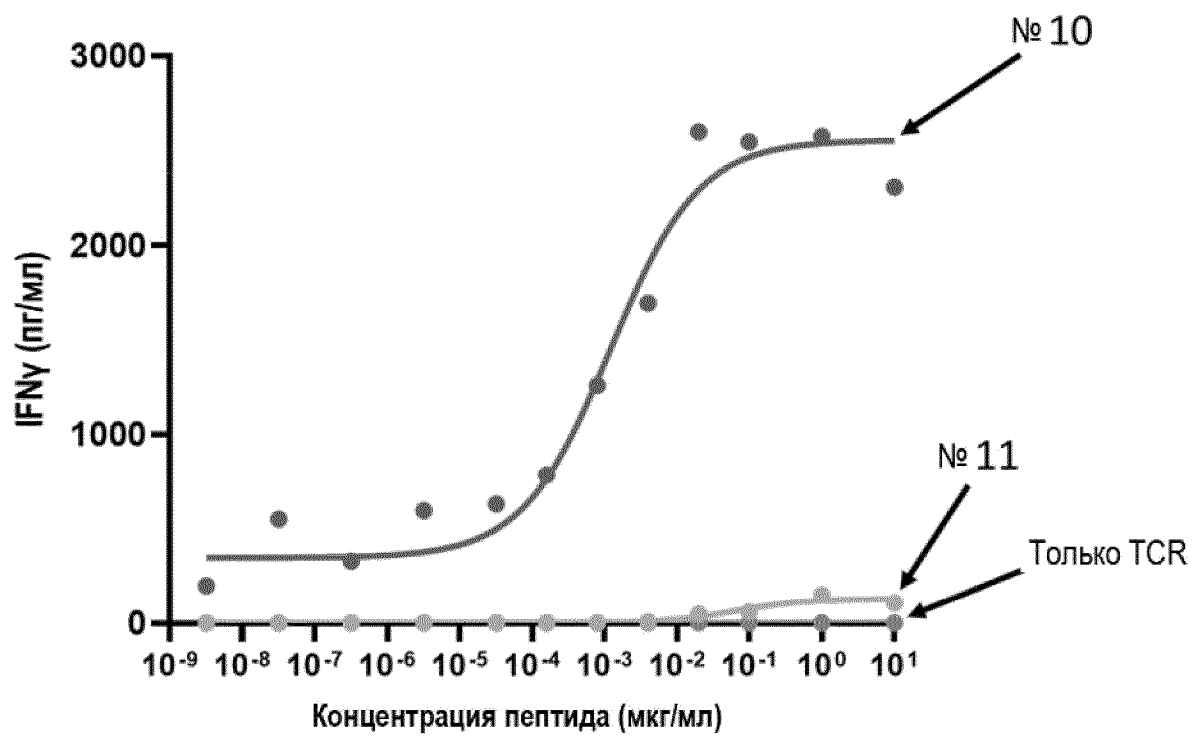
Фиг. 63А

Донор № 2, отобранный по CD4+ продукт



Фиг. 63В

Донор № 3, отобранный по CD4+ продукт



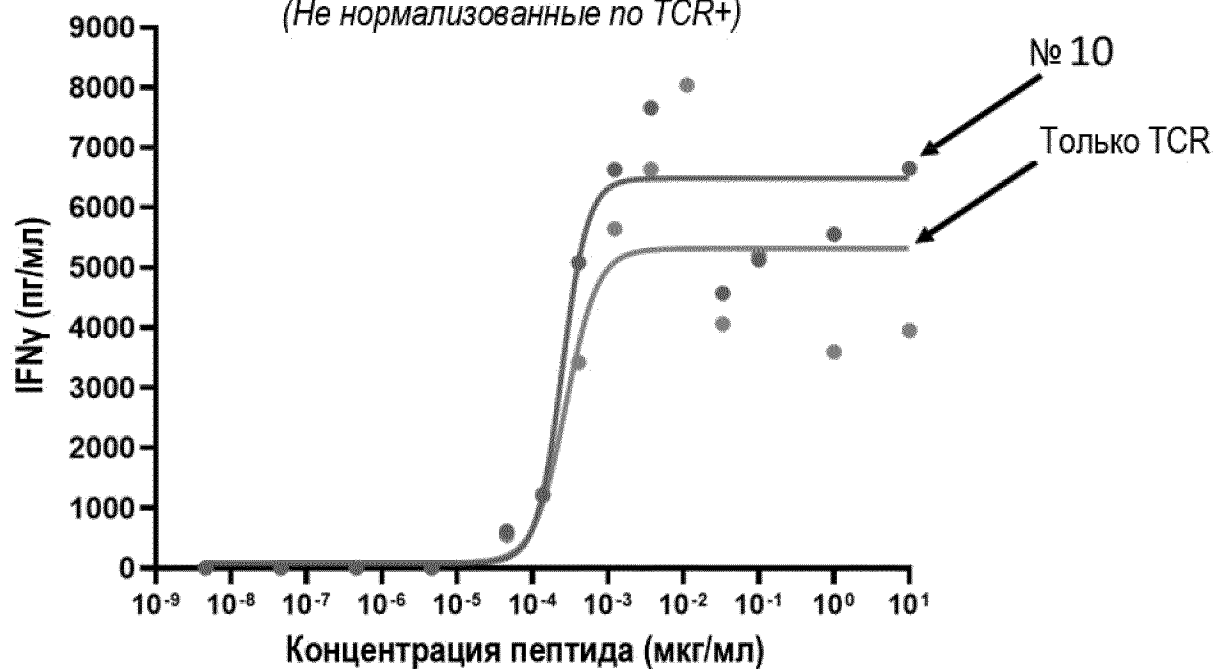
Фиг. 63С

Отобранные по CD4+	CD8ba.TCR	CD8a*.TCR	TCR
Донор № 1	0,51	10,6	-
Донор № 2	0,43	4,0	-
Донор № 3	1,21	60,0	-

Фиг. 63D

РВМС-продукт, донор № 4

(Не нормализованные по TCR+)

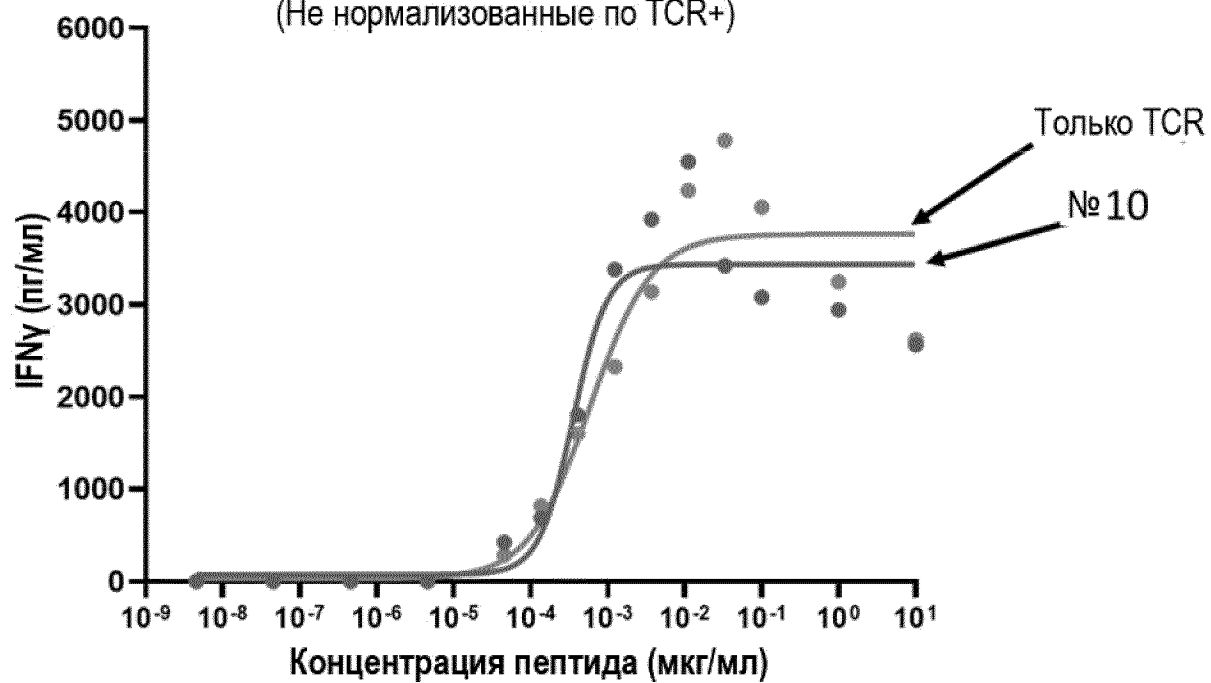


	№10	TCR
EC50 (нг/мл)	0,246	0,276
%CD3+tet+	42,2	17,1

Фиг. 64А

РВМС-продукт, донор № 1

(Не нормализованные по TCR+)

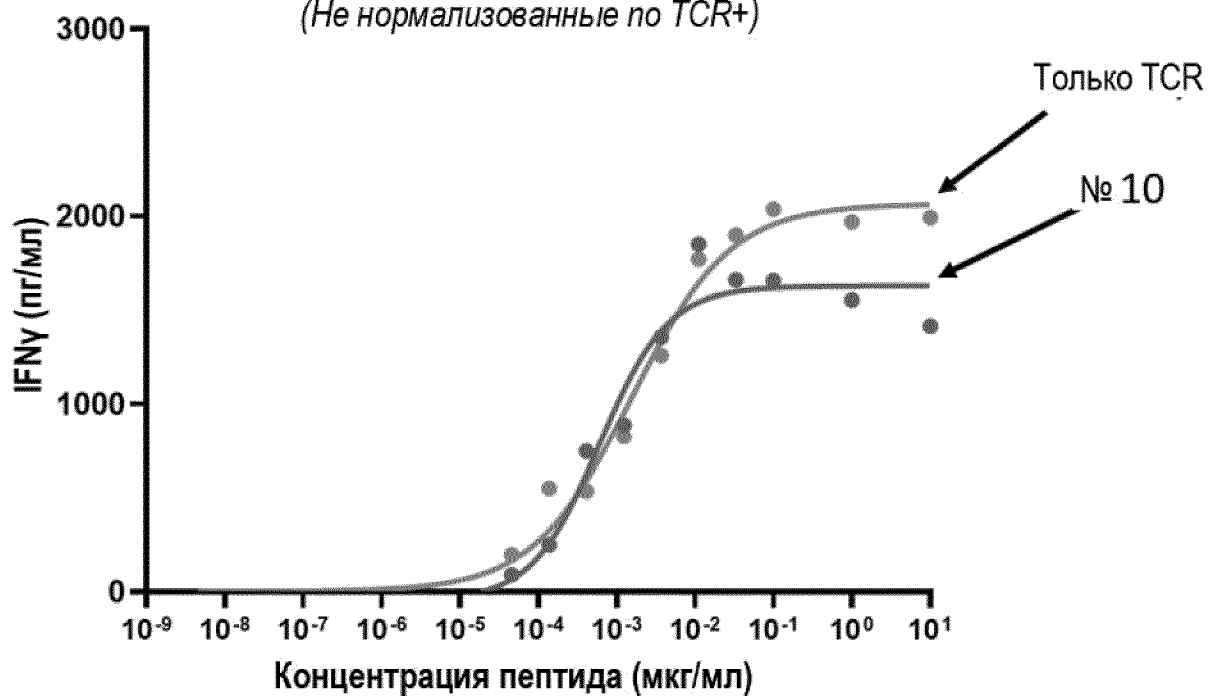


	№10	TCR
IEC50 (нг/мл)	0,360	0,591
%CD3+tet+	54,7	24,2

Фиг. 64В

РВМС-продукт, донор № 3

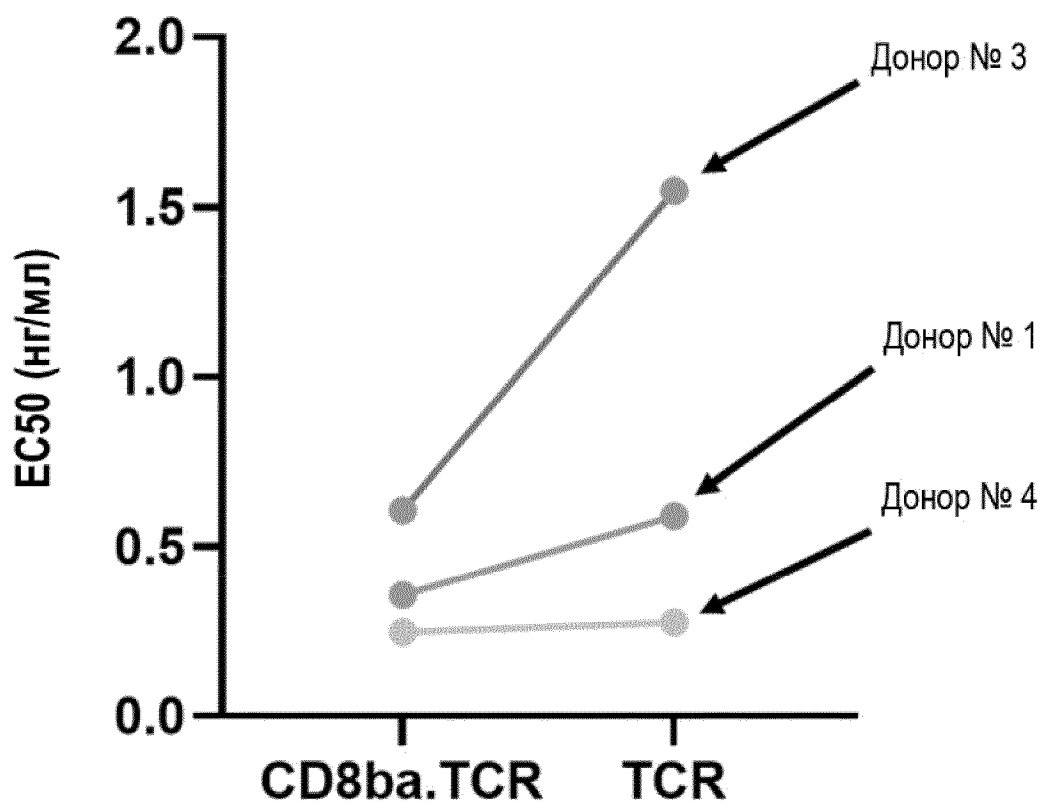
(Не нормализованные по TCR+)



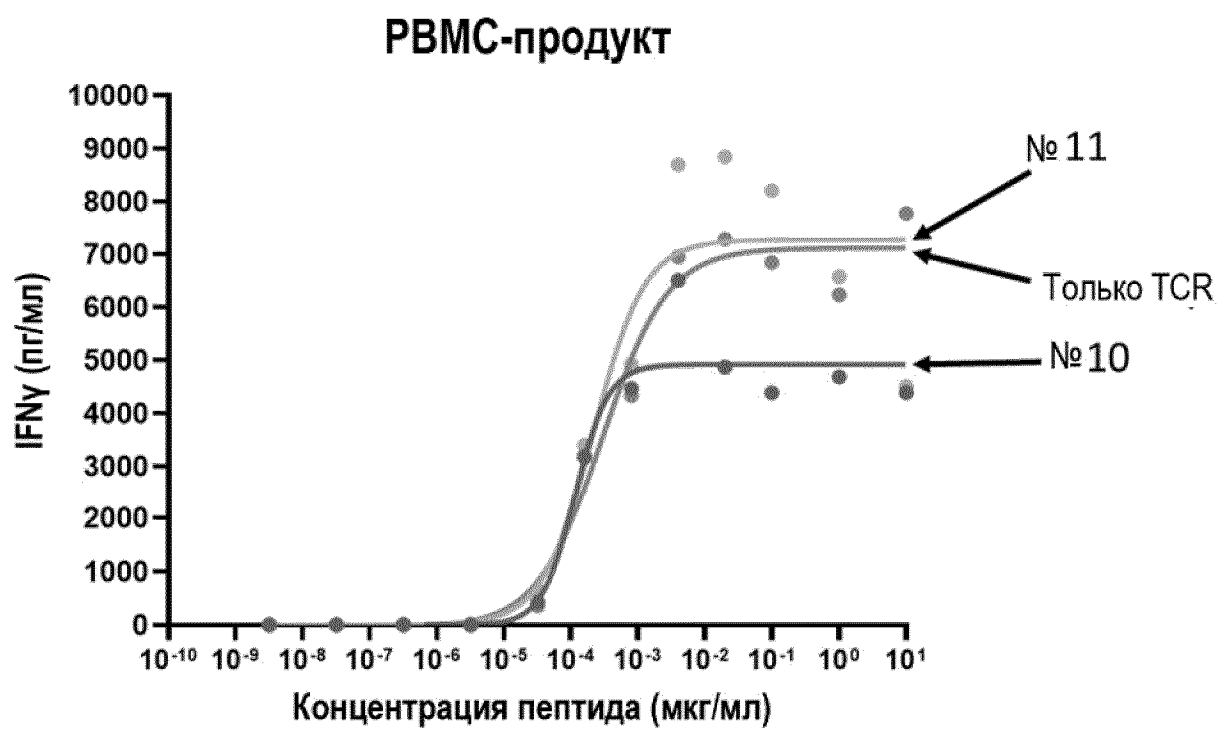
	№10	TCR
IEC50 (нг/мл)	0,608	1,549
%CD3+tet+	45,5	16,6

Фиг. 64С

Суммарные данные по EC50_PВМС-продукта
Не нормализованные, E:T::1:1



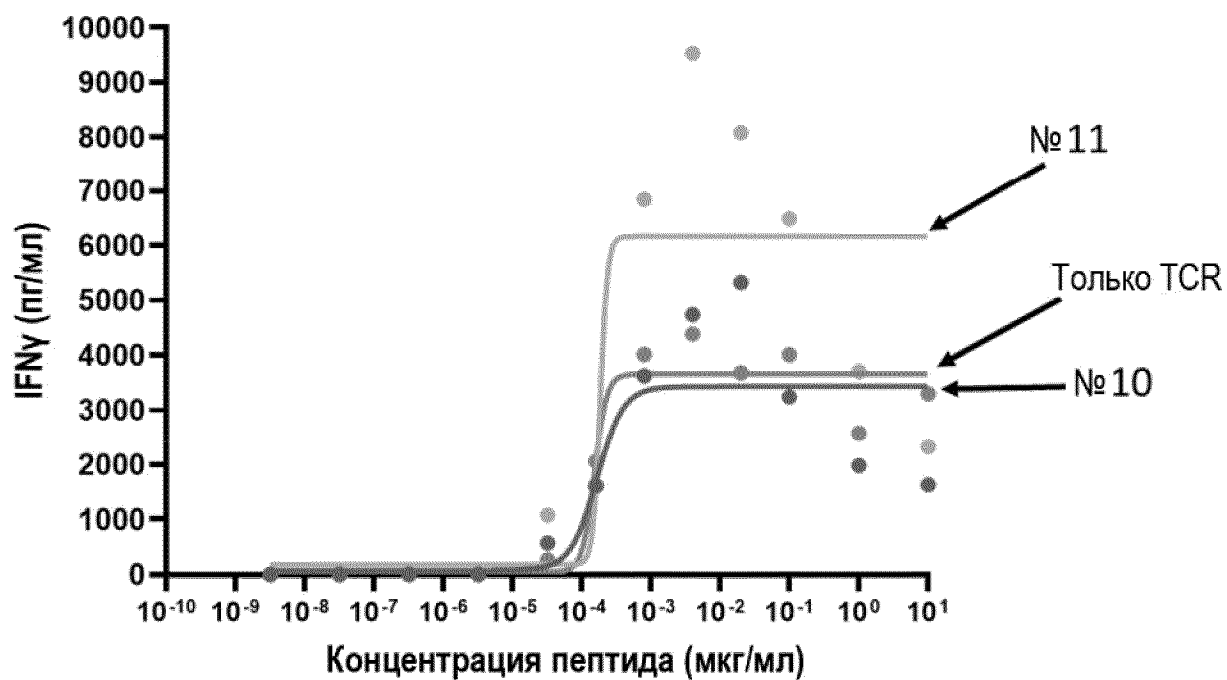
Фиг. 64D



	№10	TCR
EC50 (нг/мл)	0,116	0,295

Фиг. 65А

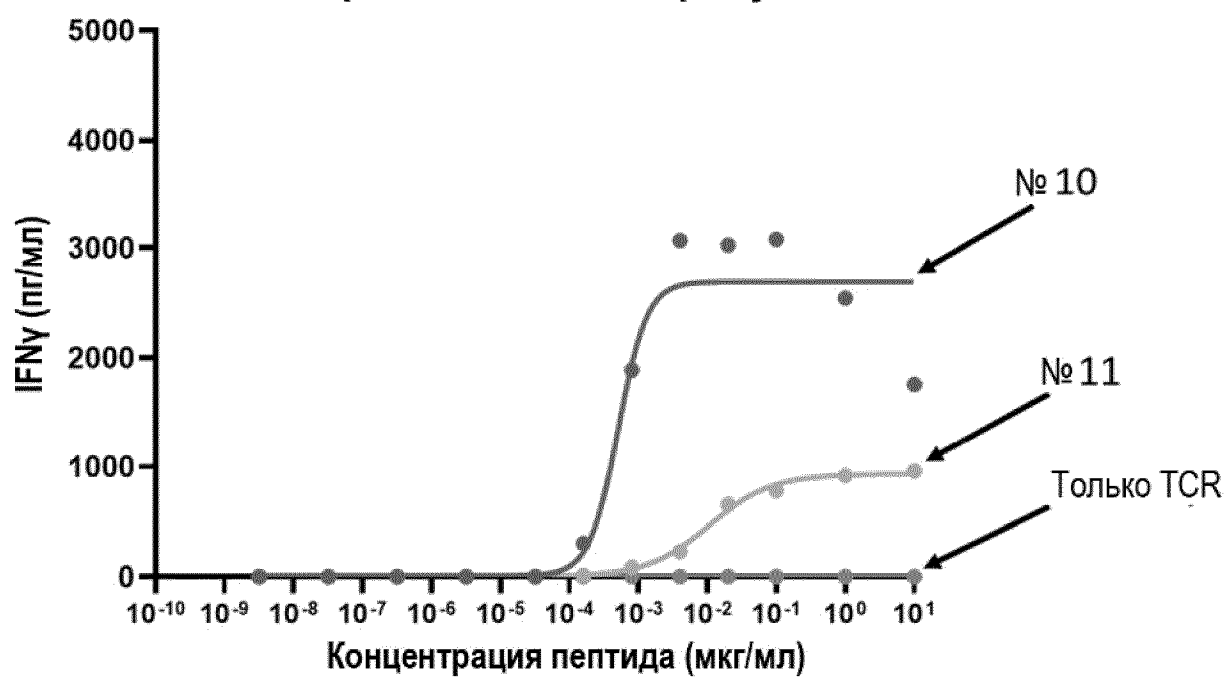
Отобранный по CD8 продукт



	№10	TCR
EC50 (нг/мл)	0,166	0,153

Фиг. 65В

Отобранный по CD4 продукт



	№10	TCR
EC50 (нг/мл)	0,51	-

Фиг. 65С