

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048022**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.21

(21) Номер заявки
202193139

(22) Дата подачи заявки
2020.05.27

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

(54) ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В АДОПТИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

(31) 62/853,123

(32) 2019.05.27

(33) US

(43) 2022.03.01

(86) PCT/US2020/034639

(87) WO 2020/243134 2020.12.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИММАТИКС ЮС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Мага Мелинда, Калра Мамта,
Буллиард Янник (US)**

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

(56) S. YANG ET AL.: "Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition", GENE THERAPY, vol. 15, no. 21, 22 May 2008 (2008-05-22), pages 1411-1423, XP055035564, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2008.90, whole document esp. seq id no 42; claim 17

US-A1-2019125798

US-A1-2019000878

WO-A1-2019070541

WO-A1-2018148454

WO-A1-2018058002

WO-A1-2020049496

(57) Вектор, содержащий первую последовательность нуклеотидов S1, кодирующую белок Z1, вторую последовательность нуклеотидов S2, кодирующую белок Z2, третью последовательность нуклеотидов S3, кодирующую белок Y1, и четвертую последовательность нуклеотидов S4, кодирующую белок Y2, в котором Z1 и Z2 образуют первый димер, а Y1 и Y2 образуют второй димер, в котором первый димер Z1Z2 отличается от второго димера Y1Y2.

B1

048022

048022

B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка является международной заявкой по процедуре РСТ (Договор о патентной кооперации), в которой испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США 62/853123, поданной 27 мая 2019 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Ссылка на список последовательностей, поданный в электронном виде

Официальная копия списка последовательностей представлена в электронной форме посредством EFS-Web в виде файла со списком последовательностей, отформатированных согласно ASCII, под названием "3000011-013977_SEQLIST_ST25.txt", созданного 26 мая 2020 г., размером 313,426 байтов, и поданного одновременно с описанием патента. Список последовательностей, содержащийся в данном файле, отформатированном согласно стандарту ASCII, являясь его частью, полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Уровень техники

1. Область изобретения

Настоящее изобретение относится к производству Т-клеток. В одном аспекте настоящее изобретение относится к процессу производства Т-клеток с помощью полицистронной кассеты в целях экспрессии множества белков в одном векторе. В частности, настоящее изобретение относится к производству Т-клеток, которые совместно экспрессируют TCR $\alpha\beta$ и CD8 $\alpha\beta$, и их применению в адоптивной клеточной терапии.

2. Уровень техники

Для получения методами генной инженерии человеческих лимфоцитов в качестве потенциальной терапии наследственных, приобретенных или инфекционных заболеваний требуются эффективный перенос и экспрессия трансгенов. В случае адоптивной иммунотерапии раковых заболеваний встречающиеся в природе и/или рекомбинантные противоопухолевые Т-клеточные рецепторы (ТКР) использовались для того, чтобы нормальные Т-клетки или опухоль-инфильтрующие лимфоциты наделить противоопухолевой активностью.

Morgan и соавт. (J Immunol. 2003 September 15; 171(6): 3287-3292) раскрывают ТКР к gp100, экспрессируемый за счет бицистронной РНК, где экспрессия первого гена, кодирующего цепь TCR β , контролируется длинным концевым повтором (LTR), а экспрессия второго гена, кодирующего цепь TCR α , регулируется участком внутренней посадки рибосомы (IRES). CD4+ Т-клетки, сконструированные с помощью данного гена, кодирующего ТКР к gp100, проявляли реактивность к антигену.

Cohen и соавт. (J Immunol. 2005 November 1; 175(9): 5799-5808) раскрывают бицистронный ретровирусный вектор для совместной экспрессии обеих цепей, TCR α и TCR β , связывающихся с эпитопом p53. Экспрессия первого гена, кодирующего цепь TCR α , регулируется LTR, а второго гена, кодирующего цепь TCR β , регулируется IRES. P53 лимфоциты, трансдуцированные ТКР, были в состоянии специфически распознавать с высокой авидностью АПК, нагруженные пептидом, а также клетки HLA-A2.1+, трансфицированные либо белком p53 дикого типа, либо его вариантом с мутацией.

Hughes и соавт. (Hum Gene Ther. 2005 April; 16(4): 457-472) раскрывают различные бицистронные ретровирусные векторы для совместной экспрессии ТКР к MART-1. Экспрессия первого гена, кодирующего цепь TCR α , контролируется LTR, а экспрессия второго гена, кодирующего цепь TCR β , регулируется IRES, или наоборот. Кроме того, экспрессия первого гена, кодирующего цепь TCR α , контролируется LTR, а экспрессия второго гена, кодирующего цепь TCR β , регулируется промотором PGK, или наоборот. Т-клетки, трансдуцированные этими векторами, демонстрировали свойства высокоэффективных эффекторных Т-клеток.

Zhao и соавт. (J Immunol. 2005 April 1; 174(7): 4415-4423) раскрывают бицистронные ретровирусные векторы для совместной экспрессии ТКР к NY-ESO-1. Экспрессия первого гена, кодирующего цепь TCR α , контролируется LTR, а второго гена, кодирующего цепь TCR β , контролируется IRES, или экспрессия первого гена, кодирующего цепь TCR α , контролируется LTR, а второго гена, кодирующего цепь TCR β , регулируется промотором PGK. Трансдуцированные лимфоциты могли эффективно распознавать и уничтожать HLA-A2- и NY-ESO-1-положительные линии клеток меланомы.

Morgan и соавт. (Gene Therapy (2008) 15, 1411-1423) раскрывают бицистронные лентивирусные векторы, в которых совмещены сайт расщепления фурином и аминокислотный спейсер (GSG или SGSG (SEQ ID NO: 8)), за которым следует 2A пептид с пропуском рибосомой пептидной связи, в целях экспрессии ТКР к gp100 или к MART-1. Если последовательность спейсера была дополнена тэговидной последовательностью синтетического пептида V5, это усиливало выработку белка, что приводило к получению лентивирусного вектора, способного на высоком уровне опосредовать экспрессию ТКР в трансдуцированных лимфоцитах.

Существует потребность в системах доставки генетического материала в целях надежной и эффективной экспрессии трансгена при адоптивной клеточной терапии.

Краткое изложение сущности изобретения

В одном аспекте данного описания предложена система доставки генетического материала, содер-

жащая вектор, включающий первую последовательность нуклеотидов S1, кодирующую белок Z1, вторую последовательность нуклеотидов S2, кодирующую белок Z2, третью последовательность нуклеотидов S3, кодирующую белок Y1, и четвертую последовательность нуклеотидов S4, кодирующую белок Y2, где Z1 и Z2 образуют первый димер, а Y1 и Y2 образуют второй димер, в котором первый димер Z1Z2 отличается от второго димера Y1Y2 и где система доставки генетического материала применяется в адоптивной клеточной терапии.

В другом аспекте S1, S2, S3 и S4 могут быть расположены в виде тандема в направлении от 5' к 3'-концу, выбранного из S1-S2-S3-S4, S1-S2-S4-S3, S1-S3-S2-S4, S1-S3-S4-S2, S1-S4-S3-S2, S1-S4-S2-S3, S2-S1-S3-S4, S2-S1-S4-S3, S2-S3-S1-S4, S2-S3-S4-S1, S2-S4-S3-S1, S2-S4-S1-S3, S3-S1-S2-S4, S3-S1-S4-S2, S3-S2-S1-S4, S3-S2-S4-S1, S3-S4-S1-S2, S3-S4-S2-S1, S4-S1-S2-S3, S4-S1-S3-S2, S4-S2-S1-S3, S4-S2-S3-S1, S4-S3-S1-S2 или S4-S3-S2-S1.

В другом аспекте вектор может дополнительно включать пятую последовательность нуклеотидов S5, кодирующую 2A пептид, и шестую последовательность нуклеотидов S6, кодирующую линкерный пептид, в котором S5 и S6 расположены между S1 и S2, S1 и S3, S1 и S4, S2 и S3, S2 и S4, и/или S3 и S4.

В другом аспекте 2A пептид может быть выбран из P2A (SEQ ID NO: 3), T2A (SEQ ID NO: 4), E2A (SEQ ID NO: 5), или F2A (SEQ ID NO: 6).

В другом аспекте линкерный пептид может быть GSG или SGSG (SEQ ID NO: 8).

В другом аспекте вектор может включать седьмую последовательность нуклеотидов S7, кодирующую пептид фурин (SEQ ID NO: 2), в котором S7 расположена между S1 и S2, S1 и S3, S1 и S4, S2 и S3, S2 и S4, и/или S3 и S4.

В другом аспекте вектор может дополнительно включать последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента (PRE), выбранную из вируса гепатита сурков (Woodchuck) PRE (WPRE) или PRE вируса гепатита В (HBV) (HPRE).

В другом аспекте вектор может дополнительно включать промоторную последовательность, которая контролирует транскрипцию S1, S2, S3, S4, S5, S6 и/или S7, где промоторная последовательность выбрана из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора фосфолипид-киназы (PGK), промотора основного белка миелина (MBP), промотора глиофибрилярного кислого белка (GFAP), модифицированного энхансера с LTR вируса MoMuLV миелолифферативной саркомы (MNDU3), промотора убиквитина С, промотора EF-1-альфа или промотора вируса стволовых клеток мыши (MSCV).

В другом аспекте первый димер Z1Z2 может быть выбран из SEQ ID NO: 13 и 14, 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 72, 73 и 74, 75 и 76, 77 и 78, 79 и 80, 81 и 82, 83 и 84, 85 и 86, 87 и 88 или 89 и 90.

В другом аспекте второй димер Y1 и Y2 представлен в последовательности SEQ ID NO: 11 и 12.

В другом аспекте ориентация соответствует S2-S1-S4-S3.

В другом аспекте вектор имеет последовательность, выбранную из PTE WPRE (SEQ ID NO: 91), PTE WPRE (SEQ ID NO: 92) или PTE fn WPRE (SEQ ID NO: 93).

В другом аспекте ориентация соответствует S4-S3-S2-S1.

В другом аспекте вектор имеет последовательность PTE CD8 TKP WPRE (SEQ ID NO: 94).

В другом аспекте вирусный вектор выбран из аденовирусов, вирусов оспы, альфа-вирусов, арена-вирусов, флавивирусов, рабдовирусов, ретровирусов, лентивирусов, вирусов герпеса, парамиксовирусов или пикорнавирусов.

В другом аспекте вектор псевдотипирован оболочечным белком вируса, выбранного из природного эндогенного вируса кошек (RD114), химерного варианта RD114 (RD114TR), вируса лейкоза гиббонов (GALV), химерного варианта GALV (GALV-TR), амфотропного вируса лейкоза мышей (MLV 4070A), бакуловируса (GP64), вируса везикулярного стоматита (VSV-G), вируса чумы кур (FPV), вируса Эболы (EboV), оболочечного гликопротеина ретровируса бабуина (BaEV) или вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV).

В другом аспекте вектор псевдотипирован оболочечным белком вируса везикулярного стоматита (VSV-G).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения Т-клеток для иммунотерапии, включающего выделение Т-клеток из пробы крови субъекта человеческого происхождения, активацию выделенных Т-клеток в присутствии аминокислот, трансдукцию активированных Т-клеток вектором согласно настоящему описанию и экспансию трансдуцированных Т-клеток.

В другом аспекте Т-клетки могут быть выделены из пробы, полученной при лейкоферезе взятых у человека образцов.

В другом аспекте аминокислот может быть выбран из памидроновой кислоты, аландоновой кислоты, золедоновой кислоты, ризедоновой кислоты, ибандоновой кислоты, инкадроновой кислоты, ее соли и/или ее гидрата.

В другом аспекте активация может производиться, кроме того, в присутствии рекомбинантного интерлейкина 2 человека (ИЛ-2) и рекомбинантного интерлейкина 15 человека (ИЛ-15).

В другом аспекте экспансия может производиться в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15.

В другом аспекте Т-клетки могут быть $\gamma\delta$ Т-клетками.

В другом аспекте первый димер Z1Z2 и второй димер Y1Y2 экспрессированы совместно на поверхности экспансированных Т-клеток.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к популяции экспансированных Т-клеток, полученных с помощью способа согласно аспектам, приведенным выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, больного раком, включающему введение пациенту композиции, включающей популяцию экспансированных Т-клеток, описанных в настоящем документе, в которой Т-клетки уничтожают раковые клетки, которые презентуют пептид в комплексе с молекулой МНС на их поверхности, где пептид выбран из любой из последовательностей с SEQ ID NO: 98-255, где раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, меланомы, пака печени, рака молочной железы, рака матки, карциномы клеток Меркеля, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака желчных протоков, колоректального рака, рака мочевого пузыря, рака почек, лейкоза, рака яичника, рака пищевода, рака головного мозга, рака желудка и рака предстательной железы.

В другом аспекте композиция дополнительно включает адъювант.

В другом аспекте адъювант выбран из одного или более из следующего: антитело к CD40, имиквимод, резиквимод, ГМ-КСФ, циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб, атезолизумаб, интерферон-альфа, интерферон-бета, CpG олигонуклеотиды и их производные, поли-(I:C) и ее производные, РНК, силденафил, составы из твердых микрочастиц на основе поли(лактид когликолида) (PLG), виросомы, интерлейкин (ИЛ)-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-21 и ИЛ-23.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу вызывания иммунного ответа у пациента, больного раком, включающему введение пациенту композиции, включающей популяцию экспансированных Т-клеток, описанных в настоящем документе, в котором Т-клетки уничтожают раковые клетки, которые презентуют пептид в комплексе с молекулой МНС на их поверхности, где пептид выбран из любой из последовательностей с SEQ ID NO: 98-255 и где раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, меланомы, пака печени, рака молочной железы, рака матки, карциномы клеток Меркеля, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака желчных протоков, колоректального рака, рака мочевого пузыря, рака почек, лейкоза, рака яичника, рака пищевода, рака головного мозга, рака желудка и рака предстательной железы.

В другом аспекте иммунный ответ включает ответ цитотоксических Т-клеток.

В одном аспекте настоящего изобретения предложены способы получения Т-клеток при использовании статина в способе, описанном в настоящем документе. В другом аспекте настоящего изобретения предложены способы получения Т-клеток за счет активации Т-клеток в присутствии статина.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения Т-клеток для иммунотерапии, включающего активацию Т-клеток в присутствии статина, трансдукцию активированных Т-клеток вектором по настоящему изобретению, причем вектор может быть псевдотипирован оболочечным белком вируса везикулярного стоматита (VSV-G), и экспансию трансдуцированных Т-клеток.

В другом аспекте Т-клетки могут включать $\alpha\beta$ Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки и/или естественные киллерные Т-клетки.

В другом аспекте статин может быть выбран из atorвастатина, церивастатина, дальвастатина, флуиндостатина, флувастатина, мевастатина, правастатина, симвастатина, велостатина и розувастатина.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения Т-клеток для иммунотерапии, включающего активацию Т-клеток, трансдукцию активированных Т-клеток вектором по настоящему изобретению и экспансию трансдуцированных Т-клеток.

В другом аспекте активация может осуществляться в присутствии антитела к CD3 и антитела к CD28.

В другом аспекте экспансия может производиться в присутствии ИЛ-7 и ИЛ-15.

Краткое описание рисунков

На фиг. 1 показана схема процесса производства $\gamma\delta$ Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления данного изобретения. Производство $\gamma\delta$ -Т-клеток может включать сбор или получение лейкоцитов или МКПК, например, продукта лейкофереза, истощение $\alpha\beta$ -Т-клеток из МКПК или продукта лейкофереза, последующую активацию, трансдукцию и экспансию $\gamma\delta$ -Т-клеток.

На фиг. 2 представлены стратегии трансдукции с помощью перестановки открытых рамок считывания (ORF) в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 3 показаны лентивирусные конструкции в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 4 показаны лентивирусы, псевдотипированные RD114TR, использованные для трансдукции $\gamma\delta$ Т-клеток в День 3 или День 6 после активации с помощью золедроната, ИЛ-2 и ИЛ-15. Эффективность трансдукции оценивали с помощью антител, специфичных к ТКР ($V\beta 8$) и CD8 (CD8 α), методом проточной цитометрии.

На фиг. 5А показана конструкция в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего

изобретения.

На фиг. 5B показана конструкция в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 5C показана конструкция в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 5D показана конструкция в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 6A показана конструкция в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 6B показана конструкция в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 7 схематически показаны конструкции в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 8A показана конструкция в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 8B показана конструкция в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 8C показана конструкция в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 8D показана конструкция в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 9A схематически показаны конструкции в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 9B схематически показаны конструкции в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 10 показана процентная доля CD8+TKP+ $\gamma\delta$ Т-клеток, трансдуцированных вирусным вектором, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE или TPE.WPRE. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей.

На фиг. 11 показано медианное значение интенсивности флуоресценции (MFI) в $\gamma\delta$ Т-клетках, экспрессирующих CD8 и ТКР, трансдуцированных вирусным вектором, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE или TPE.WPRE. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей.

На фиг. 12 показана активность по уничтожению опухолевых клеток $\gamma\delta$ Т-клетками, полученными от Донора 3, которые были трансдуцированы вирусным вектором, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE или TPE.WPRE, в линии опухолевых клеток, в высокой степени экспрессирующей антиген, например, UACC257 (верхняя секция), или в линии опухолевых клеток, в низкой степени экспрессирующей антиген, например, U2OS (нижняя секция), как было определено с помощью анализа цитотоксичности Incucyte. В качестве контроля служили только мишень-положительные и нетрансдуцированные клетки.

На фиг. 13A-13C показан уровень интерферона (IFN)- γ , секретируемого $\gamma\delta$ Т-клетками, полученными у Донора 3, которые были трансдуцированы вирусным вектором, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE или TPE.WPRE в линии опухолевых клеток, в высокой степени экспрессирующей антиген, например UACC257 (фиг. 13A), в линии опухолевых клеток, в низкой степени экспрессирующей антиген, например U2OS (фиг. 13B), или в антиген-отрицательной линии опухолевых клеток, например, MCF-7 (фиг. 13C). Нетрансдуцированные клетки использовали в качестве контроля.

На фиг. 14 показана активность по уничтожению опухолевых клеток $\gamma\delta$ Т-клетками, полученными от Донора 4, которые были трансдуцированы вирусным вектором, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE или TPE.WPRE в линии опухолевых клеток, в высокой степени экспрессирующей антиген, например UACC257 (верхняя секция) или в линии опухолевых клеток, в низкой степени экспрессирующей антиген, например, U2OS (нижняя секция), как было определено с помощью анализа цитотоксичности "Incucyte". В качестве контроля служили только мишень-положительные и нетрансдуцированные клетки.

На фиг. 15A-15C показан уровень IFN- γ , секретируемого $\gamma\delta$ Т-клетками, полученными у Донора 4, которые были трансдуцированы вирусным вектором, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE или TPE.WPRE в линии опухолевых клеток, в высокой степени экспрессирующей антиген, например UACC257 (фиг. 15A), в линии опухолевых клеток, в низкой степени экспрессирующей антиген, например U2OS (фиг. 15B), или в антиген-отрицательной линии опухолевых клеток, например MCF-7 (фиг. 15C). Нетрансдуцированные клетки использовали в качестве контроля.

На фиг. 16 показано количество копий вирусного вектора в $\gamma\delta$ Т-клетках, содержащих PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE или TPE.WPRE. Нетрансдуцированные клетки использовали в качестве контроля.

На фиг. 17А и 17В показана кратность экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток, полученных у Донора 3 (фиг. 17А) или у Донора 4 (фиг. 17В), трансдуцированных вирусным вектором, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE или TPE.WPRE. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей.

На фиг. 18А представлены данные о фенотипе клеток памяти у $\gamma\delta$ Т-клеток, полученные с помощью проточной цитометрии в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 18В представлены данные о фенотипе клеток памяти у $\gamma\delta$ Т-клеток, трансдуцированных вирусным вектором, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE или TPE.WPRE. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей.

На фиг. 19 показано сравнение эффективности трансдукции между $\gamma\delta$ Т-клетками, трансдуцированными одним лентивирусным вектором (LV), содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE (секция В (120 мкл) и секция С (240 мкл)), или трансдуцированными двумя отдельными лентивирусными векторами: одним, содержащим R11KE.WPRE, и другим, содержащим CD8.WPRE (секции D и E), с возрастающим количеством вирусных векторов, например, по 120 мкл каждого из R11KE.WPRE и CD8.WPRE (секция D) и по 240 мкл каждого из R11KE.WPRE и CD8.WPRE (секция E). Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей.

На фиг. 20 показана повышенная эффективность трансдукции в $\gamma\delta$ Т-клетках, трансдуцированных возрастающим количеством вирусного вектора PTE.CD8.TCR.WPRE, например 30 мкл, 120 мкл и 240 мкл. Нетрансдуцированные клетки использовали в качестве контроля.

На фиг. 21 показана принудительная экспрессия CD8 в CD4+ Т-клетках, полученных у Донора 5 и Донора 6, при использовании различных разведений лентивирусного вектора (LV), экспрессирующего конструкцию 4-в-1 согласно настоящему описанию, например LV-PTE.CD8.TCR.WPRE.

На фиг. 22 показано обнаружение экспрессии ТКР в CD4+ Т-клетках с помощью различных разведений LV, экспрессирующего конструкцию 4-в-1 согласно настоящему описанию, например, LV-PTE.CD8.TCR.WPRE

На фиг. 23 показана процентная доля меченых Dex203 (Dex203) клеток, экспрессирующих комплекс пептид-мишень/МНС, в CD4+ и/или CD8+ Т-клетках, полученных у Донора 5 (верхняя секция) и Донора 6 (нижняя секция), трансдуцированных конструкцией 4-в-1 согласно настоящему описанию, например LV-PTE.CD8.TCR.WPRE.

На фиг. 24 показано значение MFI для меченых Dex203 CD4+ и/или CD8+ Т-клеток, полученных у Донора 5 (верхняя секция) и Донора 6 (нижняя секция), трансдуцированных конструкцией 4-в-1 согласно настоящему описанию, например LV-PTE.CD8.TCR.WPRE.

На фиг. 25 показано планирование эксперимента по испытанию функциональности Т-клеток, трансдуцированных конструкцией 4-в-1 или конструкцией только с ТКР в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 26 показан рост процентной доли IFN- γ -положительных клеток (верхняя секция) и рост уровня MFI в меченых антителами к IFN- γ (нижняя секция) CD4-CD8 α + Т-клетках, полученных у группы доноров, которые были трансдуцированы лентивирусным вектором, содержащим R11KE.WPRE (LV-ТКР) (ТКР) или лентивирусным вектором, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE (LV-CD8.TCR) (TCR+CD8), с последующим совместным культивированием с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, по сравнению с совместным культивированием с линией клеток MCF7, не экспрессирующей мишени. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=4).

На фиг. 27 показан рост процентной доли гранзим В-положительных клеток (верхняя секция) и рост уровня MFI в меченых антителами к гранзиму В (нижняя секция) CD4-CD8 α + Т-клетках, полученных у группы доноров, которые были трансдуцированы LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с последующим совместным культивированием с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, по сравнению с совместным культивированием с линией клеток MCF7, не экспрессирующей мишени. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=3).

На фиг. 28 показан рост процентной доли IFN- γ -положительных клеток (верхняя секция) и рост уровня MFI (нижняя секция) в меченых антителами к IFN- γ CD4+CD8 α + Т-клетках, полученных у группы доноров, которые были трансдуцированы LV-CD8.TCR (ТКР+CD8) или без трансдукции (NT), с последующим совместным культивированием с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, по сравнению с совместным культивированием с линией клеток MCF7, не экспрессирующей мишени (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=4).

На фиг. 29 показан рост процентной доли гранзим В-положительных клеток (верхняя секция) и рост уровня MFI (нижняя секция) в меченых антителами к гранзиму В CD4+CD8 α + Т-клетках, полученных у группы доноров, которые были трансдуцированы LV-CD8.TCR (ТКР+CD8) или без трансдукции (NT), с последующим совместным культивированием с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени.

щими мишени, по сравнению с совместным культивированием с линией клеток MCF7, не экспрессирующей мишени (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=4).

На фиг. 30 показан рост процентной доли IFN- γ -положительных клеток (верхняя секция) и рост уровня MFI (нижняя секция) в меченых антителами к IFN- γ CD3+ Т-клетках, полученных у группы доноров, которые были трансдуцированы LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с последующим совместным культивированием с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, по сравнению с совместным культивированием с линией клеток MCF7, не экспрессирующей мишени. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=4).

На фиг. 31 показан рост процентной доли гранзим В-положительных клеток (верхняя секция) и рост уровня MFI (нижняя секция) в меченых антителами к гранзиму В CD3+ Т-клетках, полученных у группы доноров, которые были трансдуцированы LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с последующим совместным культивированием с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, по сравнению с совместным культивированием с линией клеток MCF7, не экспрессирующей мишени. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=3).

На фиг. 32 показано увеличение секреции IFN- γ в CD3+ Т-клетках, полученных у группы доноров, которые были трансдуцированы LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с последующим совместным культивированием с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, по сравнению с совместным культивированием с линией клеток MCF7, не экспрессирующей мишени. Нетрансдуцированные (NT) клетки, клетки UACC257 и клетки MCF7 служили в качестве контроля (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=4).

На фиг. 33 показано увеличение секреции IFN- γ в CD3+ Т-клетках, полученных у отдельных доноров 5, 6, 7 и 8, которые были трансдуцированы LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с последующим совместным культивированием с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, по сравнению с совместным культивированием с линией клеток MCF7, не экспрессирующей мишени. Нетрансдуцированные (NT) клетки, только клетки UACC257 и только клетки MCF7 служили в качестве контроля (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1).

На фиг. 34 показана процентная доля CD25+ клеток (верхняя секция), CD69+ клеток (средняя секция) и клеток, позитивных к рецептору липопротеинов низкой плотности человека (hLDLR)+ (нижняя секция) среди CD3+CD4+ Т-клеток, обработанных аторвастатином, правастатином или розувастатином. Предварительно активированные клетки, клетки, активированные без статина или ДМСО (контроль), и ДМСО служили в качестве контролей.

На фиг. 35 показана процентная доля CD25+ клеток (верхняя секция), CD69+ клеток (средняя секция) и hLDLR+ клеток (нижняя секция) среди CD3+CD8+ Т-клеток, обработанных аторвастатином, правастатином или розувастатином. Предварительно активированные клетки, клетки, активированные без статина или ДМСО (контроль), и ДМСО служили в качестве контролей.

На фиг. 36 показаны лентивирусные векторы в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 37 показана схема процесса производства Т-клеток в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

Подробное описание

В контексте настоящего описания понятие "саморасщепляющийся 2А-пептид" относится к относительно коротким пептидам (порядка 20 аминокислот в длину, в зависимости от вируса их происхождения), имеющим ко-трансляционную активность за счет предотвращения образования нормальной пептидной связи между глицином и последним пролином, что приводит сдвигу рибосомы на следующий кодон и расщеплению между Gly и Pro возникающего пептида. После расщепления короткий 2А-пептид остается слитым с С-концом белка, расположенного выше, а пролин добавляется к N-концу белка, расположенного ниже. Саморасщепляющийся 2А-пептид может быть выбран из тешовируса свиней-1 (P2A), вируса ринита А лошадей (E2A), вируса *Thosea asigna* (T2A), вируса ящура (F2A) или их комбинации (см., например, Kim et al., PLOS One 6:e18556, 2011, содержание которой, в том числе последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности 2А полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Добавление линкерных последовательностей (GSG или SGSG (SEQ ID NO: 8)) до саморасщепляющейся последовательности 2А может позволить производить эффективный синтез биологически активных белков, например ТКР.

В контексте настоящего описания понятие "промотор" относится к регуляторной области ДНК, обычно расположенной выше (по направлению к 5'-концу смысловой цепи) гена, которая позволяет осуществлять транскрипцию гена. В промоторе содержатся специфические последовательности ДНК и элементы отклика, которые распознаются белками, известными как факторы транскрипции. Эти факторы связываются с промоторными последовательностями, привлекая РНК-полимеразу, фермент, синтезирующий РНК из кодирующей области гена. Например, промоторная последовательность, используемая в

данном контексте, может быть выбрана из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора фосфоглицерат-киназы (PGK), промотора основного белка миеллина (MBP), промотора глиофибрилярного кислого белка (GFAP), модифицированного энхансера с LTR вируса MoMuLV миелолифолиферативной саркомы (MNDU3), промотора убиквитина С промотора убиквитина С, промотора EF-1-альфа или промотора вируса стволовых клеток мыши (MSCV).

Понятие "конститутивный промотор", используемое в данном контексте, может включать регуляторную последовательность, которая направляет транскрипцию гена в большинстве клеток или тканей в большинстве случаев. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления конститутивный промотор может быть выбран из группы, состоящей из промотора MSCV, промотора убиквитина С (Ubc), промотора CMV, промотора EF-1 альфа, промотора PGK, промотора бета-актина и промотора ROSA26.

В некоторых вариантах осуществления промотор может быть индуцибельным промотором. Активность индуцибельного промотора может повышаться или снижаться в ответ на сигнал. Например, индуцибельный промотор может способствовать транскрипции в ответ на наличие сигнала, такого как Т-клеточная активация или изопропил β-D-1-тиогаляктопиранозид (IPTG). Индуцибельный промотор может способствовать транскрипции в ответ на отсутствие сигнала, как, например, фосфат. В любом из этих сценариев количество транскрипции может быть или может не быть пропорционально количеству сигнала или его недостатку. Примеры индуцибельных промоторов, подходящих для прокариотических клеток-хозяев, могут включать, помимо прочих, промоторы NFAT, CD69, lac, tac, trc, trp, pho, recA, tetA, nar, phage PL, cspA, T7 и PBAD (см. Terpe K. 2006 Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:211; содержание которой в полном объеме включено путем ссылки).

В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор может включать ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT)/AP1 элемент транскрипционного ответа (TRE). При распознавании комплекса родственный пептид/МНС1, NFAT может подвергаться зависимой от Ca²⁺ транслокации к ядру, где он способствует транскрипции генов, несущих TRE NFAT. Подходящие TRE-элементы NFAT хорошо известны из уровня техники и включают промотор TRE NFAT человеческого ИЛ-2 (Macian et al (2001) Oncogene, 2001 Apr. 30; 20(19):2476-89). В работе Zhang и соавт. ("Tumor-Infiltrating Lymphocytes Genetically Engineered with an Inducible Gene Encoding Interleukin-12 for the Immunotherapy of Metastatic Melanoma", Clin. Cancer Res. 21:2278-2288, 2015) описано применение опухоль-инфильтрующих лимфоцитов человека (TIL), полученных методами генной инженерии для секреции одноцепочечного ИЛ-12, экспрессия которого активируется индуцибельным промотором NFAT, в клиническом исследовании. Содержание этой цитируемой литературы включено в описание во всей полноте путем ссылки.

В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор может включать промотор CD69, например, как раскрытый в патенте США № 5759805; содержание которого включено в описание во всей полноте путем ссылки. CD69 может быть среди самых ранних примеров этих недавно синтезированных молекул активации клеточной поверхности, индуцированных на активированных Т-клетках. Экспрессия CD69 может наблюдаться в течение 60 стимуляции Т-клеток, но может отсутствовать на покоящихся клетках. Экспрессия CD69 может быть индуцибельной на тимоцитах, В-клетках, естественных киллерных (NK) клетках и нейтрофилах. Четыре некодирующих участка, которые называются CNS1-4 и расположены в пределах 50 т.п.н. выше промотора CD69 у мыши, могут вносить свой вклад в контроль на стадии развития и временный контроль активации CD69 в Т- и В-клетках. Участок CNS2 может выполнять функции сильного энхансера. В работе Kulemzin и соавт. ("Design and analysis of stably integrated reporters for inducible transgene expression in human T cells and chimeric antigen receptor (CAR) NK cell lines", BMC Medical Genomics 2019, 12(Suppl 2):44, 88-95; содержание которого включено в описание во всей полноте путем ссылки) описывается, что в контексте первичных Т-клеток вариант индуцируемого активацией промотора CD69 обеспечивает высшую кратность роста индукции. Таким образом, этот промотор может использоваться для экспрессии белков в активированных, но не покоящихся Т-клетках или Т-клетках человека с CAR.

В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор может быть IPTG-индуцибельным промотором. IPTG-индуцибельный промотор может относиться к любой полинуклеотидной последовательности, которая инициирует транскрипцию в ответ на IPTG или любое другое производное лактозы, которое может инициировать транскрипцию lac-оперона (например, аллолактоза). Множество IPTG-индуцибельных промоторов известно из уровня техники, в том числе, помимо прочих, промоторы tac (например, tacl, tacll и т.д.), промоторы lac и их производные (например, lacUV5, taclac и так далее).

В одном аспекте экспрессия вирусного вектора 4-в-1, например, лентивирусного вектора, содержащего последовательности, кодирующие альфа-цепи CD8, бета-цепь CD8, альфа-цепь ТКР и бета-цепь ТКР, может инициироваться конститутивным или индуцибельным промотором. Например, на фиг. 5А показан вирусный вектор 4-В-1, который содержит PTE CD8 TCR WPRE (SEQ ID NO: 94), имеющий кодон-оптимизированные последовательности, кодирующие CD8-альфа (SEQ ID NO: 12) и CD8-бета (SEQ ID NO: 13), находящиеся выше последовательностей, кодирующих ТКР, например альфа-цепь ТКР R11KE (SEQ ID NO: 13) и бета-цепь R11KE (SEQ ID NO: 14), и который активируется конститутивным промотором MSCV (SEQ ID NO: 1). Те же самые кодирующие последовательности, описанные выше,

могут быть активированы индуцибельным промотором, например, промотором NFAT, CD69 или IPTG.

В другом аспекте экспрессия вирусного вектора 3-в-1, который содержит последовательности, кодирующие слитый белок, альфа-цепь ТКР и бета-цепь ТКР, может быть активирована конститутивным или индуцибельным промотором. Например, на фиг. 5B показан вирусный вектор, который содержит CD8aCD4Fusion.TCR WPRE (SEQ ID NO: 256), имеющий кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую слитый белок, в котором внеклеточный домен CD8 α слит с трансмембранным доменом CD4 и внутриклеточным доменом CD4, и последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР R11KE (SEQ ID NO: 13) и бета-цепь R11KE (SEQ ID NO: 14), и который активируется промотором MSCV (SEQ ID NO: 1). На фиг. 5C показан вирусный вектор, который содержит CD8bCD4Fusion.TCR WPRE (SEQ ID NO: 257), имеющий кодон-оптимизированную последовательность, кодирующую слитый белок, в котором внеклеточный домен CD8 β слит с трансмембранным доменом CD4 и внутриклеточным доменом CD4, и последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР R11KE (SEQ ID NO: 13) и бета-цепь R11KE (SEQ ID NO: 14), и который активируется промотором MSCV (SEQ ID NO: 1). На фиг. 5D показан вирусный вектор, который содержит CD8bCD8aFusion.TCR WPRE (SEQ ID NO: 258), имеющий последовательности, кодирующие слитый белок, в котором внеклеточный домен CD8 β слит с трансмембранным доменом CD8 α и внутриклеточным доменом CD8 α , и последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР R11KE (SEQ ID NO: 13) и бета-цепь R11KE (SEQ ID NO: 14), и который активируется промотором MSCV (SEQ ID NO: 1). Те же самые кодирующие последовательности, описанные выше, могут быть активированы индуцибельным промотором, например промотором NFAT, CD69 или IPTG.

В одном аспекте экспрессия вирусного вектора 4-в-1 по настоящему изобретению может быть активирована двунаправленными конститутивными и/или индуцибельными промоторами. Например, на фиг. 6A показан вирусный вектор, который содержит PGK.CD8.EF1a.TCR (SEQ ID NO: 259), имеющий кодон-оптимизированные последовательности, кодирующие альфа-цепь CD8 и бета-цепь CD8, расположенные выше последовательностей, кодирующих альфа-цепь ТКР R11KE и бета-цепь R11KE, в котором последовательности, кодирующие альфа-цепь CD8 и бета-цепь CD8, и последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР R11KE и бета-цепь R11KE, могут быть разделены двунаправленными промоторами, например, промотором PGK и промотором EF-1-альфа. Промотор PGK может быть расположен на конце 3' кодон-оптимизированных последовательностей, кодирующих альфа-цепь CD8 и бета-цепь CD8, в целях активации экспрессии альфа-цепи CD8 и бета-цепи CD8. Промотор EF-1-альфа может быть расположен на конце 5' последовательностей, кодирующих альфа-цепь ТКР R11KE и бета-цепь R11KE, в целях активации экспрессии альфа-цепи ТКР R11KE и бета-цепи R11KE.

На фиг. 6B показан другой вирусный вектор 4-в-1, который содержит PGK.TCR.EF1a.CD8 (SEQ ID NO: 260), имеющий последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР R11KE и бета-цепь R11KE, расположенные выше кодон-оптимизированных последовательностей, кодирующих альфа-цепь CD8 и бета-цепь CD8, в котором последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР R11KE и бета-цепь R11KE, и последовательности, кодирующие альфа-цепь CD8 и бета-цепь CD8, могут быть разделены двунаправленными промоторами, например, промотором PGK и промотором EF-1-альфа. Промотор PGK может быть расположен на конце 3' последовательностей, кодирующих альфа-цепь ТКР R11KE и бета-цепь R11KE, в целях активации экспрессии альфа-цепи ТКР R11KE и бета-цепи R11KE. Промотор EF-1-альфа может быть расположен на конце 5' кодон-оптимизированных последовательностей, кодирующих альфа-цепь CD8 и бета-цепь CD8, в целях активации экспрессии альфа-цепи CD8 и бета-цепи CD8.

Некоторые варианты осуществления данного раскрытия сущности изобретения могут включать вирусные векторы, содержащие последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР и бета-цепь ТКР, и последовательности, кодирующие другие белки, такие как цитокины (включая, помимо прочего, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18, и ИЛ-21), слитый белок ИЛ-15/рецептор ИЛ-15 (ИЛ-15R), доминантно-негативный рецептор TGF-бета (DN TGF β RII), и/или внеклеточный домен бета-рецептора трансформирующего фактора роста. В некоторых вариантах осуществления эти кодирующие последовательности могут активироваться промотором или двунаправленными промоторами.

На фиг. 7 показан вирусный вектор, содержащий последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР и бета-цепь ТКР, расположенные выше последовательностей, кодирующих цитокины, в котором последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР и бета-цепь ТКР, и последовательности, кодирующие цитокины, могут быть разделены двунаправленными промоторами. Двунаправленные промоторы могут быть организованы в направлении от 5' к 3'-концу цепи со следующей ориентацией: конститутивный-конститутивный, конститутивный-индуцибельный, индуцибельный-конститутивный или индуцибельный-индуцибельный. Например, конститутивный промотор, к примеру, промотор MSCV, PGK или EF1-альфа, может быть расположен на конце 3' последовательностей, кодирующих альфа-цепь ТКР и бета-цепь ТКР, в целях активации экспрессии альфа-цепи ТКР и бета-цепи ТКР. Индуцибельный промотор, к примеру, промотор NFAT, CD69 или IPTG, может быть расположен на конце 5' последовательностей, кодирующих цитокины, в целях активации экспрессии цитокинов. На фиг. 8A показан индуцибельный промотор NFAT с минимальным промотором ИЛ-2, расположенным на конце 5' последовательностей, кодирующих ИЛ-12, например, слитого белка ИЛ-12-альфа(p35)/ИЛ-12-бета (p40) (SEQ ID NO: 261), в

целях активации экспрессии слитого белка 12-альфа(p35)/ИЛ-12-бета(p40) в вирусном векторе, показанном на фиг. 7. На фиг. 8В показан индуцибельный промотор CD69 с энхансерными элементами CNS1 и CNS2, расположенным на конце 5' последовательностей, кодирующих ИЛ-12, например, слитого белка ИЛ-12-альфа(p35)/ИЛ-12-бета(p40) (SEQ ID NO: 262), в целях активации экспрессии слитого белка 12-альфа(p35)/ИЛ-12-бета(p40) в вирусном векторе, показанном на фиг. 7. На фиг. 8С показан индуцибельный промотор NFAT с минимальным промотором ИЛ-2, расположенным на конце 5' последовательностей, кодирующих ИЛ-18, например, ИЛ-18 вариант 1 (SEQ ID NO: 263), в целях активации экспрессии ИЛ-18 вариант 1 в вирусном векторе, показанном на фиг. 7. На фиг. 8D показан индуцибельный промотор CD69 с с энхансерными элементами CNS1 и CNS2, расположенными на конце 5' последовательностей, кодирующих ИЛ-18, например, ИЛ-18 вариант 1 (SEQ ID NO: 264), в целях активации экспрессии ИЛ-18 вариант 1 в вирусном векторе, показанном на фиг. 7.

В одном аспекте раскрытия сущности изобретения предложена конструкция 4-в-1 с ориентацией CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α по направлению от 5' к 3'-концу. В другом аспекте раскрытия сущности изобретения предложена конструкция 4-в-1 с ориентацией CD8 β -CD8 α -TCR α -TCR β по направлению от 5' к 3'-концу. В другом аспекте раскрытия сущности изобретения предложена конструкция 4-в-1 с ориентацией CD8 α -CD8 β -TCR β -TCR α по направлению от 5' к 3'-концу. В другом аспекте раскрытия сущности изобретения предложена конструкция 4-в-1 с ориентацией CD8 α -CD8 β -TCR α -TCR β по направлению от 5' к 3'-концу.

В одном аспекте раскрытия сущности изобретения предложена конструкция 4-в-1 с ориентацией по направлению от 5' к 3'-концу, которая не включает TCR β -TCR α -CD8 α -CD8 β . В другом аспекте раскрытия сущности изобретения предложена конструкция 4-в-1 с ориентацией по направлению от 5' к 3'-концу, которая не включает TCR β -TCR α -CD8 β -CD8 α . В другом аспекте раскрытия сущности изобретения предложена конструкция 4-в-1 с ориентацией по направлению от 5' к 3'-концу, которая не включает TCR α -TCR β -CD8 α -CD8 β . В другом аспекте раскрытия сущности изобретения предложена конструкция 4-в-1 с ориентацией по направлению от 5' к 3'-концу, которая не включает TCR α -TCR β -CD8 β -CD8 α .

В одном аспекте раскрытия сущности изобретения предложена конструкция 4-в-1 с ориентацией CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α по направлению от 5' к 3'-концу. В одном неограничивающем аспекте раскрытия сущности изобретения предложена конструкция 4-в-1 с ориентацией по направлению от 5' к 3'-концу, которая не включает TCR β -TCR α -CD8 α -CD8 β .

В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы настоящего раскрытия сущности изобретения могут включать последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР и бета-цепь ТКР, и последовательности, кодирующие ингибиторы TGF-бета, например, доминантно-негативную форму рецептора TGF-бета (DN TGF β RII), и/или внеклеточный домен рецептора трансформирующего фактора роста бета. На фиг. 9А показан вирусный вектор, содержащий последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР и бета-цепи ТКР, расположенные выше последовательностей, кодирующих DN TGF β RII, в котором последовательности, кодирующие альфа-цепь ТКР и бета-цепи ТКР, и последовательности, кодирующие DN TGF β RII, могут быть разделены двунаправленными промоторами. Например, на фиг. 9А показан конститутивный промотор, например, промотор MSCV, Ubc, CMV, EF-1 альфа и PGK, который может быть расположен на конце 3' последовательностей, кодирующих альфа-цепь ТКР и бета-цепь ТКР, в целях активации экспрессии альфа-цепи ТКР и бета-цепи ТКР; и другой конститутивный промотор может быть расположен на конце 5' последовательностей, кодирующих DN TGF β RII, в целях активации экспрессии DN TGF β RII.

В качестве альтернативы, на фиг. 9В показан вирусный вектор, содержащий конститутивный промотор, например, промотор MSCV, Ubc, CMV, EF-1-альфа и PGK, расположенный на конце 5' последовательностей, кодирующих DN TGF β RII, находящихся выше последовательностей, кодирующих альфа-цепь ТКР и бета-цепь ТКР, в целях активации экспрессии DN TGF β RII, альфа-цепи ТКР и бета-цепи ТКР. Те же самые кодирующие последовательности, описанные выше, могут быть активированы индуцибельным промотором, например, промотором NFAT, CD69 или IPTG.

В соответствии с использованием в настоящем контексте понятие "цистрон" относится к участку молекулы ДНК, который отвечает за образование одной полипептидной цепи, т.е. кодирующий одну полипептидную цепь. Например, "бицистрон" относится к двум участкам молекулы ДНК, которые отвечают за образование двух полипептидных цепей, т.е. кодирующие две полипептидные цепи; "трицистрон" относится к трем участкам молекулы ДНК, которые отвечают за образование трех полипептидных цепей, т.е. кодирующие три полипептидные цепи; и т.д.

В соответствии с использованием в настоящем контексте понятие "полицистронная РНК" или "полицистронная РНК" относится к РНК, которая содержит генетическую информацию, чтобы транслировать ее в несколько белков. Напротив, моноцистронная РНК содержит генетическую информацию, чтобы транслировать ее в один белок. В контексте настоящего раскрытия сущности полицистронная РНК, транскрибируемая из лентивируса в примерах 2-4, может транслироваться в четыре белка (4-в-1): цепь TCR α , цепь TCR β , цепь CD8 α и цепь CD8 β ; или транслироваться в два белка (2-в-1): цепь TCR α и цепь TCR β или цепь CD8 α и цепь CD8 β .

В соответствии с использованием в настоящем контексте понятие "организованы в тандем" относится к смежной организации генов, где один следует или находится за другим, в одном ряду в последовательности нуклеиновой кислоты. Эти гены лигированы друг с другом в смежном расположении на последовательности нуклеиновой кислоты, при этом кодирующие цепи (смысловые цепи) каждого гена лигированы друг с другом в последовательности нуклеиновой кислоты.

В соответствии с использованием в настоящем контексте понятие "смысловая цепь" относится к цепи ДНК гена, которая транслируется или способна транслироваться в белок. Если ген ориентирован в "смысловом направлении" относительно промотора в последовательности нуклеиновой кислоты, то "смысловая цепь" расположена на 5'-конце последовательности ниже промотора, где первый кодон нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, расположен проксимально к промотору, а последний кодон расположен дистально относительно промотора.

В соответствии с использованием в настоящем контексте понятие "вирусный вектор" относится к векторной конструкции нуклеиновой кислоты, которая включает по меньшей мере один элемент вирусного происхождения и предоставляет возможность быть упакованной в частицу вирусного вектора и кодирует по меньшей мере одну экзогенную нуклеиновую кислоту. Вектор и/или частица может быть использован в целях переноса любых нуклеиновых кислот в клетки как *in vitro*, так и *in vivo*. Многочисленные формы вирусных векторов известны из уровня техники. Понятие "вирион" используется для обозначения отдельной инфекционной вирусной частицы. "Вирусный вектор", "частица вирусного вектора" и "вирусная частица" также относятся к вирусной частице целиком с ее ядром из ДНК или РНК и белковой оболочкой, как она существует вне клетки. Например, вирусный вектор может быть выбран из аденовирусов, вирусов оспы, альфа-вирусов, арена вирусов, флавивирусов, рабдовирусов, ретровирусов, лентивирусов, вирусов герпеса, парамиксовирусов или пикорнавирусов.

Термины "Т-клетка" и "Т-лимфоцит" известны в этой области и подразумевается, что они включают тимоциты, наивные Т-лимфоциты, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты, Т-лимфоциты в стадии покоя или активированные Т-лимфоциты. Иллюстративные популяции Т-клеток, пригодных для использования в конкретных вариантах воплощения, включают, но без ограничения, хелперные Т-клетки (ХТЛ; CD4+ Т-клетку), цитотоксическую Т-клетку (ЦТЛ; CD8+ Т-клетку), CD4+CD8+ Т-клетку, CD4-CD8- Т-клетку, естественную киллерную Т-клетку, Т-клетки, экспрессирующие $\alpha\beta$ ТКР ($\alpha\beta$ Т-клетки), Т-клетки, экспрессирующие $\gamma\delta$ ТКР ($\gamma\delta$ Т-клетки) или любой другой подвид Т-клеток. Другими иллюстративными популяциями Т-клеток, подходящими для использования в конкретных вариантах воплощения, включают, но без ограничения, Т-клетки, экспрессирующие один или более из следующих маркеров: CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD197 и HLA-DR и при необходимости могут быть далее выделены при помощи методик положительного и отрицательного отбора.

Понятие "статины", "вастатины", или как в настоящем контексте попеременно используется понятие "ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазы (HMG-CoA)" относится к лекарственному средству, которое ингибирует фермент 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазу (HMG-CoA). Данный фермент задействован в превращении HMG-CoA в мевалонат, что представляет собой один из этапов биосинтеза холестерина. Такое ингибирование легко определяется согласно стандартным методикам анализа, хорошо известным специалистам данной области.

Предпочтительные статины, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим раскрытием сущности, включают аторвастатин, раскрытый в патенте США № 4681893; аторвастатин кальций, раскрытый в патенте США № 5273995; церивастатин, раскрытый в патенте США № 5502199; дальвастатин, раскрытый в патенте США № 5316765; флуиндостатин, раскрытый в патенте США № 4915954; флувастатин, раскрытый в патенте США № 4739073; ловастатин, раскрытый в патенте США № 4231938; мевастатин, раскрытый в патенте США № 3983140; правастатин, раскрытый в патенте США № 4346227; симвастатин, раскрытый в патенте США № 4444784; велостатин, раскрытый в патенте США № 4448784 и патенте США № 4450171; и розувастатин, раскрытый в патенте США № 6858618 и патенте США № 7511140, содержание каждой из этих ссылок включено в данное описание во всей полноте путем ссылки. Репрезентативные ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазы могут включать аторвастатин, аторвастатин кальций, также известный как Liptor®, ловастатин, также известный как Mevacor®, правастатин, также известный как Pravachol®, симвастатин, также известный как Zocor® и розувастатин.

В одном аспекте настоящее раскрытие сущности изобретения относится к активации, трансдукции и/или экспансии Т-клеток, например, опухоль-инфильтрующих лимфоцитов, CD8+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток, которые могут использоваться для трансгенной экспрессии. В другом аспекте раскрытие относится к активации, трансдукции и экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток при истощении α - и/или β -ТКР-положительных клеток.

В одном аспекте $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть выделены из комплексной пробы, которую культивируют *in vitro*. В другом аспекте может быть активирована и подвергнута экспансии вся популяция МКПК, без предварительного истощения конкретных популяций клеток, таких как моноциты, $\alpha\beta$ Т-клетки, В-клетки и НК-клетки. В другом аспекте обогащенные $\gamma\delta$ Т-клеточные популяции могут быть получены до их

специфической активации и экспансии. В другом аспекте активация и экспансия $\gamma\delta$ Т-клеток могут быть произведены без присутствия природных или сконструированных АПК. В других аспектах выделение и экспансия $\gamma\delta$ Т-клеток из образцов опухолевой ткани могут быть произведены при использовании иммобилизованных митогенов $\gamma\delta$ Т-клеток, в том числе антител, специфичных к $\gamma\delta$ ТКР, и других активирующих $\gamma\delta$ ТКР веществ, в том числе лектинов. В другом аспекте выделение и экспансия $\gamma\delta$ Т-клеток из образцов опухолевой ткани могут быть произведены без митогенов $\gamma\delta$ Т-клеток, в том числе антител, специфичных к $\gamma\delta$ ТКР, и других активирующих $\gamma\delta$ ТКР веществ, в том числе лектинов.

В одном аспекте $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют из продукта лейкофереза взятых у субъекта образцов, например, субъекта человеческого происхождения. В другом аспекте $\gamma\delta$ Т-клетки не выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК).

В одном аспекте выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть быстро подвергнуты экспансии в ответ на контакт с одним или более антигенами. Некоторые $\gamma\delta$ Т-клетки, такие как $V\gamma 9V\delta 2+$ Т-клетки, могут увеличиваться в количестве вследствие быстрой экспансии *in vitro* в ответ на контакт с некоторыми антигенами, как, например, пренил пирофосфатами, алкиламинами и метаболитами или микробными экстрактами во время культивирования ткани. Стимулированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут экспонировать многочисленные антигенпрезентирующие, костимуляторные молекулы и молекулы адгезии, которые упрощают выделение $\gamma\delta$ Т-клеток из комплексной пробы, $\gamma\delta$ Т-клетки в составе комплексной пробы могут стимулироваться *in vitro* по меньшей мере одним антигеном в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или другого подходящего периода времени. За счет стимуляции $\gamma\delta$ Т-клеток подходящим антигеном популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может быть экспандирована *in vitro*.

Неограничивающие примеры антигенов, которые могут быть использованы для стимуляции экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток из комплексного образца *in vitro* могут включать пренил-пирофосфаты, такие как изопентилпирофосфат (ИПФ), алкиламины, метаболиты патогенных микроорганизмов человека, метаболиты комменсальных бактерий, метил-3-бутенил-1-пирофосфат (2МЗВ1РР), (Е)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпирофосфат (НМВ-РР), этилпирофосфат (ЭПФ), фарнесил пирофосфат (ФПФ), диметилаллилфосфат (ДМАФ), диметилаллилпирофосфат (ДМАПФ), этиладенозин трифосфат (ЕРРРА), геранилпирофосфат (ГПФ), геранилгеранилпирофосфат (ГППФ), изопентиладензинтрифосфат (ИРРРА), моноэтилфосфат (МЕР), моноэтилпирофосфат (МЭПФ), 3-формил-1-бутил-пирофосфат (TUBAg 1), X-пирофосфат (TUBAg 2), 3-формил-1-бутил-уридин трифосфат (TUBAg 3), 3-формил-1-бутилдезокситимидин трифосфат (TUBAg 4), моноэтилалкиламины, аллил пирофосфат, кртоилпирофосфат, диметилаллил- γ -уридинтрифосфат, кртоил- γ -уридинтрифосфат, аллил- γ -уридинтрифосфат, этиламин, изобутиламин, вторичный бутиламин, изо-амиламин и азот содержащие бисфосфонаты.

Активация и экспансия $\gamma\delta$ Т-клеток может быть осуществлена при использовании активирующих и костимуляторных молекул, описанных в настоящем документе, чтобы инициировать специфическую пролиферацию и получение устойчивых популяций $\gamma\delta$ Т-клеток. В одном аспекте активация и экспансия $\gamma\delta$ Т-клеток из различных культур может привести к образованию различных клональных субпопуляций или смешанных поликлональных популяций. В другом аспекте различные агонисты могут быть использованы, чтобы идентифицировать агенты, которые подают специфические сигналы, активирующие $\gamma\delta$ Т-клетки. В другом аспекте агенты, которые подают специфические сигналы, активирующие $\gamma\delta$ Т-клетки, могут быть различными моноклинальными антителами (MAb), направленными против $\gamma\delta$ -форм ТКР. В другом аспекте могут быть использованы костимуляторные молекулы для поддержки инициации специфической пролиферации $\gamma\delta$ Т-клеток без индукции энергии и апоптоза клеток. Такие костимуляторные молекулы могут включать лиганды, связывающиеся с рецепторами, экспрессированными на $\gamma\delta$ -клетках, такие как NKG2D, CD161, CD70, JAML, DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1), ICOS, CD27, CD137, CD30, HVEM, SLAM, CD122, DAP и CD28. В другом аспекте костимуляторные молекулы могут быть антителами, специфичными к уникальным эпитопам на молекулах CD2 и CD3. При экспрессии на ар или $\gamma\delta$ Т-клетках молекулы CD2 и CD3 могут иметь различные конформационные структуры. В другом аспекте антитела, специфичные к CD3 и CD2, могут приводить к различной активации $\gamma\delta$ Т-клеток.

Популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может быть подвергнута экспансии *ex vivo* до конструирования $\gamma\delta$ Т-клеток. Неограничивающий пример веществ, которые могут быть использованы для стимуляции экспансии $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции *in vitro*, может включать антитела к CD3 или к CD2, CD27, CD30, CD70, OX40, ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-9, ИЛ-33, ИЛ-18 или ИЛ-21, CD70 (лиганд CD27), фитогемагглютинин (ФГА), конкавалин А (ConA), лаконос (PWM), белок агглютинин арахиса (PNA), соевый агглютинин (SBA), агглютинин чечевички (LCA), агглютинин *pisum sativum* (зеленого горошка) (PSA), агглютинин *helix pomatia* (виноградной улитки) (HPA), лектин *vicia graminea* (вьешегося горошка) (VGA) или другой подходящий митоген, способный стимулировать пролиферацию Т-клеток.

Способность $\gamma\delta$ Т-клеток распознавать широкий спектр антигенов может быть усилена за счет изменений $\gamma\delta$ Т-клеток методами генной инженерии. В одном аспекте $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть сконструированы, чтобы получить универсальную аллогенную терапию, при которой возможно распознавание интересующего антигена *in vivo*. Генная инженерия $\gamma\delta$ Т-клеток может включать устойчивую интеграцию

структуры, экспрессирующей распознающий опухоль фрагмент, такой как, например, $\alpha\beta$ ТКР, $\gamma\delta$ ТКР, химерный антигенный рецептор (CAR), который сочетает в одном рецепторе как связывание с антигеном, так и функции активации Т-клеток, его антиген-связывающий фрагмент или домен активации лимфоцитов в геном выделенной(ых) $\gamma\delta$ Т-клетки(ок), цитокин (например, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-21, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-33, ИЛ-4, ИЛ-9, ИЛ-23 или ИЛ1 β) для усиления пролиферации, выживаемости и функционирования Т-клеток *ex vivo* и *in vivo*. Генная инженерия выделенной $\gamma\delta$ Т-клетки может также включать устранение или нарушение экспрессии одного или нескольких эндогенных генов в геноме выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток, таких как локус МНС (локусы).

Сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть получены различными способами. Например, полинуклеотид, кодирующий экспрессионную кассету с сайтом распознавания опухоли, или другой вид фрагмента распознавания, может быть стабильно введен в $\gamma\delta$ Т-клетку с помощью системы транспозона/транспозазы или системы переноса генов на основе вируса, такой как лентивирусной или ретровирусной системы, или другого подходящего способа, такого как трансфекция, электропорация, трансдукция, липофекция, с фосфатом кальция (CaPO₄), с веществами, созданными методами нанотехнологии, такими как Ормосил, способами доставки на основе вирусов, в том числе аденовируса, ретровируса, лентивируса, аденоассоциированных вирусов или любым другим подходящим способом. Ряд способов на основе вирусов был использован для генной терапии человека, таких как способы, описанные в заявке WO 1993020221, содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки. Неограничивающие примеры способов на основе вирусов, которые могут использоваться для конструирования $\gamma\delta$ Т-клеток могут включать способы на основе γ -ретровирусов, аденовирусов, лентивирусов, вируса простого герпеса, вируса коровьей оспы, поксвируса или способы на основе аденоассоциированного вируса.

В одном аспекте конструкции и векторы, описываемые в настоящем документе, применяются по методике, описанной в заявке на патент США 16/200308, поданной 26 ноября 2018 г., содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки.

В одном аспекте понятие "вирусы" относится как к встречающимся в природе вирусам, так и искусственным вирусам. Вирусы в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия могут быть как оболочечным, так и безоболочечным вирусом. Парвовирусы (такие как AAV) являются примерами безоболочечных вирусов. В предпочтительном варианте осуществления вирусы могут быть оболочечными вирусами. В предпочтительных вариантах осуществления вирусы могут быть ретровирусами и особенно лентивирусами. Вирусные оболочечные белки, которые могут способствовать вирусной инфекции эукариотических клеток, могут включать полученные из ВИЧ-1 лентивирусные векторы (LV), псевдотипированные оболочечными гликопротеинами (GP) из вируса везикулярного стоматита (VSV-G), модифицированного эндогенного ретровируса кошек (RD114TR) (SEQ ID NO: 97), модифицированного вируса лейкоза гиббонов (GALVTR). Эти оболочечные белки могут эффективно способствовать внедрению других вирусов, таких как парвовирусов, в том числе аденоассоциированных вирусов (AAV), тем самым демонстрируя свою широкую эффективность. Например, возможно использование других вирусных оболочечных белков, в том числе вируса мышинного лейкоза Молони (MLV) 4070 env (как описано в работе Merten и соавт., *J. Virol.* 79:834-840, 2005; содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), RD114 env, химерного оболочечного белка RD114pro или RDpro (который является химерным RD114-ВИЧ, сконструированным путем замены последовательности расщепления пептида R в RD114 на последовательность расщепления матриксного белка ВИЧ-1 /капсида (MA/CA), как описано в работе Bell и соавт. *Experimental Biology and Medicine* 2010; 235: 1269-1276; содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), GP64 env бакуловируса (как описано в работе Wang и соавт. *J. Virol.* 81:10869-10878, 2007; содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), или GALV env (как описано в работе Merten и соавт., *J. Virol.* 79:834-840, 2005; содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), или их производных.

Варианты осуществления настоящего изобретения основаны на открытии того, что одна лентивирусная кассета может быть использована для создания одного лентивирусного вектора, экспрессирующего по меньшей мере четыре отдельных мономерных белка двух различных димеров из одной полицистронной мРНК, чтобы совместно экспрессировать димеры на поверхности клетки. Например, было достаточно интеграции одной копии лентивирусного вектора, чтобы трансформировать $\gamma\delta$ Т-клетки для совместной экспрессии TCR $\alpha\beta$ и CD8 $\alpha\beta$.

В одном аспекте настоящее раскрытие сущности изобретения относится к векторам, содержащим полицистронную кассету внутри открытого вектора, способную экспрессировать более чем один, более чем два, более чем три, более чем четыре гена, более чем пять генов или более чем шесть генов, в которых полипептиды, кодируемые данными генами, могут взаимодействовать друг с другом или могут образовывать димеры. Димеры могут быть гомодимерами, т.е., двумя идентичными белками, образующими димер, или гетеродимерами, т.е., двумя различными по структуре белками, образующими димер.

В одном аспекте лентивирусный вектор может включать первую последовательность нуклеотидов S1, кодирующую белок Z1, вторую последовательность нуклеотидов S2, кодирующую белок Z2, третью последовательность нуклеотидов S3, кодирующую белок Y1, и четвертую последовательность нуклеоти-

дов S4, кодирующую белок Y2, в котором Z1 и Z2 образуют первый димер, а Y1 и Y2 образуют второй димер, в котором первый димер Z1Z2 отличается от второго димера Y1Y2.

В одном аспекте первый лентивирусный вектор может содержать бицистронную кассету (2-в-1), кодирующую димер Z1Z2, и второй лентивирусный вектор может содержать бицистронную кассету (2-в-1), кодирующую димер Y1Y2. В векторах вида 2-в-1, S1 и S2 могут быть организованы в тандем в направлении от 5' к 3'-концу с ориентацией S1-S2 или S2-S1. В равной степени, в векторах вида 2-в-1 S3 и S4 могут быть организованы в тандем в направлении от 5' к 3'-концу с ориентацией S3-S4 или S4-S3. Z1 и Z2 или Y1 и Y2 могут быть разделены одним или несколькими саморасщепляющимися 2А пептидами.

В другом аспекте один лентивирусный вектор (4-в-1) может кодировать оба различных димера Z1Z2 и Y1Y2, в которых Z1, Z2, Y1 и Y2 могут быть разделены одним или несколькими саморасщепляющимися 2А пептидами. Например, S1, S2, S3 и S4 могут быть организованы в тандем в направлении от 5' к 3'-концу с ориентацией, выбранной из S1-S2-S3-S4, S1-S2-S4-S3, S1-S3-S2-S4, S1-S3-S4-S2, S1-S4-S3-S2, S1-S4-S2-S3, S2-S1-S3-S4, S2-S1-S4-S3, S2-S3-S1-S4, S2-S3-S4-S1, S2-S4-S3-S1, S2-S4-S1-S3, S3-S1-S2-S4, S3-S1-S4-S2, S3-S2-S1-S4, S3-S2-S4-S1, S3-S4-S1-S2, S3-S4-S2-S1, S4-S1-S2-S3, S4-S1-S3-S2, S4-S2-S1-S3, S4-S2-S3-S1, S4-S3-S1-S2 или S4-S3-S2-S1.

В одном аспекте димер Z1Z2 может быть ТКР с цепью ТКР α и цепью ТКР β .

В одном аспекте, ТКР и антиген-связывающие белки, которые применимы в совокупности с конструкциями, способами и вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, включают, например, те ТКР и антиген-связывающие белки, что представлены в табл. 2 (SEQ ID NO: 13-90) и те, что описаны в патентной заявке США 20170267738, патентной заявке США 20170312350, патентной заявке США 20180051080, патентной заявке США 20180164315, патентной заявке США 20180161396, патентной заявке США 20180162922, патентной заявке США 20180273602, патентной заявке США 20190016801, патентной заявке США 20190002556, патентной заявке США 20190135914, патенте США 10 538 573, патенте США 10 626 160, патентной заявке США 20190321478, патентной заявке США 20190256572, патенте США 10 550 182, патенте США 10 526 407, патентной заявке США 20190284276, патентной заявке США 20190016802 и в патенте США 10 583 573, содержание каждой из этих публикаций и списков последовательностей, описанных в них, включено в данное описание во всей полноте путем ссылки.

В другом аспекте димер Z1Z2 может быть цепью ТКР α и цепью ТКР β , выбранным из R11KEA (SEQ ID NO: 13 и 14), R20P1H7 (SEQ ID NO: 15 и 16), R7P1D5 (SEQ ID NO: 17 и 18), R10P2G12 (SEQ ID NO: 19 и 20), R10P1A7 (SEQ ID NO: 21 и 22), R4P1D10 (SEQ ID NO: 23 и 24), R4P3F9 (SEQ ID NO: 25 и 26), R4P3H3 (SEQ ID NO: 27 и 28), R36P3F9 (SEQ ID NO: 29 и 30), R52P2G11 (SEQ ID NO: 31 и 32), R53P2A9 (SEQ ID NO: 33 и 34), R26P1A9 (SEQ ID NO: 35 и 36), R26P2A6 (SEQ ID NO: 37 и 38), R26P3H1 (SEQ ID NO: 39 и 40), R35P3A4 (SEQ ID NO: 41 и 42), R37P1C9 (SEQ ID NO: 43 и 44), R37P1H1 (SEQ ID NO: 45 и 46), R42P3A9 (SEQ ID NO: 47 и 48), R43P3F2 (SEQ ID NO: 49 и 50), R43P3G5 (SEQ ID NO: 51 и 52), R59P2E7 (SEQ ID NO: 53 и 54), R11P3D3 (SEQ ID NO: 55 и 56), R16P1C10 (SEQ ID NO: 57 и 58), R16P1E8 (SEQ ID NO: 59 и 60), R17P1A9 (SEQ ID NO: 61 и 62), R17P1D7 (SEQ ID NO: 63 и 64), R17P1G3 (SEQ ID NO: 65 и 66), R17P2B6 (SEQ ID NO: 67 и 68), R11P3D3KE (SEQ ID NO: 69 и 70), R39P1C12 (SEQ ID NO: 71 и 72), R39P1F5 (SEQ ID NO: 73 и 74), R40P1C2 (SEQ ID NO: 75 и 76), R41P3E6 (SEQ ID NO: 77 и 78), R43P3G4 (SEQ ID NO: 79 и 80), R44P3B3 (SEQ ID NO: 81 и 82), R44P3E7 (SEQ ID NO: 83 и 84), R49P2B7 (SEQ ID NO: 85 и 86), R55P1G7 (SEQ ID NO: 87 и 88) или R59P2A7 (SEQ ID NO: 89 и 90). В одном аспекте последовательности демонстрируют по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или по меньшей мере примерно 98% к любой из SEQ ID NO: 13-90.

В табл. 1 представлены примеры пептидов, с которыми связываются ТКР, когда пептид находится в комплексе с молекулой МНС.

Таблица 1

Название ТКР	Пептид (название/последовательность/SEQ ID NO:)
R20P1H7, R7P1D5, R10P2G12	MAG-003 (KVLEHVVRV) (SEQ ID NO: 215)
R10P1A7	IGF2BP3-001 (KIQEILTQV) (SEQ ID NO: 123)
R4P1D10, R4P3F9, R4P3H3	COL6A3-002 (FLLDGSANV) (SEQ ID NO: 238)
R36P3F9, R52P2G11, R53P2A9	DCAF4L2-001 (ILQDGGFLV) (SEQ ID NO: 193)
R26P1A9, R26P2A6, R26P3H1, R35P3A4, R37P1C9, R37P1H1, R42P3A9, R43P3F2, R43P3G5, R59P2E7	MAGEA1-003 (KVLEYVIKV) (SEQ ID NO: 202)
R11KEA, R11P3D3, R16P1C10, R16P1E8, R17P1A9, R17P1D7, R17P1G3, R17P2B6, R11P3D3KE	PRAME-004 (SLLQHLIGL) (SEQ ID NO: 147)
R39P1C12, R39P1F5, R40P1C2, R41P3E6, R43P3G4, R44P3B3, R44P3E7, R49P2B7, R55P1G7, R59P2A7	SPINK2-001 (ALSVLRLAL) (SEQ ID NO: 248)

В одном аспекте пептиды опухолеассоциированного антигена (ТАА), которые применимы в совокупности со способами и вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, включают, например, те пептиды ТАА, что представлены в табл. 3 и те, что описаны в патентной заявке США 20160187351, патентной заявке США 20170165335, патентной заявке США 20170035807, патентной заявке США 20160280759, патентной заявке США 20160287687, патентной заявке США 20160346371, патентной заявке США 20160368965, патентной заявке США 20170022251, патентной заявке США 20170002055, патентной заявке США 20170029486, патентной заявке США 20170037089, патентной заявке США 20170136108, патентной заявке США 20170101473, патентной заявке США 20170096461, патентной заявке США 20170165337, патентной заявке США 20170189505, патентной заявке США 20170173132, патентной заявке США 20170296640, патентной заявке США 20170253633, патентной заявке США 20170260249, патентной заявке США 20180051080, патентной заявке США № 20180164315, патентной заявке США 20180291082, патентной заявке США 20180291083, патентной заявке США 20190255110, патенте США 9 717 774, патенте США 9895415, патентной заявке США 20190247433, патентной заявке США 20190292520, патентной заявке США 20200085930, патенте США 10 336 809, патенте США 10131703, патенте США 10081664, патенте США 10081664, патентах США 10093715, 10583573 и патентной заявке США US 20200085930, содержание каждой из этих публикаций, последовательностей и списков последовательностей, описанных в них, включены в данное описание во всей полноте путем ссылки.

В другом аспекте димер Z1Z2 может быть Т-клеточными димерными сигнальными молекулами, такими как CD3 δ/ϵ , CD3 γ/ϵ и CD247 ζ/ζ или ζ/η , димером вариабельной области TCR α (V α) и вариабельной области ТКР β (V β), димером вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (VH) и вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина (VL), димером V α и VH, димером V α и VL, димером V β и VH или димером V β и VL.

В другом аспекте Y1Y2 может быть цепью CD8 α и цепью CD8 β или любым другим подходящим димерным мембранным рецептором, предпочтительно таким, который экспрессируется в CD8+ Т-клетках и/или в CD4+ Т-клетках.

Фурин - это широко распространенная субтилизин-подобная пропротеинконвертаза, природные субстраты которой включают определенные сывороточные белки и рецепторы факторов роста, такие как рецептор инсулиноподобного фактора роста. Консенсусная последовательность расщепления фурина представлена RXXR (SEQ ID NO: 7), однако потенциал для фактического расщепления зависит от третичной структуры субстрата и аминокислот, непосредственно окружающих сайт распознавания. Добавление сайта расщепления фурина и линкерных последовательностей (GSG или SGSG (SEQ ID NO: 8)) может приводить к высоко эффективной экспрессии гена.

В одном аспекте нуклеотидная последовательность линкера фурин-2А пептид, организованная в тандем, может быть расположена между Z1 и Z2, между Z1 и Y1, между Z1 и Y2, между Z2 и Y1, между

Z2 и Y2, и/или между Y1 и Y2. Фурин может иметь консенсусную последовательность RXXR (SEQ ID NO: 7), например, RAKR (SEQ ID NO: 2). Линкерная последовательность может быть GSG или SGSG (SEQ ID NO: 8). 2A пептид может быть выбран из P2A (SEQ ID NO: 3), T2A (SEQ ID NO: 4), E2A (SEQ ID NO: 5), F2A (SEQ ID NO: 6), или любой из их комбинаций.

В другом аспекте нуклеотидная последовательность линкерного 2A пептида, организованная в тандем, может быть расположена между Z1 и Z2, между Z1 и Y1, между Z1 и Y2, между Z2 и Y1, между Z2 и Y2, и/или между Y1 и Y2. Линкерная последовательность может быть GSG или SGSG (SEQ ID NO: 8). 2A пептид может быть выбран из P2A (SEQ ID NO: 3), T2A (SEQ ID NO: 4), E2A (SEQ ID NO: 5), F2A (SEQ ID NO: 6), или любой из их комбинаций.

В одном аспекте сконструированные (или трансдуцированные) $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть подвергнуты экспансии *ex vivo* без стимуляции антигенпрезентирующей клеткой или аминокислотами. Реагирующие с антигеном сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим описанием могут быть подвергнуты экспансии *ex vivo* и *in vivo*. В другом аспекте активная популяция сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток в соответствии с настоящим описанием может быть подвергнута экспансии *ex vivo* без антигенной стимуляции с помощью антигенпрезентирующей клетки, антигенным пептидом, непептидной молекулой или низкомолекулярным соединением, таким как аминокислотами, но при использовании определенных антигенов, цитокинов, митогенов или слитых белков, таких как гибридный белок ИЛ-17 и Fc, гибридный белок MICA и Fc и гибридный белок CD70 и Fc. Примеры антигенов, которые могут быть использованы для экспансии $\gamma\delta$ Т-клеточной популяции, включают антигены к CD3, CD27, CD30, CD70, OX40, NKG2D или CD2, примеры цитокинов могут включать ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-21, ИЛ-18, ИЛ-9, ИЛ-7 и/или ИЛ-33, и примеры митогенов могут включать CD70, лиганд CD27 человека, фитогемагглютинин (ФГА), конкавалин А (ConA), митоген лаконоса (PWM), белок агглютинин арахиса (PNA), соевый агглютинин (SBA), агглютинин чечевички (LCA), агглютинин *pisum sativum* (зеленого горошка) (PSA), агглютинин *h romatia* (HRA), лектин *vicia graminea* (вьющегося горошка) (VGA) или другой подходящий митоген, способный стимулировать пролиферацию Т-клеток. В другом аспекте популяция сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может быть подвергнута экспансии за менее чем 60 дней, менее чем 48 дней, менее чем 36 дней, менее чем 24 дня, менее чем 12 дней или менее чем 6 дней. В другом аспекте популяция сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может быть подвергнута экспансии в течение от примерно 7 до примерно 49 дней, от примерно 7 до примерно 42 дней, от примерно 7 до примерно 35 дней, от примерно 7 до примерно 28 дней, от примерно 7 до примерно 21 дня или от примерно 7 до примерно 14 дней.

В другом аспекте в настоящем раскрытии предложены способы экспансии *ex vivo* популяции сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток для терапии на основе адоптивного переноса. Сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки согласно раскрытию могут быть подвергнуты экспансии *ex vivo*. Сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки согласно раскрытию могут быть подвергнуты экспансии *in vitro* без активации при помощи АПК или без совместного культивирования с АПК и без аминокислотами.

Способы лечения

Композиции, содержащие сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки, описанные в настоящем документе, могут вводиться в целях профилактического и/или терапевтического лечения. При терапевтическом применении фармацевтические композиции могут вводиться субъекту, уже страдающему заболеванием или от состояния, в количестве, достаточном для излечения или, по меньшей мере, частичного купирования симптомов заболевания или состояния. Сконструированная $\gamma\delta$ Т-клетка может вводиться для снижения вероятности развития, возникновения или ухудшения состояния. Эффективные количества популяции сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток для терапевтического применения могут варьироваться в зависимости от тяжести и течения заболевания или состояния, предшествовавшей терапии, состояния здоровья, веса и/или ответа субъекта на лекарственные препараты, и/или заключения лечащего врача.

Композиция согласно настоящему раскрытию сущности может также включать один или более адьювантов. Адьюванты - это вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные CD8-положительными Т-клетками или хелперными Т-клетками (ТН) на антиген, и могут, таким образом, рассматриваться как полезные в медикаменте по настоящему изобретению. Подходящие адьюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, СуаА, dSLIM, флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA®), резиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как ИЛ-2, ИЛ-13, ИЛ-21, интерферон-альфа или бета или их пегелированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, иммуностимулирующие комплексы IS-COM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, моносомфорил липид А, Монтанид IMS 1312, Монтанид ISA 206, Монтанид ISA 50V, Монтанид ISA-51, эмульсии "вода в масле" и "масло в воде", ОК-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторную систему PepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [PLG] и декстране микрочастицы, талактоферрин SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон Aquila QS21, который получают из сапонина, микобактериальные экстракты и синтетические имитаторы бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адьюванты, такие как Detox компании Ribic, Quil или Superfos. Предпочтитель-

ными адъювантами являются такие как адъювант Фрейнда или ГМ-КСФ. Несколько иммунологических адъювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Allison and Krummel, 1995). Также могут использоваться цитокины. Несколько цитокинов были непосредственно соотнесены с влиянием на миграцию дендритных клеток к лимфоидным тканям (например, TNF-), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США 5849589, отдельно включенный сюда в полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, IFN-альфа, IFN-бета) (Gabrilovich и соавт. 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антиген-специфичные гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к повышенной активации клеток типа TH1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация TH1, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже большую адъювантную активность, если они переводятся в лекарственную форму или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или в подобных лекарственных формах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антител на полную дозу вакцины без CpG в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6406705 В1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антиген-специфического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двухцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9, связывающиеся с РНК.

Другие примеры пригодных к использованию адъювантов включают, но без ограничения, химически модифицированные CpG (например, CpR, Idera), аналоги dsРНК, такие как поли-(I:C) и их производные (например, AmpliGen®, Hiltonol®, поли-(ICLC), поли(IC-R), поли(I:C12U), бактериальные ДНК или РНК, отличные от CpG, а также иммуноактивные малые молекулы и антитела, такие как циклофосфамид, сунитиниб, ингибиторы иммунных контрольных точек, включая ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб и темиплимаб, бевацизумаб®, целебрекс, NCX-4016, силденафил, тадалафил, варденафил, сорафениб, темозоломид, темсиролимус, XL-999, CP-547632, пазопаниб, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, анти-CTLA4, другие антитела, нацеленные на основные структуры иммунной системы (например, антитела к CD40, рецептору TGF-бета, рецептору TNF-альфа) и SC58175, которые могут действовать терапевтически и/или как адъюванты. Количества и концентрации адъювантов и добавок, пригодных для использования в контексте настоящего изобретения, могут быть легко определены опытным специалистом без проведения излишних экспериментов.

Предпочтительными адъювантами являются антитела к CD40, имиквимод, резиквимод, ГМ-КСФ, циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб, атезолизумаб, интерферон-альфа, интерферон-бета, CpG олигонуклеотиды и их производные, поли-(I:C) и ее производные, РНК, силденафил и составы из твердых микрочастиц на основе поли(лактид когликолида) (PLG), виросомы и/или интерлейкин (ИЛ)-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-21 и ИЛ-23.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамид, имиквимод, резиквимод и интерферон-альфа.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамид, имиквимод и резиквимод. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювантом является циклофосфамид, имиквимод или резиквимод. Еще более предпочтительными адъювантами являются монтанид IMS 1312, монтанид ISA 206, монтанид ISA 50V, монтанид ISA-51, поли-ICLC (Hiltonol®) и моноклональные антитела к CD40 или их комбинации.

Сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения субъекта, нуждающегося в лечении состояния, например, ракового заболевания, описанного в настоящем документе.

Способ лечения состояния (например, болезненного состояния) у субъекта с помощью $\gamma\delta$ Т-клеток может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток. $\gamma\delta$ Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть введены по различным схемам (например, по времени, концентрации, дозировке, промежуткам между курсами лечения, и/или лекарственной форме). Перед получением субъектом сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток согласно настоящему раскрытию он может быть подвергнут, например, воздействию химиотерапии, лучевой терапии или их комбинации. Популяция сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может быть также заморожена или подвергнута криоконсервации до введения субъекту. Популяция сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может включать две или более клеток, которые экспрессируют идентичные, различные или комбинацию идентичных и различных фрагментов, распознающих опухоль. Например, популяция сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может включать несколько различных сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток, которые разработаны, чтобы распознавать различные антигены или различные эпитопы одного и того же антигена.

$\gamma\delta$ Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения различных состояний. В одном аспекте сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения рака, в том числе солидных опухолей и гематологических злокачественных заболеваний. Неограничивающие примеры раковых заболеваний включают: острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденокарциному, связанные с ВИЧ виды рака, связанные с ВИЧ виды лимфомы, рак анального отверстия, рак аппендикса, астроцитомы, нейробластома, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, раковые опухоли кости, раковые опухоли головного мозга, такие как астроцитомы мозжечка, астроцитомы головного мозга/злокачественную глиому, эпендимому, медуллобластома, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, глиому зрительных путей и гипоталамическую глиому, рак молочной железы, аденомы бронхов, лимфому Беркитта, карциному неизвестного первичного происхождения, лимфому центральной нервной системы, астроцитомы мозжечка, рак шейки матки, детские раковые заболевания, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелолифферативные нарушения, рак толстой кишки, Т-клеточную лимфому кожи, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга, герминогенные опухоли, рак желчного пузыря, рак желудка, гастроинтестинальную карциноидную опухоль, гастроинтестинальную стромальную опухоль, глиомы, лейкоз ворсистых клеток, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоклеточный (печени) рак, ходжкинскую лимфому, гипофарингеальный рак, внутриглазную меланому, карциному островковых клеток, саркому Капоши, рак почки, рак гортани, рак губ и полости рта, липосаркому, рак печени, раковые опухоли легких, такие как немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легких, лимфомы, лейкозы, макроглобулинемия, злокачественную фиброзную гистиоцитому костей/остеосаркому, медуллобластома, меланомы, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи с неизвестным первичным, рак полости рта, синдром множественной эндокринной неоплазии, миелодиспластические синдромы, миелолейкоз, рак полости и придаточных пазух носа, назофарингеальную карциному, нейробластома, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легких, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому костей, рак яичника, эпителиальный рак яичника, герминогенную опухоль яичника, рак поджелудочной железы, рак островковых клеток поджелудочной железы, рак придаточных пазух и полости носа, рак паразитовидной железы, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитому, астроцитомы шишковидной железы, герминому шишковидной железы, аденому гипофиза, плевроролечную бластома, плазмноклеточную опухоль, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечноклеточную карциному, переходо-клеточный рак почечной лоханки и мочеточников, ретинобластома, рабдомиосаркому, рак слюнной железы, саркомы, раковые опухоли кожи, карциному кожи из клеток Меркеля, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, рак желудка, Т-клеточную лимфому, рак горла, тимому, карциному вилочковой железы, рак щитовидной железы, трофобластную опухоль (гестационную), раковые опухоли с неизвестным первичным очагом, рак уретры, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса.

В одном аспекте сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения инфекционного заболевания. В другом аспекте сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения инфекционного заболевания, причем инфекционное заболевание может быть вызвано вирусом. В еще одном аспекте сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения иммунного заболевания, такого как аутоиммунное заболевание.

Лечение с применением $\gamma\delta$ Т-клеток согласно настоящему раскрытию может быть предложено субъекту до, во время или после клинического проявления состояния. Препарат может вводиться субъекту через 1 день, 1 неделю, 6 месяцев, 12 месяцев или через 2 года после клинического проявления забо-

лечения. Препарат может вводиться субъекту в течение более чем 1 дня, 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 более после клинического проявления заболевания. Препарат может вводиться субъекту в течение менее чем 1 дня, 1 недели, 1 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев или 2 лет после клинического проявления заболевания. Лечение может также включать лечение человека в рамках клинического исследования. Лечение может включать введение субъекту фармацевтической композиции, включающей сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки согласно настоящему раскрытию.

В другом аспекте введение субъекту сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток согласно настоящему раскрытию может модулировать активность эндогенных лимфоцитов в организме субъекта. В другом аспекте введение субъекту сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может обеспечивать антигеном эндогенную Т-клетку и может усиливать иммунный ответ. В другом аспекте Т-клетка памяти может быть CD4⁺ Т-клеткой. В другом аспекте Т-клетка памяти может быть CD8⁺ Т-клеткой. В другом аспекте введение субъекту сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток согласно настоящему раскрытию может активировать цитотоксичность другой иммунной клетки. В другом аспекте другая иммунная клетка может быть CD8⁺ Т-клеткой. В другом аспекте другая иммунная клетка может быть естественной киллерной Т-клеткой. В другом аспекте введение субъекту сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток согласно настоящему раскрытию может подавлять регуляторную Т-клетку. В другом аспекте регуляторная Т-клетка может быть FOXP3⁺ Treg-клеткой. В другом аспекте регуляторная Т-клетка памяти может быть FOXP3⁻ Treg-клеткой. Неограничивающие примеры клеток, активность которых может быть модулирована сконструированными $\gamma\delta$ Т-клетками согласно описанию могут включать: гемопоэтические стволовые клетки; В-клетки; CD4; CD8; эритроциты; лейкоциты; дендритные клетки, в том числе дендритные антигенпрезентирующие клетки; белые кровяные клетки; макрофаги; В-клетки памяти; Т-клетки памяти; моноциты; естественные киллерные клетки; нейтрофильные гранулоциты; Т-хелперные клетки; и Т-киллерные клетки.

В большинстве случаев во время трансплантации костного мозга обычно может применяться комбинация циклофосфида с облучением всего тела, чтобы предупредить отторжение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) трансплантата иммунной системой субъекта. В одном аспекте может производиться инкубирование костного мозга донора с интерлейкином-2 (ИЛ-2) *ex vivo* для усиления образования киллерных лимфоцитов в донорском костном мозге. Интерлейкин-2 (ИЛ-2) является цитокином, который может быть необходим для роста, пролиферации и дифференциации лимфоцитов дикого типа. В текущих исследованиях адоптивного переноса $\gamma\delta$ Т-клеток человеку может потребоваться одновременное введение $\gamma\delta$ Т-клеток и интерлейкина-2. Однако как низкие, так и высокие дозы ИЛ-2 могут вызывать побочные эффекты вследствие высокой токсичности. Токсичность ИЛ-2 может поражать многие органы/системы, наиболее существенно - сердце, легкие, почки и центральную нервную систему. В другом аспекте в раскрытии предложен способ введения субъекту сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток без одновременного введения природного цитокина или его модифицированных версий, таких как ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-21. В другом аспекте сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть введены субъекту без одновременного введения ИЛ-2. В другом аспекте сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть введены субъекту в рамках процедуры, такой как трансплантация костного мозга без одновременного введения ИЛ-2.

Способы введения

Одна или несколько популяций сконструированных популяций $\gamma\delta$ Т-клеток могут быть введены субъекту в любом порядке или одновременно. Если одновременно, то несколько сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток могут быть предложены в отдельной унифицированной форме, такой как внутривенная инъекция, или в виде множества форм, например, в виде многократных внутривенных инфузий, в. к, инъекций или пилюль. Сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть упакованы вместе или отдельно, в отдельную упаковочную единицу или в несколько упаковочных единиц. Одна или все сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут вводиться в виде многократных доз. Если не одновременно, то промежуток времени между многократными дозами может варьироваться, достигая вплоть до примерно одной недели, одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или примерно одного года. В другом аспекте сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть подвергнуты экспансии в организме субъекта, *in vivo*, после введения субъекту. Сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть заморожены в целях обеспечения клетками для многократного введения одного и того же клеточного препарата. Сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки согласно настоящему раскрытию и фармацевтические композиции, включающие их, могут быть упакованы в виде комплекта. В комплект могут входить инструкции (например, письменные инструкции) по применению сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток и композиций, включающих их.

В другом аспекте способ лечения рака включает введение субъекту терапевтически эффективного количества сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток, при котором за счет введения производится лечение рака. В других вариантах осуществления терапевтически эффективное количество сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может вводиться в течение не менее примерно 10, 30 с, 1, 10, 30 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 ч, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 меся-

цев, 5 месяцев, 6 месяцев или 1 года. В другом аспекте терапевтически эффективное количество сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может вводиться в течение не менее чем одной недели. В другом аспекте терапевтически эффективное количество сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может вводиться в течение не менее чем двух недель.

Сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки, описанные в настоящем документе, могут вводиться до, во время или после появления заболевания или состояния, и сроки введения фармацевтической композиции, включающей сконструированную $\gamma\delta$ Т-клетку, могут варьироваться. К примеру, сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть использованы для профилактики и могут вводиться продолжительно субъектам с предрасположенностью к состояниям или заболеваниям, чтобы снизить вероятность возникновения данного заболевания или состояния. Сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут вводиться субъекту во время или как можно скорее после появления симптомов. Введение сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может быть инициировано сразу же после появления симптомов, в течение первых 3 ч после появления симптомов, в течение первых 6 ч после появления симптомов, в течение первых 24 ч после появления симптомов, в течение 48 ч после появления симптомов или в течение любого периода времени после появления симптомов. Первичное введение может осуществляться любым практически осуществимым способом, таким как любой способ, описанный в настоящем документе, при использовании любой лекарственной формы, описанной в настоящем документе. В другом аспекте введение сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток согласно настоящему раскрытию может быть внутривенным введением. Одно- или многократная доза сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может быть введена, как только это будет практически осуществимо, после возникновения ракового заболевания, инфекционного заболевания, иммунного заболевания, сепсиса или вместе с трансплантатом костного мозга и с продолжительностью по времени, необходимой для лечения иммунного заболевания, такой как, например, от примерно 24 до примерно 48 ч, от примерно 48 ч до примерно 1 недели, от примерно 1 до примерно 2 недель, от примерно 2 недель до примерно 1 месяца, от примерно 1 до примерно 3 месяцев. Для лечения рака одно- или многократная доза сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может быть введена спустя годы после возникновения ракового заболевания и перед или после других видов лечения. В другом аспекте сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут вводиться в течение не менее примерно 10, 30 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 ч, не менее 48, не менее 72, не менее 96 ч, не менее 1 недели, не менее 2 недель, не менее 3 недель, не менее 4 недель, не менее 1 месяца, не менее 2 месяцев, не менее 3 месяцев, не менее 4 месяцев, не менее 5 месяцев, не менее 6 месяцев, не менее 7 месяцев, не менее 8 месяцев, не менее 9 месяцев, не менее 10 месяцев, не менее 11 месяцев, не менее 12 месяцев, не менее 1 года, не менее 2 лет, не менее 3 лет, не менее 4 лет или не менее 5 лет. Продолжительность лечения может варьироваться для каждого отдельного субъекта.

Консервация

В одном аспекте $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть составлены в среде для замораживания и помещены в устройства для криогенного хранения, такие как скороморозильный аппарат на основе жидкого азота (-196°C) или скороморозильный аппарат с ультра-низкой температурой (-65°C , -80°C , -120°C , или -150°C) для долгосрочного хранения, продолжительностью не менее примерно 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет или по меньшей мере 5 лет. Среда для замораживания может содержать диметилсульфоксид (ДМСО), и/или хлорид натрия (NaCl), и/или декстрозу, и/или сульфат декстрана и/или гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) с рН-регулирующими реагентами для поддержания физиологического значения рН на уровне между примерно 6,0 и примерно 6,5, примерно 6,5 и примерно 7,0, примерно 7,0 и примерно 7,5, примерно 7,5 и примерно 8,0 или примерно 6,5 и примерно 7,5. Подвергнутые криоконсервации $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть разморожены и далее обработаны путем стимуляции антителами, белками, пептидами и/или цитокинами согласно настоящему описанию. Подвергнутые криоконсервации $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть разморожены и генетически модифицированы с помощью вирусных векторов (в том числе ретровирусных, аденоассоциированных вирусных (AAV) и лентивирусных векторов) или невирусных средств (в том числе РНК, ДНК, например, транспозонов и белков) согласно настоящему описанию. Модифицированные $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть дополнительно подвергнуты криоконсервации для создания банков клеток в количестве, составляющем по меньшей мере примерно 1, 5, 10, 100, 150, 200, 500 флаконов с примерно по меньшей мере 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или по меньшей мере примерно 10^{10} клеток на мл в среде для замораживания. Подвергнутые криоконсервации банки клеток могут сохранять их функциональность и могут быть разморожены и далее простимулированы и подвергнуты экспансии. В другом аспекте размороженные клетки могут быть простимулированы и подвергнуты экспансии в подходящих закрытых сосудах, таких как, например, мешки для клеточных культур и/или биореакторы, для получения количеств клеток в виде аллогенного клеточного продукта. Подвергнутые криоконсервации $\gamma\delta$ Т-клетки могут сохранять свои биологические функции в течение по меньшей мере примерно 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 13 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев, 20 месяцев, 24 месяцев, 30 месяцев, 36 месяцев, 40 месяцев, 50 месяцев или по меньшей мере примерно 60 месяцев в условиях криогенного хранения. В другом аспекте в лекарственной форме не могут использоваться консерванты. Подвергнутые криоконсервации $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть разморожены и введены с помощью инфузии нескольким пациентам в

качестве готового к применению аллогенного клеточного продукта.

В одном аспекте сконструированные $\gamma\delta$ Т-клетки, описанные в настоящем документе, могут присутствовать в композиции в количестве, составляющем 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 более, от примерно 1×10^3 клеток/мл до примерно по меньшей мере 1×10^8 клеток/мл, от примерно 1×10^5 клеток/мл до примерно по меньшей мере 1×10^8 клеток/мл, или от примерно 1×10^6 клеток/мл до примерно по меньшей мере 1×10^8 клеток/мл.

В одном аспекте способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для получения аутологичных или аллогенных продуктов в соответствии с одним аспектом раскрытия.

В одном аспекте векторы, конструкции или последовательности, описанные в настоящем документе, могут включать примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 85%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, или примерно 99% к любой из SEQ ID NO: 1-97 и 265-266. Последовательность, "по меньшей мере на 85% идентичная контрольной последовательности", это такая последовательность, которая по всей своей длине на 85% или более, в частности на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична всей длине контрольной последовательности.

В контексте настоящей заявки "процентная доля идентичности" рассчитывается с помощью глобального попарного выравнивания (т.е. две последовательности сравниваются по всей их длине). Способы сравнения идентичности двух или более последовательностей хорошо известны из уровня техники. К примеру, может быть использована программа "Needle", в которой используется алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453), чтобы найти оптимальное выравнивание (включая гэпы) двух последовательностей при рассмотрении их длины целиком. Программа "Needle", доступна, например на веб-сайте ebi.ac.uk и дополнительно 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) стр. 276-277). Процентная доля идентичности между двумя полипептидами в соответствии с изобретением рассчитывается с помощью пакета EMBOSS: (глобальной) программы "needle" с параметром "Открытие гэпа", равным 10.0, параметром "Расширение гэпа", равным 0,5, и матрицей Blosum62. Белки, состоящие из аминокислотной последовательности, "по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной" контрольной последовательности, могут включать мутации, такие как делеции, вставки и/или замены в сравнении с контрольной последовательностью. В случае замен белок, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной контрольной последовательности, может соответствовать гомологичной последовательности, полученной из другого вида, нежели в случае контрольной последовательности. "Аминокислотные замены" могут быть консервативными или неконсервативными. Предпочтительно, если замены являются консервативными заменами, где одна аминокислота заменена другой аминокислотой с похожими структурными и/или химическими свойствами.

В одном варианте осуществления консервативные замены могут включать те, что описаны Dayhoff в работе "The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5", Natl. Biomedical Research, содержание которой в полном объеме включено путем ссылки. Например, в одном аспекте аминокислоты, которые относятся к одной из следующих групп, могут быть заменены на другие, что представляет собой консервативную замену: 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 аспекте консервативная аминокислотная замена может быть выбрана из следующих T→A, G→A, A→I, T→V, A→M, T→I, A→V, T→G, и/или T→S.

В другом варианте осуществления консервативная аминокислотная замена может включать замену одной аминокислоты на другую аминокислоту из одного и того же класса, например (1) неполярную: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) незаряженную полярную: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) кислотную: Asp, Glu; и (4) основную: Lys, Arg, His. Другие консервативные аминокислотные замены могут быть осуществлены по следующему принципу: (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, патент США № 10106805, содержание которой в полном объеме включено путем ссылки).

В другом варианте осуществления консервативные замены могут быть осуществлены в соответствии с табл. 1. Способы предсказания толерантности к белковой модификации могут быть взяты, например, из работы Guo и соавт., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210 (2004), содержание которой в полном объеме включено путем ссылки.

Таблица А. Консервативные аминокислотные замены

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

В одном аспекте последовательности, описанные в настоящем документе, могут включать 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 или 30 мутаций, замен, делеций аминокислот или нуклеотидов. В одном аспекте любая из последовательностей SEQ ID NO: 1-97 и 265-266 может включать 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 или 30 мутаций, замен или делеций. В еще одном аспекте мутации или замены являются консервативными аминокислотными заменами.

В другом варианте осуществления консервативные замены могут быть такими, как показано в таблице Б под заголовком "Консервативные замены". Если такие замены приводят в результате к изменениям в биологической активности, тогда могут быть произведены дополнительные существенные изменения, названные под заголовком "Примеры замен" в таблице Б, и при необходимости проведен скрининг продуктов.

Таблица В. Аминокислотные замены

Аминокислотные замены		
Исходный остаток (встречающаяся в природе аминокислота)	Консервативные замены	Примеры замен
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

Пример 1.

Таблица 2. Последовательности ДНК и белков

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Промотор MSCV	Tgaaagacccacactgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccatttgcaa ggcatggaaaatacataactgagaatagagaagtcagatcaaggtaggaac agagagacagcagaatatggccaacaggatatctgtggaagcagttcctgc cccgctcaggccaagaacagatggtcccagatgcggtcccgcctcagca gttctagagaaccatcagatgttcagggtgccccaggacctgaaaatgacc ctgtgccttattgaaactaaccaatcagttcgcttctcgcttctgtcgcgcttctgct ccccgagctcaataaaagagcccaaccctcact
2	Фурин	RAKR
3	P2A	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
4	T2A	EGRGSLTCDGVEENPGP
5	E2A	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
6	F2A	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
7	Фурин, консенсусная	RXXR
8	Линкер	SGSG

9	WPRE	cagctgacgtacgcgtaatacaacctctggattacaaaatttgtaaagattgactg gtattcttaactatgtgctcctttacgctatgtggatacgcctttaaagccttgatc atgctattgctcccgatggcttcattttctcctctgtataaatcctgggtgctgctct ttatgaggagttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtggtgacactggttct gacgcaacccccactggtggggcattgccaccacctgacgctccttccggga cttcgcttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgcttggccg ctgctggacaggggctcggtgtgggcaactgacaattccgtggtgtgctgggga agctgacgtccttccatggctgctgcctgtgtgccacctgattctgcgccggac gtccttctgctacgtccctcggccctcaatccagcggacctcctcccgggctg ctccggctctgcgcccttccgctcttgccttgcctcagacgagtcggatct cccttggccgctccccgcc
10	промотор белка X	Ggggaagctgacgtccttcc
11	альфа-цепь CD8	MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRV/SPLDRTWNLGETVE LKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKA AEGLDTRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYFCSALS NSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKS GDKP SLSARYV
12	бета-цепь CD8	MRPRLWLLLAQLTVLHGNSVLQQTTPAYIKVQTNKMVML SCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKG TIHGEEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVG SPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRP ETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRAR LRFMKQPQGEGISGTFVPCQLHGYYSNTTTSQKLLNPWIL KT

13	альфа-цепь R11KEA	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDS TNFTCSFPSSNFYALHWYRKETAKSPEALFVMTLNGDEK KKGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCALYNNND MRFGAGTRLTVPNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
14	бета-цепь R11KE	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHNSLFWYRETMMRGLELLIYFNNNPIDDSGMP EDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSPGSTD QYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP ALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
15	альфа-цепь R20P1H7	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGES SSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEK EKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCAVQGENSGY STLTFGKGTMLLVSPDIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLF TDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVA WSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSF ETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
16	бета-цепь R20P1H7	MGPQLLGYVVLCLLGGAPLEAQTQNPRLITVTGKKLTV TCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGD VPEGYKVSRRKEKRNFLILESPSPNQTSLYFCASSLGPGL AAYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQ PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPRNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

17	альфа-цепь R7P1D5	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQD QRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIF GSGTRLSIRPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNL NFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
18	бета-цепь R7P1D5	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMP EDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTGEL FFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA LNSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVТQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
19	альфа-цепь R10P2G12	MLTASLLRAVIASICVSSMAQKVТQAQTEISVVEKEDVTL DCVYETRDТTYLFWYKQPPSGELVFLIRRNSFDEQNEIS GRYSWNFQKSTSSFNFTITASQVVDSAVYFCALSEGNSG NTPLVFGKGRТLSVIANIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCL FTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAV AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKS FETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
20	бета-цепь R10P2G12	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFL ECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGD PEGYSVSREKKERFSLILESASTNQТSMYLCASSLSSGSH QETQYFGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYDPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVТQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQ GVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
21	альфа-цепь R10P1A7	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQD QRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAESKETRLMF GDGTQLVVKPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
22	бета-цепь R10P1A7	MLLLLLLPGISLLPGSLAGSGLGAWSQHPVWICKSG TSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSK ATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVТSAHPEDSSFYICSA RAGGHEQFFGPGTRЛTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVТQIVSAEAWGRADCGFTSE SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDS RG
23	альфа-цепь R4P1D10	MKSLRVLLVILWLQLSWWWQQKEVEQNSGPLSVPEGAI ASLNCTYSDRGSQFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKE DGRFTAQLNKASQYVLLIRDSQPSDSATYLCVNFHDKII FGKGRТLHILPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

24	бета-цепь R4P1D10	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTL RCSPPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIHYNGEERAKGNI LERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASSVASAYG YTFGSGTRLTVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP ALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPРНHFRСQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
25	альфа-цепь R4P3F9	MKSLRVLLVILWLQLSWWWVQQKEVEQNSGPLSVPEGAI ASLNCTYSDRGSQFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKE DGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPDSATYLCAAYSGAGS YQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVVSQKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFET DTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
26	бета-цепь R4P3F9	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTL RCSPPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNI LERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASSVESSYG YTFGSGTRLTVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP ALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPРНHFRСQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
27	альфа-цепь R4P3H3	MKSLRVLLVILWLQLSWWWVQQKEVEQNSGPLSVPEGAI ASLNCTYSDRGSQFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKE DGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPDSATYLCAVAKAGNQF YFGTGTSLTVIPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVVSQKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
28	бета-цепь R4P3H3	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVVSQSPRYKVAKRQGDV ALRCDPISGHVSLFWYQQALGQGPEFLTYFQNEAQLDKS GLPSDRFFAERPEGSVSTLKIQRТQQEDSAVYLCASSLLT SGGDNEQFFGPGTRLTVELELKNVFPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPРНHFRСQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSE SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDS RG
29	альфа-цепь R36P3F9	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENAT MNCSYKTSINNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKKSSLLITASRAADTASYFCATVSNYQLIWGA GTKLIKPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFETDTNLFQ NLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
30	бета-цепь R36P3F9	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRLITVTGKCLTV TCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGD VPEGYKVSРKEKRNFLILESPSPNQTSLYFCASSSTSGG LSGETQYFGPGTRLLVLELKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPРНHFRСQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

31	альфа-цепь R52P2G11	MKKHLTTFVLVILWLYFYRGNQVEQSPQSLIILEGKNCT LQCNYTVSPFNSLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSN GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSAYGKLF GAGTQVVVTPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
32	бета-цепь R52P2G11	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMP EDRFSAKMPNASFSTLKIQSEPRDSAVYFCASSLGSFDG NQPQHFGDGRSLILEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNPRNHFRQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTVIWSAEAWGRADCGFTSVSYQQ GVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVVKRDF
33	альфа-цепь R53P2A9	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAETV TLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQNA TENRFSVNFQKAASFSLKISDSQLGDAAMYFCAYNSYAG GTSYGKLTFGGTTILTVHPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKS VCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL EKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
34	бета-цепь R53P2A9	MGPGLLCWVLLCLLGGAPVDAGVTQSPHTRGQQVT LRCSPISGHKSVSWYQQVLGQGPQFIFQYKEERGRGN FPDRFSARQFPNYSELNVNALLLGDALYLCASSLDGTS EQYFGPGTRLTVEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNPRNHFRQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTVIWSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVVKRDSRG

35	альфа-цепь R26P1A9	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENAT MNCSYKTSINNLLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKKSSLLITASRAADTASYFCLIGASGSRLTFG EGTQLTVNPDIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFETDTNLN FQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
36	бета-цепь R26P1A9	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMP EDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSYFGWN EKLFFGSGTQLSVLEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVТQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVЛ SATILYEILLGKATLYAVLVСALVLMAMVKRKDF
37	альфа-цепь R26P2A6	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGA IVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNK EDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAMSDVSG GYNKLIFGAGTRLAVHPYIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAV AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKS FETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
38	бета-цепь R26P2A6	MGPQLLGYVVLCLLGAQVLEAQTQNPRLITVTGKCLTV TCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGD VPEGYKVSРKEKRNFLILESPSPNQTSLYFCASSTPDGT DEQFFGPGTRLTVLEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVТQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVСALVLMAMVKRKDSRG

39	альфа-цепь R26P3H1	MASAPISMLAMLFTLSGLRAQSVQPEDQVNVAEGNPLT VKCTYSVSGNPYLFWYVQYPNRGLQFLLKYITGDNLVKGS YGFEAEFNKSQTSFHLKKPSALVSDSALYFCAVRDMNRD DKIIFGKGRHLHILPNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVVSQKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVCLVEKSFET DTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
40	бета-цепь R26P3H1	MSNQVLCVVLCLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNV LSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGD IAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSRAEGG EQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
41	альфа-цепь R35P3A4	MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVIK CTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIIDIRSNVGEKKDQRIA VTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAASPTGGYNKLIFG AGTRLAVHPYIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVVSQKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVCLVEKSFETDTNLN FQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
42	бета-цепь R35P3A4	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTL QCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGE VPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSLGGAS QEYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPRNHFRQCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

43	альфа-цепь R37P1C9	MKLVTSITVLLSLGIMGDAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCN HSTISGTDYIHWYRQLPSQGPYVIHGLTSNVNRMASLAI AEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILFNFKFYFGSGTKLN VKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLNLS VIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
44	бета-цепь R37P1C9	MGPGLLHWMALCLLGTGHGDAMVIQNPYQVTQFGKPV TLSCSQTLNHNVMYWYQQKSSQAPKLLFHYDKDFNNEA DTPDNFQSRPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYLCATSSGET NEKLFFGSGTQLSVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTVIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQ GVL SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
45	альфа-цепь R37P1H1	MTRVSLWVAVVSTCLESGMAQTVTQSQPEMSVQEAET VTLSCYDTSESNYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAQKQN ATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFCAFGYSG GGADGLTFGKGTHLIQPYIQNPDPVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNS AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVE KSFETDTNLFQNLNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
46	бета-цепь R37P1H1	MGPGLLCWALLCLL GAGLVDAGVTQSPHLIKTRGQQVTL RCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQRGN FPDRFSGHQFPNYSEELNVNALLGDSALYLCASSNEGQ GWEAEAFFGQGTRLTVVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVTVIVSAEAWGRADCGFTSVSYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
47	альфа-цепь R42P3A9	MKRILGALLGLLSAQVCCVRGIQVEQSPDLILQEGANSTL RCNFSDSVNLLQWFHQNPWGQLINLFYIPSGTKQNGRLS ATTVATERYSLLYISSSQTTDSGVYFCVHNFNFKFYFGSG TKLNVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQ NLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
48	бета-цепь R42P3A9	MLSPDLPSAWNTRLLCHVMCLL GAVSVAAGVIQSPRHL IKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQLISFYE KMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSLELGDSALYF CASSLLGQGYNEQFFGPGTRLTVLEDLNKVFPEVAVFEP SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHF RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVIVSAEAWGRADCG FTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVK RKDSRG
49	альфа-цепь R43P3F2	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTL DCVYETRDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRRNSFDEQNEIS GRYSWNFQKSTSSFNFTITASQVVDSAVYFCALSNNNAG NMLTFGGGTRLMVKPHIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCL FTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAV AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKS FETDTNLFQNLNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

50	бета-цепь R43P3F2	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCCLLGAVSVAAGVIQSPRHL IKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYE KMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSLELGDSALYF CASSPTGTSQYNEQFFGPGTRTLVLEDLKNVFPPEVAVFE PSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWWNGKEVHS GVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADC GFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDSRG
51	альфа-цепь R43P3G5	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDS TNFTCSFPSSNFYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGDEK KKGRISATLNTKEGYSYLYIKGSPEDSATYLCALNRDDKII FGKGTRELHILPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLEKSFETDTN LNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
52	бета-цепь R43P3G5	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFL ECVQDMDHENMFYWRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGGDI PEGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASRLPSRTY EQYFGPGTRTLVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYDPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCFTSESYQQGVLS SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
53	альфа-цепь R59P2E7	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTPAALSVPENLVL NCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSREQTSGR LNASLDKSSGRSTLYAASQPGDSATYLCVANSYKLSFG AGTTVTVRANIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVQSKSDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLEKSFETDTNLN FQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
54	бета-цепь R59P2E7	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCCLLGAVSVAAGVIQSPRHL IKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYE KMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSLELGDSALYF CASSLGLGTGDYGYTFGSGTRTLVVEDLNKVPPEVAVFE PSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHS GVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADC GFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF
55	альфа-цепь R11P3D3	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDS TNFTCSFPSSNFYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGDEK KKGRISATLNTKEGYSYLYIKGSPEDSATYLCALYNNND MRFGAGTRTLVKPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVQSKSDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLEKSFET DTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

56	бета-цепь R11P3D3	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMP EDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSPGSTDT QYFGPGTRTLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFYDPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTVIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
57	альфа-цепь R16P1C10	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAI ASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKE DGRFTAQLNKASQYVLLIRDSQPSDSATYLCAAVISNFG NEKLTFTGTGTRLTIIPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLF TDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSNSAVA WSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSF ETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
58	бета-цепь R16P1C10	MGSRLLCWVLLCLLGGAPVKAGVTQTPRYLIKTRGQVTL SCSPISGHRVSVWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKGNF PGRFSGRQFSNSRSEMNVTLELGDSALYLCASSPWDSP NEQYFGPGTRTLVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYDPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTVIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
59	альфа-цепь R16P1E8	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGA IVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNK EDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAMSEAAG NKLTFTGGTRVLVKPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLF TDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSNSAVA WSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSF ETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

60	бета-цепь R16P1E8	MGTRLLCWAALCCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIIEKRQSVAF WCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFNNGVWDDSQL PKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSYTNQG EAFFGQGTRLTVVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVТQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVСALVLMAMVKRKDF
61	альфа-цепь R17P1A9	MKSLRVLLVILWLQLSWWWQQKEVEQNSGPLSVPEGAI ASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYNSGDKE DGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCAVLNQAGT ALIFGKGTLSVSNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTD FDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWS NKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETD TNLNFQNLСVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
62	бета-цепь R17P1A9	MGFRLLCCVAFCLL GAGPVD SGVTQTPKHLITATGQRVTL RCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNI LERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDСALYFCASSAETGPW LGNEQFFGPGTRLTVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVТQIVSAEAWGRADCGFTSESYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVСALVLMAMVKRKDSRG
63	альфа-цепь R17P1D7	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAEV TLСTYDTSESDYLLFWYKPPSRQMILVIRQEAYKQQNA TENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAYRWAQ GGSEKLVFGKGTKLTVNPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNS AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVE KSFETDTNLNFQNLСVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS

64	бета-цепь R17P1D7	MTIRLLCYMGFYFLGAGLMEADYQTPRYLVIGTGKKITLE CSQTMGHDKMYWYQQDPGMELHLIHYSYGVNSTEKGDL SSESTVSRIRTEHFPLTLESARPSHTSQYLCATELWSSGG TGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHRCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
65	альфа-цепь R17P1G3	IMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPDSAT YLCAVGPSGTYYIFGTGTRLKVLANIQNPDPVAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRS MDFKNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSS CDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTL RLWSS
66	бета-цепь R17P1G3	MGPQLLYVVLCLL GAGPLEAQVTQNPRLITVTGKKLTV TCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGD VPEGYKVSРKEKRNFLILESPSPNQTSLYFCASSPGGSG NEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHRCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
67	альфа-цепь R17P2B6	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAI ASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKE DGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPDSATYLCVVSGGG ADGLTFGKGTHLIQPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLF TDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVA WSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSF ETDTNLFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS

68	бета-цепь R17P2B6	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRHL IKEKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYE KMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSELGDSALYF CASSLGRGGQPQHFGDGTRLSILEDLNKVFPEVAVFEP EAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGV STDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQQQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGF TSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR KDF
69	альфа-цепь R11P3D3KE	MEKNPLAAPLLILWFHLDVCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDS TNFTCSFPSSNFYALHWYRKETAKSPEALFVMTLNGDEK KKGRISATLNTKEGYSYLKIGSQPEDSATYLCALYNNND MRFGAGRTLTVKPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFET DTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
70	бета-цепь R11P3D3KE	NNNVPIDDSGMPEDRFSKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASSPGSTDTQYFGPGTRLTVLEDLNKVFPEVAVFEP SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR RCQQQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCG FTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVK RKDSRG
71	альфа-цепь R39P1C12	TYLYWYKQEPGAGLQLLYIFSNMDMKDQRLTVLLNKK DKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEIDNQGKLIQGGTELSV KPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIG FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

72	бета-цепь R39P1C12	MGPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPTHLIKTRGQQVTL RCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQRGN FPDRFSGHQFPNYSELNVNALLLGDALYLCASSQLNTE AFFGQGTRLTVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
73	альфа-цепь R39P1F5	MKSLRVLLVILWLQLSWWWQQKEVEQNSGPLSVPEGAI ASLNCTYSDRGSQSFYWRQYSGKSPELIMFIYSNGDKE DGRFTAQLNKASQYVLLIRDSQPSDSATYLCAVNNARLM FGDGTQLVVKPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLSVIGFRILLKVGFNLLMTRLRWSS
74	бета-цепь R39P1F5	MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGEVIL RCVPISNHLYFYWRQILGQKVEFLVSYNNEISEKSEIFD DQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSGQGANЕ QYFGPGTRLTVTEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP PALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
75	альфа-цепь R40P1C2	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAETV TLSCYDTSESDYLLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNA TENRFSVNFQKAASFSLKISDSQLGDAAMYFCAYLNYQL IWGAGTKLIIKPDIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLSVIGFRILLKVGFNLLMTRLRWSS

76	бета-цепь R40P1C2	MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGGQEVIL RCVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSYFNNEISEKSEIFD DQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSEMTAVG QYFGPGTRTLVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSA TILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
77	альфа-цепь R41P3E6	MKSLRVLLVILWLQLSWWWQQKEVEQNSGPLSVPEGAI ASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKE DGRFT AQLNKASQYVLLIRDSQPDSATYLCAAFSGYALNFGKG TSLLVTPHIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLEKSFETDTNLNFQ NLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTRLRLWSS
78	бета-цепь R41P3E6	MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGGQEVIL RCVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSYFNNEISEKSEIFD DQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSQYTSELF FGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGLSEND EWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSA TILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
79	альфа-цепь R43P3G4	MKSLRVLLVILWLQLSWWWQQKEVEQNSGPLSVPEGAI ASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKE DGRFTAQLNKASQYVLLIRDSQPDSATYLCAVNGGDM RFGAGTRTLVKPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLEKSFETDT

		NLNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
80	бета-цепь R43P3G4	MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVIL RCVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNIEISEKSEIFD DQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSGQGALE QYFGPGTRTLVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPРНHFRСQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVSAVLVLMAMVKRKDSRG
81	альфа-цепь R44P3B3	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSSL VQEGRISILNCDYTNMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIK DKNEDGRFTVFLNKSАKHLSLHIVPSQPГDSAVYFCAASG LYNQGGKLIFGQTELSVKPNIQNPDPАVYQLRDSKSSDK SVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKS NSАVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
82	бета-цепь R44P3B3	MGCRLCCVVFCLLQAGPLDTAVSQTPKYLVTQMGNDKS IKCEQNLGHDTMYWYKQDSKKFLKIMFSYNNKELIINETVP NRFSPKSPDKAHLNLHINSLELGDSAVYFCASSLGDRGYE QYFGPGTRTLVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPРНHFRСQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLVSAVLVLMAMVKRKDSRG
83	альфа-цепь R44P3E7	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSS VINCTYTDSSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMMDMKQD QRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSАIYFCAEINNARLM FGDGTQLVVKPNIQNPDPАVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSАVAWSNK

		SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMLRLWSS
84	бета-цепь R44P3E7	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRHL IKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQLISFYE KMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSLELGDSALYF CASSPPDQNTQYFGPGTRTLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVS TDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQPNRHFRC QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT SESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRK DSRG
85	альфа-цепь R49P2B7	MLLLLVPVLEVIFTLGGTRAQSVTQLGSHVSVSEGAIVLLR CNYSSSVPPYLFWYVQYPNQGLQLLLKYTTGATLVKGING FEAEFKKSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFCAVRIFGNEKLT FGTGRLLIIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNL NLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMLRLWSS
86	бета-цепь R49P2B7	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFL ECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKEDI PEGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSLMGELT GELFFGEGSRLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQPNRHFRCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
87	альфа-цепь R55P1G7	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGA IVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNK EDGRFTAQVDKSSKYISLFIKSDSQPSDSATYLCAMMGDTG TASKLTFGTGTRLQVTLDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVC

		LFTDFDSQTNVQSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKNSNSAV AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKS FETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMLRLWSS
88	бета-цель R55P1G7	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFL ECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDI PEGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFGGYEQ YFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA LNSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
89	альфа-цель R59P2A7	VKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVQS SKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKNSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFETDTNLFQNLV VIGFRILLKLVAGFNLLMLRLWSS
90	бета-цель R59P2A7	MLCSLLALLLGTFFGVRSQTIHQWPATLVQPVGSPLESC TVEGTSNPPLYWYRQAAGRGLQLLFYVIGQISSEVPQ NLSASRPQDRQFILSSKLLLSDSGFYLCAWSGLVAEQFF GPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
91	PTE WPRE	tgaaagacccacctgtaggttggcaagctagcttaagtaacgcatttgcaag gcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaaca gagagacagcagaataatggccaacaggatatctgtgtaagcagttcctgcc ccggctcaggccaagaacagatgtcccagatgcggtcccgcctcagcag ttctagagaacctcagatgttccagggtgcccaaggacctgaaatgacct gtgcctattgaaactaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgctcctctgctcc ccgagctcaataaaagagcccacaacccctcactcagcggccgcccgggtcg

		<p>acgctaccaccatggactcttgaccctctgctgctgagcctgtgcatcctggtg ccaagcacacagacgccggcgtgatccagctcccctagccacgaggtgaccga gatggccaggaggtgacactgctgtaagccaatctctggccaacaagcct gttttggtataggagaccatgatgcgcccctggagctgctgatctactcaataa caatgtgccatcgacgattccggcatgctgaggatcggtttctgccaagatgc ccaatgccagcttccacactgaagatccagcctagcgagccaagagactccg ccgtgatTTTTGcCctctagcccaggcagcaccgatacacagactctcgacca ggaaccaggctgacagtgtggaggacctgaagaacgtgtccccctgaggtg gccgtgttgagccctctgaggccgagatcagccacaccagaaggccaccctg gtgtcctggcaaccgcttctatcctgatcacgtggagctgctcctggtggaac ggcaaggaggtgcacagcggcgtgccacagaccacagcccctgaaggag cagccagccctgaatgatagccggtattgcctgtcctcctggctgagagtgccgc cacctttggcagaacccccgaatcacttcagatgtcaggtgcagtttaaggcct gtccgagaacgatgagtgaccaggaccgggccaagcctgtgacacagatc gtgtctccgaggcatggggaagacgactgtggcttccactctgagagctacc agcaggcgtgctgagcgcaccatcctgatgagatcctgctggcaaggcca cactgtacgcccctgctcctcctgctgctgagtgcaatgtcaaaagaaaa gatagtggggacgggccaagagatctggcagcggcggccaatctcagcct gctgaaacagccggcgcagctggaagagaaccctggccccatggagaagaat cccctgctgccccctgctgatcctgtggttccactggactgctgctctatcct gaatgtggaacagagcccacagagcctgcacgtcaggagggcgactccacc aactcacatgctctttctagctccaactctacgcccctgactggtacagaaagg agaccgcaaagtccccagaggccctgtcgtgatgacactgaacggcgatgag aagaagaaggcccatcagcgcaccctgaatacaaggagggtactcct atctgtacatcaagggtcccagcctgaggactctgccacctatctgtgcctct acaacaataacgatatgctggttggcggcggcaccagactgacagtgaagcca aacatccagaatccagaccccggctgtatcagctgaggacagcaagtctagc gataagagcgtgtcctgttaccgacttgattctcagacaaacgtgagccagtc caaggacagcagctgtacatcaccgacaagacagtgctggatgagaagc atggactcaagtcaacagcggcgtggcctgtccaataagctgatttcgctgc gccaatgccttaataactccatcatccccgaggataccttcttctctccagagtc</p>
--	--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p>ctctgtgacgtgaagctggtggagaagctttcgagaccgatacaaacctgaatt tcagaacctgagcgtgatcgcttcaggatcctgctgctgaagggtgcccgttta atctgctgatgacctgaggctgtggagctcccggccaagagatctggcagcg gagggcagaggcagcctgctgacctgcgcgacgtggaggagaaccccg gccccatgccccgagactgtgcttctgctgcccgcgcaactgactgctgac ggaaacagcgtgctgagcagacaccggcctacatcaaagtgcagaccaaca agatggtcatgctgctcctgagggccaagattccctctccaacatgctgctatt ggttgcggcagagacaggccttccctggactcccacatgagttcttggcctg tggactccgccaagggaactattcacggcgaagaagtgaacaggagaaga tcgccgtttcgcatgctcccgtttatactgaatctgacctcctgaaagccga agatagcgggatcacttttgcattgtgggtcaccggaactgacctcgggaa gggactcagctgagcgtggtgacttctcccactaccgccaaccactaa gaagtcaaccctgaagaagcgggttgcagactcccacggcggaaaacgag aagggtccgctgtgtccccgatcaccctggggtccttggctggagtctggtc cttctggtccttggcgtgcccattcacctctgctccggagaaggaggccag actgaggtcatgaagcagcctcaggggaggggatcagtgccacttctgccc acaatgctcctatggctactattccaacaccaccctcgcaaaagctgtaac ccctgatcctgaaaaccgggccaagagatctgagcggccagtgcaccaa ctacccctgctgaagctggccggcagctggagagcaacccggccccatgg cgcttccgtagaccgactcctgttcccctgcccctgctgttcacgcccacgac ctccaattccgggtgtcccctctgcatcaccctggaacctcgggaaacggtg gagctcaagtcaagtctcctgctgaacccgaccagcggatgacgtggtgt tccagccgagaggagctgccgctcaccaccttctcctgactgagccagaa caagccgaaggccgctgagggtctggacaccagcgttctcgggcaaacggc tgggagacactttgtgctgactctccgactccggcgggagaacgagggtac factctgctctgctcctcaatcaatcatgtacttctcacactcgtccgggttcc tgctccaagcccaccactactccggcaccagacctccaactccgctcca ccatcgctcccaacccttctgctgcccctgaagcgtgctggcctgctgctgga ggagccgtgcatacccgggtctgactcgcgtgacatctacattgggcccc tttgctggcacctgtgagtgctcctgctcctgtgatcaccctgactgcaacc accggaataggcggagagctgcaagtgctccggcctgctggaagtcagga</p>
--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

		<p>gataagccgagcctgtccgcacgctacgtgtgaaccgggtccgcagtctgacgtac gcgtaatcaacctctggattacaaaatttgaaagattgactggattcttaactatg ttgctccttttacgctatgtggatacgtgcttaatgcctttgtatcatgctattgctccc glatggcttcaltttctcctctgtataaatcctggtgctgctctttatgaggagttgt ggcccggtgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgcactgtgttctgacgcaaccccc actggtggggcattgccaccacctgcagctccttccgggacttctgcttccccct ccctattgccacgcggaactcatcgcgcctgccttgcctgctggacaggg gctcggctgtgggactgacaattcctggtgtgctgggaagctgacgtccttc catggctgctgcctgtgtgccacctggattctgcgcggaagctcctctgctacgt ccctcggccctcaatccagcggacctcctcccggcctgctgcccgtctgc ggcctctccgcttctgccttgcctcagacgagtcggatctcccttggggccgc ctccccgc</p>
92	TPE WPRE	<p>tgaagaccccacctgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccattttgaag gcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaaca gagagacagcagaatagggccaacaggatatctgtggaagcagttcctgcc ccggctcagggccaagaacagatggtccccagatgctggcctccgctcagcag ttctagagaacctcagatgttccagggtgccccaggacctgaaatgacctt gtccttattgaaactaaccaatcagttcgttctcgttctgttcgctctctcc ccgagctcaataaaagagcccacaacccctcactcagcggcggcccggtgctg acgtaccaccatggactcttggacctctgctgctgagcctgtgcatcctggtgg ccaagcacacagacgcccggctgatccagtccttaggcacgaggtgaccga gatggccaggaggtgacactgcgctgtaagccaatctctggccacaacagcct gttttgatagggagaccatgatgcgcccctggagctgctgatctactcaataa caatgtgccatcgacgattccggcatgcctgagatcgggtttctgccaagatgc ccaatgccagcttcccaactgaagatccagcctagcagccaagagactccg ccgtgattttgcgctctagcccaggcagcaccgatacacagactctcgacca ggaaccaggctgacagtgtgaggacctgaagaacgtgttccccctgagggtg gccgtgttgagccctctgaggccgagatcagccacaccagaaggccaccctg gtgtcctggcaaccgctctatcctgatcacgtggagctgctcctggtgggaac ggcaaggaggtgcacagcggcgtgtccacagaccacagcccctgaaggag</p>

	<p>cagccagccctgaatgatagccggtattgcctgtcctctcggctgagagtgccgc cacctttggcagaacccccggaatcacttcagatgacaggtgcagtttacggcct gtccgagaacgatgagtgaccaggaacgggccaagcctgtgacacagatc gtgtctgccgagcatggggaagagcagactgtgcttcacctctgagagctacc agcagggcgtgctgagcgcaccatcctgtatgagatcctgtggcaaggcca cactgtacgctcctggtctccgctgtgtgctgaggaatggtcaaaagaaa gatagtcgggagggccaagagatctggcagcggcgagggcagaggcagc ctgtgacctgcgcgactggaggagaacccccggcccatggagaagaatc cctggctgccccctgtgatcctgtggtttcacctggactcgtgtcctctatcctg aatgtggaacagagcccacagagcctgcactgcaggagggcgactccacca actcacatgctctttctagctccaactctacgcccctgcactggtacagaaggga gaccgcaaagtcccagagccctgtctgtgacactgaacggcgtgaga agaagaaggccgcatcagcgcaccctgaatacaaggagggtactcctat ctgtacatcaagggtcccagcctgaggactctgccacatctgtgcccctgta caacaataacgatatcggtttgcccggcaccagactgacagtgaagccaa acatccagaatccagacccccggtgtatcagctgcccggcagcaagttagcg ataagagcgtgtcctgttaccgactttgattctcagacaaaactgagccagtc aaggacagcagctgtacatcaccgacaagacagtgctggatgagaagcat ggactcaagttaacagcgcctgtgctgtccaataagtctgattcgcctgcg ccaatgccttaataactccatcatccccgaggatcctcttctcctccagagtc tctgtgacgtgaagctggtggaagtcttcgagaccgatacaaacctgaattt cagaacctgagcgtgatcggcttcaggatcctgctgctgaaggtggccggttaa tctgtgatgacctgagctgtgagctcccggccaagagatctggcagcgg cgccaccaattcagcctgctgaaacagggcgcgacgtggaagagaacctg gccccatgccccgagactgtgctctgctcgcgcgcaactgactgtcctgca ggaacagcgtgctgagcagacaccgctcatcaaatgacagaccaaca agatggtcatgctgctcctgagggccaagattccctctccaacatcgggatctatt ggttcggcagagacagggcctcctcgactcccaccatgagttctggccctg tgggactccgccaagggaactattcacgggaagaagtgaacagggagaaga tcgccgtgttcgagatgcctcccgttatactgaatctgacctcgtgaagccga agatagcgggatcactttgcatgattgtgggctcaccggaactgacctcgggaa</p>
--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p> gggcactcagctgagcgtggtggactcctcccactaccgccaaccactaa gaagtcaaccctgaagaagcgggttgacagactcccacggccggaacgcag aagggccgctgtgtcccgatcaccctggggctccttggtgctgagtgctgtc cttctgggtcccttggcgtgccattcacctctgctgccggagaaggaggccag actgaggtcatgaagcagcctcaggagaggggatcagtggcacttctgtgcc acaatgcctccatggtactattccaacaccaccacctcgaaaagctgtgaac ccctggatcctgaaaaccgggccaagagatctggcagcggccaagtgcaccaa ctacgccctgctgaagctggccggcgacgtggagagcaacccggccccatgg cgctcccgtagaccactcctgttccccttgccctgctgttgacgcccgcacgac cttccaattccgggtgtccccttgatcgacacctggaacctcgggaaacggtg gagctcaagtgtcaagtctcctgctgaacccgaccagcggatgcagctggctgt tccagccgagaggagctgcccctcaccaccttctcctgtacttgagccagaa caagccgaaggccgctgagggctggacaccaagcgttctcgggcaaacggc tgggagacactttgtgctgactctccgactccggcgggagaacgagggctac tactctgctcgcctccaattcaatcatgtacttctcacactcgtgccgggttcc tgctgccaagcccaccactactccggcaccagacctccaactcccgtccca ccatcgcgtcccaacccttctgctgcgcctgaagcgtgctggcctgctgctgga ggagccgtgcatacccgggtctgactcgcgtgcgacatctacattgggcccc tttgctggcacctgtggagtgtcctcctgtccctgtgatcaccctgactgcaacc accggaataggcggagagtctgcaaggtccgcccctgctgtaagtcagga gataagccgagcctgtccgacgctacgtgtgaaccggctccgagctgacgtac gcgtaataaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattctaactg ttgctcctttacgctatgtggatacgtgcttaatgccttggatcatgctattgcc gtatggcttcatttctcctcctgtataaatcctggtgctgctcttatgaggagtgt ggcccgtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgttgctgacgcaaccccc actggtggggcattgccaccacgtcagctccttccgggacttctccttccccct ccctattgccacggcgaactacgcccgcctccttcccgcctgctggacaggg gctcggctgtggcactgacaattccgtggtgtgctggggaagctgacgtccttc catgctgctgcctgtgttccaacctggattctgcgcccagcgcctctgctacgt ccctcggccctcaatccagcggaccttcttcccggcctgctgcccggctgctgc ggcctctccgcttctgcctcgcctcagacgagctcgatctcccttggggccgc </p>
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

		ctccccgcc
93	PTE fn WPRE	<p>tgaagacccacctgtaggttgcaagctagcttaagtaacgccatTTTgcaag gcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaaca gagagacagcagaatatggccaacaggatctgtgtaagcagttcctgcc ccggctcagggccaagaacagatggccccagatcgggtccgcccctcagcag ttctagagaacctcagatgttccagggtgccccaggacctgaaaatgacct gtccttattgaaactaaccaatcagttcgtctcgtctgttcgcgcttctgtcc ccgagctcaataaaagagcccacaaccccactcagcggccgccccgggtcg acgtaccaccatggactctggacctctgctgctgagcctgtgcatcctggtg ccaagcacacagacgcccggctgatccagtcacctaggcacgaggtgaccga gatggccaggaggtagactcgtgtaagccaatctctggccaacacagcct gtttgtatagggagaccatgatcgcggcctggagctgctgactactcaataa caatgtcccacgacgattccggcatgctgaggatcggtttctgccaagatgc ccaatgccagcttccacactgaagatccagcctagcggccaagagactccg ccgtgtattttgccccttagcccaggcagcaccgatacacagactctggacca ggaaccaggctgacagtgctggaggacctgaagaacgtgtccccctgagggtg gccgtgttgagccctctgaggccgagatcagccacaccagaaggccaccctg gtgtcctggcaaccggcttctatcctgatcacgtggagctgtcctggtggggaac ggcaaggagggtgcacagcggcgtgtccacagaccacagcccctgaaggag cagccagccctgaatgatagccggtattgctgtcctctcggctgagaggtccgc cacctttggcagaacccccggaatcactcagatgcagggtcagtttacggcct gtccgagaacgatgagtgaccaggaccggccaagcctgtgacacagatc gtgtctcggaggcatggggaagagcagactgtggcttccactctgagagctacc agcagggcgtgctgagcgcaccatcctgtatgagatcctgtggcaaggcca cactgtacgcccctgtctccgctctggtgctgagtggaatggtaaaagaaaa gatagtcgggatctggcagcggcgccaccaattcagcctgtgaaacaggcc ggcagctggaagagaaccctggccccatggagaagaatccccgtgctcccc cctgtgatcctgtggtttcacctggactcgtgtcctctatcctgaatgtggaacag agcccacagcctgcacgtcagaggggcactccaccaactcacatgctct ttcctagctccaactctacgcctgcactggtacagaaaggagaccgcaaatg</p>

	<p> cccagaggccctgttcgtgatgacactgaacggcgatgagaagaagaagggcc gcatcagcgccaccctgaatacaagaggggctactcctatctgtacatcaagg gctcccagcctgaggactctgccacctatctgtgccctgtacaacaataacgat atcggtttggcgccggcaccagactgacagtgaagcacaacatccagaatcc agaccccgcgtgatcagctgctgggacagcaagtctagcgataagagcgtgtg cctgttcaccgacttgattctcagacaaacgtgagccagccaaggacagcgac gtgtacatcaccgacaagacagtgtggatgagaagcatggactcaagtcta acagcgcgtggcctgtccaataagtctgattcgcctgcgccaatgccttaata actccatcatcccaggatacctcttctcctccagagcctctgtgacgtgaag ctgtggagaagtcttcgagaccgatacaaacctgaatttcagaacctgagcgt gatcggctcaggatcctgctgctgaaggtggccggctttaatctgctgataccct gaggctgtggagctcccgggccaagagaggcagcggcgagggaagaggca gcctgtgactcggcgacgtggaggagaacccggccccatgcggcgag actgtgctctgctcggcgcaactgactgtcctgcacggaaacagcgtgctgc agcagacaccggcctacatcaagtcagaccaacaagatggatgctgtcct gcgaggccaagattccctcctcaacatgctgctattggttcggcagagaca ggcgcttctcggactcccaccatgattcttgccctgtgggactccgccaagg gaactattcacggcgaagaagtgaacaggagaagatcgccgttttcgctgatg cctcccgtttatactgaatctgacctcctggaagccgaagatagcgggatctact tttgcattgattgtggctcaccgaaactgacctcgggaagggaactcagctgagc gtgtggactcctcccactaccgccaaccactaagaagtcaacctgaag aagcgggtttgcagactcccacggcggaaacgcagaagggtccgctgtgtcc ccgatcaccctgggctcctgtggctggagctgtgtcctctgtgtccctggcgt cgccattcaactctgctgccggagaaggaggccagactgaggttcatgaagca gcctcaggagaggggatcagtgccacttcgtgccacaatgcctccatggctac tattcaaccaccacctcgaaaagctgctgaaccttgatcctgaaaacc cgggccaagagatctggcagcggccagtgaccaactacgccctgctgaagct ggccggcgacgtggagagcaacccggccccatggcgttcccgtagaccgca ctcctgtgccccttgccctgctgttcacgcccgcacgacctccaattccgggtgt cccctctggatcgcaactggaacctcgggaaacgggtggagctcaagtgcaag tctcctgtgaaccgaccagcggatgcagctggctgtccagccgagaggag </p>
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

		<p>ctgccgctcaccacctcctcctgtacttgagccagaacaagccgaaggccgc tgagggtctggacaccagcgtctcgggcaaacggctgggagacactttgtg ctgactctccgactccggcgaggagaacgaggctactactctctctgctc tccaattcaatcatgtactctcacactctgtccgggttctctgctccaagcca ccactactccggcaccagacctccaactccgctcccaccatcgctccaac cccttctgctgcgcoctgaagcgtgctggcctgctgctggaggagccgtcacc cgggctgactcgcgtgacatctacattgggccccttggctggcacctgtg gagtgctgctcctgtccctgtgatcaccctgactgcaaccaccggaataggcgg agagtgcaagtgccggcctgctggaagtcaggagataagccgagcctgt ccgacgctacgtgtaaccggcgcgctgacgtacgctacgtaatacaactctg gattacaaaatttgaaagattgactggattcttaactatgtgctctttacgctat gtggatacgtgcttaatgcccttgcctgctgctgctcccgatggcttctttct cctctgtataaatcctggtgctgctctttagaggagttggccggtgacggc aacgtggcgtggtgctgactggttctgacgcaacccccactggtgggcatg ccaccacgtcagctccttccgggacttgccttcccctccctattgccacggc ggaactcatcgcgctccttcccctgctgacagggctcggctggtggc actgacaattccgtggttgcggggaagctgacgtccttccatggctgctcct gtgtgccacctggattctgcgaggacgtccttctgctacgtccctcggccctcaa tccagcggaccttcccggcctgctccggctctcggccttccgctct cgcttccctcagacgagtcggatcctccttgggcccctccccgcc</p>
<p>94</p>	<p>PTE CD8 TCR WPRE</p>	<p>tgaagaccccacctgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccatttgcaag gcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaaca gagagacagcagaataggccaacaggataatctgtgtaagcagttcctgcc ccgctcagggccaagaacagatggtcccagatgctgcccgcctcagcag ttctagagaacctcagatgttccagggtgcccacaggacctgaaaatgacct gtgcttattgaaactaaccatcagttcgtctcgtctctgttccgctctgctcc ccgagctcaataaaagagcccacaaccctcactcagcggccgccccgggtcg acgctaccacctgcccagactgtgcttctgctcgcgcaactgactgt cctgcaggaacagcgtgctgacgacacccggcctacatcaaagtcag accaacaagatggtcgtctcctcggaggccaagatttccctccaacatgcg</p>

	<p>gatctattggtgctgagacagggccttctcggactcccaccatgagttct ggccctgtgggactccgccaagggactattcacggcgaagaagtggacagg agaagatgcccgtgttcgcatgctcccgttatactgaatctgacctcgtga agccccgaagatagcgggatctactttgcatgattgtgggtcaccggaactgacc ttcgggaagggcactcagctgagcgtggtgacttctccccactaccgccaac ccactaagaagtcaacctgaagaagcgggttgcagactcccacggccggaa acgcagaagggctcgtgttccccgatcacctggggctcctgtggctggagt gctggtccttctggtgtccctggcgtcgccattcacctctgctccggagaaggag ggccagactgaggtcatgaagcagcctcaggagaggggatcagtgacctt cgtgccacaatgctcctggtactattccaaccaccacctcgcaaaagctg ctgaaccttggatcctgaaaacctggccaagagatctgagcagcggccac caattcagcctgctgaaacagcggcgacgtggaagaaacctggccca tggcgtctccctgaccgactcctgttccccctgcccctgctgttgcaocccgac gacctccaattcgggtgtccccttgatcgacctggaacctcgggaaac ggtggagctcaagtgcaagtcctctgctgaacctgaccagcggatgacgtg gctgtccagccgagaggagctgcccctcaccaccttctcctgactgagcc agaacaagccgaaggccgctgagggtctggacaccagcgttctcgggaa acggctgggagacactttgtgctgactctcggactcggcgggagaacgag ggctacttctgctcgtcctccaattcaatcatgtacttctcacactcgtccg gttctcctgccaagcccactactcggcaccagacctccaactccc ctcccaccatcgctcccaccttctgctgcccctgaagcgtgtcggcctgct gctggaggagccgtgcatacccggtctggactcgcgtgacatctacattg ggcccccttggctggcacctgtggagtgtcctcctgtgatcaccctgact gcaaccaccggaataggcggagagtctcaagtgccggcctgtcgtgaagt caggagataagccgagccttccgcacgtacgtcgggccaagagatctggc agcggcagggcagaggcagcctgtgacctgcccgcagctggaggagaac cccggcccatggactctggacctctgctgctgagcctgtcatcctggtggcc aagcacacagacccggcgtgatccagtccttaggcacgaggtagaccgaga tggccagggagtgacctgctgtaagccaatctcggccacaacagcctgtt tggataggagaccatgatgcggcctggagctgctgactactcaataaca atgtgccatcgacgattccgcatgctgaggatcggttctccaagatgcc</p>
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p>aatgccagcttctccacactgaagatccagcctagcagccaagagactccgcc gtgtatTTTTGgcctctagcccaggcagcaccgatacacagtactcggaccagg aaccaggctgacagtgctggaggacctgaagaactgttccccctgaggtggc cgtgttgagccctctgaggccgagatcagccacaccagaaggccaccctgtg gtgcctggcaaccggcttctatcctgatcacgtggagctgtcctggtgggtaacg gcaaggaggtgcacagcggcgtgtccacagaccacagcccctgaaggagc agccagcctgaatgatagccggtattgcctgtcctcctcgctgagagtgccgcc acctttggcagaacccccggaatcactcagatgtcaggtgcagtttacggcctg tccgagaacgatgagtggaaccaggaccggccaagcctgtgacacagatct gtctgccgaggcatggggaagagcagactgtggtcacctctgagagctacca gcaggcgtgctgagcggccaccatcctgtatgagatcctgtggcaaggccac actgtacgccctcctgtctccgctctgtgtgatgcaatggtcaaaagaaaag atagtcggggacgggccaagagatctggcagcggccagtgcaccaactacgc cctctgaagctggcggcgagctggagagcaacccggccccatgggagaag aatccccctggctccccctctgatcctgtgtttcacctggactgctgtctctat cctgaatgtggaacagagcccacagagcctgcacgtgcaggagggcgactcc accaactcacatgctcttttctagctccaactctacgccctgcactggtacagaa aggagaccgcaaagtcaccagaggccctgtctgtatgacactgaacggcgat gagaagaagaaggccgatcagcggccacctgaatacaagagggtact cctatctgtacatcaagggtcccagcctgaggactctgccacatctgtgccc ctgtacaacaataacgatatgcggtttggcggcaccagactgacagtgaa ccaaacatccagaatccagaccggcgtgtatcagctgcgggacagcaagtct agcgataagagcgtgtcctgtcaccgactttgattctcagacaaactgagcca gtccaaggacagcagctgtacatcaccgacaagacagctgctgatagaa gcatggactcaagtctaacagcggcgtggcctgtccaataagtctgattcgcct gccaatgccccttaataactccatcctcccaggatacctctttcctctccaga gtcctctgtgacgtgaagctggtggagaagtctttcgagaccgatacaaacctga atttcagaacctgagcgtgatcggctcaggatcctgctgctgaagggtggcggct ttaatctgtgatgacctgagctgtggagctcctgaaccggtccgagctgac gtacgctaataacctctggattacaaaatttgaaagattgactggtattcttaa ctatgtgctctttacgctatgtggatacgtccttaatgcctttgtatcatgctattgc</p>
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

		<p>ttccgatggcttcattttctcctctgtataaatcctggtgctgctctttatgagga gttgtggcccgtgtcagcaacgtggcgtggtgactgtgttctgacgcaac ccccactggtgggcatgccaccactgtcagctccttccggacttctgcttcc cctccctattgccacggcgaactatcgccgctgcttgcctgctggaca ggggctcggctgtggcactgacaattcctggtgtgtcggggaagctgacgtc cttccatggctcgcctgtgtgccacctggattctgcgaggacgtcctctgct acgtccctcggccctcaatccagcggacctcctcccgccgctgctgccggt ctgaggcctctccgctctgcctcgcctcagacgagtgatcctcttggg ccgctccccgcc</p>
95	R11KE WPRE	<p>tgaagaccccactgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaag gcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaaca gagagacagcagaatatggccaaacaggatctgtgtaagcagttctgccc ccgctcaggccaagaacagatgtcccagatgctggctccgcccctcagcag tttctagagacacctagatgttccagggtgcccaaggacctgaaaatgacct gtgcttattgaaactaaccaatcagttcgttctcctctgttgcgctctgctcc ccgagctcaataaaagagcccacaaccctcactcagcggccgccccgggtg acgctaccacatggactctggacctctgctgctgagcctgtgcatcctggtg ccaagcacacagacgcccgtgatccagtcccctaggcacgaggtgaccga gatggccaggaggtgacactgctgtaagcfaatctctggccaacaacgcct gtttggataggagacctgatgcgcggcctggagctgctgactactcaataa caatgtcccacgacgattccggcatgctgaggtcggtttctgccaagatgc ccaatgccagcttccacactgaagatccagcctagcagccaagagactccg ccgtgattttgcgctctagcccaggcagcaccgatacacagtaactcggacca ggaaccaggctgacagtctgaggacctgaagaacgttccccctgagggtg gccgtgttgagccctctgaggccgagatcagccacaccagaaggccacctg gtgctcctggcaaccggctctatcctgatcacgtggagctgctggtgggaac ggcaaggaggtgcacagcggcgtgccacagaccacagccctgaaggag cagccagccctgaatgatagccggtattgcctgctcctcggctgagaggtccgc cacctttggcagaacccccgaatcactcagatgtcaggtgagtttacggcct gtccgagaacgatgagtgaccaggaccggccaagcctgtgacacagatc</p>

	<p>gtgtctgccgagcatggggaagagcagactgtggctcacctctgagagctacc agcagggcgtgctgagcgcaccatcctgtatgagatcctgctggcaaggcca cactgtacgacctgctggctccgctgtgctgtaggcaatggtaaaagaaa gatagtcggggacggccaagagatctggcagcggcgccaccaattcagcct gctgaaacagggcggcagctggaagagaacctggccccatggagaagaat ccccggctgccccctgctgatcctgtggttcacctggactgctgtcctatcct gaatgtggaacagagcccacagagcctgcacgtgcaggaggcgactccacc aactcacatgctctttctagctcaactctacgccctgactggtacagaagg agaccgcaaagtcccagaggccctgtctgatgacactgaacggcgtatgag aagaagaaggccgcatcagcgcaccctgaatacaaggagggtactcct atctgtacatcaagggtcccagcctgaggactctgccacatctgtgcccctgt acaacaataacgatatgctggtggcggcaccagactgacagtgaagcca aacatccagaatccagaccgctgtatcagctgaggacagcaagtctagc gataagagcgtgtcctgtaccgacttgattctcagacaaactgagccagtc caaggacagcagctgtacatcaccgacaagacagctgctgatatgagaagc atggactcaagtctaacagcgcctggcctggccaataagtctgattcgcctgc gccaatgccttaataactccatcatccccgaggataccttcttctccagagtc ctctgtgacgtgaagctggtggagaagcttccgagaccgatacaaacctgaatt tcagaacctgagcgtgatcgcttcaggatcctgctgtaagggtggccgttta atctgctgatgacctgaggctgtgagctcctgaaccggcgcagctgaogta cgcgtaatcaacctctggattacaaaattgtgaagattgactgtattctaactat gtgctcctttacgctatgtgatacgtctgcttaatgcttctatcatgctattgctcc cgtatggcttcaatttctcctctgtataaatcctggtgctgctctttatgaggagttg ggcccggtgtcaggaacgtggcgtggtgtgactgtttgctgacgcaaccccc actggtggggcaatgccaccctgtcagctccttccgggacttctgcttccccct cctattgccacggcggaaactcatcgcgcctgctgccccgctgctggacaggg gctcggctgtggcactgacaattcgtggtgtgtcggggaagctgacgtccttc catggctgctgcctgtgtgccacctgattctgcggggacgtcctctgctacgt ccttcggcccctcaatccagcggacttctcccggcctgctgcccgtctgc ggcctctccgctcttcgctcgcctcagacgagctggatctcccttgggcccgc</p>
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

		ctccccgcc
96	CD8 WPRE	<p>tgaagaccccacctgtaggtttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaag gcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaaca gagagacagcagaatatggccaacaggatatctgtgtaagcagttcctgcc ccggtcagggccaagaacagatggtccccagatcggtccccccctcagcag ttctagagaacctcagatgttccagggtgccccaggacctgaaaatgacct gtgccttattgaaactaaccaatcagttcgcttctcgcttctgtcgcgcttctgctcc ccgagctcaataaaagagcccacaacccctcactcagcgccgccccgggtg acgctaccacatgccccgagactgtggcttctgctcgcgcaactgactgt cctgcacggaaacagcgtgctgcagcagacaccggcctacatcaaagtgcag accaacaagatggtcatgctgctcgcgagccaagattccctcccaacatg gatctattggtgctgagagacagggcctcctcggactcccacatgattctt ggcctgtggactccgccaagggaactattcacggcgaagaagtgaacagg agaagatgccgtgttccgcatgctccgcttatactaatctgacctccgga agccccagatagcgggatctctttgcatgattgtggctcaccgaaactgacc ttcgggaagggcactcagctgagcgtggtgacttctccccactaccgccaac ccactaagaagtcaacctgaagaagcgggtttgcagactcccacggccggaa acgcagaagggtccgctgttccccgatcacctggggctcctgtggctggagt gctggtcctctggtgtccctggcgtcgccattcacctctgctccggagaaggag ggccagactgaggtcatgaagcagcctcagggagaggggatcagtggcactt cgtgccacaatgcctcatggtactattccaaccaccacctcgaaaagctg ctgaaccttgatcctgaaaacccggccaagagatctggcagcggcgccac caatttcagcctgctgaaacagggccgacgtggaagagaacctggcccca tggcgttcccgtgaccgactcctgtgcccctggcctgctgttgacgcccac gacctccaattccgggtgtccccttgatcgacactggaacctcgggaaac ggtggagctcaagtgcaagtcctcctgtgaacccgaccagcggatgcagctg gctgtccagccgagagagctgcccctcaccacctcctcctgactgagcc agaacaagccgaaggccgctgagggtctggacaccagcgttctcgggcaa acggctgggagacactttgtgctgactctcgcgactccggcgggagaacgag ggctactactctgctcgcctccaattcaatcatgtacttctcacactcgtgccc</p>

		<p>gtgttctgctgccaagcccaccactactcggcaccagacctccaactccg ctcccaccatcgctccaaccccttctgctgcccctgaagcgtgctggcctgct gctggaggagccgtgcatacccgcggtcggactcgcgtgacatctacattg ggccccttggctggcacctgtgagtgctcctctccttgatcacctgtact gcaaccaccggaataggcggagagtgcaagtgccggcctgctggaagt caggagataagccgagcctgtccgcacgctacgtggaaccggtccgagctg acgtacgcgtaatacaacctcggattacaaaatttgaaagattgactgattct aactatgttgccttttacgctatgaggatacgtcttaagcctttgatcgtatt gctcccgtatggcttcttctcctctgtataaatcctggtgctgctcttatgag gagttggtggcccgtgctcaggcaacgtggcgtggtgctactgtttgctgacgca acccccactggtgggattgccaccacctgcagctccttccgggacttccgct tccccctcctattgccacggcggaaactatcgcgcctgctgcccgtgctgg acaggggctcggctgtggcactgacaattccgtggtgtgctggggaagctga cgtccttccatggctcgcctggtgccaacctgattctgcccgggacgtcctc tgctacgtcctcggcccaatccagcggacctcctcccggcctgctgccc gctctgcccctcctccgctcttgcctcgcctcagacgagtcggatcctccttg ggccgctccccgcc</p>
97	RD114TR	<p>MKLPTGMVILCSLIIVRAGFDDPRKAIALVQKQHKGKPECS GGQVSEAPPNSIQVTCPGKTAAYLMTNQKWKCRVTPKIS PSGELQNCPCNTFQDSMHSSCYTEYRQCRRINKTYTA TLLKIRSGSLNEVQILQNPQLLQSPCRGSINQPVCWSAT APIHISDGGGPLDTRVWTVQKRLEQIHKAMTPELQYHPL ALPKVRDDLSDARTFDILNTFRLLQMSNFSLAQDCWLC LKLGTPTPLAIPSLTYSLADSLANASCQIIPLLVQPMQF SNSSCLSSPFINDTEQIDLGAFTFNCTSVANVSSPLCALN GSVFLCGNNMAYTYLPQNWTRLCVQASLLPDIDINPGDEP VPIPAIDHYIHRPKRAVQFIPLLAGLITAFTTGATGLGVS VTQYTKLSHQLISDVQVLSGTIQDLQDQVDSLAEVVLQNR RGLDLLTAEQGGICLALQECCFYANKSGIVRNKIRTLQEE LQKRRESLASNPLWTGLQGFLPYLLPLLPPLLLLLITIGP</p>
		<p>CVFNRLVQFVKDRISVVQALVLTQQYHQLKPL</p>
265	WPREmut1	<p>cagctcagctacgcgtaatacaacctcggattacaaaatttgaaagattgactg gtattctaaactatggtccttttacgctatgaggatacgtccttaagcctttgatc atgctattgctcccgtatggcttcttctcctcctgtataaatcctggtgctgctc ttatgaggagttggtcccgtgctcaggcaacgtggcgtggtgctactgtttgct gacgcaacccccactggtgggattgccaccacctgcagctccttccggga cttccgcttccccctcctattgccacggcggaaactatcgcgcctgctgccc ctgctggacagggctcggctgtggcactgacaattccgtggtgtgctgggga aatcatcgtccttctggtcctgctgctggtgccaacctgattctgcccggagc tcctctgctacgtccttccgcccataatccagcggacctcctcccggcctgc tgcggctcctgccccttccgctcttgcctcgcctcagacgagtcggatctc ccttgggcccctccccgcc</p>
266	WPREmut2	<p>gagcatctaccgccattataccataattgtctgttttctgattgggtatacattta aatgtaataaaacaaaatggtgggcaatcattacattttgggatgtaattac tagttcaggtgattgccacaagacaaactgtaagaaacttcccgtatttacgct ctgttctgtaatacaacctcggattacaaaatttgaaagattgactgataattcta actttgtgctcctttacgctgtggtgattgctcttattgcctctgatactgctattgct cccgtacggcttctgttctcctcctgtataaatcctggtgctgctcttttggagg tggggcccgttccgcaacgtggcgtggtgctctggttctgctgacgcaacccc cactggctgggattgccaccacctgcaactccttctgggacttctgcttcccc tccgatcggccacggcagaactatcgcgcctgctgcccgtgctgctgacag ggctagggtgctggcactgataatccgtggtgctgct</p>

Таблица 3. Последовательность пептидаТАА

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
100	GLLKKINSV	153	GLLGKVTSTV	206	ALLEQTGDMSL
101	FLVDGSSAL	154	KMISAIPTL	207	VIKGLEEITV
102	FLFDGSANLV	155	GLLETTGLLAT	208	KQFEGTVEI
103	FLYKIIDEL	156	TLNTLDINL	209	KLQEEIPVL
104	FILDSAETTTL	157	VIKGLEEI	210	GLAEFQENV
105	SVDVSPPKV	158	YLEDGFAYV	211	NVAEIVIH
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	KWWSDVTPPL	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
123	KIQEILTQV	176	ILAEPIYIRV	229	FLLDKPQDLSI
124	VIFEGEPMYL	177	FLLEREQLL	230	YLLDMPLWYL
125	SLFESLEYL	178	LLLPLELSLA	231	GLLDCPIFL
126	SLLNQPKAV	179	SLAETIFIV	232	VLEIYNFSI
127	GLAEFQENV	180	AILNVDEKNQV	233	TLYNPERTITV
128	KLLAVIHEL	181	RLFEEVLGV	234	AVPPPPSSV
129	TLHDQVHLL	182	YLDEVAFML	235	KLQEELNKV
130	TLYNPERTITV	183	KLIDEDPLFL	236	KLMDPGSLPPL
131	KLQEKIQEL	184	KLFEKSTGL	237	ALIVSLPYL
132	SVLEKEIYSI	185	SLLEVNEASSV	238	FLLDGSANV
133	RVIDDSL VGV	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	ALSSQAEV	191	ALYVQAPTV	244	MLAEKLLQA
139	SLITGQDLSV	192	KLIYKDLVSV	245	YMLDIFHEV
140	QLIEKNWLL	193	ILQDGQFLV	246	ALWLPTDSATV
141	LLDPKTIFL	194	SLLDYEYSI	247	GLASRILDA
142	RLHDENILL	195	LLGDSSFFL	248	ALSVLRLAL
143	YTFSGDVQL	196	VIFEGEPMYL	249	SYVKVLHHL
144	GLPSATTTV	197	ALSILPYL	250	VYLPKIPSW
145	GLLPSAESIKL	198	FLFVDPELV	251	NYEDHFPLL
146	KTASINQNV	199	SEWGSPPHAAVP	252	VYIAELEKI
147	SLLQHLIGL	200	ALSELERVL	253	VHFEDTGKTLFF
148	YLMDDFSSL	201	SLFESLEYL	254	VLSPFILTL
149	LMYPYIYHV	202	KVLEYVIKV	255	HLLEGSVGV
150	KVWSDVTPL	203	VLLNEILEQV		

Пример 2. Производство $\gamma\delta$ Т-клеток

В целях выделения $\gamma\delta$ Т-клеток в одном аспекте $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть выделены у субъекта или из комплексной пробы субъекта. В одном аспекте комплексная проба может быть пробой периферической крови, пробы пуповинной крови, опухолью, предшественником стволовой клетки, биоптатом опухоли, тканью, лимфой или из участков эпителия субъекта, напрямую контактирующего с внешним окружением, или может быть получена из стволовых клеток-предшественников, $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть непосредственно выделены из комплексной пробы субъекта, например, с помощью сортировки $\gamma\delta$ Т-клеток, которые экспрессируют один или несколько маркеров клеточной поверхности, при использовании технологии проточной цитометрии. $\gamma\delta$ Т-клетки дикого типа могут экспонировать многочисленные антигенраспознающие, антигенпрезентирующие, костимуляторные молекулы и молекулы адгезии, которые могут быть ассоциированы с $\gamma\delta$ Т-клетками. Один или несколько маркеров клеточной поверхности, таких как специфические $\gamma\delta$ ТКР, антигенраспознающие, антигенпрезентирующие молекулы, лиганды, молекулы адгезии или костимуляторные молекулы могут быть использованы для выделения $\gamma\delta$ Т-клеток дикого типа из комплексной пробы. Различные молекулы, ассоциированные с или экспрессирующиеся $\gamma\delta$ Т-клетками, могут быть использованы для выделения $\gamma\delta$ Т-клеток из комплексной пробы, например, выделение смешанной популяции V δ 1+, V δ 2+, V δ 3+ клеток или любой их комбинации.

Например, мононуклеарные клетки периферической крови могут быть собраны у субъекта, к примеру, с помощью аппарата для афереза, включая систему Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare), или другого подходящего устройства/системы, $\gamma\delta$ Т-клетка(-и), или желаемая субпопуляция $\gamma\delta$ Т-клетки(-ок),

может (могут) быть очищены из собранного образца, например, с помощью методов проточной цитометрии. Клетки пуповинной крови могут быть также получены из пуповинной крови во время родов субъекта.

Положительный и/или отрицательный отбор на основе маркеров клеточной поверхности, экспрессируемых собранными $\gamma\delta$ Т-клетками, может быть использован для непосредственного выделения $\gamma\delta$ Т-клеток или популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, экспрессирующих похожие маркеры клеточной поверхности из пробы периферической крови, пробы пуповинной крови, из опухоли, биоптата опухоли, ткани, лимфы или из пробы эпителия субъекта. К примеру, $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть выделены из комплексной пробы на основе положительной или отрицательной экспрессии CD2, CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD44, Kit, α -ТКР, β -ТКР, α -ТКР, δ -ТКР, NKG2D, CD70, CD27, CD30, CD16, CD337 (NKp30), CD336 (NKp46), OX40, CD46, CCR7 и других подходящих маркеров клеточной поверхности.

На фиг. 1 показано производство $\gamma\delta$ -Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Данный процесс может включать сбор или получение лейкоцитов или МКПК из продуктов лейкофереза. Лейкоферез может включать сбор цельной крови донора и разделение компонентов с помощью аппарата для афереза. Аппарат для афереза выделяет желаемые компоненты крови и возвращает остальные в систему кровообращения донора. Например, лейкоциты, плазма и тромбоциты могут быть собраны с помощью оборудования для афереза, а эритроциты и нейтрофилы - возвращены в систему кровообращения донора. В этом процессе могут быть использованы имеющиеся в продаже продукты лейкофереза. Другой способ получения лейкоцитов - это их выделение из лейкоцитарной пленки. В целях выделения из лейкоцитарной пленки у донора собирают и центрифугируют антикоагулированную цельную кровь. После центрифугирования кровь разделяют на плазму, эритроциты и лейкоцитарную пленку. Лейкоцитарная пленка - это слой, находящийся между слоями плазмы и эритроцитов. В результате сбора методом лейкофереза может быть получена высокая чистота и существенно более высокое содержание моноклеарных клеток, чем при сборе лейкоцитарной пленки. Содержание моноклеарных клеток, возможное при лейкоферезе, может быть, как правило, в 20 раз выше, чем получаемое из лейкоцитарной пленки. В целях обогащения моноклеарных клеток для дальнейшего разделения может быть необходимо использование градиента Ficoll.

Чтобы произвести истощение $\alpha\beta$ Т-клеток из МКПК, $\alpha\beta$ ТКР-экспрессирующие клетки могут быть выделены из МКПК с помощью магнитной сепарации, например, при использовании магнитных частиц CliniMACS®, покрытых антителами к $\alpha\beta$ ТКР, с последующей криоконсервацией МКПК, истощенных по несущим $\alpha\beta$ ТКР Т-клеткам. Для производства "готовых к применению" Т-клеточных продуктов криоконсервированные МКПК, истощенные по несущим $\alpha\beta$ ТКР Т-клеткам, могут быть разморожены и активированы в малом/среднем масштабе, например, в от 24 до 4-6-луночных планшетах или флаконах T75/T175, или в крупном масштабе, например, в 50 мл-100-литровых мешках, в присутствии аминокислот, например, золедроната, и/или изопентилпирофосфата (ИПФ) и/или цитокинов, например, интерлейкина 2 (ИЛ-2), интерлейкина 15 (ИЛ-15), и/или интерлейкина 18 (ИЛ-18), и/или других активаторов, например, лиганда Toll-подобного рецептора 2 (TLR2), в течение 1-10 дней, например, 2-7 дней.

На фиг. 1 показано, что активированные Т-клетки могут быть сконструированы путем трансдукции вирусным вектором, таким как лентивирусный вектор, экспрессирующим интересующие экзогенные гены, такие как $\alpha\beta$ ТКР к специфическому раковому антигену и CD8, в выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки. Трансдукция может осуществляться однократно или несколько раз для получения стабильной экспрессии трансгена в малом масштабе, например, в планшетах с количеством лунок от 24 до 4-6, или в среднем/крупном масштабе в течение $1/2$ -5 дней, например, 1 дня.

На фиг. 1 показано далее, что экспансия трансдуцированных или сконструированных $\gamma\delta$ Т-клеток может быть осуществлена в присутствии цитокинов, например, ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-18 и других, в малом/среднем масштабе, например, флаконах/колбах G-Rex, или в крупном масштабе, например, в 50-мл-100-литровых мешках, в течение 7-35 дней, например, 7-28 дней. Экспансированные трансдуцированные Т-клеточные продукты могут затем быть подвергнуты криоконсервации в качестве "готовых к применению" Т-клеточных продуктов для введения пациентам методом инфузии.

Пример 3. Лентивирусные векторы

Лентивирусные векторы, используемые в настоящем документе, содержат несколько элементов, которые, как было показано ранее, усиливают функциональность вектора, включая центральный полипуриновый тракт (сPPT) для улучшения репликации и импорта в ядро, промотор из вируса стволовых клеток мыши (MSCV) (SEQ ID NO: 1), который, как было показано, в некоторых видах клеток снижает подавление экспрессии вектора, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE) (SEQ ID NO: 9) для улучшения терминации транскрипции, а каркасом служил самоинактивирующийся вектор (SIN) с делецией в 3'-LTR, который, возможно, обладает повышенной безопасностью, устойчивой экспрессией генов и свойствами, препятствующими сайленсингу (Yang и соавт. Gene Therapy (2008) 15, 1411-1423, содержание которой в полном объеме включено путем ссылки).

В одном аспекте векторы, конструкции или последовательности, описанные в настоящем документе, включают мутантные формы WPRE. В другом аспекте последовательности или векторы, описанные в

настоящем документе, включают мутации в WPRE версии 1, например, WPREmut1 (SEQ ID NO: 265), или WPRE версии 2, например, WPREmut2 (SEQ ID NO: 266). В одном аспекте WPRE с мутацией включают не более одной мутации, не более двух мутаций, не более трех мутаций, не более четырех мутаций или не более пяти мутаций. В одном аспекте векторы конструкции или последовательности, описанные в настоящем документе, не включают WPRE. В другом аспекте раскрытия сущности изобретения предложен(ы) один, два, три, четыре, пять, десять или 20 замен в одной из последовательностей с SEQ ID NO: 91-96.

В другом аспекте векторы, конструкции или последовательности, описанные в настоящем документе, не включают промотор белка X.

Для получения оптимальных уровней совместной экспрессии TCR $\alpha\beta$ и CD8 $\alpha\beta$ в трансдуцированных $\gamma\delta$ Т-клетках были созданы лентивирусные векторы различного дизайна. На фиг. 2 показано, что Т-клетки могут быть трансдуцированы двумя отдельными лентивирусными векторами (2-в-1), экспрессирующими TCR $\alpha\beta$ или CD8 $\alpha\beta$, и одним лентивирусным вектором (4-в-1), совместно экспрессирующим TCR $\alpha\beta$ и CD8 $\alpha\beta$. В векторе 4-в-1 нуклеотиды, кодирующие цепь TCR α , цепь TCR β , цепь CD8 α и цепь CD8 β , могут быть перетасованы в любом порядке. Полученные таким образом различные векторы 4-в-1 могут быть использованы для трансдукции $\gamma\delta$ Т-клеток с последующим измерением уровней совместной экспрессии ТКР/CD8 трансдуцированными клетками с помощью методов, известных из уровня техники, например, проточной цитометрии.

Для получения лентивирусных векторов, экспрессирующих совместно TCR $\alpha\beta$ и CD8 $\alpha\beta$, нуклеотид, кодирующий фурин-линкер (GSG или SGSG (SEQ ID NO: 8))-2A пептид, может быть расположен между цепью TCR α и цепью TCR β , между цепью CD8 α и цепью CD8 β , и между цепью ТКР и цепью CD8, чтобы обеспечить возможность высоко эффективной экспрессии гена. 2A пептид может быть выбран из P2A (SEQ ID NO: 3), T2A (SEQ ID NO: 4), E2A (SEQ ID NO: 5), или F2A (SEQ ID NO: 6).

Лентивирусные вирусные векторы могут содержать пост-транскрипционный регуляторный элемент (PRE), такой как Woodchuck PRE (WPRE) (SEQ ID NO: 9), для усиления экспрессии трансгена за счет увеличения уровня как ядерной, так и цитоплазматической мРНК. Также могут быть использованы один или несколько регуляторных элементов, в том числе мотив RTE (RNA transport element), конститутивный транспортный элемент (CTE) ретровируса обезьян типа 1 (SRV-1) и 5' нетранслируемый участок белка теплового шока человека 70 (Hsp70 5'UTR), и/или в комбинации с WPRE для усиления экспрессии трансгена.

Лентивирусные векторы могут быть псевдотипированы RD114TR (SEQ ID NO: 97), который является химерным гликопротеином, содержащим внеклеточный и трансмембранный домен эндогенного вируса кошек (RD114), слитые с цитоплазматическим хвостом (TR) оболочки вируса лейкоза мышей. Также могут использоваться другие вирусные оболочечные белки, такие как VSV-G env, MLV 4070A env, RD114 env, химерный оболочечный белок RD114pro, бакуловирусный GP64 env или GALV env или их производные.

На фиг. 3 показаны четыре различных вектора 4-в-1, т.е., PTE WPRE (SEQ ID NO: 91), TPE WPRE (SEQ ID NO: 92), PTE fn WPRE (SEQ ID NO: 93) и PTE CD8 TCR WPRE (SEQ ID NO: 94), совместно экспрессирующие TCR $\alpha\beta$ (R11KEA) и CD8 $\alpha\beta$, и два вектора 2-в-1, т.е., R11KE WPRE (SEQ ID NO: 95), экспрессирующий TCR $\alpha\beta$ (R11KEA), и CD8 WPRE (SEQ ID NO: 96), экспрессирующий CD8 $\alpha\beta$. TCR $\alpha\beta$ (R11KEA) связывается с PRAME-004 (SLLQHLIGL) (SEQ ID NO: 147) в комплексе с молекулой МНС.

Пример 4. Совместная экспрессия ТКР и CD8

$\gamma\delta$ Т-клетки, полученные у Донора 1 и Донора 2, подвергли обработке с помощью процесса, показанного на фиг. 1. На День 3 или День 6 после активации с использованием золедроната, ИЛ-2 и ИЛ-15 $\gamma\delta$ Т-клетки трансдуцировали лентивирусом, псевдотипированным RD114TR, например, PTE WPRE (SEQ ID NO: 91), TPE WPRE (SEQ ID NO: 92), PTE fn WPRE (SEQ ID NO: 93) и PTE CD8 TCR WPRE (SEQ ID NO: 94), за чем следовали измерения уровней совместной экспрессии R11KEA и CD8 с помощью проточной цитометрии. Эффективность трансдукции оценивали с помощью антител, специфичных к ТКР (V β 8) и CD8 (CD8 α) с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 4 показано, что в $\gamma\delta$ Т-клетках Донора 1 уровни совместной экспрессии R11KEA и CD8, полученные в результате трансдукции с помощью PTE CD8 TCR WPRE, т.е., 40,5% (День 3) и 18,5% (День 6), выше, чем уровни в результате трансдукции с помощью PTE WPRE (29,6% (День 3), 16,2% (День 6)), TPE WPRE (30,8% (День 3), 11,0% (День 6)) и PTE fn WPRE (33,0% (День 3), 15,0% (День 6)). В $\gamma\delta$ Т-клетках Донора 2 уровни совместной экспрессии R11KEA и CD8 на День 6 после активации в результате трансдукции с помощью PTE WPRE, а именно 18,8%, выше, чем в результате трансдукции с помощью TPE WPRE (14,2%), PTE fn WPRE (14,7%) и PTE CD8 TCR WPRE (17,2%). В качестве контролей были обнаружены фоновые уровни R11KEA и CD8 в $\gamma\delta$ Т-клетках, трансдуцированных векторами 2-в-1 в отдельности, т.е., TCR $\alpha\beta$ (R11KEA) или CD8WPRE.

Пример 5. Влияние на трансгенную экспрессию и функциональность вирусных векторов 4-в-1, например, лентивирусных векторов, содержащих последовательности, кодирующие цепи CD8 $\alpha\beta$, и после-

довательности, кодирующие цепи TCR $\alpha\beta$, расположенные в векторах в различных положениях.

В патентной заявке WO 2019/204662 описываются CD4+ клетки, которые экспрессируют экзогенный корецептор CD8 $\alpha\beta$ и один или несколько сконструированных экзогенных антигенных рецепторов, например ТКР. В табл. 4 показано сравнение конструкций 4-в-1, описанных в патентной заявке WO 2019/204662, и конструкций в соответствии с аспектами настоящего изобретения.

Таблица 4

	WO 2019/204662	Аспекты, описываемые в настоящем документе
Ориентация трансгена (по направлению от 5' к 3'-концу)	TCR β -TCR α -CD8 α -CD8 β	CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α
Источники последовательностей CD8 $\alpha\beta$	GenBank	с оптимизацией кодона (для улучшения экспрессии)
2A линкеры	2A	Линкер 2A + фурин (для обеспечения эффективного расщепления остаточных последовательностей 2A интересующего гена)
Вид клеток	CD4+ клетки и CD8+ клетки	CD4 $\gamma\delta$ Т-клетки (с низким уровнем экспрессии CD8 (0-20%) и отсутствием экспрессии CD4)
Вирус и псевдотип	ретровирус и RD114	лентивирус и RD114TR и VSV-G

Открытая рамка считывания (ORF) молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению может быть, по меньшей мере, частично кодон-оптимизирована. Оптимизация кодона основана на том факте, что эффективность трансляции может определяться различной частотой встречаемости трансферной РНК (тРНК) в клетках. Таким образом, открытые рамки считывания молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут быть модифицированы по сравнению с соответствующей кодирующей областью дикого типа, так что по меньшей мере один кодон последовательности дикого типа, кодирующей тРНК, которая встречается в клетке относительно редко, может быть заменен на кодон, который кодирует тРНК, которая встречается в клетке сравнительно часто и может нести ту же самую аминокислоту, что и относительно редкая тРНК. При такой модификации открытая рамка считывания молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению может быть модифицирована так, что кодоны, для которых доступны часто встречающиеся тРНК, могут заменить кодоны, которые соответствуют редким тРНК. Другими словами, в соответствии с настоящим изобретением при такой модификации все кодоны открытой рамки считывания дикого типа, которые кодируют редкую тРНК, могут быть заменены на кодон, который кодирует тРНК, которая встречается в клетке более часто и которая несет ту же самую аминокислоту, что и редкая тРНК. Какие из тРНК встречаются в клетке относительно часто и какие, напротив, встречаются относительно редко, известно специалисту данной области; например, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666, содержание которой в полном объеме включено путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления открытые рамки считывания молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут быть кодон-оптимизированными, предпочтительно, в отношении системы, в которой должны экспрессироваться молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, предпочтительно, в отношении системы, в которой должны транслироваться молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Предпочтительно если использование кодона открытых рамок считывания молекул нуклеиновых кислот по настоящему изобретению может быть кодон-оптимизировано в соответствии с использованием кодонов млекопитающих, наиболее предпочтительно, в соответствии с использованием кодонов человека. Предпочтительно если открытая рамка считывания может быть кодон-оптимизирована, а содержание нуклеотидов G/C -модифицированным.

Для определения того, какая ориентация трансгена обеспечивает лучшую экспрессию и функциональные свойства трансгена, три вирусных вектора 4-в-1, каждый из которых содержал последовательности, кодирующие цепи TCR $\alpha\beta$, расположенные выше последовательностей, кодирующих цепи CD8 $\alpha\beta$, например, PTE.WPRE (SEQ ID NO: 91), TPE.WPRE (SEQ ID NO: 92) и PTE.fn.WPRE (SEQ ID NO: 93), и вирусный вектор 4-в-1, содержащий последовательности, кодирующие цепи CD8 $\alpha\beta$, расположенные

выше последовательностей, кодирующих цепи TCR $\alpha\beta$, например, PTE.CD8.TCR.WPRE (SEQ ID NO: 94), были трансдуцированы в $\gamma\delta$ Т-клетки, после чего проводили анализ методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) при использовании антител к CD8 с флуоресцентной меткой и антител к V β 8-варианту ТКР (V β 8) с флуоресцентной меткой в целях выявления экспрессии CD8 и ТКР, соответственно, на поверхности клеток.

На фиг. 10 и 11 показано, что $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные у Донора 3 и Донора 4, трансдуцированные вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, приводит к наиболее высокой экспрессии как CD8, так и ТКР, на поверхности клетки в День 14 производственного процесса по сравнению с теми клетками, которые были трансдуцированы вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.WPRE, TPE.WPRE или PTE.fn.WPRE, на основании процентного содержания дважды положительных CD8+V β 8+ клеток (фиг. 10) и показателя MFI для клеток, экспрессирующих CD8, или показателя MFI для клеток, экспрессирующих V β 8 (фиг. 11).

Высокая экспрессия как CD8, так и ТКР на поверхности $\gamma\delta$ Т-клеток, трансдуцированных вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, хорошо коррелирует с их активностью по уничтожению *in vitro*. Например, на фиг. 12 показано, что $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные у Донора 3, трансдуцированные вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, демонстрируют наилучшую активность по уничтожению как по отношению к линии клеток UACC257, в высокой степени презентующих пептид-мишень (верхняя секция), так и к линии клеток U2OS, в низкой степени презентующих пептид-мишень (нижняя секция), по сравнению с теми клетками, которые были трансдуцированы вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.WPRE, TPE.WPRE или PTE.fn.WPRE. На фиг. 13A-13C показано количество секретируемого IFN- γ соответствующими $\gamma\delta$ Т-клетками, трансдуцированными вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, TPE.WPRE или PTE.fn.WPRE, в присутствии клеток-мишеней, например, UACC257 (фиг. 13A), U2OS (фиг. 13B), и мишень-отрицательной линии клеток MCF-7 (фиг. 13C).

На фиг. 14 показано, что $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные у Донора 4, трансдуцированные вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, также демонстрируют наилучшую активность по уничтожению как по отношению к UACC257 (верхняя секция), так и к U2OS (нижняя секция), по сравнению с теми клетками, которые были трансдуцированы вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.WPRE, TPE.WPRE или PTE.fn.WPRE. На фиг. 15A-15C показано количество секретируемого IFN- γ соответствующими $\gamma\delta$ Т-клетками, трансдуцированными вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, TPE.WPRE или PTE.fn.WPRE, в присутствии клеток-мишеней, например, UACC257 (фиг. 15A), U2OS (фиг. 15B), и MCF-7 (фиг. 15C). На фиг. 16 показано, что $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные у Донора 3 и Донора 4, трансдуцированные вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, приводят к менее чем 0,6 копий интегрированного вектора на клетку, аналогично клеткам, трансдуцированным PTE.WPRE, TPE.WPRE и PTE.fn.WPRE. Низкое число копий интегрированного вектора на клетку находится в пределах требований по безопасности, т.е., менее 5 копий интегрированного вектора на клетку.

На фиг. 17A и 17B показано, что $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные у Донора 3 и Донора 4 соответственно, трансдуцированные вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, приводят к уровням клеточной экспрессии в День 14 производственного процесса, сравнимым с клетками, трансформированными вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.WPRE, TPE.WPRE или PTE.fn.WPRE.

Чтобы определить фенотип клеток памяти в трансдуцированных $\gamma\delta$ Т-клетках, клетки окрашивали антителами к CD45RA, мечеными аллофикоцианином (APC)-Cy7, и антителами к CCR7, мечеными BV421, за чем следовал анализ методом FACS в целях определения процентного содержания T_{sm}, наивных Т-клеток, T_{em}RA и T_{eff}, присутствующих в трансдуцированных $\gamma\delta$ Т-клетках. На фиг. 18A показан пример такого анализа.

На фиг. 18B показано, что $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные у Донора 3, трансдуцированные вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE, приводят к уровням Т-клеток с фенотипом памяти в День 14 производственного процесса, сравнимым с клетками, трансдуцированными вирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.WPRE, TPE.WPRE или PTE.fn.WPRE.

Пример 6. Влияние трансгенной экспрессии в клетках, трансдуцированных одним вирусным вектором 4-в-1 в сравнении с клетками, трансформированными двумя вирусными векторами 2-в-1

На фиг. 19 показано, что в результате трансдукции лентивирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE (120 мкл), было получено больше CD8+ТКР+ $\gamma\delta$ Т-клеток (секция В, 20,9%), чем в случае трансдукции смесью лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего CD8.WPRE (120 мкл) и лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего R11KE.WPRE (120 мкл) (секция D, 15,5%). С другой стороны, в результате трансдукции смесью лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего CD8.WPRE (120 мкл) и лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего R11KE.WPRE (120 мкл) (секция D, 28,3%), было получено больше CD8+ТКР- $\gamma\delta$ Т-клеток, чем в случае трансдукции лентивирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE (секция В, 21,2%). В равной степени, в результате трансдукции лентивирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE (240 мкл) (секция С, 27,7%), было получено больше

CD8+TKP+ $\gamma\delta$ Т-клеток, чем в случае трансдукции смесью лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего CD8.WPRE (240 мкл) и лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего R11KE.WPRE (240 мкл) (секция Е, 21,1%). С другой стороны, в результате трансдукции смесью лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего CD8.WPRE (240 мкл) (секция Е, 40,2%) и лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего R11KE.WPRE (240 мкл) было получено больше CD8+TKP- $\gamma\delta$ Т-клеток, чем в случае трансдукции лентивирусным вектором 4-в-1, содержащим PTE.CD8.TCR.WPRE (секция С, 24,4%). Нетрансдуцированные (NT) $\gamma\delta$ Т-клетки использовали в качестве контролей (секция А). Окрашивание 2 красителями производили при использовании антител к CD8 β , меченых АПК, и тетрамерного комплекса пептид-мишень/МНС, меченого фикоэритрином (PE). Эти результаты позволяют предположить, что трансдукция лентивирусным вектором 4-в-1, содержащим последовательности, кодирующие CD8 $\alpha\beta$ и TCR $\alpha\beta$, например, PTE.CD8.TCR.WPRE, может привести к более высокому числу CD8+TKP+ Т-клеток, чем в случае клеток, трансдуцированных смесью из лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего последовательности, кодирующие CD8 $\alpha\beta$, например, CD8.WPRE, и лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего последовательности, кодирующие TCR $\alpha\beta$, например, R11KE.WPRE. С другой стороны, трансдукция смесью из лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего последовательности, кодирующие CD8 $\alpha\beta$, например, CD8.WPRE, и лентивирусного вектора 2-в-1, содержащего последовательности, кодирующие TCR $\alpha\beta$, например, R11KE.WPRE, может привести к более высокому числу CD8+TKP- Т-клеток, чем в случае клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором 4-в-1, содержащим последовательности, кодирующие CD8 $\alpha\beta$ и TCR $\alpha\beta$, например, PTE.CD8.TCR.WPRE.

На фиг. 20 показано, что увеличивающееся количество вирусного вектора 4-в-1 для трансдукции, содержащего PTE.CD8.TCR.WPRE, например, 30, 120 и 240 мкл, усиливает эффективность трансдукции, например, повышается процентное содержание CD8+TKP+ $\gamma\delta$ Т-клеток, например, 9,6% при 30 мкл, 20,9% при 120 мкл и 27,7% при 240 мкл. Нетрансдуцированные $\gamma\delta$ Т-клетки использовали в качестве контроля. Окрашивание 2 красителями производили при использовании антител к CD8 β , меченых АПК, и тетрамерного комплекса пептид-мишень/МНС, меченого PE.

Пример 7. Экспрессия конструкций 4-в-1 в $\alpha\beta$ Т-клетках

Сконструированные лимфоциты, в том числе сконструированные $\alpha\beta$ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантные белки, например, CD8 $\alpha\beta$ и/или TCR $\alpha\beta$, могут быть получены согласно способам, раскрытых в патентной заявке США 2019/0247433, содержание которой во всей своей полноте включено в настоящий документ путем ссылки. Например, на фиг. 37 представлен процесс производства Т-клеток 370, который может включать выделение МКПК (371), в котором МКПК могут быть использованы свежеполученными или храниться в замороженном виде до использования, или могут быть продуктами лейкофереза, например, Leukopak, или могут быть использованы в качестве исходного материала для производства Т-клеток и отбора популяций лейкоцитов (например, $\alpha\beta$ ТКР+ Т-клетки, CD8+, CD4+ или обеих); размораживание и выдерживание в стадии покоя в течение ночи, например, примерно 16 ч или примерно 4-6 ч (372), что может способствовать гибели, одна за другой, апоптотических клеток и восстановлению функций Т-клеток (необходимость в этой стадии может отпасть, если используются свежие материалы); активацию лимфоцитов (373), для которой могут использоваться антитела к CD3 и к CD28 (растворимые или связанные с поверхностью, например, магнитных или биотрансдуцируемых микрогранул, антител, иммобилизованных на поверхности культуральных сосудов); трансдукцию при помощи вирусных векторов, содержащих последовательности, кодирующие рекомбинантные белки, например, полипептиды CD8 $\alpha\beta$ и/или TCR $\alpha\beta$ (374), для которой в качестве вирусных векторов могут использоваться лентивирусные или ретровирусные векторы, или трансфекция может производиться с помощью методов без вирусов; и экспансию, сбор и криоконсервацию лимфоцитов (375), которая может совершаться в присутствии цитокина(ов), например, ИЛ-7 и ИЛ-15, сыворотки ABS или FBS) и/или среды для криоконсервации.

Экзогенная экспрессия CD8

Для определения экзогенной экспрессии CD8 в $\alpha\beta$ Т-клетках, трансдуцированных вирусными векторами, содержащими конструкции 4-в-1 с последовательностями, кодирующими CD8 и ТКР, Т-клетки, полученные у Донора 5 и Донора 6, трансдуцировали с повышением количества LV-PTE.CD8.TCR.WPRE, за чем следовал FACS-анализ с гейтами для популяций лимфоцитов <одиночных клеток <живых клеток <CD3+ в целях определения процентного содержания CD8 α + клеток среди CD4+ клеток. На фиг. 21 показано, что процентное содержание CD8 α +CD4+ клеток от Донора 5 возрастает, начиная от 2,87% (нетрансдуцированные) до 14,7% (2,5 мкл/1×10⁶ клеток), 19,5% (5 мкл/1×10⁶ клеток), 21,7% (7,5 мкл/1×10⁶ клеток) и 24,1% (10 мкл/1×10⁶ клеток); и процентное содержание CD8 α +CD4+ клеток от Донора 6 возрастает, начиная от 1,93% (нетрансдуцированные) до 12,5% (2,5 мкл/1×10⁶ клеток), 17,2% (5 мкл/1×10⁶ клеток), 19,6% (7,5 мкл/1×10⁶ клеток) и 20,8% (10 мкл/1×10⁶ клеток).

Экзогенная экспрессия ТКР

Для определения экзогенной экспрессии ТКР в $\alpha\beta$ Т-клетках, трансдуцированных вирусными векторами, содержащими конструкции 4-в-1 с последовательностями, кодирующими CD8 и ТКР, Т-клетки,

полученные у Донора 5 и Донора 6, трансдуцировали с повышением количества LV-PTE.CD8.TCR.WPRE, за чем следовал FACS-анализ с гейтами для популяций лимфоцитов<одиночных клеток<живых клеток<CD3+<CD4+CD8+ в целях определения процентного содержания меченых Dextramer203 клеток комплекса пептида-мишени/МНС ((т.е., ТКР+)), среди популяции CD4+CD8+ клеток. На фиг. 22 показано, что процентное содержание меченых Dextramer203 клеток от Донора 5 возрастает, начиная от 0,32% (нетрансдуцированные) до 41,9% (2,5 мкл/1×10⁶ клеток), 48,3% (5 мкл/1×10⁶ клеток), 54,5% (7,5 мкл/1×10⁶ клеток) и 49,5% (10 мкл/1×10⁶ клеток); и процентное содержание меченых Dextramer203 клеток от Донора 6 возрастает, начиная от 0,19% (нетрансдуцированные) до 35,5% (2,5 мкл/1×10⁶ клеток), 41,2% (5 мкл/1×10⁶ клеток), 44,6% (7,5 мкл/1×10⁶ клеток) и 44,0% (10 мкл/1×10⁶ клеток).

Для выявления экспрессии ТКР в различных популяциях αβ Т-клеток, αβ Т-клетки, трансдуцированные LV-PTE.CD8.TCR.WPRE, анализировали с помощью FACS с гейтами на популяции лимфоцитов<одиночные клетки<живые клетки<CD3+<CD4+/-CD8+/- . На фиг. 23 показано, что процентное содержание меченых Dextramer203 (Dex203) (т.е., ТКР+) клеток, полученных у Донора 5 (верхняя секция) и Донора 6 (нижняя секция), обычно выше в популяции CD4+CD8α+ клеток, чем в популяции CD4-CD8α+ клеток. Напротив, процентное содержание меченых Dex203+ (т.е., ТКР+) клеток минимально в популяции CD4+CD8α- клеток. В равной степени, на фиг. 24 показано, что процентная доля меченых Dextramer203 (Dex203) клеток, полученных у Донора 5 (верхняя секция) и Донора 6 (нижняя секция), по показателю MFI обычно выше в популяции CD4+CD8α+ клеток, чем в популяции CD4-CD8α+ клеток. Напротив, процентная доля меченых Dex203 клеток, по показателю MFI, минимальна в популяции CD4+CD8α- клеток. Данные результаты позволяют предположить, что экзогенные ТКР и CD8, кодируемые LV-PTE.CD8.TCR.WPRE, могут совместно экспрессироваться как в CD4+ Т-клетках, так и CD4- Т-клетках.

Пример 8. Функциональный анализ αβ Т-клеток, экспрессирующих конструкцию 4-в-1 или конструкцию только с ТКР

На фиг. 25 представлено планирование эксперимента для испытания функциональности αβ Т-клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором (LV), содержащим конструкцию 4-в-1, например, PTE.CD8.TCR.WPRE (LV-CD8.TCR), или конструкцию только с ТКР, например, R11KE.WPRE (LV-TCR). Вкратце, в День -1 клетки-мишени, например, линию клеток UACC257+RFP, в высокой степени экспрессирующую антиген (положительный контроль) и антиген-отрицательную линию клеток MCF7+GFP (отрицательный контроль), высевали в 96-луночные планшеты. Клеточные продукты доноров, например, МКПК (полученные у Доноров 5, 6, 7 и 8), трансдуцированные LV-CD8.TCR (5 мкл/1×10⁶ клеток) или LV-TCR (2,5 мкл/1×10⁶ клеток), размораживали и переводили в стадию покоя на ночь в 24-луночном устройстве для быстрой экспансии G-Rex®, пропускающим газ. В День 0 клеточные продукты доноров (эффektorные клетки) культивировали совместно с клетками-мишенями, например, UACC257+RFP и MCF7+GFP, при соотношении эффektorных клеток к клеткам-мишеням (E/T) 2:1, например, 200.000 эффektorных клеток к 100.000 клеткам-мишеням. После 5-часовой инкубации при 37°C в каждую лунку добавляли по 0,5 мкл/лунка ингибитора транспорта белка, например, GolgiStop™ (BD Biosciences), после чего инкубировали 4 часа при 37°C. Затем клетки центрифугировали для снятия супернатантов для анализа ELISA в целях выявления экспрессии IFN-γ и сбора клеток для окрашивания с помощью панели внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS), например CD3, CD4, CD8, IFN-γ, гранзим В и красителя "live/dead".

Популяция CD4-CD8+ Т-клеток

На фиг. 26 показано, что совместное культивирование CD4-CD8α+ Т-клеток, полученных у сгруппированных доноров, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, приводило к более высокой процентной доле IFN-γ-положительных клеток (верхняя секция) и более высокому уровню MFI в меченых антителами к IFN-γ клетках (нижняя секция), чем в клетках без трансдукции (NT). Напротив, существенной разницы в процентной доле IFN-γ-положительных клеток и уровне MFI в меченых антителами к IFN-γ клетках между трансдуцированными и нетрансдуцированными клетками не наблюдалось при совместном культивировании CD4-CD8α+ Т-клеток, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с антиген-отрицательными MCF7. Анализ FACS проводили с гейтом на CD4-CD8α+IFN-γ+ Т-клетки. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей. (Соотношение клеток-эффektorов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=4). Данные результаты позволяют предположить, что CD4-CD8α+ Т-клетки, трансдуцированные LV-TCR или LV-CD8.TCR, являются функционально активными, например, за счет экспрессии IFN-γ, когда они контактируют с клетками-мишенями, в высокой степени экспрессирующими антиген, например, клетками линии UACC257, и что трансдуцированные клетки оказывают небольшое воздействие на антиген-отрицательные клетки, например клетки MCF7.

На фиг. 27 показано, что совместное культивирование CD4-CD8α+ Т-клеток, полученных у сгруппированных доноров, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с клетками

UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, приводило к более высокой процентной доле гранзим В-положительных клеток (верхняя секция) и более высокому уровню MFI в меченых антителами к гранзиму В клетках (нижняя секция), чем в клетках без трансдукции (NT). Напротив, существенной разницы в процентной доле гранзим В-положительных клеток и MFI в меченых антителами к гранзиму В клетках между трансдуцированными и нетрансдуцированными клетками не наблюдалось при совместном культивировании CD4-CD8 α ⁺ Т-клеток, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с антиген-отрицательными MCF7. При анализе FACS гейт устанавливали на CD4-CD8 α ⁺гран зим В+ Т-клетки. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей. (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=3). Данные результаты позволяют предположить, что CD4-CD8 α ⁺ Т-клетки, трансдуцированные LV-TCR или LV-CD8.TCR, являются функционально активными, например, за счет экспрессии гранзима В, когда они контактируют с клетками-мишенями, в высокой степени экспрессирующими антиген, например клетками линии UACC257, и что трансдуцированные клетки, возможно, оказывают небольшое воздействие на антиген-отрицательные клетки, например, клетки MCF7.

Популяция CD4+CD8 α ⁺ Т-клеток

На фиг. 28 показано, что совместное культивирование CD4+CD8 α ⁺ Т-клеток, полученных у сгруппированных доноров, трансдуцированных LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, приводило к более высокой процентной доле IFN- γ -положительных клеток (верхняя секция) и более высокому уровню MFI в меченых антителами к IFN- γ клетках (нижняя секция), чем в клетках без трансдукции (NT). Напротив, существенной разницы в процентной доле IFN- γ -положительных клеток и MFI в меченых антителами к IFN- γ клетках между трансдуцированными и нетрансдуцированными клетками не наблюдалось при совместном культивировании CD4-CD8 α ⁺ Т-клеток, трансдуцированных LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с антиген-отрицательными MCF7. При анализе FACS гейт устанавливали на CD4+CD8 α -IFN- γ ⁺ для NT-клеток и CD4+CD8 α +IFN- γ ⁺ для трансдуцированных LV-CD8.TCR клеток. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей.

(Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=4). Данные результаты позволяют предположить, что CD4+CD8 α ⁺ Т-клетки, трансдуцированные LV-CD8.TCR, являются функционально активными, например, за счет экспрессии IFN- γ , когда они контактируют с клетками-мишенями, в высокой степени экспрессирующими антиген, например клетками линии UACC257, и что трансдуцированные клетки, возможно, оказывают небольшое воздействие на антиген-отрицательные клетки, например клетки MCF7.

На фиг. 29 показано, что совместное культивирование CD4+CD8 α ⁺ Т-клеток, полученных у сгруппированных доноров, трансдуцированных LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, приводило к более высокой процентной доле гранзим В-положительных клеток (верхняя секция) и более высокому уровню MFI в меченых антителами к гранзиму В клетках (нижняя секция), чем в клетках без трансдукции (NT). Напротив, существенной разницы в процентной доле гранзим В-положительных клеток и MFI в меченых антителами к гранзиму В клетках между трансдуцированными и нетрансдуцированными клетками не наблюдалось при совместном культивировании CD4+CD8 α ⁺ Т-клеток, трансдуцированных LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с антиген-отрицательными MCF7. При анализе FACS гейт устанавливали на CD4+CD8 α -гранзим В+ для NT-клеток и CD4+CD8 α +гранзим В+ для трансдуцированных LV-CD8.TCR Т-клеток. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей. (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=3). Данные результаты позволяют предположить, что CD4+CD8 α ⁺ Т-клетки, трансдуцированные LV-CD8.TCR, являются функционально активными, например, за счет экспрессии гранзима В, когда они контактируют с клетками-мишенями, в высокой степени экспрессирующими антиген, например, клетками линии UACC257, и что трансдуцированные клетки, возможно, оказывают небольшое воздействие на антиген-отрицательные клетки, например, клетки MCF7.

CD3+Т-клетки

На фиг. 30 показано, что совместное культивирование CD3⁺ Т-клеток, полученных у сгруппированных доноров, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, приводило к более высокой процентной доле IFN- γ -положительных клеток (верхняя секция) и более высокому уровню MFI в меченых антителами к IFN- γ клетках (нижняя секция), чем без трансдукции (NT). Напротив, существенной разницы в процентной доле IFN- γ -положительных клеток и уровне MFI в меченых антителами к IFN- γ клетках между трансдуцированными и нетрансдуцированными клетками не наблюдалось при совместном культивировании CD4-CD8 α ⁺ Т-клеток, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с антиген-отрицательными MCF7. При анализе FACS гейт устанавливали на CD3⁺ Т-клетки. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей. (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=4). Данные результаты позволяют предположить, что CD3⁺ Т-клетки,

трансдуцированные LV-TCR или LV-CD8.TCR, являются функционально активными, например, за счет экспрессии IFN- γ , когда они контактируют с клетками-мишенями, в высокой степени экспрессирующими антиген, например, клетками линии UACC257, и что трансдуцированные клетки, возможно, оказывают небольшое воздействие на антиген-отрицательные клетки, например, клетки MCF7.

На фиг. 31 показано, что совместное культивирование CD3+ Т-клеток, полученных у сгруппированных доноров, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, приводило к более высокой процентной доле гранзим В-положительных клеток (верхняя секция) и более высокому уровню MFI в меченых антителами к гранзиму В клетках (нижняя секция), чем в клетках без трансдукции (NT). Напротив, существенной разницы в процентной доле гранзим В-положительных клеток и MFI в меченых антителами к гранзиму В клетках между трансдуцированными и нетрансдуцированными клетками не наблюдалось при совместном культивировании CD3+ Т-клеток, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с антиген-отрицательными MCF7. При анализе FACS гейт устанавливали на CD3+ Т-клетки. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей. (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=3). Данные результаты позволяют предположить, что CD3+ Т-клетки, трансдуцированные LV-TCR или LV-CD8.TCR, являются функционально активными, например, за счет экспрессии гранзима В, когда они контактируют с клетками-мишенями, в высокой степени экспрессирующими антиген, например, клетками линии UACC257, и что трансдуцированные клетки, возможно, оказывают небольшое воздействие на антиген-отрицательные клетки, например, клетки MCF7.

На фиг. 32 показано, что совместное культивирование CD3+ Т-клеток, полученных у группы доноров, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, приводило к более высоким уровням секреции IFN- γ , чем в случае без трансдукции (NT), только клеток MCF7 и только клеток UACC257. Напротив, существенной разницы в уровнях секреции IFN- γ между трансдуцированными и нетрансдуцированными клетками не наблюдалось при совместном культивировании CD4-CD8 α + Т-клеток, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с антиген-отрицательными MCF7. (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1 и сгруппированные доноры N=4). Данные результаты позволяют предположить, что CD3+ Т-клетки, трансдуцированные LV-TCR или LV-CD8.TCR, являются функционально активными, например, за счет секреции IFN- γ , когда они контактируют с клетками-мишенями, в высокой степени экспрессирующими антиген, например клетками линии UACC257, и что трансдуцированные клетки, возможно, оказывают небольшое воздействие на антиген-отрицательные клетки, например клетки MCF7.

На фиг. 33 показано, что совместное культивирование CD3+ Т-клеток, полученных у отдельных Доноров 5, 6, 7 и 8, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с клетками UACC257, в высокой степени экспрессирующими мишени, приводило к более высоким уровням секреции IFN- γ , чем в случае без трансдукции (NT), только клеток MCF7 и только клеток UACC257. Напротив, существенной разницы в уровнях секреции IFN- γ между трансдуцированными и нетрансдуцированными клетками не наблюдалось при совместном культивировании CD4-CD8 α + Т-клеток, трансдуцированных LV-TCR (ТКР) или LV-CD8.TCR (ТКР+CD8), с антиген-отрицательными MCF7. (Соотношение клеток-эффекторов и мишеней = 2:1). Данные результаты позволяют предположить, что CD3+ Т-клетки, полученные у отдельных доноров, трансдуцированные LV-TCR или LV-CD8.TCR, являются функционально активными, например, за счет секреции IFN- γ , когда они контактируют с клетками-мишенями, в высокой степени экспрессирующими антиген, например клетками линии UACC257, и что трансдуцированные клетки, возможно, оказывают небольшое воздействие на антиген-отрицательные клетки, например клетки MCF7.

Пример 9. Воздействие статинов на экспрессию маркеров активации Т-клеток

В целях определения воздействия статинов на экспрессию маркеров активации Т-лимфоцитов, Т-клетки обрабатывали статинами, например, аторвастатином, правастатином или розувастатином, после чего проводили анализ FACS для измерения экспрессии маркеров активации Т-клеток, например CD25, CD69 и hLDLR.

Популяция CD4+ Т-клеток

На фиг. 34 показано %-ное содержание CD25+ клеток (верхняя секция), CD69+ клеток (средняя секция) и hLDLR+ клеток (нижняя секция) среди CD3+CD4+ Т-клеток, обработанных аторвастатином, правастатином или розувастатином. Предварительно активированные клетки, клетки, активированные без статина или ДМСО (контроль), и ДМСО служили в качестве контролей. Данные результаты показывают, что, тогда как аторвастатин, правастатин и розувастатин оказывают небольшое воздействие на процентную долю CD4+CD25+ клеток и процентную долю CD4+CD69+ клеток, статины, например, аторвастатин, могут повышать процентную долю CD4+hLDLR+ клеток. Анализ FACS проводили с гейтом на лимфоциты >одиночные клетки>жизнеспособность Live/Dead>CD3+ клетки>CD4+ клетки.

Популяция CD8+ Т-клеток

На фиг. 35 показана процентное содержание CD25+ клеток (верхняя секция), CD69+ клеток (средняя секция) и hLDLR+ клеток (нижняя секция) среди CD3+CD8+ Т-клеток, обработанных аторвастати-

ном, правастатином или розувастатином. Предварительно активированные клетки, клетки, активированные без статина или ДМСО (контроль), и ДМСО служили в качестве контролей. Данные результаты показывают, что, тогда как аторвастатин, правастатин и розувастатин оказывают небольшое воздействие на процентную долю CD8+CD25+ и процентную долю CD8+CD69+ клеток, статины, например аторвастатин, могут повышать процентную долю CD8+hLDLR+ клеток. Анализ FACS проводили с гейтом на лимфоциты >одиночные клетки>жизнеспособность Live/Dead>CD3+ клетки>CD8+ клетки.

Пример 10. Воздействие WPRE на титры лентивируса

Для определения воздействия WPRE на титры лентивируса были получены лентивирусные векторы (LV), содержащие WPRE дикого типа (wt) (SEQ ID NO: 9) (LV-A), не содержащие WPRE (LV-B), содержащие WPREmut1 (SEQ ID NO: 265) (LV-C) или WPREmut2 (SEQ ID NO: 266) (LV-D). Клетки НЕК293Т трансфицировали LV-A, LV-B, LV-C или LV-D, а затем определяли титр при использовании способов, известных из уровня техники. На фиг. 36 показано, что титры данных лентивирусных векторов располагаются в порядке LV-C > LV-D > LV-A > LV-B. Данные результаты позволяют предположить, что WPREmut1 и WPREmut2 могут быть полезны для улучшения способов получения лентивирусных векторов.

Преимущества настоящего раскрытия могут включать получение вирусных векторов, которые совместно экспрессируют несколько трансгенов, например 4 полипептида, в одном векторе, и получение $\gamma\delta$ Т-клеток, которые совместно экспрессируют TCR $\alpha\beta$ и CD8 $\alpha\beta$ как безопасные и мишень-специфические "готовые к применению" Т-клеточные продукты для адоптивной клеточной терапии.

Все цитируемые в настоящем описании источники включены в него посредством ссылки, как если бы каждый источник был конкретно и в отдельности был предназначен для его включения путем ссылки. Цитирование любой ссылки предназначается для ее раскрытия до даты подачи заявки и не должно истолковываться как допущение, что настоящее изобретение не может быть датировано ранее такой публикации путем ссылки на более раннее изобретение.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор, включающий последовательность нуклеотидов S1, кодирующую полипептид CD8 α , последовательность нуклеотидов S2, кодирующую полипептид CD8 β , последовательность нуклеотидов S3 кодирующую полипептид Т-клеточного рецептора (TCR) α , и последовательность нуклеотидов S4, кодирующую полипептид TCR β , где последовательности нуклеотидов организованы в тандем с ориентацией от 5' к 3'-концу S2-S1-S4-S3.

2. Вектор по п.1, где полипептид CD8 α имеет по меньшей мере 90% идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11 и полипептид CD8 β имеет по меньшей мере 90% идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

3. Вектор по п.1 или 2, где полипептид TCR α содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и полипептид TCR β содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

4. Вектор по любому из пп.1-3, дополнительно включающий последовательность нуклеотидов S5, кодирующую 2A пептид, и последовательность нуклеотидов S6, кодирующую линкерный пептид, где S5 и S6 расположены между S1 и S2, S1 и S3, S1 и S4, S2 и S3, S2 и S4 и/или S3 и S4.

5. Вектор по п.4, где 2A пептид выбран из P2A (SEQ ID NO: 3), T2A (SEQ ID NO: 4), E2A (SEQ ID NO: 5) или F2A (SEQ ID NO: 6).

6. Вектор по п.4 или 5, где линкерный пептид является GSG или SGSG (SEQ ID NO: 8).

7. Вектор по любому из пп.1-6, дополнительно включающий последовательность нуклеотидов S7, кодирующую пептид фурина (SEQ ID NO: 2), где S7 расположена между S1 и S2, S1 и S3, S1 и S4, S2 и S3, S2 и S4 и/или S3 и S4.

8. Вектор по любому из пп.1-7, дополнительно включающий последовательность посттранскрипционного регуляторного элемента (PRE), выбранную из PRE вируса гепатита сурков (Woodchuck) (WPRE) или PRE вируса гепатита В (HBV) (HPRE).

9. Вектор по любому из пп.1-8, дополнительно включающий промоторную последовательность, которая контролирует транскрипцию S1-S4, где промоторная последовательность выбрана из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора фосфоглицерат-киназы (PGK), промотора основного белка миеллина (MBP), промотора глиофибрилярного кислого белка (GFAP), модифицированного энхансера с LTR вируса MoMuLV миелопролиферативной саркомы (MNDU3), промотора убиквитина С, промотора EF-1-альфа или промотора вируса стволовых клеток мыши (MSCV).

10. Вектор по п.1, включающий последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 94.

11. Вектор по любому из пп.1-10, где вектор является вирусным вектором, выбранным из аденовирусов, вирусов оспы, альфа-вирусов, аренавирусов, флавивирусов, рабдовирусов, ретровирусов, лентивирусов, вирусов герпеса, парамиксовирусов или пикорнавирусов.

12. Вектор по п.11, где вектор псевдотипирован оболочечным белком вируса, выбранного из встречающегося в природе эндогенного вируса кошек (RD114), химерного варианта RD114 (RD114TR), виру-

са лейкоза гиббонов (GALV), химерного варианта GALV (GALV-TR), амфотропного вируса лейкоза мышей (MLV 4070A), бакуловируса (GP64), вируса везикулярного стоматита (VSV-G), вируса чумы кур (FPV), вируса Эболы (EboV) или оболочечного гликопротеина бабуина (BaEV), вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV).

13. Способ получения Т-клеток для иммунотерапии, включающий выделение Т-клеток из пробы крови субъекта человеческого происхождения, активацию выделенных Т-клеток в присутствии аминокислот, трансдукцию активированных Т-клеток вектором по любому из пп.1-12 и экспансию трансдуцированных Т-клеток.

14. Способ по п.13, в котором Т-клетки выделяют из пробы, полученной при лейкоферезе взятых у человека образцов.

15. Способ по п.13 или 14, в котором аминокислот выбран из памидроновой кислоты, алендроновой кислоты, золедроновой кислоты, ризедроновой кислоты, ибандроновой кислоты, инкадроновой кислоты, соли любой из упомянутых выше и/или их гидрата.

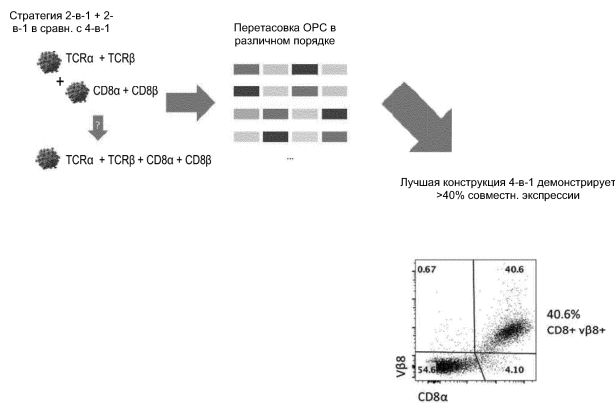
16. Способ по любому из пп.13-15, в котором активация производится, кроме того, в присутствии рекомбинантного интерлейкина 2 человека (ИЛ-2) и рекомбинантного интерлейкина 15 человека (ИЛ-15).

17. Способ по любому из пп.13-16, в котором экспансия осуществляется в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15.

18. Способ по любому из пп.13-17, в котором Т-клетки являются $\gamma\delta$ Т-клетками.



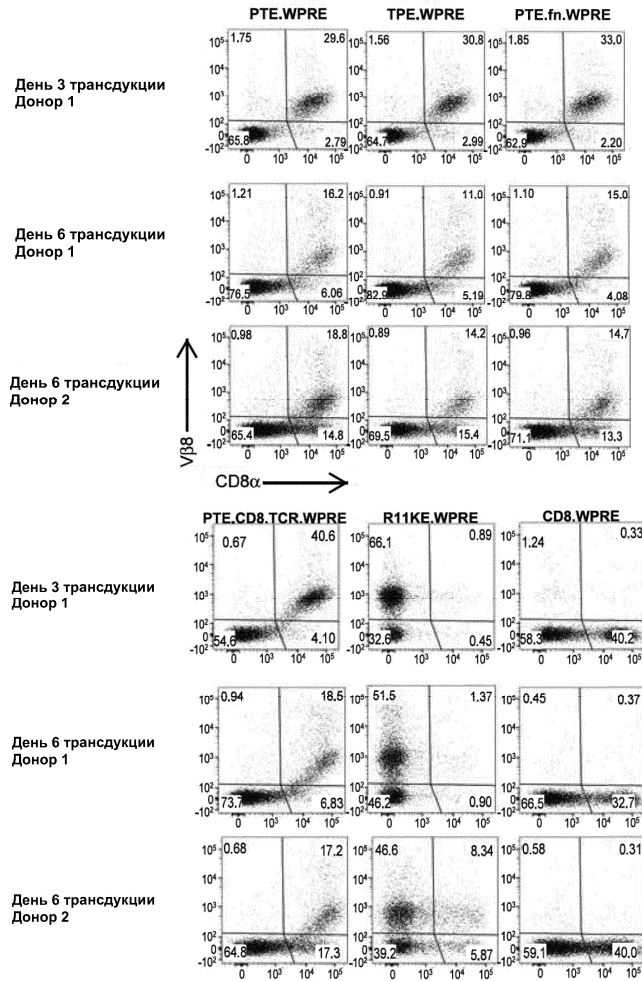
Фиг. 1



Фиг. 2

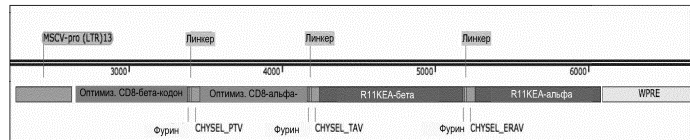
Название	Конструкция
PTE.WPRE	R11KEA beta Фурин SGS P2A R11KEA alpha Фурин SGS T2A CD8beta Фурин SGS E2A CD8alpha WPRE
TPE.WPRE	R11KEA beta Фурин SGS T2A R11KEA alpha Фурин SGS P2A CD8beta Фурин SGS E2A CD8alpha WPRE
PTE.fn.WPRE	R11KEA beta SGS P2A R11KEA alpha Фурин SGS T2A CD8beta Фурин SGS E2A CD8alpha WPRE
PTE.CD8.TCR.WPRE	CD8beta Фурин SGS P2A CD8alpha Фурин SGS T2A R11KEA beta Фурин SGS E2A R11KEA alpha WPRE
R11KE.WPRE	R11KEA beta Фурин SGS P2A R11KEA alpha WPRE
CD8.WPRE	CD8beta Фурин SGS P2A CD8alpha WPRE

Фиг. 3



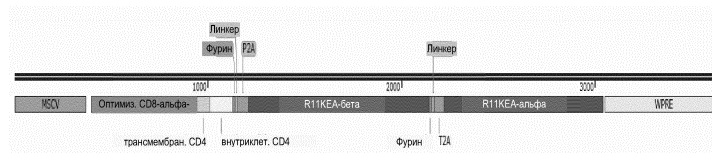
Фиг. 4

PTE.CD8.TCR.WPRE



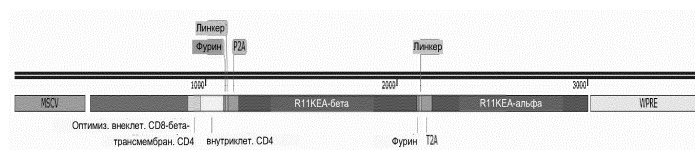
Фиг. 5А

CD8aCD4Fusion.TCR.WPRE



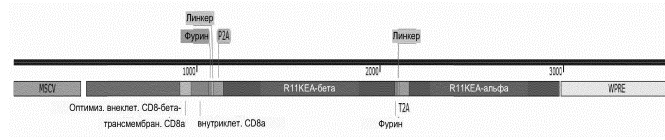
Фиг. 5В

CD8bCD4Fusion.TCR.WPRE



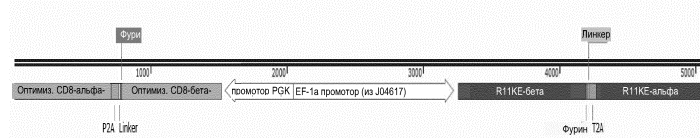
Фиг. 5С

CD8bCD8aFusion.TCR.WPRE



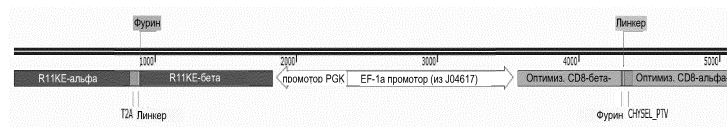
Фиг. 5D

PGK.CD8.EF1a.TCR

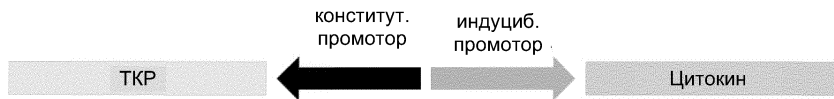


Фиг. 6А

PGK.TCR.EF1a.CD8

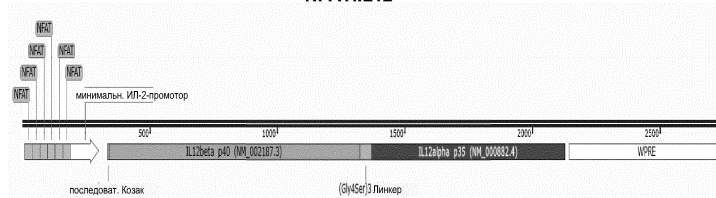


Фиг. 6B



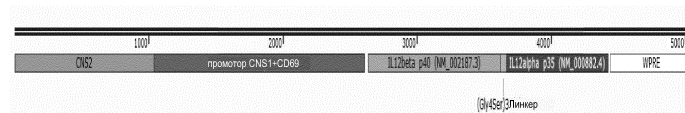
Фиг. 7

NFAT.IL12



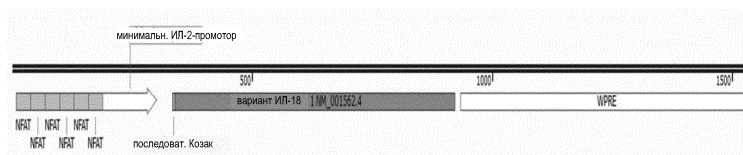
Фиг. 8А

CD69pro.IL12



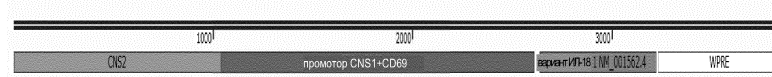
Фиг. 8B

NFAT.IL18.var1

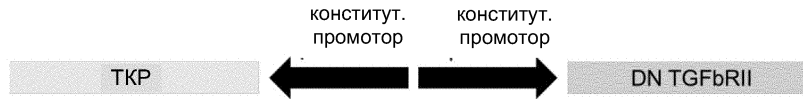


Фиг. 8C

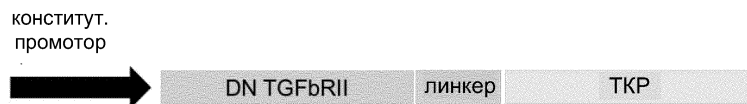
CD69pro.IL18.var1



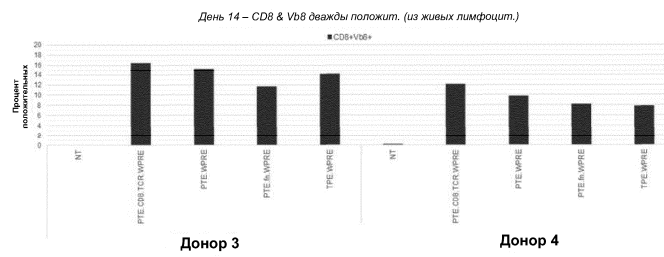
Фиг. 8D



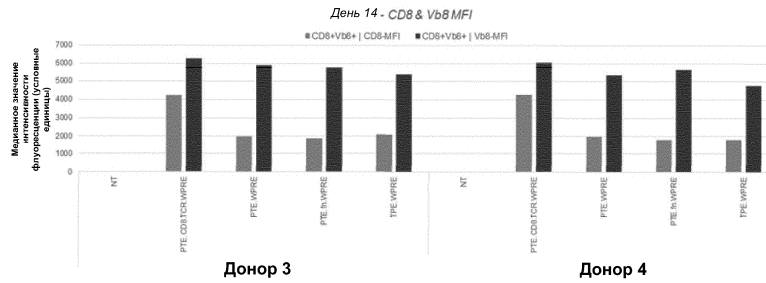
Фиг. 9A



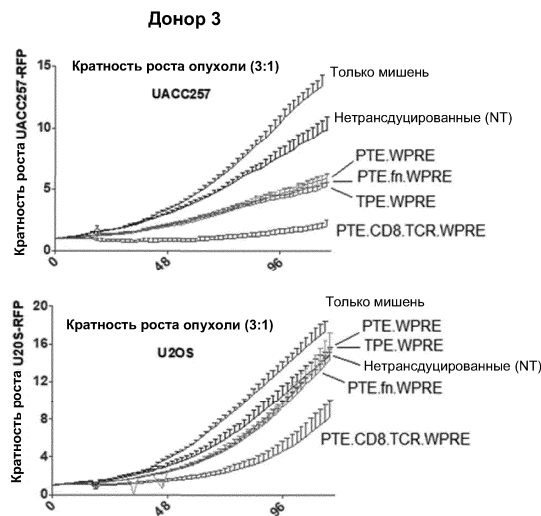
Фиг. 9B



Фиг. 10



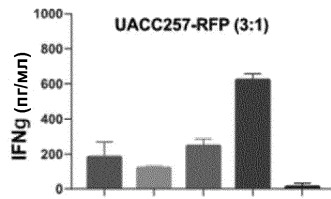
Фиг. 11



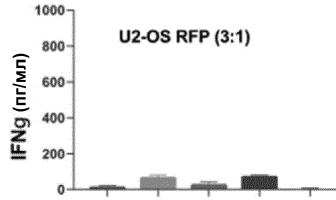
Фиг. 12

048022

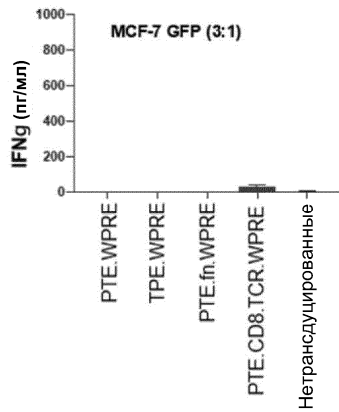
Донор 3



Фиг. 13А

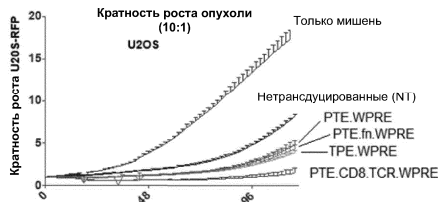
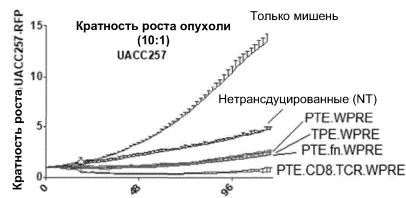


Фиг. 13В



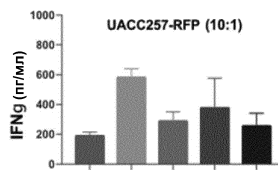
Фиг. 13С

Донор 4



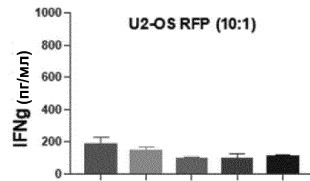
Фиг. 14

Донор 4

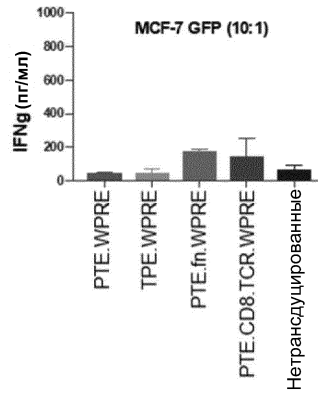


Фиг. 15А

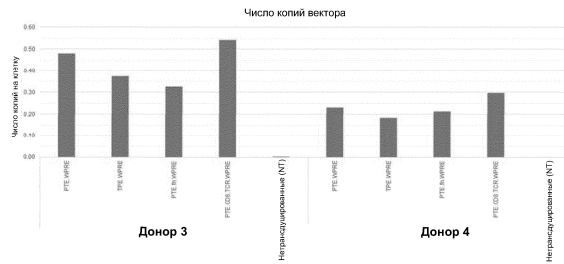
048022



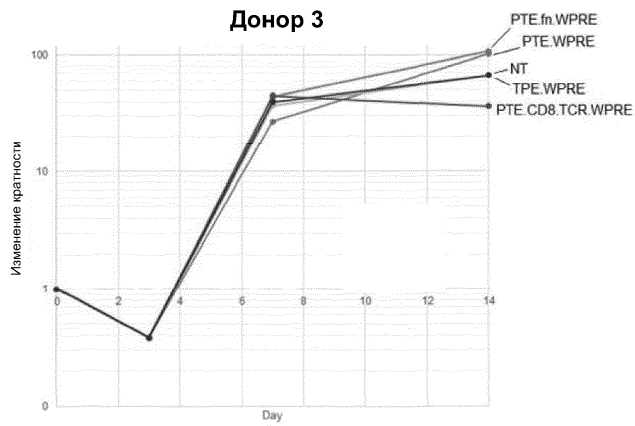
Фиг. 15В



Фиг. 15С

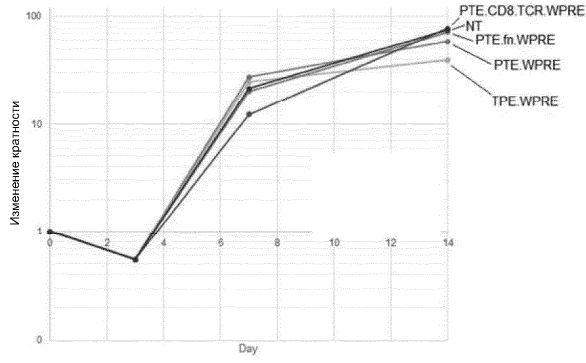


Фиг. 16

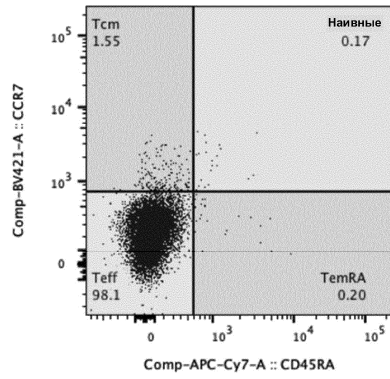


Фиг. 17А

Донор 4



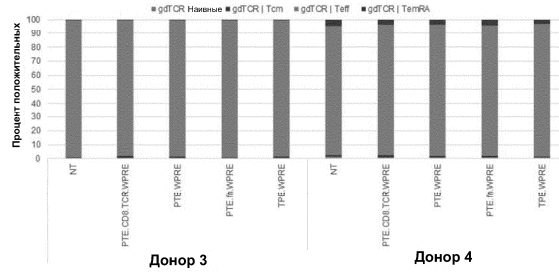
Фиг. 17В



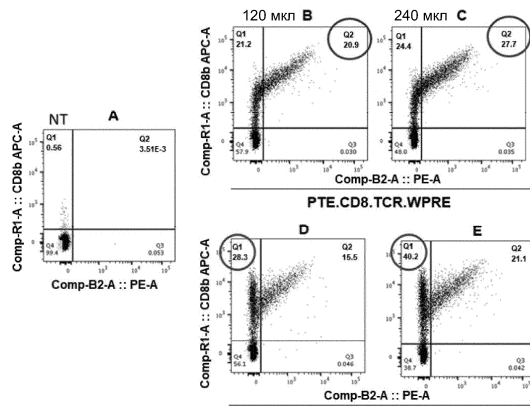
Фиг. 18А

День 14 произв. процесса

Подходы кл. памяти (из угТСR+)

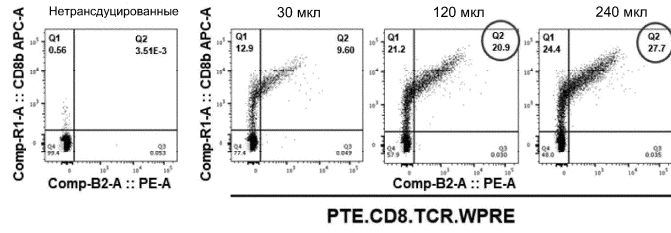


Фиг. 18В

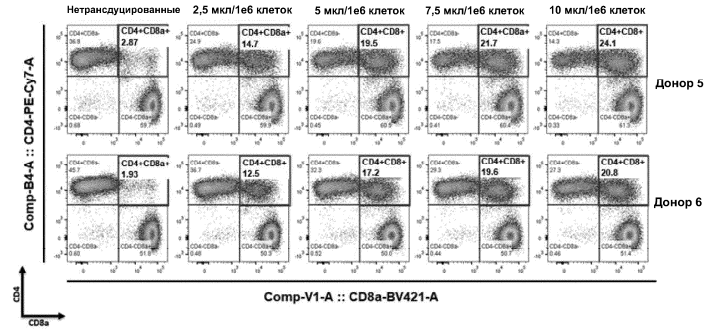


2 конструкции (CD8.WPRE + R11KE.WPRE)
смешанная трансдукция на День 3

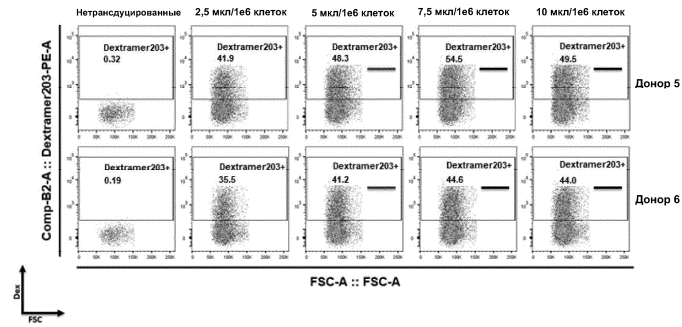
Фиг. 19



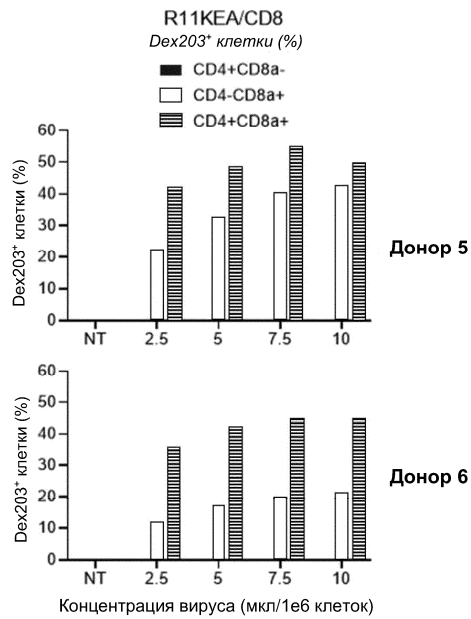
Фиг. 20



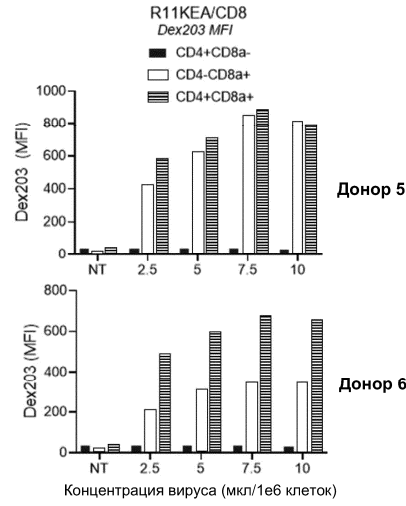
Фиг. 21



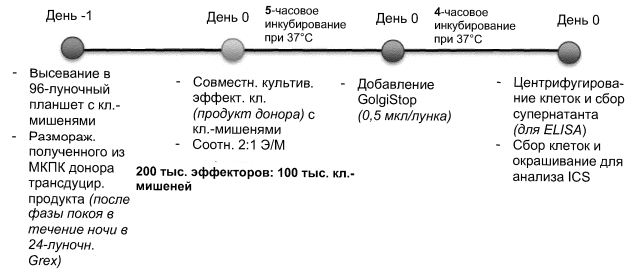
Фиг. 22



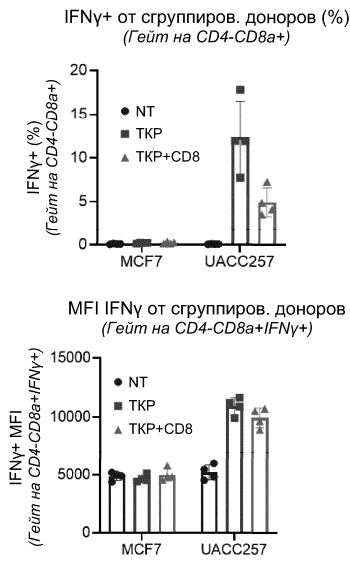
Фиг. 23



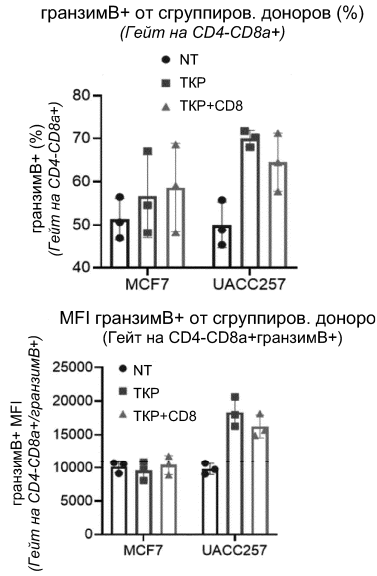
Фиг. 24



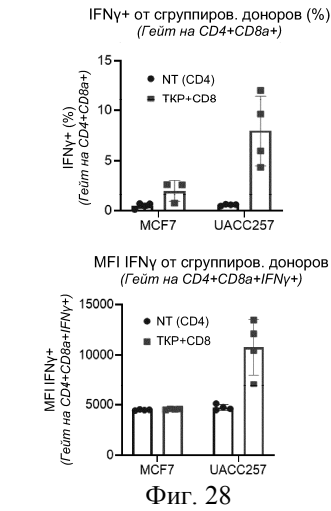
Фиг. 25



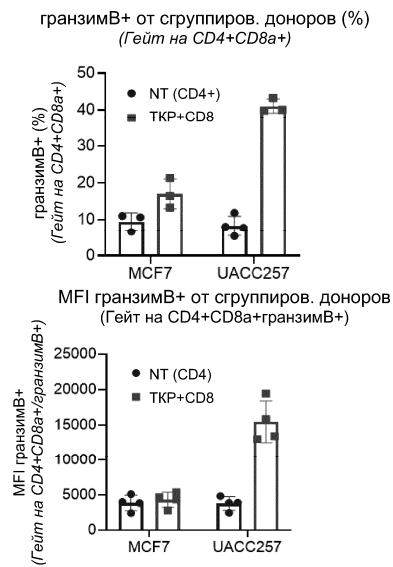
Фиг. 26



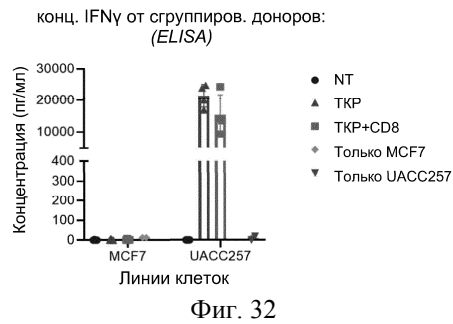
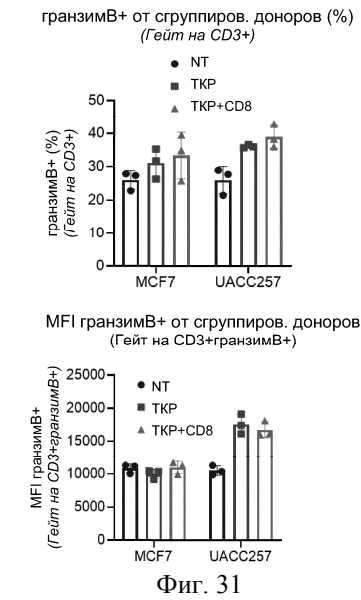
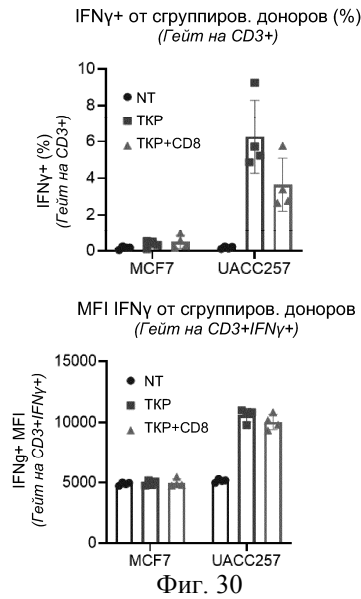
Фиг. 27

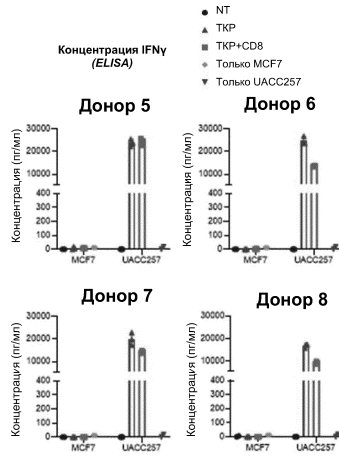


Фиг. 28

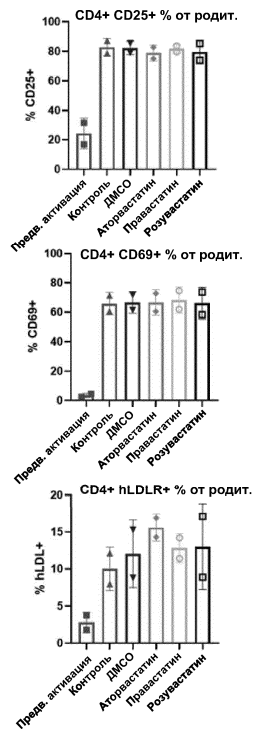


Фиг. 29

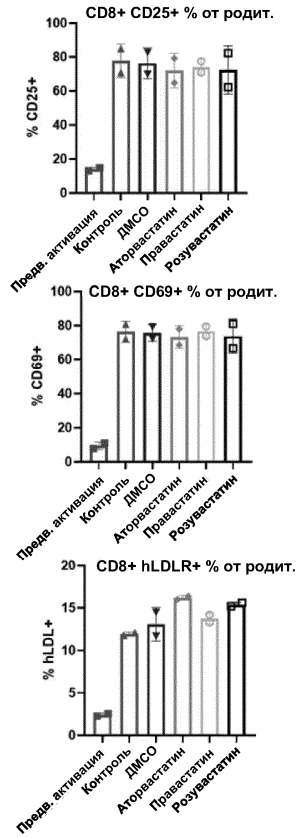




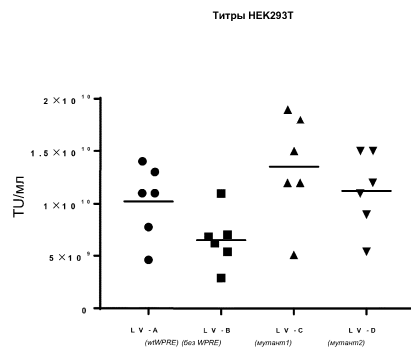
Фиг. 33



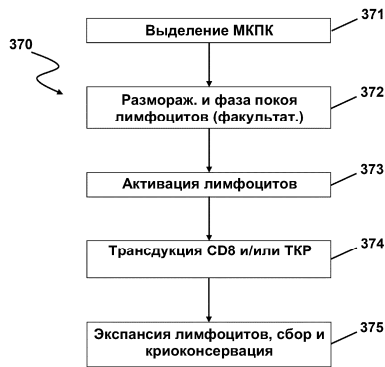
Фиг. 34



Фиг. 35



Фиг. 36



Фиг. 37