(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202290130 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.07

(22) Дата подачи заявки
2020.07.13

(51) Int. Cl. ***C07K 14/725*** (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
C40B 20/00 (2006.01)
C40B 30/04 (2006.01)
G06F 19/22 (2011.01)

(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ TCR

(31) **62/874,125; 62/975,924; 63/024,341; 63/034,157; 63/039,346**
(32) **2019.07.15; 2020.02.13; 2020.05.13; 2020.06.03; 2020.06.15**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/041824**
(87) **WO 2021/011482 2021.01.21**

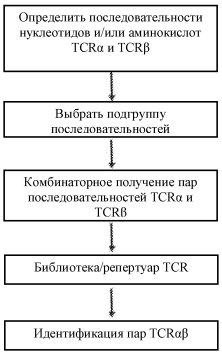
(71) Заявитель:
НЕОГЕН ТЕРАПЬЮТИКС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Схюмахер Антониус Николас Мария, Линнеманн Карстен, Кёйлман Томас, Бендл Гэвин М., Гадьо Жюль Ф.К., Ван Хейст Йерун В.Й., Гомес-Эрланд Ракель, Схриккема Дебора София (NL)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены способы получения репертуаров Т-клеточных рецепторов (TCR). В некоторых вариантах реализации репертуары TCR получают из нежизнеспособных образцов. В некоторых вариантах реализации создают библиотеки пар TCRαβ. В некоторых вариантах реализации предложенные способы применяют с целью иммунотерапии или диагностики рака. В настоящей заявке предложены, в некоторых вариантах реализации, способы идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот.

Иллюстрация способа получения репертуара TCR для создания библиотеки



202290130 A1

202290130 A1

СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ TCR

ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/874125, поданной 15 июля 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/975924, поданной 13 февраля 2020 г., предварительной заявки на патент США № 63/024341, поданной 13 мая 2020 г., предварительной заявки на патент США № 63/034157, поданной 3 июня 2020 г., и предварительной заявки на патент США № 63/039346, поданной 15 июня 2020, содержания которых полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка была подана вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла с названием «NTBV001WOSEQLIST.txt", который был создан 13 июля 2020 г., и размер которого составляет 21765 байт. Информация, представленная в электронном перечне последовательностей, настоящим полностью включена в данную заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Технология в соответствии с настоящим изобретением в общем относится к выделению последовательностей гена Т-клеточного рецептора (TCR) для получения репертуара TCR. Также предложены композиции и способы лечения.

Описание предшествующего уровня техники

[0004] Методики на основе ПЦР и секвенирование всех цепей TCR применялись для детектирования пар TCRαβ (Kobayashi et al. Nat Med 2013, Linnemann et al. Nat Med. 2013, Tran et al. Science 2015; Tran et al. N Engl J Med 2016; Tsuji et al Cancer Immunol Res 2018).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящей заявке предложены, в некоторых вариантах реализации, способы идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает (I) предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, кодирующих цепи TCRα и TCRβ, (II) введение указанной библиотеки в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, кодируемые представителем множества вариантных нуклеиновых кислот, (III) селекцию субпопуляции из популяции клеток на основании экспрессии маркера выше порогового уровня в ответ на антиген, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток, (IV) выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции, (V) определение последовательностей нуклеотидов вариантных нуклеиновых кислот, и (VI) идентификацию по меньшей мере одной вариантной последовательности нуклеотидов на основании обогащения подгруппы указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля.

[0006] В других некоторых вариантах реализации предложены способы получения репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) из разнообразных популяций Т-клеток, указанные способы включают: I) определение последовательностей нуклеотидов или аминокислот TCRα и β в образце из организма субъекта; II) выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара; III) создание репертуара TCR путем комбинаторного получения пар выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ, тем самым создавая библиотеку пар TCRαβ; и IV) идентификацию по меньшей мере одной пары TCRαβ с желательными свойствами из созданного репертуара TCR.

[0007] В некоторых вариантах реализации одну или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара выбирают на основании по меньшей мере одного критерия: a) частоты в популяции Т-клеток; b) относительного обогащения по сравнению со второй популяцией Т-клеток; c) относительного различия числа копий ДНК и РНК данной цепи TCR, d) биологических свойств цепи TCR, причем указанные свойства выбраны из по меньшей мере одного из: (предсказанной) специфичности к антигену, мотива(-ов) последовательности, (предсказанной) HLA-

рестрикции, аффинности, зависимости от корецептора или исходной Т-клеточной линии дифференцировки (например, CD4 или CD8 Т-клетка); e) пространственных паттернов экспрессии генов, причем пространственные паттерны экспрессии генов получают из по меньшей мере одного из: области происхождения в ткани или паттернов коэкспрессии других генов; f) совместной встречаемости или встречаемости со сходной частотой во множестве образцов, например, встречаемости во множестве очагов опухоли; g) выбора во множество групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR; h) комбинации множества критериев, приведенных в различных вариантах реализации. В некоторых вариантах реализации выбор на основании частоты встречаемости в популяции Т-клеток основан на данных о частоте встречаемости последовательностей TCR, которые используют для создания отдельного порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ или комбинированного порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации указанные способы дополнительно включают определение порога частоты встречаемости, который определяют на основании желательной глубины получения репертуара TCR и применяют для выбора совокупностей цепей TCRα и TCRβ на основании частоты встречаемости. В некоторых вариантах реализации определение последовательностей TCRα- и β осуществляют с помощью по меньшей мере одного из способов: a) мультиплексной ПЦР; b) получения последовательностей TCR с помощью направленного обогащения; c) получения последовательностей TCR с помощью быстрой амплификации 5'-концов (5'-RACE) и ПЦР; d) получения последовательностей TCR с помощью пространственного секвенирования; или e) получения последовательностей TCR по данным секвенирования РНК. В некоторых вариантах реализации полученную последовательность цепи TCR определяют как последовательность нуклеотидов CDR3 вместе с достаточной информацией о 5'- и 3'-последовательности нуклеотидов для выбора семейства по меньшей мере одного TCR V- и одного TCR J-сегмента на основании выравнивания последовательностей нуклеотидов, чтобы собрать полноразмерную последовательность цепи TCR. В некоторых вариантах реализации выравнивание последовательностей нуклеотидов основано на 65%-ной идентичности последовательностей, 70%-ной идентичности последовательностей, 75%-ной идентичности последовательностей, 80%-ной идентичности последовательностей, 85%-ной идентичности последовательностей, 90%-ной идентичности последовательностей, 95%-ной идентичности

последовательностей, 96%-ной идентичности последовательностей, 97%-ной идентичности последовательностей, 98%-ной идентичности последовательностей, 99%-ной идентичности последовательностей, 100%-ной идентичности последовательностей, и любом числе или диапазоне между указанными значениями. В некоторых вариантах реализации оптимальное выравнивание последовательностей основано на минимизировании меры расстояния в соответствии с алгоритмами картирования прочтений, известными квалифицированному специалисту. В некоторых вариантах реализации ищут наилучшее выравнивание.

[0008] В некоторых вариантах реализации этап III осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов: i) последовательности цепей TCR используют для синтеза отдельных библиотек фрагментов ДНК цепей TCRα и TCRβ, которые впоследствии соединяют в один фрагмент ДНК или РНК (необязательно в котором соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь), ii) комбинации цепей TCRα и TCRβ получают путем непосредственного синтеза фрагментов ДНК или РНК, в которых соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь, или iii) комбинации цепей TCRα и TCRβ создают внутри клетки путем модификации пула клеток отдельными совокупностями генов TCRα- и β, кодируемых в виде ДНК- или РНК-векторов таким образом, что клетки будут экспрессировать одну TCRα- и одну β-цепь; (iv) комбинации цепей TCRα и TCRβ соединены в одноцепочечную TCR конструкцию, содержащую фрагменты обеих цепей TCR, а также сигнальные домены CD3ζ или CD3ε отдельно или в комбинации с сигнальными доменами CD28. В некоторых вариантах реализации непосредственный синтез фрагментов ДНК или РНК, в которых соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь, исключает необходимость осуществления случайного образования пар *in silico* и синтеза всех полученных комбинаций в виде одного фрагмента ДНК. В некоторых вариантах реализации этап IV осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов: i) пул репортерных клеток или Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки или Т-клетки выделяют на основании по меньшей мере одного маркера активации для выделения TCR; ii) пул репортерных клеток или Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, метят флуоресцентным

красителем, подходящим для отслеживания пролиферации клеток, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки или Т-клетки выделяют на основании пролиферации для выделения TCR; iii) пул репортерных клеток или Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, разделяют на по меньшей мере два образца; образцы стимулируют антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген или нет, соответственно; после стимуляции, популяции как репортерных клеток, так и Т-клеток инкубируют в течение некоторого периода времени, и впоследствии популяции как репортерных клеток, так и Т-клеток анализируют путем выделения TCR; сравнение пар TCRαβ, полученных из обоих образцов, позволит идентифицировать гены TCR с большей распространенностью в образце, приведенном в контакт с по меньшей мере одним антигеном; iv) пул репортерных клеток или Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки или Т-клетки выделяют на основании по меньшей мере одного репортерного гена, такого как NFAT-GFP или NFAT-YFP, который свидетельствует о стимуляции TCR; v) пул репортерных клеток или Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки или Т-клетки выделяют для выделения TCR на основании селекции антигенспецифических репортерных клеток или Т-клеток на основании приобретенной устойчивости к антибиотику в результате сигнализации TCR, например, путем применения трансгена NFAT-пуромицин; vi) пул репортерных клеток или Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, приводят в контакт с одним или множеством комплексов ГКГС, которые несут интересующий антиген; репортерные клетки или Т-клетки, связанные с комплексом ГКГС, выделяют для выделения TCR; vii) пул репортерных клеток или Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген; затем интересующие пары TCRαβ идентифицируют, применяя основанные на отдельных клетках капельную ПЦР или микрофлюидные

подходы, чтобы комбинировать выделение TCR с детектированием уровней транскрипта по меньшей мере одного маркера активации; тем самым детектируют отдельные репортерные клетки или Т-клетки из пула репортерных клеток или Т-клеток, в которых коэкспрессируются транскрипты TCRαβ, с повышенными уровнями маркера активации. В некоторых вариантах реализации выделение TCR на этапах i)-vi) можно осуществить путем (i) выделения ДНК или РНК из массы антигенреактивных репортерных клеток или Т-клеток, чтобы получить специфический продукт ПЦР TCRαβ, который анализируют путем секвенирования ДНК, чтобы определить последовательности генов TCRαβ антигенреактивных репортерных клеток или Т-клеток, или (ii) капельной ПЦР на основе отдельных клеток или микрофлюидных подходов, чтобы проанализировать последовательности генов TCRαβ, экспрессированные в анализируемых отдельных Т-клетках. В некоторых вариантах реализации репортерные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах реализации репортерные клетки позволяют отслеживать связывание TCR. В некоторых вариантах реализации пул репортерных клеток может быть с выключенным TCR a/b.

[0009] В некоторых вариантах реализации образец из организма субъекта содержит нежизнеспособный исходный материал. В некоторых вариантах реализации получают определенную часть идентифицированного репертуара TCR. В некоторых вариантах реализации определенное или выборочное получение осуществляют путем выбора лишь части или всех детектированных цепей TCR на основании критериев, включающих, но не ограниченных перечисленными: a) частоты в популяции Т-клеток, b) относительного обогащения по сравнению со второй популяцией Т-клеток, c) относительного различия числа копий ДНК и РНК данной цепи TCR, d) биологических свойств цепи TCR, причем указанные свойства выбраны из по меньшей мере одного из: (предсказанной) специфичности к антигену, (предсказанной) HLA-рестрикции, аффинности, зависимости от корецептора, исходной Т-клеточной линии дифференцировки (например, CD4 или CD8 Т-клетка) или мотивов последовательности TCR, e) пространственных паттернов экспрессии генов, причем пространственные паттерны экспрессии генов получают из по меньшей мере одного из: области происхождения в ткани или паттернов коэкспрессии других генов, f) совместной встречаемости или встречаемости со сходной частотой во множестве образцов, например, встречаемости во

множестве очагов опухоли, g) выбора во множество групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR, комбинации множества критериев, приведенных в различных вариантах реализации. В некоторых вариантах реализации выборочное получение последовательностей TCR относится к получению последовательностей TCR, которые содержат некоторые сегменты гена V.

[0010] В некоторых вариантах реализации получают последовательности антигенспецифического TCR. В некоторых вариантах реализации получают терапевтические последовательности TCR. В некоторых вариантах реализации получают опухолереактивные последовательности TCR. В некоторых вариантах реализации получают последовательности специфических к неоантигену TCR. В некоторых вариантах реализации способы, предложенные в данной заявке, дополнительно включают этап введения Т-клеток, экспрессирующих специфические к неоантигену последовательности TCR, в качестве терапии рака. В некоторых вариантах реализации способы, предложенные в данной заявке, предназначены для диагностики. В некоторых вариантах реализации диагностика представляет собой получение репертуаров TCR из патологических очагов инфекции или аутоиммунитета. В некоторых вариантах реализации способы, предложенные в данной заявке, предназначены для получения репертуаров BCR/антител. В некоторых вариантах реализации способы, предложенные в данной заявке, дополнительно включают выделение из организма субъекта нуклеиновых кислот, которые содержат последовательности нуклеотидов TCR-α и -β. В некоторых вариантах реализации маркер активации представляет собой маркер активации CD4 или CD8 Т-клеток. Можно использовать любой маркер активации CD4 или CD8 Т-клеток. В некоторых вариантах реализации способов, описанных в данной заявке, маркер активации выбирают из группы, состоящей из: CD69, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF. В некоторых вариантах реализации в способах, описанных в данной заявке, ДНК и РНК выделяют из популяции Т-клеток, которая представляет собой смесь различных типов клеток или часть образца ткани (такой как кровь или опухолевая ткань). В некоторых вариантах реализации образец из организма субъекта содержит клетки, выделенные из биологической жидкости. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой опухолеспецифические Т-клетки. В некоторых вариантах реализации биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из крови, мочи, сыворотки, серозной жидкости, плазмы, лимфы,

спинномозговой жидкости, слюны, мокроты, секрета слизистой, вагинальной жидкости, асцитной жидкости, плевральной жидкости, перикардиальной жидкости, перитонеальной жидкости и жидкости брюшной полости. В некоторых вариантах реализации способы, предложенные в данной заявке, дополнительно включают применение последовательностей цепей TCRαβ для лечения субъекта, страдающего от рака, иммунологического расстройства, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания. В некоторых вариантах реализации этап IV способов, описанных в данной заявке, осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов: (i) идентификации или селекции на основании по меньшей мере одного маркера активации; (ii) идентификации или селекции на основании пролиферации в ответ на антиген; (iii) идентификации или селекции на основании идентификации генов TCR с большей распространенностью в стимулированных антигеном клетках по сравнению с нестимулированными клетками; (iv) идентификации или селекции на основании активации репортерного гена путем стимуляции TCR; (v) идентификации или селекции на основании селективной выживаемости, включая, но не ограничиваясь приобретенной устойчивостью к антибиотику, в результате сигнализации TCR; (vi) идентификации или селекции на основании связывания с одним или более комплексами ГКГС; (vii) идентификации или селекции с применением основанных на отдельных клетках капельной ПЦР или микрофлюидных подходов; или любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации этап (vii) дополнительно включает определение коэкспрессии ассоциированных с активацией генов.

[0011] В данной заявке предложены, в некоторых вариантах реализации, способы создания множества библиотек Т-клеток, указанные способы включают: (a) получение репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке; (b) выбор последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара во множество групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR, при этом создается множество библиотек Т-клеток, которые имеют меньшую сложность или которые позволяют получить определенные части репертуара TCR. В некоторых вариантах реализации выбор последовательностей цепей TCRα и TCRβ осуществляют на основании диапазона частот.

[0012] В настоящей заявке предложены, в некоторых вариантах реализации, способы создания множества библиотек Т-клеток, указанные способы включают: (a) получение репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке; (b) выбор последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара во множество групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR, при этом создается множество библиотек Т-клеток, которые имеют меньшую сложность или которые позволяют получить определенные части репертуара TCR.

[0013] В некоторых вариантах реализации выбор последовательностей цепей TCRα и TCRβ осуществляют на основании диапазона частот.

[0014] В настоящей заявке предложены, в некоторых вариантах реализации, способы получения репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) из разнообразных популяций Т-клеток, указанные способы включают: I) определение последовательностей нуклеотидов или аминокислот TCRα и β в образце из организма субъекта; II) выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара; III) создание репертуара TCR путем комбинаторного получения пар выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ, тем самым создавая библиотеку пар TCRαβ; и IV) идентификацию по меньшей мере одной пары TCRαβ с желательными свойствами из созданного репертуара TCR.

[0015] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает предоставление комбинаторной библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о. Способ дополнительно включает введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот. Способ дополнительно включает селекцию субпопуляции из популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, зависящего от непрерывного участка из по меньшей мере 600 п.о., причем указанная субпопуляция содержит множество клеток. Способ дополнительно включает выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых

кислот из субпопуляции. Способ дополнительно включает определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы. Способ дополнительно включает идентификацию непрерывного участка из по меньшей мере 600 п.о. на основании последовательностей нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации способ также может представлять способ, в котором непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о. распределен по всей длине 600 пар оснований.

[0016] В некоторых вариантах реализации способ может включать один или более из этапов (1) - (7), описанных ниже. Этап (1). Получение образца. Образец может представлять собой ткани, кровь или биологические жидкости из пациента, страдающего инфекционными заболеваниями, аутоиммунными заболеваниями или раком. Образец может быть жизнеспособным или нежизнеспособным. Этап (2). Секвенирование TCRα- и β цепей в образце. Этап (3). Выбор и комбинаторное образование пары последовательностей цепей TCRα и TCRβ для создания библиотеки пар TCRαβ. Этап (4). Введение указанной библиотеки пар TCRαβ в пул репортерных клеток, например, репортерных Т-клеток Jurkat. Этап (5). Стимулирование репортерных клеток, которые модифицированы библиотекой пар TCRαβ, антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген. Указанный по меньшей мере один интересующий антиген может быть аутологическим или аллогенным. Этап (6). Определение пар TCRαβ, специфических к по меньшей мере одному интересующему антигену. Этап (7). Введение пар TCRαβ в клетки и селекция клеток, содержащих пары TCRαβ. В некоторых вариантах реализации способ может включать один или более из этапов (1) - (7), описанных выше. Любой из этапов можно опустить, повторить или заменить на другие варианты реализации, предложенные в данной заявке, в случае необходимости. Также можно добавить дополнительные промежуточные этапы.

[0017] В некоторых вариантах реализации предложена нуклеотидная библиотека, содержащая репертуар Т-клеточных рецепторов, полученных в соответствии с любым из описанных выше вариантов реализации. В некоторых вариантах реализации предложена нуклеотидная конструкция, содержащая последовательность нуклеотидов, идентифицированную в соответствии с любым из описанных выше вариантов реализации.

В некоторых вариантах реализации клетка содержит нуклеотидную конструкцию, описанную в данной заявке.

[0018] В некоторых вариантах реализации предложен способ получения репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) из разнообразных популяций Т-клеток. Указанный способ включает определение последовательностей нуклеотидов или аминокислот TCRα и β в образце из организма субъекта; выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара; создание репертуара TCR путем комбинаторного получения пар выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ, тем самым создавая библиотеку пар TCRαβ; и идентификацию по меньшей мере одной пары TCRαβ с желательными свойствами из созданного репертуара TCR. В некоторых вариантах реализации предложен способ создания множества библиотек Т-клеток. Указанный способ включает получение репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) в соответствии с описанным выше способом, выбор последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара во множество групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR, при этом создается множество библиотек Т-клеток, которые имеют меньшую сложность или которые позволяют получить определенные части репертуара TCR.

[0019] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает предоставление комбинаторной библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит комбинацию двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, причем первая вариантная подпоследовательность нуклеотидов из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет первый конец непрерывного участка и вторая вариантная подпоследовательность нуклеотидов из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу; введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот; селекцию субпопуляции из

популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, зависящего от комбинации двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток; выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции; определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и идентификацию по меньшей мере одной комбинации двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании последовательностей нуклеотидов.

[0020] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает: предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит: комбинацию первой вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей вариантную последовательность аминокислот TCRα и определяющей первый конец непрерывного участка, и второй вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей вариантную последовательность аминокислот TCRβ и определяющей второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу. Способ может дополнительно включать введение указанной библиотеки в популяцию иммортализованных Т-клеток, сконструированных для экспрессии TCRα- и TCRβ-цепей, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот. Способ может дополнительно включать селекцию субпопуляции из популяции иммортализованных Т-клеток на основании экспрессии маркера активации Т-клеток выше порогового уровня в ответ на приведение в контакт иммортализованных Т-клеток с иммортализованными В-клетками, экспрессирующими антиген, причем указанная субпопуляция содержит множество Т-клеток. Способ может дополнительно включать выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции. Способ может дополнительно включать определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и идентификацию по меньшей мере одной комбинации первой и второй вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на

основании обогащения подгруппы по меньшей мере одной комбинацией последовательностей нуклеотидов относительно контроля.

[0021] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей шарнирный домен, трансмембранный домен и/или внутриклеточный сигнальный домен химерного антигенного рецептора (CAR), из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ может включать: предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит комбинацию двух или более из: первой вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей шарнирный домен CAR; второй вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей трансмембранный домен CAR; и третьей вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей внутриклеточный сигнальный домен CAR. Одна из первой, второй или третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет первый конец непрерывного участка, и при этом другая одна из первой, второй или третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу. Способ может дополнительно включать введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии CAR, кодируемого представителем множества вариантных нуклеиновых кислот. Популяция клеток включает популяцию иммортализованных Т-клеток или первичных Т-клеток человека. Способ может дополнительно включать селекцию субпопуляции из популяции клеток на основании пролиферации клеток выше порогового уровня в ответ на приведение клеток в контакт с антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими антиген, специфичный к связывающему антиген домену CAR, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток. Способ может дополнительно включать выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции. Способ может дополнительно включать определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и идентификацию по меньшей мере одной комбинации первой, второй и третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании обогащения подгруппы по меньшей мере одной комбинацией последовательностей нуклеотидов относительно контроля.

[0022] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ может включать: предоставление комбинаторной библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о.; введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот; селекцию субпопуляции из популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, зависящего от непрерывного участка из по меньшей мере 600 п.о., причем указанная субпопуляция содержит множество клеток; выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции; определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и идентификацию непрерывного участка из по меньшей мере 600 п.о. на основании последовательностей нуклеотидов.

[0023] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих пары цепей антигенспецифического Т-клеточного рецептора α (TCRα)- и TCRβ, из библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает введение библиотеки в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, кодируемые представителем множества вариантных нуклеиновых кислот, селекцию субпопуляции из популяции клеток на основании экспрессии маркера выше порогового уровня в ответ на антиген, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток. Способ может дополнительно включать выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции. Способ может дополнительно включать определение последовательностей нуклеотидов вариантных нуклеиновых кислот и идентификацию по меньшей мере одной вариантной последовательности нуклеотидов на основании обогащения подгруппы указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля.

[0024] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из образца. Указанный способ может включать секвенирование TCRα- и β цепей в образце, выбор и комбинаторное образование пары последовательностей цепей TCRα и

TCRβ для создания библиотеки пар TCRαβ, введение указанной библиотеки пар TCRαβ в пул репортерных клеток, стимулирование репортерных клеток, которые модифицированы библиотекой пар TCRαβ, антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген (причем указанный антиген может быть из того же хозяина, из которого происходят цепи TCR-альфа и TCR-бета), определение пар TCRαβ, специфических к по меньшей мере одному интересующему антигену, введение пар TCRαβ в клетки и селекцию клеток, содержащих пары TCRαβ.

[0025] В некоторых вариантах реализации предложена нуклеотидная библиотека, содержащая репертуар Т-клеточных рецепторов, полученных в соответствии с любым из описанных выше способов.

[0026] В некоторых вариантах реализации предложена нуклеотидная конструкция, содержащая последовательность нуклеотидов, идентифицированную в соответствии с любым из способов, описанных в настоящей заявке.

[0027] В некоторых вариантах реализации предложена клетка, содержащая нуклеотидную конструкцию в соответствии с любым из нуклеотидов, предложенных в настоящей заявке.

[0028] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей пару цепей антигенспецифического Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ может включать: введение библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, чтобы получить библиотеку клеток; селекцию первой популяции из библиотеки клеток на основании экспрессии маркера выше первого порогового уровня в ответ на антиген; и выделение первой популяции вариантных нуклеиновых кислот из первой популяции из библиотеки. В некоторых вариантах реализации антиген может быть один или более чем один, и как антиген(ы), так и последовательности TCR-альфа и TCR-бета могут находиться в одном и том же субъекте.

[0029] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей цепь Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ может включать: введение библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, чтобы получить библиотеку клеток; и определение по меньшей мере одной

последовательности нуклеотидов или идентичности нуклеиновых кислот из первой популяции вариантных нуклеиновых кислот на основании обогащения последовательностью нуклеотидов внутри указанной подгруппы относительно контроля.

[0030] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов из библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ может включать введение указанной библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, чтобы получить библиотеку клеток; приведение в контакт библиотеки клеток с первой популяцией клеток; селекцию субпопуляции из библиотеки клеток на основании экспрессии по меньшей мере одного маркера путем обогащения с помощью магнитных гранул; и идентификацию по меньшей мере одной последовательности нуклеотидов на основании статистически значимого обогащения или обеднения субпопуляции указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля.

[0031] В некоторых вариантах реализации предложена совокупность клеток. Указанная совокупность содержит группу из по меньшей мере двух Т-клеток, причем каждая сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета происходит из организма субъекта, причем Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR, и причем указанная группа сконструирована для активации одного или более маркеров активации Т-клеток; и группу из по меньшей мере двух В-клеток, причем каждая из по меньшей мере двух В-клеток сконструирована для экспрессии по меньшей мере одного экзогенного неоантигена (или антигена), так что способны продуцироваться по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена), и причем по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена) одинаковы с присутствующими у субъекта.

[0032] В некоторых вариантах реализации предложена библиотека экспрессирующих TCR клеток. Библиотека экспрессирующих TCR клеток содержит: группу из по меньшей мере трех Т-клеток, причем по меньшей мере две из Т-клеток сконструированы для экспрессии по меньшей мере двух пар TCR-альфа и TCR-бета (по меньшей мере двух пар TCR), причем указанные по меньшей мере две пары TCR происходят из организма субъекта, причем по меньшей мере три Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR, причем указанные по меньшей мере три Т-клетки сконструированы для активации одного или более маркеров активации Т-клеток при

связывании с антигеном (или неоантигеном), презентированным В-клеткой, причем количество геномных копий каждой пары TCR, которое отражается количеством клеток с TCR, такое, что можно узнать количество всех TCR в образце, и при этом по меньшей мере один из TCR не распределен равномерно по всей композиции, составляющей библиотеку.

[0033] В некоторых вариантах реализации предложен способ лечения субъекта. Указанный способ включает идентификацию субъекта, имеющего опухоль; предоставление группы из по меньшей мере двух Т-клеток, каждая из которых сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной отличной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета происходит из указанного субъекта, предоставление группы из по меньшей мере двух В-клеток, причем указанная группа В-клеток сконструирована для экспрессии по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов, и причем по меньшей мере два экзогенных неоантигена одинаковы с неоантигенами, обнаруженными у субъекта; объединение группы из по меньшей мере двух Т-клеток с группой из по меньшей мере двух В-клеток и селекцию комбинации из по меньшей мере двух пар TCR на основании активации по меньшей мере двух Т-клеток посредством по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов; и введение комбинации из по меньшей мере двух пар TCR субъекту, тем самым осуществляя лечение опухоли.

[0034] В некоторых вариантах реализации предложен способ лечения субъекта. Указанный способ включает: идентификацию субъекта, имеющего опухоль; предоставление группы из по меньшей мере двух Т-клеток, каждая из которых сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной отличной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета происходит из указанного субъекта; предоставление группы из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток, причем группа антигенпрезентирующих клеток происходит из организма субъекта, сконструирована для экспрессии по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов, и при этом по меньшей мере два экзогенных неоантигена одинаковы с неоантигенами, обнаруженными у субъекта; объединение группы из по меньшей мере двух Т-клеток с группой из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток и селекцию комбинации из по меньшей мере двух пар TCR на основании активации по меньшей мере двух Т-клеток посредством по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов; и введение комбинации из по меньшей мере двух пар TCR субъекту, тем самым осуществляя лечение опухоли.

[0035] В некоторых вариантах реализации предложена фармацевтическая композиция. Указанная композиция может содержать: первую пару TCR, которая связывается с первым антигеном (или неоантигеном) в опухоли субъекта; и вторую пару TCR, которая связывается со вторым антигеном (или неоантигеном) в опухоли субъекта.

[0036] В некоторых вариантах реализации предложена фармацевтическая композиция. Указанная композиция может содержать: первую пару TCR, которая связывается с первым антигеном и рестриктирована по ГКГС I класса; и вторую пару TCR, которая связывается со вторым антигеном и рестриктирована по ГКГС II класса.

[0037] В некоторых вариантах реализации предложена совокупность клеток. Указанная совокупность может содержать: группу из по меньшей мере двух Т-клеток, причем каждая сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем указанная пара происходит из организма субъекта, в котором Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR, и причем указанная группа сконструирована для активации одного или более маркеров активации Т-клеток; и группу из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток (АПК), в которой каждая из по меньшей мере двух АПК сконструирована для экспрессии по меньшей мере одного экзогенного неоантигена (или антигена), так что способны продуцироваться по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена), и при этом по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена) одинаковы с присутствующими у субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0038] На ФИГ. 1 показан способ получения репертуара TCR для создания библиотеки.

[0039] На ФИГ. 2 показан способ получения репертуара TCR и идентификации последовательностей антигенспецифических TCRα и TCRβ для применения для терапии рака.

[0040] На ФИГ. 3 показан типичный дизайн кассеты экспрессии TCR.

[0041] На ФИГ. 4 показаны некоторые варианты реализации для скрининга комбинаторных библиотек TCR.

[0042] На ФИГ. 5 показан пример применения процессов, описанных в настоящей заявке, для лечения страдающего раком пациента.

[0043] На ФИГ. 6 показан схематический пример кассеты TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину.

[0044] На ФИГ. 7 показана типичная стратегия для сборки кассет экспрессии TCR.

[0045] На ФИГ. 8 показан схематический пример способа скрининга в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения.

[0046] На ФИГ. 9 показана схема последовательности способа скрининга в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения.

[0047] На Фигурах 10A - 10J изображено получение репертуаров TCR из нежизнеспособных образцов опухоли, чтобы идентифицировать специфические к неоантигену последовательности TCR.

[0048] На ФИГ. 10A представлено схематическое изображение некоторых вариантов реализации процесса скрининга.

[0049] На ФИГ. 10B представлена диаграмма, на которой изображено количество клонотипов TCR.

[0050] На ФИГ. 10C представлена диаграмма, на которой изображена плотность вероятности каждой из 10000 комбинаций TCR-альфа x бета.

[0051] На ФИГ. 10D представлен график, на котором изображена результирующая популяция клеток после селекции бластицидином.

[0052] На ФИГ. 10E представлена серия результатов сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) с применением различных указанных маркеров.

[0053] На ФИГ. 10F представлен гель, на котором видны различные продукты ПЦР.

[0054] На ФИГ. 10G представлена серия диаграмм, на которых изображены средние Rlog-преобразованные количества прочтений для скрининга в присутствии (ось x) и отсутствие (ось y) экспрессии TMG B-клетками, которые представлены для образца опухоли pt1, описанного в 10B) - 10F), а также для трех дополнительных образцов MMRp-КРР (pt2, pt3 и pt4), обработанных идентичным способом. Лидирующие неоантигенреактивные TCR изображены в виде обведенных более крупных черных точек.

[0055] На ФИГ. 10H представлен график, на котором изображен этап 10H.

[0056] На ФИГ. 10I представлена диаграмма, на которой изображена активация, измеренная как положительность по CD69 по сравнению с положительным контролем (обработка PMA/иономицином). Показана активация контрольным пептидом (PARVA-P70R), а также пептидом AKAP8L-R191W.

[0057] На ФИГ. 10J представлена диаграмма, на которой изображена активация, измеренная как положительность по CD69 по сравнению с положительным контролем (обработка PMA/иономицином). Показана активация контрольным пептидом (ETS1-R70W), а также пептидом TP53-R282W.

[0058] На ФИГ. 10K представлена диаграмма, на которой изображена активация, измеренная как положительность по CD69 по сравнению с положительным контролем (обработка PMA/иономицином). Показана активация контрольными B-клетками (не экспрессирующими TMG), а также B-клетками, экспрессирующими MG91 (HSPA9-p.K654RfsX42) или TMG3.

[0059] На ФИГ. 10L представлена диаграмма, на которой изображена активация, измеренная как положительность по CD69 по сравнению с положительным контролем (обработка PMA/иономицином). Показана активация контрольными B-клетками (не экспрессирующими TMG), а также B-клетками, экспрессирующими MG132 (ITPR3-p.L2379M) или TMG4.

[0060] На ФИГ. 11A представлена гистограмма, на которой изображено количество клонотипов TCR.

[0061] На ФИГ. 11B представлено схематическое изображение плазмиды экспрессии TCR.

[0062] На ФИГ. 11C представлены диаграммы, на которых изображена плотность вероятности каждой из 10000 комбинаций альфа x бета для библиотеки из каждого пациента.

[0063] На ФИГ. 11D представлен диапазон количества прочтений на TCR, среднее покрытие и процент TCR, которые находятся в пределах диапазона медианы +/- ^{2}log-единица.

[0064] На ФИГ. 12A представлена диаграмма, на который изображено количество клонотипов.

[0065] На ФИГ. 12B представлены диаграммы, на которых изображена плотность вероятности каждой из 10000 комбинаций TCR-альфа x бета для библиотек из двух пациентов.

[0066] На ФИГ. 12C представлена таблица, в которой приведено покрытие каждой из 10000 комбинаций альфа x бета.

[0067] На ФИГ. 13A представлена таблица, в которой представлено разведение шести TCR с известной антигенспецифичностью среди 24 TCR с неизвестной антигенспецифичностью.

[0068] На ФИГ. 13B представлены результаты FACS, показывающие частоту встречаемости репортерных TCR+ клеток Jurkat после селекции.

[0069] На ФИГ. 13C представлены диаграммы FACS, изображающие стратегию сортировки верхних и нижних популяций Т-клеток на основании маркера активации CD69.

[0070] На ФИГ. 13D представлен гель, на котором видны различные продукты ПЦР.

[0071] На ФИГ. 13E представлена диаграмма, сравнивающая обогащение с частотой TCR с известной антигенспецифичностью и TCR с неизвестной антигенспецифичностью.

[0072] На ФИГ. 14A представлена схема последовательности дизайна 50x50 и 100x100 с добавленными охарактеризованными цепями TCR.

[0073] На ФИГ. 14B представлен ряд диаграмм FACS, на которых изображена стратегия сортировки верхних и нижних популяций Т-клеток на основании маркера активации CD69.

[0074] На ФИГ. 14C представлен гель, на котором видны различные продукты ПЦР.

[0075] На ФИГ. 14D представлены графики сравнения кратности изменения представленности TCR в верхнем образце по сравнению с нижним образцом в зависимости от средней экспрессии в данных образцах.

[0076] На ФИГ. 14E представлена таблица, в которой приведен порядок ранжирования наиболее обогащенных последовательностей TCR и базовое среднее значение, кратность изменения Log(2) и скорректированное p-значение таких TCR.

[0077] На ФИГ. 14F представлена диаграмма, сравнивающая реактивность TCR в отсутствие антигена с реактивностью TCR в присутствии антигена.

[0078] На ФИГ. 14G представлена диаграмма, на которой изображена вероятность обогащения при скрининге антигенспецифическими TCR и TCR с неизвестной специфичностью.

[0079] На ФИГ. 15A представлено схематическое изображение, на котором представлена комбинаторная сборка кассет TCR.

[0080] На ФИГ. 15B представлена серия диаграмм, на которых изображены плотности вероятностей TCRα-, TCRβ-цепей и комбинаций TCRαβ в библиотеке TCR.

[0081] На ФИГ. 15C и ФИГ. 15D представлены диаграммы, на которых изображены альтернативные стратегии создания библиотек TCR большей сложности.

[0082] На ФИГ. 15E изображены плотности вероятностей комбинаций TCR, которые представлены в двух библиотеках TCR 200 x 200, созданных путем синтеза четырех библиотек 100 x 100 и их смешивания в эквимолярных соотношениях 1:1:1:1.

[0083] На ФИГ. 15F представлена идентификация TCR для pt2 с применением подхода скрининга библиотеки 200x200.

[0084] На ФИГ. 15G представлена таблица статистического поведения TCR из pt2, идентифицированных при скрининге 100x100 при скрининге обеих библиотек 100x100 и 200x200.

[0085] На ФИГ. 16A представлена диаграмма, на которой показана взаимосвязь процента CD69+ клеток и количества пептида CMV, применяемого для примирования АПК.

[0086] На ФИГ. 16B представлена гистограмма, на которой изображен процент CD69+ клеток в зависимости от плотности посева клеток.

[0087] На ФИГ. 16C представлена гистограмма, на которой изображен процент CD69+ клеток в зависимости от отношения эффектора к мишени и от культурального сосуда.

[0088] На ФИГ. 16D представлена серия гистограмм, на которых изображен процент CD69+ клеток в зависимости от количества высеяных эффекторных клеток и используемого количества антигенного пептида.

[0089] На ФИГ. 16E представлена гистограмма, показывающая степень обогащения в зависимости от различных TCR.

[0090] ФИГ. 17A-C. Анализ титрования пептида с трансдуцированными CDK4 и CMV клетками Jurkat TCR KO. (17**a**) Клетки Jurkat TCR KO трансдуцировали ретровирусом либо с CDK4-8 или 17 TCR, либо с CMV-1 или 2 TCR. Трансдуцированные TCR состояли из константных областей мыши и вариабельных областей человека. Затем сортировали популяцию mTCRβ$^+$ CD8$^+$. На верхней панели показаны клетки перед сортировкой, а на нижней панели – после сортировки. (17**b**: CDK4, 17**c**: CMV) Активация трансдуцированных или нетрансдуцированных TCR клеток Jurkat, которую оценивали по повышению экспрессии CD69 после 20 ч совместного культивирования с клетками JY (соотношение Э:М составляло 1:1), нагруженными ступенчато изменяющимися концентрациями распознаваемого пептида. Значения EC50 представлены на подписях к диаграммам. Стимуляцию PMA/иономицином использовали в качестве положительного контроля и культивирование без клеток JY и с клетками JY, нагруженными наибольшей концентрацией (1 мкг/мл) посторонних пептидов, использовали в качестве отрицательных контролей (представлены на правой стороне каждого графика). Анализ проводили в трех повторах (нетрансдуцированные клетки Jurkat с мутантным пептидом CDK4 в двух повторах). Результаты представлены в виде среднего значения ± СО (планки погрешностей показаны только на кривых титрования пептидов). n=1. Н/т - нетрансдуцированные.

[0091] **ФИГ. 18a - 18e.** Селекция бластицидином трансдуцированных CMV-1 клеток Jurkat TCR KO с различными эффективностями трансдукции. (18a) Клетки Jurkat TCR KO трансдуцировали различными объемами супернатанта ретровируса CMV-1-бластицидин, чтобы добиться различных эффективностей трансдукции. Нетрансдуцированные и трансдуцированные TCR клетки Jurkat окрашивали на CD8 и mTCRβ. (18b, 18c, 18d, 18e) Клетки Jurkat TCR KO с различными эффективностями трансдукции CMV-1 высевали в концентрации 0,25x10^6 клеток/мл и осуществляли селекцию с помощью различных концентраций бластицидина. Через четыре дня клетки пересевали при плотности 0,25x10^6 клеток/мл либо путем удаления бластицидина (обозначено ‘удаляли бластицидин на 4 день’), либо путем добавления свежего бластицидина в соответствующей концентрации (обозначено ‘добавляли свежий бластицидин на 4 день’). (18b, 18d) Кратность размножения всех живых и mTCRβ$^+$ CD8$^+$

клеток через шесть или семь дней после начала селекции бластицидином, соответственно. (**18c, 18e**) Процент mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток через шесть или семь дней после начала селекции бластицидином, соответственно. n=1. Н/т - нетрансдуцированные.

[0092] ФИГ. 19a - 19d. Увеличение масштаба совместных культур клеток Jurkat-АПК. (a,b,c,d – слева) Экспрессия CD8 и mTCRβ в эффекторных клетках Jurkat в каждом эксперименте. Клетки Jurkat трансдуцировали либо (19**a**) библиотекой TCR, состоящей из 16 TCR, четыре из которых специфичны к антигенам, содержащимся внутри TMG2.1, либо (19**b, 19c, 19d**) CDK4-17 TCR. (19**b, 19c**) Дважды отрицательные популяции представляли собой клетки-мишени, которые невозможно было выделить вследствие низкой экспрессии в них CD20. (19**a, 19b, 19c, 19d – справа**) Совместные культуры вели с экспрессирующими TMG2.1 EBV LCL в течение 20 ч (соотношение Э:М составляло 1:1, плотность клеток 2,5x10^6 клеток/мл). Нетрансдуцированные EBV LCL использовали в качестве отрицательного контроля. Процент всех живых клеток и CD69$^+$ эффекторных клеток наносили на график. Текст зеленым цветом указывает, какие условия подвергали центрифугированию при 1100 об/мин в течение 1 мин (краткосрочное центрифугирование). Суммарное количество используемых клеток: 0,5x10^6 клеток (96-луночный планшет (96Л)), ≤2x10^6 клеток (1,3/2x10^6 клеток в пробирке Falcon емкостью 15/50 мл, соответственно), 170x10^6 клеток (мешок GMP). Совместные культуры в 96Л вели (19**c**) в трех повторах или (19**d**) в двух повторах. Результаты представлены в виде среднего значения ± СО. n=1. 96Л - 96-луночный планшет со скругленным дном лунок. Мешок GMP - Мешок MACS GMP Cell Differentiation Bag – 500. *результаты для низкого количества живых клеток.

[0093] ФИГ. 20a - 20e. Динамический анализ маркеров активации Т-клеток CD69, CD25 и CD62L. Клетки Jurkat TCR KO, трансдуцированные либо CDK4-8, либо CMV-1 TCR (>80% mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток), культивировали в присутствии (CDK4-8: круги, CMV-1: треугольники) или в отсутствие (CDK4-8: прямоугольники, CMV-1: перевернутые треугольники) экспрессирующих TMG2.1 EBV LCL в течение 16, 20, 24, 28 и 32 ч при соотношении Э:М 1:1, а затем методом многоцветной проточной цитометрии проводили анализ экспрессии CD69, CD25 и CD62L в эффекторных клетках. Нетрансдуцированные клетки Jurkat TCR KO, совместно культивированные с EBV LCL TMG2.1, использовали в качестве отрицательного контроля (ромбы). Каждая типичная точечная диаграмма получена в результате 20 ч совместного культивирования трансдуцированных CDK4-8

клеток Jurkat с EBV LCL TMG2.1. (20**a**) Повышение экспрессии CD69, (20**b**) повышение экспрессии CD25 и (20**d**) снижение экспрессии CD62L в эффекторных клетках. Анализ коэкспрессии CD69 либо с (20**c**) CD25, либо с (20**e**) CD62L. Совместные культуры вели в трех повторах (представлены в виде среднего значения ± СО), n=1. Н/т - нетрансдуцированные.

[0094] ФИГ. 21a - 21d. Оценка эффективности лентивирусных репортерных векторов на основе NFAT и с геном устойчивости к пуромицину в клетках Jurkat TCR KO. (21**a**) Схематическое представление четырех лентивирусных репортерных плазмид на основе NFAT и с кассетой устойчивости к пуромицину. (21**b**) Четырьмя векторами трансфицировали клетки HEK293T, применяя PEI в качестве трансфицирующего реагента. Осуществляли котрансфекцию дополнительной плазмидой (pmaxGFP) в качестве меры эффективности трансфекции. На точечных диаграммах показана экспрессия GFP нетрансфицированными и трансфицированными клетками HEK293T через три дня после трансфекции. (21**c**) Кондиционированный лентивирусом супернатант использовали в комбинации с полибреном, чтобы трансдуцировать клетки Jurkat TCR KO. Клетки Jurkat стимулировали PMA/иономицином в течение 24 ч, а затем проводили селекцию 1 мкг/мл пуромицина в течение трех дней. На точечных диаграммах показан процент живых ($DAPI^-$) и $CD69^+$ нетрансдуцированных и трансдуцированных клеток Jurkat TCR KO. (21**d**) Трансдуцированные и прошедшие селекцию пуромицином клетки размножали в течение 20 дней, чтобы провести второй раунд стимуляции PMA/иономицином в течение 24 ч, а затем 4-дневную селекцию пуромицином с использованием различных концентраций пуромицина. Процент живых ($DAPI^-$) и $CD69^+$ клеток наносили на график. Стоит отметить, что н/т клетки отличаются от н/т клеток в (**c**). n=1. Н/т - нетрансдуцированные.

[0095] ФИГ. 22a-22c. Оценка эффективности лентивирусных репортерных векторов на основе NFAT и EGFP в клетках Jurkat TCR KO. (22**a**) Схематическое представление четырех лентивирусных репортерных плазмид на основе NFAT с геном EGFP. (22**b**) Четырьмя векторами с NFAT трансфицировали клетки HEK293T, применяя PEI или FuGENE в качестве трансфицирующего реагента. Показан процент GFP^+ клеток HEK293T через три дня после трансфекции. (22**c**) Кондиционированным лентивирусом супернатантом после трансфекций с помощью PEI трансдуцировали клетки Jurkat TCR KO с помощью полибрена в качестве трансдуцирующего реагента. Трансдуцированные NFAT

клетки Jurkat TCR KO стимулировали PMA/иономицином в течение 24 ч и измеряли экспрессию GFP (представленную в виде процента и MFI GFP^+ клеток) каждые 24 ч в течение трех дней. Активацию клеток Jurkat оценивали по повышению экспрессии CD69. n=1. MFI - средняя интенсивность флуоресценции. EGFP - усиленный GFP. Н/т - нетрансдуцированные.

[0096] ФИГ. 23. Оценка эффективности лентивирусных репортерных векторов на основе NFAT и EGFP в первичных Т-клетках. Первичные Т-клетки трансдуцировали либо лентивирусным вектором NFAT4x, использованным на ФИГ. 23, либо лентивирусным вектором NFAT4x (NFAT4x new), который содержит отличный минимальный промотор (minP). Трансдуцированные NFAT первичные Т-клетки стимулировали PMA/иономицином в течение 24 ч и измеряли экспрессию GFP (представленную в виде процента и MFI GFP^+ клеток) каждые 24 ч в течение трех дней. Активацию клеток Jurkat оценивали по экспрессии CD69. n=2 биологически независимых повтора (представленных в виде среднего значения ± СО). *$P \leq 0,05$, **$P \leq 0,01$, н/з - не значимый (двухфакторный дисперсионный анализ с последующим критерием множественных сравнений Сидака). MFI - средняя интенсивность флуоресценции. Н/т - нетрансдуцированные.

[0097] ФИГ. 24a - 24d. Невирусная доставка репортерных плазмид на основе NFAT в клетки Jurkat TCR KO. (24**a**) Схематическое представление двух плазмид NFAT. NFAT0x не содержит ни одного сайта связывания NFAT, и его применяли для оценки фонового сигнала minP отдельно. (**b,c,d**) NFAT0x и NFAT4x внедряли путем электропорации в трансдуцированные CDK4-17 клетки Jurkat TCR KO (~90% $mTCR\beta^+$ $CD8^+$ клеток). (24**b**) Жизнеспособность клеток Jurkat, которые либо не подвергали электропорации, либо подвергали электропорации в присутствии или в отсутствие плазмидной ДНК, оценивали через 20 ч, 2 дня и 6 дней после электропорации. (24**c**) Динамический анализ процента единожды и дважды положительных по E2-Crimson и GFP популяций трансфицированных NFAT клеток Jurkat. Селекцию антибиотиком начинали на 6 день с помощью 0,5 мкг/мл пуромицина и вели в течение семи дней. Пуромицин восполняли через четыре дня после начала селекции. (24**d**) Точечные диаграммы жизнеспособности клеток ($DAPI^-$ клетки) и экспрессии GFP и E2-Crimson через семь дней после селекции пуромицином. n=1. minP - минимальный промотор. EGFP - усиленный GFP.

[0098] ФИГ. 25a, 25b. Селекция бластицидином нетрансдуцированных клеток Jurkat TCR KO. Нетрансдуцированные клетки Jurkat TCR KO высевали в концентрации 0,25x10^6 клеток/мл и проводили селекцию с помощью различных концентраций бластицидина в течение шести дней. Через четыре дня клетки пересевали при концентрации 0,25x10^6 клеток/мл либо с удалением бластицидина (обозначают 'удаляли бластицидин на 4 день'), либо с добавлением свежего бластицидина в соответствующей концентрации (обозначают 'добавляли свежий бластицидин на 4 день'). (25**a**) Кратность размножения всех живых клеток после селекции бластицидином. (25**b**) На диаграммах проточной цитометрии показана экспрессия FSC-A/SSC-A и CD8/mTCRβ в нетрансдуцированных клетках, культивированных в присутствии или в отсутствие 4 мкг/мл бластицидина. n=1. Н/т - нетрансдуцированные.

[0099] ФИГ. 26a, 26b. mTCRβ MFI прошедших селекцию с помощью 4 мкг/мл бластицидина трансдуцированных CMV-1 клеток Jurkat TCR KO с различными эффективностями трансдукции. (26**a, 26b**) Клетки Jurkat TCR KO с различными эффективностями трансдукции ретровирусом CMV-1 TCR высевали в концентрации 0,25x10^6 клеток/мл и проводили селекцию с помощью 4 мкг/мл бластицидина. Через четыре дня клетки пересевали при концентрации 0,25x10^6 клеток/мл либо с удалением бластицидина (обозначают: удаляли бластицидин на 4 день), либо с добавлением 4 мкг/мл свежего бластицидина (обозначают: добавляли свежий бластицидин на 4 день). (26**a**) mTCRβ MFI в mTCRβ^+ $CD8^+$ клетках, прошедших селекцию бластицидином в течение шести/семи дней. (26**b**) На типичных точечных диаграммах показано окрашивание CD8 и mTCRβ через семь дней после начала селекции бластицидином. n=1. MFI - средняя интенсивность флуоресценции.

[0100] ФИГ. 27. Измерение активации Т-клеток с применением двух различных моноклональных антител против CD69 человека - клона FN50 и клона CH/4. Схема эксперимента описана на подписи к ФИГ. 19b. Клетки одновременно окрашивали клоном FN50 CD69 (APC) и клоном CH/4 CD69 (PE). n=1. 96Л - 96-луночный планшет со скругленным дном лунок. *результаты для низкого количества живых клеток.

[0101] На ФИГ. 28 изображены некоторые варианты реализации платформы для выделения специфических к неоантигену TCR.

[0102] ФИГ. 29. Улучшение масштабируемости платформы для выделения TCR, позволяя более эффективный процессинг большого количества клеток, при этом все еще сохраняя покрытие TCR.

[0103] ФИГ. 30. Способы проверки эффективности и токсичности бластицидина.

[0104] ФИГ. 31. Изображены различные варианты реализации платформы для выделения TCR, которые могут включать все этапы или каждый из заключенных в прямоугольники этапов (например, 1, и/или 2, и/или 3, и/или 4), или любой один или более из пронумерованных на одной линии этапов (например, 1 - 7)

[0105] ФИГ. 32. Изображена SEQ ID NO: 1. Последовательность аминокислот гена TCR, экспрессированного в виде кассеты экспрессии TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину; и SEQ ID NO: 4: последовательность аминокислот гена TCR, экспрессированного в виде кассеты экспрессии TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к бластицидину.

[0106] ФИГ. 33. SEQ ID NO: 2: последовательность аминокислот трансгена CD8α-P2A-CD8β.

[0107] На ФИГ. 34. SEQ ID NO 3: пример последовательности нуклеотидов HLA-A*02:01-IRES-FusionRed.

[0108] На ФИГ. 35A показана схема дизайна скрининга. Пять охарактеризованных TCR и 95 неохарактеризованных TCR из образцов рака яичников (РЯ) или колоректального рака (КРР) использовали для создания комбинаторных библиотек TCR дизайна 100 x 100.

[0109] На ФИГ. 35B показаны результаты сортировки клеток с помощью FACS по активации Т-клеток, используя маркер CD69.

[0110] На ФИГ. 35C показано, что у полученного продукта ПЦР, где в ПЦР было ограниченное число циклов для амплификации части кассеты TCRβ-P2A-TCRα из сортированных трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat, размер составляет приблизительно 1,5 т.п.н.

[0111] На ФИГ. 35D показан анализ обогащения TCR по результатам скрининга, представленным на Фиг. 35C.

[0112] На ФИГ. 35E показаны характеристики пяти охарактеризованных антигенреактивных TCR.

[0113] На ФИГ. 36A показана схема дизайна скрининга. Пять охарактеризованных TCR и 95 неохарактеризованных TCR из образцов рака яичников (РЯ) или колоректального рака (КРР) использовали для создания комбинаторных библиотек TCR дизайна 100 x 100.

[0114] На ФИГ. 36B показана стратегия сортировки для скрининга.

[0115] На ФИГ. 36C показано получение кассет экспрессии TCR.

[0116] На ФИГ. 36D показан анализ обогащения TCR по результатам скрининга, представленным на ФИГ. 36C.

[0117] На ФИГ. 36E показаны характеристики 7 наиболее значительно обогащенных TCR, представленных на ФИГ. 36D.

[0118] На ФИГ. 37A показано схематическое изображение дизайна комбинаторного кодирования TMG 6x6.

[0119] На ФИГ. 37B показан анализ порядка ранжирования всех комбинаций TCR-альфа x бета как функции количества повторов скрининга библиотеки TCR из pt2.

[0120] На ФИГ. 37C показана сводная таблица статистического анализа на основании 2 или 3 повторов скрининга библиотеки TCR из КРР.

[0121] На ФИГ. 37D показана таблица образцов из pt4, используемых для анализа попарного обогащения TCR.

[0122] На ФИГ. 37E показаны результаты анализа попарного обогащения TCR.

[0123] На ФИГ. 38 показана взаимосвязь активации TCR и фоновой активации TCR между скринингом и контрольными данными.

[0124] На ФИГ. 39 показана мера представленности TCR. На диаграмме показано обогащение верхних образцов пятью охарактеризованными TCR, которые стимулированы распознаваемыми антигенами (наиболее светлая серая штриховка). Для нижних образцов, полученных из совместных культур с B-клетками, экспрессирующими TMG, выявлены более низкие значения rlog.

[0125] На ФИГ. 40 изображена диаграмма SEQ ID NO: 1 - гена TCR, экспрессированного в виде кассеты экспрессии TCRβ-P2ATCRα-T2A-устойчивость к пуромицину.

[0126] На ФИГ. 41 изображена диаграмма SEQ ID NO: 2 - трансген CD8α-P2A-CD8β.

[0127] На ФИГ. 42 изображена диаграмма SEQ ID NO: 3 - K562-HLA-A*02:01-IRESFusionRed.

[0128] На ФИГ. 43 изображена диаграмма SEQ ID NO: 4 - гена TCR, экспрессированного в виде кассеты экспрессии TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к бластицидину.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ

[0129] В настоящем изобретении предложены способы и композиции для получения репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) из разнообразных популяций Т-клеток. В некоторых вариантах реализации способов предложена идентификация и выделение антигенспецифических TCR из нежизнеспособного материала, включая образцы ткани человека. Некоторые варианты реализации соответствуют некоторым или всем, представленным на ФИГ. 31. В некоторых вариантах реализации способ может включать один или более из этапов (1) - (7), перечисленных на ФИГ. 31 и здесь. Например, способ может включать: (1) Получение образца. Образец может представлять собой ткани, кровь или биологические жидкости из пациента, страдающего инфекционными заболеваниями, аутоиммунными заболеваниями или раком. Образец может быть жизнеспособным или нежизнеспособным. Этап (2). Секвенирование TCRα- и β цепей в образце. Этап (3). Выбор и комбинаторное образование пары последовательностей цепей TCRα и TCRβ для создания библиотеки пар TCRαβ. Этап (4). Введение указанной библиотеки пар TCRαβ в пул репортерных клеток, например, репортерных Т-клеток Jurkat. Этап (5). Стимулирование репортерных клеток, которые модифицированы библиотекой пар TCRαβ, антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген. Указанный по меньшей мере один интересующий антиген может быть аутологическим или аллогенным. Этап (6). Определение пар TCRαβ, специфических к по меньшей мере одному интересующему антигену. Этап (7). Введение пар TCRαβ в клетки и селекцию клеток, содержащих пары TCRαβ. В некоторых вариантах реализации способ может включать один или более из этапов (1) - (7), описанных выше. В некоторых вариантах реализации любой из этапов можно опустить, повторить или заменить на другие варианты реализации, предложенные в данной заявке, в случае необходимости. Также можно добавить дополнительные промежуточные этапы.

[0130] В некоторых вариантах реализации любого из способов, предложенных в данной заявке, пары TCR и/или Т-клетки, экспрессирующие пары TCR, выбирают путем селекции или идентифицируют по связыванию с антигеном (таким как неоантиген), причем антиген экспрессируется В-клеткой или антигенпрезентирующей клеткой. В некоторых вариантах реализации любого из способов, предложенных в данной заявке, антиген или неоантиген происходит из опухоли из организма субъекта, и каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета из пар TCR также происходит из организма субъекта. В некоторых вариантах реализации присутствует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион пар TCR (или клеток, содержащих данные пары) и по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион антигенов.

[0131] В некоторых вариантах реализации любая из композиций, используемых и/или полученных в результате описанных выше способов, также предложена в виде библиотек, и/или наборов, и/или композиций для их применения в медицине и/или системах скрининга. В некоторых вариантах реализации композиция может представлять собой пару цепей TCRα и TCRβ, которую выбрали или получили с помощью любого из способов, предложенных в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации композиция может представлять собой любой из используемых компонентов или продуктов из любого из способов, предложенных в настоящей заявке.

[0132] Также предложены различные композиции клеток, библиотеки, лекарства на основе клеток и белков. В некоторых вариантах реализации совместная культура содержит по меньшей мере первый и второй тип клеток в качестве популяции клеток. В некоторых вариантах реализации первый и второй тип клеток в совместной культуре могут контактировать и вызывать фенотипические изменения. В некоторых вариантах реализации совместная культура поддерживается в культуральном сосуде. В некоторых вариантах реализации совместная культура поддерживается в культуральном мешке. В некоторых вариантах реализации первый и второй тип клеток представляют собой две или более популяций различных типов клеток. В некоторых вариантах реализации популяция клеток представляет собой ровно две популяции различных типов клеток. В некоторых вариантах реализации любая из совокупностей клеток, или интермедиатов, или конечных популяций клеток из любого из способов, предложенных в данной заявке, рассматриваются как

конкретные композиции, библиотеки, лекарства и т.д. В некоторых вариантах реализации совместная культура содержит Т-клетку и В-клетку.

[0133] В некоторых вариантах реализации первый тип клетки в совместной культуре представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах реализации первый тип включает Т-клетку человека. В некоторых вариантах реализации первый тип включает Т-клетку Jurkat. В некоторых вариантах реализации первый тип включает Т-клетку Jurkat, которая сконструирована для экспрессии CD8a и CD8b человека и в которой отсутствует эндогенная экспрессия TCR. В некоторых вариантах реализации первый тип включает Т-клетку Jurkat, которая экспрессирует одну или более молекул вариантных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации первый тип включает Т-клетку Jurkat, которая экспрессирует один или более вариантных TCR. В некоторых вариантах реализации Т-клетки Jurkat экспрессируют низкие фоновые уровни маркеров активации, включая, но не ограничиваясь CD69, вследствие предварительного культивирования при низкой плотности.

[0134] В некоторых вариантах реализации второй тип клетки в совместной культуре включает клетку, которая может презентировать антигены. В некоторых вариантах реализации другой тип клетки включает клетку человека, которая может презентировать антигены. В некоторых вариантах реализации другой тип клетки включает клетку опухоли человека. В некоторых вариантах реализации другой тип клетки включает В-клетку человека. В некоторых вариантах реализации другой тип клетки включает аутологическую В-клетку человека. В некоторых вариантах реализации другой тип клетки включает аутологическую иммортализованную В-клетку человека. В некоторых вариантах реализации популяция В-клеток сконструирована для экспрессии экзогенного антигена. В некоторых вариантах реализации популяция В-клеток сконструирована для экспрессии множества экзогенных антигенов. В некоторых вариантах реализации популяция В-клеток сконструирована для экспрессии множества экзогенных неоантигенов. В некоторых вариантах реализации популяция В-клеток сконструирована для экспрессии множества экзогенных неоантигенов в формате множества минигенов. В некоторых вариантах реализации популяция В-клеток сконструирована для экспрессии множества экзогенных неоантигенов в формате единых TMG. В некоторых вариантах реализации популяция В-клеток сконструирована для экспрессии множества экзогенных неоантигенов в формате

множества TMG. В некоторых вариантах реализации отдельные клетки в популяции В-клеток экспрессируют только один экзогенный миниген или TMG. В некоторых вариантах реализации отдельные клетки в популяции В-клеток могут экспрессировать множество экзогенных минигенов или TMG.

[0135] В некоторых вариантах реализации предложена композиция. Указанная композиции содержит: i) первую популяцию Т-клеток, которые активированы, что измеряют по одному или более маркерам активации Т-клеток; и ii) вторую популяцию другой селекции Т-клеток в качестве референсной популяции, экспрессирующую такую же библиотеку TCR или пул плазмид из той же библиотеки TCR, причем первая популяция Т-клеток обогащена одним или более TCR относительно второй популяции Т-клеток.

[0136] В некоторых вариантах реализации предложена совокупность клеток, указанная совокупность содержит группу Т-клеток, которые сконструированы для экспрессии по меньшей мере одной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем указанная пара происходит из организма субъекта, в котором Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR, и причем группа Т-клеток сконструирована для активации одного или более маркеров активации Т-клеток; и

группу В-клеток, причем указанная группа В-клеток сконструирована для экспрессии по меньшей мере одного экзогенного неоантигена, и причем указанный по меньшей мере один экзогенный неоантиген происходит из опухоли из организма субъекта.

[0137] В некоторых вариантах реализации в совокупности присутствуют по меньшей мере две пары TCR и по меньшей мере два экзогенных неоантигена. В некоторых вариантах реализации в композиции присутствуют по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион пар TCR (или клеток, содержащих указанные пары). В некоторых вариантах реализации в совокупности присутствуют по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион антигенов (или В-клеток, экспрессирующих данные антигены). В некоторых вариантах реализации в композиции присутствуют по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион пар TCR (или клеток, содержащих данные пары) и в совокупности присутствуют по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион антигенов. В некоторых вариантах реализации

последовательности каждой пары или ее части различны. В некоторых вариантах реализации каждая пара TCR отлична.

[0138] В некоторых вариантах реализации соотношение, в котором две или более популяций клеток присутствуют в совместной культуре, находится в диапазоне от 1000:1 до 1:1000.

[0139] В некоторых вариантах реализации соотношение, в котором две или более популяций клеток присутствуют в совместной культуре, устанавливают, чтобы позволить индуцировать вызванный контактом фенотип.

[0140] В некоторых вариантах реализации соотношение, в котором популяции B- и T-клеток присутствуют в совместной культуре, позволяет активацию T-клеток.

[0141] В некоторых вариантах реализации соотношение, в котором популяции B- и T-клеток присутствуют в совместной культуре, позволяет активацию T-клеток из подгруппы T-клеток, экспрессирующих специфические TCR. В некоторых вариантах реализации соотношение, в котором две или более популяций клеток присутствуют в совместной культуре, находится в диапазоне от 1000:1 до 1:1000. В некоторых вариантах реализации указанное соотношение достаточное, чтобы привести к активации клеток с TCR.

[0142] В некоторых вариантах реализации совместная культура или композиция содержит a) T-клетки Jurkat, которые были сконструированы для экспрессии человеческих CD8a, CD8b и библиотеки вариантов TCR, и в которых отсутствует эндогенная экспрессия TCR; и b) аутологические B-клетки человека, которые иммортализованы, и причем аутологические B-клетки человека экспрессируют множество антигенов в виде отдельных минигенов или TMG. В некоторых вариантах реализации совместная культура поддерживается в культуральном сосуде или культуральном мешке, и популяции B- и T-клеток присутствуют в соотношении, которое позволяет активацию T-клеток. Антигенспецифическая активация T-клеток опосредуется только специфическими TCR в библиотеке TCR.

[0143] В некоторых вариантах реализации присутствует количество и/или соотношение T-клеток (экспрессирующих пары TCR) к B-клеткам (предоставляющим неоантигены), составляющее по меньшей мере 2 к 2, например, по меньшей мере 10 к 10, по меньшей мере 1000 (пар TCR) к 10 (неоантигенам), по меньшей мере 10000 (пар TCR) к

10 (неоантигенам), по меньшей мере 10000 (пар TCR) к 100 (неоантигенам), по меньшей мере 10000 (пар TCR) к 1000 (неоантигенам), по меньшей мере 100000 (пар TCR) к 10, 100, 1000 или 10000 (антигенам), по меньшей мере 50 к 50, по меньшей мере 100 к 100, по меньшей мере 1000000 (TCR) к 10000 (антигенам), включая любой диапазон, установленный между любыми двумя из перечисленных выше соотношений. В некоторых вариантах реализации одна пара TCR и/или антиген присутствует в каждой клетке (Т или В), так что каждое из указанных выше количеств может представлять также количество клеток.

[0144] В некоторых вариантах реализации композиция содержит совместную культуру В- и Т-клеток, в которой Т-клетки экспрессируют по меньшей мере две различные пары TCR, и в которой В-клетки экспрессируют по меньшей мере два различных антигена.

[0145] В некоторых вариантах реализации присутствует множество TCR в Т-клетках и множество антигенов в В-клетках. В некоторых вариантах реализации композиция сформирована таким образом, что можно вызвать активацию Т-клеток, опосредованную по меньшей мере одним TCR и одним антигеном (или по меньшей мере двумя или более TCR и/или двумя или более антигенами). В некоторых вариантах реализации в композиции присутствуют низкие фоновые уровни CD69. В некоторых вариантах реализации композиция содержит аутологические АПК (или аутологические иммортализованные В-клетки). В некоторых вариантах реализации Т-клетки сконструированы для экспрессии библиотеки TCR (и/или в них отсутствует экспрессия эндогенного TCR). В некоторых вариантах реализации Т-клетки сконструированы таким образом, что они лишены экспрессии нативного TCR, но способны к опосредованной TCR активации посредством экзогенных пар TCR.

[0146] В некоторых вариантах реализации предложена совокупность клеток. Совокупность содержит: группу из по меньшей мере двух Т-клеток. В некоторых вариантах реализации каждая сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной пары TCR-альфа и TCR-бета. В некоторых вариантах реализации каждая из TCR-альфа и TCR-бета происходит из организма субъекта, Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR, и указанная группа сконструирована для активации одного или более маркеров активации Т-клеток. Совокупность дополнительно содержит группу из по меньшей мере двух В-клеток. Каждая из по меньшей мере двух В-клеток сконструирована для экспрессии по меньшей

мере одного экзогенного неоантигена (или антигена), так что способны продуцироваться по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена), и указанные по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена) такие же, как в организме субъекта.

[0147] В некоторых вариантах реализации, в композиции с клетками, группа из по меньшей мере двух В-клеток содержит: по меньшей мере первую В-клетку, которая продуцирует экзогенный неоантиген (или антиген); и по меньшей мере вторую В-клетку, которая продуцирует второй экзогенный неоантиген (или антиген).

[0148] В некоторых вариантах реализации предложена библиотека TCR (или экспрессирующих TCR клеток). Указанная библиотека содержит: группу из по меньшей мере трех Т-клеток, причем по меньшей мере две из Т-клеток сконструированы для экспрессии по меньшей мере двух пар TCR-альфа и TCR-бета (по меньшей мере двух пар TCR), причем указанные по меньшей мере две пары TCR происходят из организма субъекта, причем по меньшей мере три Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR, причем указанные по меньшей мере три Т-клетки сконструированы для активации одного или более маркеров активации Т-клеток при связывании с антигеном (или неоантигеном), презентированным В-клеткой, причем количество геномных копий каждой пары TCR, которое отражается количеством клеток с TCR, такое, что можно узнать количество всех TCR в образце, и при этом по меньшей мере один из TCR не распределен равномерно по всей композиции, составляющей библиотеку.

[0149] В некоторых вариантах реализации распределение по меньшей мере одной Т-клетки изменяется в результате связывания с антигеном, презентированным В-клеткой. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере две пары TCR приблизительно равномерно присутствуют в библиотеке.

[0150] В некоторых вариантах реализации предложена совокупность клеток. Совокупность содержит: группу из по меньшей мере двух Т-клеток, причем каждая сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем указанная пара происходит из организма субъекта, в котором Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR, и причем указанная группа сконструирована для активации одного или более маркеров активации Т-клеток. Совокупность клеток может дополнительно содержать группу из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток (АПК), в которой каждая из по меньшей мере двух АПК сконструирована для экспрессии

по меньшей мере одного экзогенного неоантигена (или антигена), так что способны продуцироваться по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена), и при этом по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена) одинаковы с присутствующими у субъекта.

[0151] В некоторых вариантах реализации группа или набор содержит первую популяцию Т-клеток и вторую популяцию Т-клеток. В некоторых вариантах реализации первая популяция Т-клеток состоит из Т-клеток с некоторым общим фенотипом, который можно измерить. В некоторых вариантах реализации первая популяция Т-клеток содержит Т-клетки с общим фенотипом активации Т-клеток. В некоторых вариантах реализации первая популяция Т-клеток может представлять собой выбранную при селекции популяцию Т-клеток.

[0152] В некоторых вариантах реализации первая популяция Т-клеток содержит Т-клетки с общим некоторым уровнем экспрессии одного маркера или большего числа маркеров. В некоторых вариантах реализации первая популяция Т-клеток содержит Т-клетки с общей экспрессией одного или более маркеров активации Т-клеток или маркеров.

[0153] В некоторых вариантах реализации Т-клетки экспрессируют библиотеку молекул вариантных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации Т-клетки экспрессируют библиотеку TCR.

[0154] В некоторых вариантах реализации вторая популяция Т-клеток может представлять собой референсную популяцию. Референсная популяция может представлять собой выбранную при селекции или не выбранную при селекции популяцию Т-клеток, которые экспрессируют такую же библиотеку TCR, которая экспрессируется первой выбраной при селекции популяцией Т-клеток. В некоторых вариантах реализации референс представляет собой пул плазмид из той же библиотеки TCR, которая экспрессируется первой популяцией Т-клеток.

[0155] В некоторых вариантах реализации количество каждого TCR такое, что можно узнать количество всех TCR в образце, и при этом присутствует по меньшей мере одна пара TCR, которая неравномерно распределена по всей композиции. В некоторых вариантах реализации число геномных копий каждой пары TCR, которое отражается количеством клеток с TCR, такое, что можно узнать количество всех TCR в образце. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один из TCR не экспрессируется

равномерно по всей композиции, составляющей библиотеку. В некоторых вариантах реализации большая часть TCR приблизительно равномерно представлена среди выбраной при селекции популяции Т-клеток и в референсе. В некоторых вариантах реализации более чем 90% всех TCR, присутствующих в библиотеке TCR, представлены как в первой популяции Т-клеток, так и во второй популяции Т-клеток (например, референсной популяции). В некоторых вариантах реализации более чем 99% всех TCR, присутствующих в библиотеке TCR, представлены как в первой популяции Т-клеток, так и во второй популяции Т-клеток.

[0156] В некоторых вариантах реализации первая популяция обогащена одним или более TCR относительно второй популяции. В некоторых вариантах реализации первая популяция статистически значимо обогащена одним или более TCR относительно второй популяции.

[0157] В некоторых вариантах реализации композиция содержит TCR (или клетки, экспрессирующие указанные TCR), которые представляют собой верхние 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или по меньшей мере 10% для данного способа скрининга, например, при сравнении верхних и нижних образцов.

[0158] В некоторых вариантах реализации более 99% всех TCR присутствуют среди первой (выбраной при селекции) популяции Т-клеток. В некоторых вариантах реализации большая часть TCR в композиции приблизительно равномерно распределена среди первой популяции Т-клеток и второй (например, в данном случае референсной) популяции.

[0159] В некоторых вариантах реализации идентифицирована, выделена и/или предложена по меньшей мере одна пара TCRαβ с желательными свойствами. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна пара TCRαβ с желательными свойствами происходит из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ИОЛ). В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна пара TCRαβ с желательными свойствами происходит из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ИОЛ) и применяется для терапии рака у того же субъекта. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна пара TCRαβ с желательными свойствами происходит из периферической крови. В некоторых вариантах реализации желательное свойство представляет собой специфичность к антигену. В некоторых вариантах реализации желательное свойство представляет собой распознавание

неоантигена. В некоторых вариантах реализации желательное свойство представляет собой распознавание вирусного антигена. В некоторых вариантах реализации желательное свойство представляет собой распознавание общего антигена, экспрессируемого клетками опухоли. В некоторых вариантах реализации желательное свойство представляет собой рестрикцию по ГКГС I класса или ГКГС II класса. В некоторых вариантах реализации желательное свойство представляет собой авидность к антигену. В некоторых вариантах реализации желательное свойство представляет собой отсутствие реактивности по отношению к антигену. В некоторых вариантах реализации желательно множество свойств. В некоторых вариантах реализации указанная пара TCR сконфигурирована для придания любого одного или более из указанных свойств.

[0160] В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одну пару TCRαβ с желательными свойствами применяют, и/или получают, и/или приспосабливают для терапии. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одну пару TCRαβ применяют, и/или получают, и/или приспосабливают для терапии. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одну пару TCRαβ применяют или конструируют для применения для терапии рака. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одну пару TCRαβ применяют, и/или получают, и/или приспосабливают для терапии инфекционного заболевания. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одну пару TCRαβ применяют, и/или получают, и/или приспосабливают для терапии аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одну пару TCRαβ применяют, и/или получают, и/или приспосабливают для конструирования рекомбинантного белка для терапии. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный белок вводят для терапии.

[0161] В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одну пару TCRαβ применяют для конструирования Т-клеток для терапии. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере две пары TCRαβ применяют для конструирования Т-клеток для терапии. В некоторых вариантах реализации более чем две пары TCRαβ применяют для конструирования Т-клеток для терапии. В некоторых вариантах реализации пять пар TCRαβ применяют для конструирования Т-клеток для терапии. В некоторых вариантах реализации десять пар TCRαβ применяют для конструирования Т-клеток для терапии. В некоторых вариантах реализации двадцать пар TCRαβ применяют для конструирования Т-клеток для

терапии. В некоторых вариантах реализации сконструированные Т-клетки вводят для терапии. В некоторых вариантах реализации пару TCRαβ внедряют в Т-клетки, применяя вирус. В некоторых вариантах реализации вирус представляет собой лентивирус. В некоторых вариантах реализации вирус представляет собой ретровирус. В некоторых вариантах реализации вирус представляет собой аденовирус. В некоторых вариантах реализации вирус опосредует встраивание TCR в геном Т-клетки.

[0162] В некоторых вариантах реализации вирус приводит к временной экспрессии TCR. В некоторых вариантах реализации вирус несет ДНК TCR как матрицу для репарации двухцепочечных разрывов в геноме Т-клеток с помощью направляемой гомологией репарации (НГР).

[0163] В некоторых вариантах реализации пару TCRαβ внедряют в Т-клетки, применяя невирусные способы доставки генов. В некоторых вариантах реализации невирусный способ доставки генов основан на электропорации. В некоторых вариантах реализации невирусный способ доставки генов основан на других способах, которые позволяют осуществить временное перфорирование мембраны Т-клеток, чтобы доставить компоненты в Т-клетку. В некоторых вариантах реализации невирусный способ доставки генов включает транспозазы. В некоторых вариантах реализации невирусный способ доставки генов включает нуклеазы.

[0164] В некоторых вариантах реализации нуклеаза представляет собой комплекс CRISPR/Cas9.

[0165] В некоторых вариантах реализации сконструированные Т-клетки модифицированы TCR и дополнительно генетически модифицированы для контроля их фенотипа и реактивности.

[0166] В некоторых вариантах реализации сконструированные Т-клетки, экспрессирующие различные пары TCRαβ со специфичностью к различным антигенам, комбинируют с получением композиции клеток для введения. В некоторых вариантах реализации комбинация позволяет нацелиться на множество антигенов, что может быть более эффективным, чем монотерапия. В некоторых вариантах реализации комбинация позволяет объединить Т-клетки, рестриктированные как по ГКГС I класса, так и по ГКГС II класса, которые могут действовать синергично для терапии солидного рака. В некоторых вариантах реализации комбинация позволяет одновременно нацелиться как на основные

(truncal), так и на дополнительные (branch) мутации опухоли. В некоторых вариантах реализации комбинация основана на использовании равных соотношений каждой сконструированной популяции Т-клеток. В некоторых вариантах реализации комбинация основана на использовании различных количеств клеток каждой сконструированной популяции Т-клеток.

[0167] В некоторых вариантах реализации композиция содержит сконструированный Т-клеточный продукт на основе использования более чем одного гена TCR. В некоторых вариантах реализации сконструированная Т-клетка отвечает по меньшей мере одному из следующих критериев: она аутологична для пациента, получающего ее; она происходит из ИОЛ; в ней используется по меньшей мере один TCR I класса и один TCR II класса; и в ней используются равные соотношения.

[0168] В некоторых из вариантов реализации, предложенных в настоящей заявке, обходят потребность получить нативные комбинации цепей TCRα и TCRβ, и такие варианты реализации можно применять по отношению к нежизнеспособному клеточному материалу и нежизнеспособным образцам ткани. Путем создания комбинаторных библиотек TCRαβ, некоторые варианты реализации настоящего изобретения позволяют идентификацию антигенспецифических пар TCRαβ из сохраненных или архивных образцов. Например, варианты реализации настоящего изобретения могут решить проблему, связанную со смешиванием мРНК-транскриптов TCRα и TCRβ из различных Т-клеток, возникшую в результате утраты целостности клеточной мембраны нежизнеспособных Т-клеток. В таких смесях, информация об исходных парах TCRαβ утрачена. Некоторые варианты реализации способов, предложенных в настоящей заявке, решают проблему низкой чувствительности ранее описанных технологий скрининга библиотеки TCR, вызванную смещением полученных библиотек TCR в сторону последовательностей TCR с высокой частотой встречаемости. Некоторые варианты реализации способов, предложенных в настоящей заявке, устраняют необходимость включать полный репертуар полученных цепей TCR в последующие применения, позволяя, например, сфокусировать обнаружение TCR на цепях TCR с желательными свойствами. В отличие от подходов с отдельными клетками, таких как устройства для капельной ПЦР и микрофлюидные устройства, для способов получения определенных пар TCRαβ из Т-клеток, описанных в настоящей заявке, не требуется особое оборудование и

жизнеспособный клеточный материал, которые ограничивают масштабируемость. В отличие от способов массового ПЦР для получения совокупностей последовательностей TCRα и TCRβ из популяции Т-клеток, которые *a priori* не позволяют получить нативные пары TCRαβ, в способах, описанных в настоящей заявке, используется дизайн для получения определенной части идентифицированного репертуара TCR, чтобы получить интересующие пары TCRαβ.

[0169] Способы, описанные в настоящей заявке, можно применять в терапевтических и диагностических целях, и/или композициях, и/или лекарственных средствах. Рекомбинантные гены TCR можно применять для получения Т-клеток с желательной специфичностью для иммунотерапии, включая, например, иммунотерапию рака. Для применения для иммунотерапии рака, Т-клетки с желательной специфичностью можно получить путем выбора генов TCR для получения антигенспецифических Т-клеток путем переноса генов TCR. В некоторых вариантах реализации указанный подход основан на наблюдении, что антигенспецифичность можно переносить между Т-клетками путем переноса генов, кодирующих пару TCRαβ. Интересующие гены TCR можно внедрить в геном Т-клеток человека, применяя γ-ретровирусные или лентивирусные векторы, платформы доставки генов на основе транспозонов, доставку мРНК (например, с помощью электропорации или наночастиц) или инструменты для конструирования генома, включая CRISPR/Cas9. Последний инструмент позволяет одновременный нокаут эндогенных цепей TCR путем сайт-специфического встраивания новых цепей TCR в эндогенные локусы TCR.

[0170] В некоторых вариантах реализации полученную в результате этого выбранную пару молекул применяют для лечения субъекта и/или для получения лекарственного средства для субъекта для любого из расстройств, описанных в настоящей заявке.

[0171] В некоторых вариантах реализации предложен способ лечения субъекта. Указанный способ включает идентификацию субъекта, имеющего опухоль; предоставление группы из по меньшей мере двух Т-клеток, каждая из которых сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной отличной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета происходит из указанного субъекта, предоставление группы из по меньшей мере двух В-клеток, причем указанная группа В-клеток сконструирована для экспрессии по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов, и причем

по меньшей мере два экзогенных неоантигена одинаковы с неоантигенами, обнаруженными у субъекта; объединение группы из по меньшей мере двух Т-клеток с группой из по меньшей мере двух В-клеток и селекцию комбинации из по меньшей мере двух пар TCR на основании активации по меньшей мере двух Т-клеток посредством по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов; и введение комбинации из по меньшей мере двух пар TCR субъекту, тем самым осуществляя лечение опухоли. В некоторых вариантах реализации любое из соотношений Т-клеток к В-клеткам, предложенное в настоящей заявке, можно использовать в указанном процессе. В некоторых вариантах реализации лечение уменьшает размер опухоли. В некоторых вариантах реализации оно уменьшает размер опухоли на по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 95, 99 или 100%, включая любой диапазон, установленный между любыми двумя из перечисленных выше значений.

[0172] В некоторых вариантах реализации предложен способ лечения субъекта. Указанный способ включает идентификацию субъекта, имеющего опухоль; предоставление группы из по меньшей мере двух Т-клеток, каждая из которых сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной отличной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета происходит из указанного субъекта; предоставление группы из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток, причем группа антигенпрезентирующих клеток происходит из организма субъекта, сконструирована для экспрессии по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов, и при этом по меньшей мере два экзогенных неоантигена одинаковы с неоантигенами, обнаруженными у субъекта; объединение группы из по меньшей мере двух Т-клеток с группой из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток и селекцию комбинации из по меньшей мере двух пар TCR на основании активации по меньшей мере двух Т-клеток посредством по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов; и введение комбинации из по меньшей мере двух пар TCR субъекту, тем самым осуществляя лечение опухоли. В некоторых вариантах реализации присутствует более чем две пары TCR, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или можно использовать больше пар TCR. В некоторых вариантах реализации пары TCR вводят посредством клеточной терапии. В некоторых вариантах реализации последовательности у указанных пар отличные от таковых у других пар.

[0173] В некоторых вариантах реализации любую из выбранных пар TCR или комбинаций пар, предоставленных здесь с помощью любого из способов, можно применять в способах лечения, предложенных в настоящей заявке.

[0174] В некоторых вариантах реализации предложена фармацевтическая композиция. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит первую пару TCR, которая связывается с первым антигеном (или неоантигеном) в опухоли субъекта; и вторую пару TCR, которая связывается со вторым антигеном (или неоантигеном) в опухоли субъекта. В некоторых вариантах реализации присутствует более чем две пары TCR, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или можно использовать больше пар TCR. В некоторых вариантах реализации пары TCR вводят посредством клеточной терапии. В некоторых вариантах реализации последовательности у пар отличны от таковых у других пар. В некоторых вариантах реализации первая пара TCR рестриктирована по ГКГС I класса и при этом вторая пара TCR рестриктирована по ГКГС II класса.

[0175] В некоторых вариантах реализации предложена фармацевтическая композиция. Она может содержать первую пару TCR, которая связывается с первым антигеном и рестриктирована по ГКГС I класса; и вторую пару TCR, которая связывается со вторым антигеном и рестриктирована по ГКГС II класса.

[0176] В некоторых вариантах реализации композиция может дополнительно содержать третью пару TCR.

[0177] В некоторых вариантах реализации первая пара TCR связывается с неоантигеном из опухоли, при этом вторая пара TCR связывается с неоантигеном из указанной опухоли, и при этом как первая, так и вторая пары TCR присутствуют в организме хозяина опухоли.

[0178] Рекомбинантные гены TCR для терапевтического применения при раке можно получить из различных источников. Во-первых, можно детектировать и выделить Т-клетки со специфичностью к антигенам опухоли из жизнеспособных образцов пациента, таких как кровь или ткань опухоли. Технологии, описанные в данной области техники, включают выделение связывающих ГКГС-мультимер Т-клеток, а также выделение Т-клеток, экспрессирующих некоторые фенотипические маркеры или секретирующих некоторые цитокины после стимуляции антигеном, с помощью проточной цитометрии или селекции на магнитных гранулах. Затем выделенные антигенспецифические Т-клетки

можно применять для определения последовательности экспрессированных генов TCR с помощью методик на основе ПЦР отдельных клеток, секвенирования всех цепей TCR или методик ПЦР на микрофлюидной основе. Во-вторых, системы или модели на животных алло-CTL (например, трансгенные по HLA и/или трансгенные по TCR человека модели на мышах) являются альтернативным источником специфических к антигенам опухоли Т-клеток/TCR. В-третьих, терапевтические гены TCR можно выбрать из мутированных *in vitro* цепей TCR, экспрессированных в виде рекомбинантных библиотек TCR в системах дисплея в фаге, дрожжах или Т-клетках.

[0179] Т-клетки (или TCR) для терапии рака можно выбрать на основании желательных терапевтических критериев; во-первых, гены TCR, используемые для терапии рака, в идеале, распознают опухолеспецифический антиген с низкой или отсутствующей экспрессией в жизнеспособных тканях. Во-вторых, TCR должны распознавать антиген с высокой чувствительностью, например, небольшие количества антигена должны запускать эффекторные функции модифицированных TCR Т-клеток против опухолевых клеток, например, цитолитическую активность. В-третьих, TCR не должен проявлять перекрестную реактивность против других антигенов с экспрессией в жизнеспособных тканях.

[0180] Путем переноса генов TCR можно нацелиться на различные опухолевые антигены, включая специфические для линий клеток антигены (например, MART-1), сверхэкспрессированные антигены (например, WT-1), антигены рака яичка (C/T) (такие как NY-ESO-1, MAGE-A4, MAGE-A10), вирусные антигены (например, HPV E6, E7) и мутированные белки (неоантигены). Примечательно, что последовательности специфических к неоантигену TCR могут быть особенно подходящими для лечения рака. Например, специфические к неоантигену Т-клетки коррелировали с регрессией распространенного метастатического рака как после терапии путем блокирования иммунных контрольных точек, так и после адоптивной Т-клеточной терапии. Так как подавляющее большинство геномных мутаций в опухоли являются мутациями-пассажирами и обнаруживаются лишь в небольшой доле опухолей, и вследствие рестрикции по ГКГС, репертуар опухолевых неоантигенов, которые могут узнаваться Т-клетками, в значительной степени отличается между отдельными пациентами. Таким образом, для использования переноса генов TCR для получения специфических к

неоантигену Т-клеток для терапии часто будет требоваться одна или более новых специфических к неоантигену последовательностей TCR для каждого пациента или опухоли. Учитывая требования безопасности к любому TCR, используемому для переноса генов TCR, коммерчески масштабируемый подход, в идеале, основан на аутологической ткани, так как можно полагать, что специфические к неоантигену TCR, происходящие непосредственно из пациента, безопасны. Более того, использование нежизнеспособной ткани, такой как архивные образцы опухоли, например, предпочтительно, чтобы добиться коммерчески масштабируемого процесса, так как это позволяет избежать потребности работать с жизнеспособными клетками пациента для выделения TCR. Способы, описанные в настоящей заявке, направлены на удовлетворение значительной потребности в идентификации значимых специфических к неоантигену TCR с высокой чувствительностью для каждого отдельного пациента. Кроме того, перенос генов специфических к неоантигену TCR, предложенный в способах, описанных в настоящей заявке, может принести пользу пациентам, которые не получают пользу от других способов лечения, таких как, например, блокирование иммунных контрольных точек.

[0181] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает: а) предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит: комбинацию 1) первой вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей вариантную последовательность аминокислот TCRα и определяющей первый конец непрерывного участка, и 2) второй вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей вариантную последовательность аминокислот TCRβ и определяющей второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу. Способ дополнительно включает введение указанной библиотеки в популяцию иммортализованных Т-клеток, сконструированных для экспрессии TCRα- и TCRβ-цепей, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот, и селекцию субпопуляции из популяции иммортализованных Т-клеток на основании экспрессии маркера активации Т-клеток выше порогового уровня в ответ на приведение в контакт иммортализованных Т-клеток с

иммортализованными В-клетками, экспрессирующими антиген, причем указанная субпопуляция содержит множество Т-клеток, и/или выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции; и/или определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и/или идентификацию по меньшей мере одной комбинации первой и второй вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании обогащения подгруппы по меньшей мере одной комбинацией последовательностей нуклеотидов относительно контроля.

[0182] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей шарнирный домен, трансмембранный домен и/или внутриклеточный сигнальный домен химерного антигенного рецептора (CAR), из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает: предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит комбинацию двух или более из: 1) первой вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей шарнирный домен CAR; 2) второй вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей трансмембранный домен CAR; и 3) третьей вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей внутриклеточный сигнальный домен CAR. Одна из первой, второй или третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет первый конец непрерывного участка, и другая одна из первой, второй или третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу. Способ дополнительно включает введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии CAR, кодируемого представителем множества вариантных нуклеиновых кислот, причем популяция клеток включает популяцию иммортализованных Т-клеток или первичных Т-клеток человека. Способ может дополнительно включать селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании пролиферации клеток выше порогового уровня в ответ на приведение клеток в контакт с антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими антиген, специфичный к связывающему антиген домену CAR, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток. Способ может дополнительно

включать выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции, и/или определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и/или идентификацию по меньшей мере одной комбинации первой, второй и третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании обогащения подгруппы по меньшей мере одной комбинацией последовательностей нуклеотидов относительно контроля.

Определения

[0183] По всему тексту настоящего описания термин «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «включающий», следует понимать как подразумевающий включение указанных элементов, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов, но не исключение какого-либо другого элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов.

[0184] Следующие разъяснения терминов и способов предложены для лучшего описания настоящего изобретения и чтобы обучить средних специалистов в данной области осуществлению настоящего изобретения. Формы единственного числа обозначают один или более чем один, если в контексте явно не указано иное. Например, термин «содержащий молекулу нуклеиновой кислоты» включает одну или множество молекул нуклеиновых кислот, и считают, что он эквивалентен формулировке «содержащий по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты». Термин «или» относится к одному элементу из указанных альтернативных элементов или к комбинации двух или более элементов, если в контексте явно не указано иное. В данной заявке, «содержит» означает «включает». Таким образом, «включающий A или B», означает «включая A, B или A и B», без исключения дополнительных элементов. Если не указано иное, определения, предложенные в настоящей заявке, имеют преимущественную силу в случаях, когда определения в настоящей заявке отличаются от других возможных определений.

[0185] Если не объясняется иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют те же значения, которые обычно понимает средний специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Все идентификаторы (ID) Комитета по номенклатуре генов HUGO (HGNC), упомянутые в настоящей заявке, полностью включены в него посредством ссылки. Хотя способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящей заявке, можно применять

для осуществления или тестирования настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Материалы, способы, и примеры являются лишь иллюстрирующими и не предназначены для ограничения.

[0186] «Т-клеточный рецептор» или «TCR» обозначает молекулу, находящуюся на поверхности Т-клеток, или Т-лимфоцитов, которая распознает антиген, связанный в виде пептидов с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). Молекулы ГКГС включают молекулы ГКГС I класса, II класса, и III класса. Как I класс, так и II класс играют решающую роль в иммунном ответе. Молекулы ГКГС I класса экспрессируются во всех содержащих ядро клетках, а также в тромбоцитах — по существу, во всех клетках, кроме красных кровяных клеток (эритроцитов). Они презентируют эпитопы киллерным Т-клеткам, также называемым цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL). ГКГС II класса могут экспрессироваться в зависимости от условий всеми типами клеток, но обычно встречаются только на «профессиональных» антигенпрезентирующих клетках (АПК): макрофагах, В-клетках и, особенно, на дендритных клетках (ДК). АПК поглощает антигенный белок, осуществляет процессинг антигена, возвращает его молекулярную фракцию — фракцию, называемую эпитопом, — и выставляет ее на поверхности АПК, соединенную с молекулой ГКГС II класса (презентация антигена). На поверхности клетки эпитоп может распознаваться иммунологическими структурами, такими как Т-клеточные рецепторы (TCR). В некоторых вариантах реализации TCR содержит две полипептидные цепи: TCRα и TCRβ (кодируемые *TRA* и *TRB*, соответственно). В некоторых вариантах реализации TCR содержит цепи TCRγ и TCRδ (кодируемые *TRG* и *TRD*, соответственно). В некоторых вариантах реализации TCR содержит внеклеточную вариабельную область и внеклеточную константную область. В некоторых вариантах реализации вариабельный домен цепей TCRα и TCRβ содержит три гипервариабельные определяющие комплементарность области (CDR), обозначенные CDR1, CDR2 и CDR3. В некоторых вариантах реализации CDR3 является главной распознающей антиген областью. В некоторых вариантах реализации гены цепи TCRα содержат сегменты гена V и J, и гены цепи TCRβ содержат сегменты V, D и J, которые вносят вклад в разнообразие TCR.

[0187] В настоящей заявке термин «репертуар TCR» относится к совокупности цепей TCR в образце или библиотеке. Совокупность может содержать по меньшей мере два или более различных вариантов цепи TCR. В некоторых вариантах реализации «репертуар

TCR» относится к совокупности всех цепей TCR в образце или библиотеке. В некоторых вариантах реализации «репертуар TCR» относится к совокупности из подгруппы или выборки цепей TCR в образце или библиотеке. В некоторых вариантах реализации «репертуар TCR» относится к совокупности пар TCRαβ в образце или библиотеке. В некоторых вариантах реализации «репертуар TCR» относится к совокупности из подгруппы или выборки пар TCRαβ в образце или библиотеке.

[0188] Подгруппа или выборка цепей TCR может быть основана, например, на частоте встречаемости цепей TCR. В некоторых вариантах реализации «частота встречаемости цепи TCR» относится к абсолютному количеству молекул нуклеиновых кислот (РНК и/или ДНК), кодирующих (часть) определенную(-ой) последовательность(-и) цепи аминокислот TCR, среди всех нуклеиновых кислот, кодирующих (часть) все последовательности цепей TCR аминокислот. В некоторых вариантах реализации абсолютное количество молекул нуклеиновых кислот, кодирующих (часть) определенную(-ой) последовательность(-и) цепи аминокислот TCR, можно определить на основании подсчета уникальных молекул с использованием «уникального молекулярного идентификатора» (UMI) (как принцип, например, описан в Kivioja et Nat Meth 2011 и Islam et Nat Meth 2013). В некоторых вариантах реализации частоту встречаемости цепи TCR можно выразить в процентах. Общее количество всех цепей TCR может включать молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие только TCRα-цепи, только TCRβ-цепи или как TCRα-, так и TCRβ-цепи. В некоторых вариантах реализации частоту встречаемости выражают как частоту встречаемости цепи TCR, равную и выше, равную, выше или ниже 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% цепей в образце, или любое число или диапазон между указанными значениями. Используя абсолютные количества молекул нуклеиновых кислот, кодирующих (часть) последовательность(-и) цепи аминокислот TCR или соответствующие проценты, можно получить порядок ранжирования цепей TCR. В некоторых вариантах реализации частоту встречаемости выражали как встречаемость цепи TCR среди верхних 1000, верхних 900, верхних 800, верхних 700, верхних 600, верхних 500, верхних 450, верхних 400, верхних 350, верхних 300, верхних 250, верхних 200, верхних 150, верхних 140, верхних 130, верхних 120, верхних 110, верхних 100, верхних 90, верхних 80, верхних 70, верхних 60, верхних 50, верхних 40, верхних 30, верхних 20, верхних 10, верхних 5, или любого числа

или диапазона между указанными значениями, цепей в образце в порядке ранжирования. В некоторых вариантах реализации «частота встречаемости цепи TCR» относится к частоте встречаемости цепи TCR относительно всех цепей TCR в образце. В некоторых вариантах реализации «частота встречаемости цепи TCR» относится к частоте встречаемости цепи TCR относительно меньшего количества, чем все, или относительно подгруппы цепей TCR в образце.

[0189] В настоящей заявке термин «порог частоты встречаемости» относится к минимальной частоте встречаемости, при которой указанная цепь TCR встречается в образце, чтобы ее включили в подгруппу или выборку цепей TCR. В некоторых вариантах реализации порог частоты встречаемости включает верхние 1000, верхние 900, верхние 800, верхние 700, верхние 600, верхние 500, верхние 450, верхние 400, верхние 350, верхние 300, верхние 250, верхние 200, верхние 150, верхние 140, верхние 130, верхние 120, верхние 110, верхние 100, верхние 90, верхние 80, верхние 70, верхние 60, верхние 50, верхние 40, верхние 30, верхние 20, верхние 10, верхние 5, или любое число или диапазон между указанными значениями, цепей TCR в образце в порядке ранжирования. В некоторых вариантах реализации порог частоты встречаемости выражают как включающий все цепи TCR, которых ровно и больше, ровно и меньше, ровно, больше или меньше 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или любого числа или диапазона между указанными значениями, цепей в образце. В некоторых вариантах реализации «порог частоты встречаемости» относится к порогу относительно всех цепей TCR в образце. В некоторых вариантах реализации «порог частоты встречаемости» относится к порогу относительно меньшего количества, чем все, или относительно подгруппы цепей TCR в образце.

[0190] В настоящей заявке термин «относительное обогащение» относится к большей распространенности или частоте встречаемости цепи TCR в одном образце по сравнению с другим образцом. Образцы, которые можно сравнить, включают, например, образец опухоли и кровь, различные образцы опухоли, образец опухоли и образец не из опухоли, образцы из различных областей из одной опухоли, образцы из центра опухоли и границы или края опухоли, образцы из Т-клеток в различных состояниях активации или дифференцировки, и другие образцы.

[0191] В настоящей заявке термин «рецептор-переключатель» используют в соответствии с его пониманием специалистом в данной области, и он включает рецепторы-переключатели, включая, но не ограничиваясь молекулами рецептора, которые используют для преобразования внеклеточных сигналов, обычно связанных с ингибированием или апоптозом Т-клеток, в сигнал активации Т-клеток. Это можно осуществить путем слияния внеклеточного домена (ECD), связывающего ингибиторный или вызывающий апоптоз лиганд (например, но не ограничиваясь TGFBR2, FAS или TIGIT), с внутриклеточным сигнальным доменом (ISD) из активирующего Т-клетку рецептора (такого как CD3ε, CD28, IL2RB). Квалифицированный специалист поймет, что слитая молекула рецептора также может быть разработана таким образом, чтобы она ингибировала функцию Т-клетки, путем объединения ECD, связывающих активирующие Т-клетки лиганды, с ISD из ингибирующих Т-клетки рецепторов (например, PD-1 или CTLA-4). В некоторых вариантах реализации рецепторы-переключатели могут содержать, не ограничиваясь перечисленными, ECD, слитый с одним, двумя или еще большим количеством сигнальных доменов. В некоторых вариантах реализации молекулы рецепторов-переключателей включают, но не ограничены молекулами рецепторов, которые содержат различные трансмембранные домены (TM) дополнительно к доменам ECD и ISD или любые другие новые компоненты, включая, но не ограничиваясь последовательностями линкера или спейсера между различными доменами, включая, но не ограничиваясь ECD и TM и/или TM и ISD.

[0192] В настоящей заявке термин «одноцепочечный TCR» используют в соответствии с его пониманием специалистом в данной области техники. Указанный термин дополнительно включает, но не ограничен ковалентным связыванием фрагментов вариабельных цепей TCRα и TCRβ с помощью линкера. Одноцепочечные TCR включают, но не ограничены ковалентным связыванием фрагментов вариабельных цепей TCRα и TCRβ с помощью линкера, слитого с константным доменом TCRβ, который коэкспрессируется с константным доменом TCRα транс-активно. В некоторых вариантах реализации одноцепочечные TCR включают, но не ограничены ковалентным связыванием фрагментов вариабельных цепей TCRα и TCRβ с помощью линкера, слитого с константным доменом TCRα, который коэкспрессируется с константным доменом TCRβ транс-активно. Некоторые варианты реализации одноцепочечных TCR включают, но не ограничены

ковалентным связыванием фрагментов вариабельных цепей TCRα и TCRβ с помощью линкера и слиянием с сигнальными доменами CD3ε или CD3ζ отдельно или в комбинации с сигнальным доменом CD28.

[0193] В настоящей заявке термин «пространственный паттерн экспрессии генов» относится к экспрессии гена в определенной области или пространстве. В некоторых вариантах реализации «пространственный паттерн экспрессии генов» относится к экспрессии гена внутри ткани, такой как опухоль, т.е., к внутриопухолевой экспрессии. В некоторых вариантах реализации «пространственный паттерн экспрессии генов» относится к повышению экспрессии генов в области или пространстве, характеризуемом экспрессией или отсутствием экспрессии одного или более фенотипических маркеров. В некоторых вариантах реализации фенотипический маркер может представлять собой любой маркер, ассоциированный с фенотипом, включая, но не ограничиваясь одним или более маркерами поверхности или их фрагментами, одним или более белками или их фрагментами, одной или более РНК, такими как микроРНК, миРНК или любая другая РНК. В других вариантах реализации «пространственный паттерн экспрессии генов» относится к экспрессии или отсутствию экспрессии одного гена в комбинации с экспрессией или в отсутствием экспрессии по меньшей мере одного другого гена.

[0194] В настоящей заявке термин «паттерн коэкспрессии» включает экспрессию одного или более генов в одной и той же клетке или в одном и том же образце ткани. В некоторых вариантах реализации термин «паттерн коэкспрессии» относится к отсутствию экспрессии одного или более генов в одной и той же клетке или в одном и том же образце ткани.

[0195] Термин «рак» обозначает злокачественное новообразование, которое претерпело характерную анаплазию с утратой дифференцировки, повышенной скоростью роста, инвазией в окружающую ткань, и способно к метастазированию. Термин «рак» следует понимать как включающий заболевание, которое характеризуется неконтролируемым ростом клеток внутри субъекта. В некоторых вариантах реализации термины «рак» и «опухоль» используют взаимозаменяемо. В некоторых вариантах реализации термин «опухоль» относится к доброкачественному или незлокачественному росту.

[0196] Термин «библиотека» относится к совокупности цепей TCR. В некоторых вариантах реализации библиотека содержит совокупность цепей TCR, которые комбинируются с образованием пар TCRαβ. В некоторых вариантах реализации библиотека содержит совокупность из подгруппы или выборки цепей TCR, которые комбинируются с образованием пар TCRαβ.

[0197] В настоящей заявке термин «неоантиген» относится к антигену, образовавшемуся в результате опухолеспецифической геномной мутации. Например, неоантиген может возникнуть в результате экспрессии мутированного белка в образце опухоли вследствие несинонимичной однонуклеотидной мутации или в результате экспрессии альтернативной открытой рамки считывания вследствие вызванных мутацией сдвигов рамки считывания. Таким образом, неоантиген может быть связан с патологическим состоянием. В некоторых вариантах реализации «мутированный белок» относится к белку, содержащему по меньшей мере одну аминокислоту, которая отличается от аминокислоты в том же положении в канонической последовательности аминокислот. В некоторых вариантах реализации мутированный белок содержит вставки, делеции, замены, присоединение аминокислот, возникшие в результате сдвигов рамки считывания, или любую их комбинацию, относительно канонической последовательности аминокислот.

[0198] В объем термина «лечение» входит его обычное значение в данной области техники, и включает облегчение по меньшей мере одного симптома или другого варианта реализации расстройства, или снижение тяжести заболевания, и тому подобное. Лечение не обязательно должно приводить к полному исцелению или устранять каждый симптом или проявление заболевания, чтобы представлять собой приемлемое лечение. В соответствующей области техники известно, что композиции, применяемые в качестве терапевтического агента, могут уменьшать тяжесть такого болезненного состояния, но не обязательно должны прекращать каждое проявление заболевания, чтобы расцениваться как пригодные. Достаточно уменьшения влияния заболевания (например, путем уменьшения количества или тяжести симптомов, или путем повышения эффективности другого лечения, или вызывая другие полезные эффекты), или уменьшения вероятности того, что заболевание у субъекта возникнет или ухудшится.

[0199] «Антитело» обозначает полипептид, содержащий по меньшей мере вариабельную область легкой цепи или тяжелой цепи иммуноглобулина, которая

специфично распознает и связывает эпитоп антигена. В некоторых вариантах реализации антитела состоят из тяжелой и легкой цепей, каждая из которых содержит вариабельную область, названную вариабельной областью тяжелой (V_H) и вариабельной областью легкой (V_L) цепей. В совокупности, область V_H и область V_L отвечают за связывание антигена, распознаваемого антителом. Термин антитело включает интактные иммуноглобулины, а также их варианты и части, такие как Fab'-фрагменты, F(ab)'$_2$-фрагменты, и любую другую молекулу, полученную из интактного иммуноглобулина.

[0200] В настоящей заявке формулировка «репертуар В-клеточных рецепторов (BCR)/антител» относится к совокупности BCR или цепей антител в образце. В некоторых вариантах реализации «репертуар BCR/антител» относится к совокупности всех BCR или цепей антител в образце. В некоторых вариантах реализации «репертуар BCR/антител» относится к совокупности из подгруппы или выборки BCR или цепей антител в образце.

[0201] В настоящей заявке термины «свежезамороженный» или «быстрозамороженный» означают замораживание образца ткани или клеток в течение короткого периода времени после сбора. В некоторых вариантах реализации образец ткани или клеток не консервируют перед замораживанием. Термины «свежезамороженный» или «быстрозамороженный» можно использовать взаимозаменяемо.

[0202] В настоящей заявке в объем термина «выделение TCR» входит оценка того, какие конкретные комбинации цепей TCRα и TCRβ опосредует желательные функциональные свойства. Термин «выделение TCR» может относиться к выделению одноцепочечных молекул TCR. Способы выделения TCR могут отличаться в зависимости от желательных функциональных свойств и дизайна кассеты TCR.

[0203] В объем термина «маркер активации» входит полный объем термина, который понимает специалист в данной области техники, и данный термин дополнительно обозначает один или множество генов, которые дифференциально регулируются внутри клетки в ответ на внешний стимул. Гены, служащие в качестве маркера активации, могут представлять собой природную часть генома клетки или могут быть введены с помощью инструментов генной инженерии, известных специалисту в данной области техники (например, вирусной доставки генов). Примечательно, что дифференциальная регуляция может описывать повышенную или сниженную экспрессию генов, которую детектируют по уровню РНК. В некоторых случаях такие изменения уровней транскрипта могут

привести к детектируемым изменениям уровня белка. В качестве неограничивающего примера, маркеры активации в Т-клетках, которые коррелируют с активацией Т-клеточного рецептора, могут включать CD69, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF, OX40, а также искусственные репортерные гены, такие как NFAT-GFP или NFAT-ген устойчивости к пуромицину.

[0204] В настоящей заявке термин «библиотека TCR» относится к поликлональной совокупности плазмид, кодирующих TCR, или к клеткам, содержащим такие плазмиды. Совокупность может содержать по меньшей мере два или более различных вариантов цепей TCR. «Библиотека TCR» может включать совокупность из подгруппы или выборки плазмид, кодирующих TCR. «Библиотека TCR» может относиться к совокупности всех TCR, которые могут экспрессироваться из совокупности плазмид, кодирующих TCR. В некоторых вариантах реализации «библиотека TCR» относится к совокупности из подгруппы или выборки TCR, которую можно экспрессировать с совокупности плазмид, кодирующих TCR. В некоторых вариантах реализации «библиотека TCR» относится к совокупности пар TCRab в поликлональной совокупности плазмид, кодирующих TCR. В некоторых вариантах реализации «библиотека TCR» относится к совокупности из подгруппы или выборки пар TCRab в поликлональной совокупности плазмид, кодирующих TCR.

Общее описание различных вариантов реализации

[0205] В некоторых вариантах реализации, описанных в данной заявке, предложен способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации указанный способ включает (I) предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, кодирующих цепи TCRα и TCRβ, (II) введение указанной библиотеки в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, кодируемые представителем множества вариантных нуклеиновых кислот, (III) селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании экспрессии маркера выше порогового уровня в ответ на антиген, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток, (IV) выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции, (V) определение последовательностей

нуклеотидов вариантных нуклеиновых кислот, и (VI) идентификацию по меньшей мере одной вариантной последовательности нуклеотидов на основании обогащения подгруппы указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля. В некоторых вариантах реализации обогащение может быть основано на статистическом обогащении с применением подходящего аналитического программного обеспечения. В некоторых вариантах реализации для определения значимости обогащения можно использовать пакет программ R DESeq2. В некоторых вариантах реализации порог значимости p-значения можно определить как равный 0,2, 0,1, 0,05, 0,01, 0,001, 0,0001, нулю, или любому значению между любыми из указанных значений.

[0206] В некоторых вариантах реализации предложен способ получения репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) из разнообразных популяций Т-клеток. Указанный способ может включать **(I)** определение последовательностей нуклеотидов TCRα и β в образце из организма субъекта, **(II)** выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании по меньшей мере одного критерия; **(III)** создание репертуара TCR путем комбинаторного получения пар выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ, тем самым создавая библиотеку пар TCRαβ; и (**IV**) идентификацию по меньшей мере одной пары TCRαβ с желательными свойствами из созданного репертуара TCR. Различные варианты реализации указанных способов представлены на ФИГ. 1 - 3.

[0207] В некоторых вариантах реализации выбор цепей TCR изначально будут осуществлять на основании порога частоты встречаемости, как описано далее в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации выбор будут осуществлять на основании более чем одного критерия. Можно выбрать более чем один критерий выбора, например, на основании типа анализируемой опухоли. В некоторых вариантах реализации выбор цепей TCR осуществляют на основании порогов эффективности скрининга. В некоторых вариантах реализации критерии выбора выбирают на основании того, как много комбинаторных цепей TCRαβ можно эффективно подвергнуть скринингу. В качестве примера, если можно эффективно подвергнуть скринингу $1x10^6$ пар TCRαβ, то можно выбрать до 1000 цепей TCRα и до 1000 цепей TCRβ. В некоторых вариантах реализации можно выбрать неравное количество цепей TCRα и TCRβ, например, чтобы компенсировать тот факт, что значительная фракция Т-клеток несет две перестройки TCRα

в одной рамке считывания. В некоторых вариантах реализации соотношение TCR-альфа к TCR-бета может составлять, например, от 1 миллиона:1 до 1:1 миллиону. В некоторых вариантах реализации указанное отношение представляет собой любое соотношение между указанными диапазонами, включая, например, 100000:1, 10000:1, 1,000:1, 100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000.

[0208] В некоторых вариантах реализации последовательности цепей TCR, идентифицированные в библиотеках, полученных с помощью способов, описанных в настоящей заявке, пригодны для лечения или диагностики пациента, из которого были выделены указанные последовательности цепей TCR. В некоторых вариантах реализации последовательности цепей TCR, идентифицированные в библиотеках, полученных с помощью способов, описанных в настоящей заявке, пригодны для лечения или диагностики пациентов, отличных от пациента, из которого были выделены последовательности цепей TCR. Например, последовательности цепей TCR, выделенных из одного пациента, могут распознавать опухолевый антиген, общий с таковым у другого пациента.

[0209] В некоторых вариантах реализации большие количества библиотек получены с помощью способов, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации скрининг большого количества библиотек позволяет прогнозирование свойств TCR, таким образом позволяя, например, специфический выбор цепей TCR.

[0210] В некоторых вариантах реализации библиотеки TCR могут включать i) комбинаторные библиотеки TCR; ii) клетки, экспрессирующие такую библиотеку; и/или iii) библиотеки секвенирования ампликонов TCR.

[0211] В некоторых вариантах реализации библиотеки TCR представляют собой поликлональную совокупность плазмид, которые экспрессируют ровно одну альфа- и одну бета-цепь TCR комбинаторным образом. Природа библиотеки такова, что частота встречаемости образования пары данной альфа-цепи с данной бета-цепью пропорциональна общей представленности указанной бета-цепи. И наоборот, частота встречаемости образования пары данной бета-цепи с данной альфа-цепью пропорциональна общей представленности указанной альфа-цепи (из этого следует, что можно контролировать частоту встречаемости отдельных цепей в библиотеке). Процент частот встречаемости отдельной комбинации, которые находятся в пределах диапазона, составляющего медиану частоты встречаемости + / - 1 log2 единица, составляет 25%, 50%,

60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 86%, 97%, 98%, 99%, 100%, или любое значение между любыми двумя из указанных выше значений.

[0212] В некоторых вариантах реализации библиотека может содержать клетку, экспрессирующую соответствующие последовательности нуклеиновых кислот. Экспрессия может включать стабильные или временные подходы и может обеспечиваться молекулами ДНК/РНК (или их производными). Количество клеток в поликлональном пуле, экспрессирующем такую библиотеку, может составлять 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1000, 5000, 10000, 100000, 1000000 x количество вариантов TCR, присутствующих в указанном пуле.

[0213] В некоторых вариантах реализации библиотека секвенирования ампликонов TCR представляет собой совокупность молекул ДНК, представляющую частоту встречаемости TCR в указанном образце. Ампликон содержит информацию как об альфа-, так и о бета-цепях, которые экспрессируются в указанной клетке, и последовательность на участке из более чем 600 смежных нуклеотидов необходима для определения идентичности обоих участков V и J, а также определения последовательности CDR3 как для альфа-, так и для бета-цепей.

[0214] В некоторых вариантах реализации библиотека представляет собой библиотеку вариантов из приблизительно 1,5 т.п.н.

[0215] Разнообразные популяции Т-клеток, используемые в способах, описанных в настоящей заявке, могут содержать Т-клетки из любой линии дифференцировки или их смеси. В некоторых вариантах реализации разнообразные популяции Т-клеток содержат CD4 или CD8 Т-клетки. В некоторых вариантах реализации разнообразные популяции Т-клеток содержат непримированные Т-клетки. В некоторых вариантах реализации разнообразные популяции Т-клеток содержат эффекторные Т-клетки. В разнообразных популяциях Т-клеток можно обнаружить любой тип эффекторной Т-клетки, включая Th_1, Th_2, Th_{17} и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL). В некоторых вариантах реализации разнообразные популяции Т-клеток содержат регуляторные Т-клетки (T_{reg}). В некоторых вариантах реализации разнообразные популяции Т-клеток содержат Т-клетки памяти. В разнообразных популяциях Т-клеток можно обнаружить любой подтип клеток памяти, включая Т-клетки центральной памяти (клетки T_{CM}), Т-клетки эффекторной памяти (клетки T_{EM} и клетки T_{EMRA}), резидентные в ткани Т-клетки памяти (T_{RM}), стволовые

Т-клетки памяти (T_{SCM}) и Т-клетки виртуальной памяти. В некоторых вариантах реализации Т-клетки виртуальной памяти включают CD4 положительные Т-клетки. В некоторых вариантах реализации Т-клетки виртуальной памяти включают CD8 положительные Т-клетки памяти. В некоторых вариантах реализации разнообразные популяции Т-клеток содержат регуляторные Т-клетки. В некоторых вариантах реализации разнообразные популяции Т-клеток содержат дисфункциональные Т-клетки. Дисфункциональные Т-клетки характеризуются (1) высокими уровнями ингибиторных рецепторов, (2) утратой классических эффекторных функций (например, IFN-γ, IL-2 и TNF-α), при этом секрецией хемокина CXCL13, и (3) высокими уровнями экспрессии профилей транскрипции, связанных с цитотоксичностью, включая высокие уровни гранзима В. В некоторых вариантах реализации разнообразные популяции Т-клеток содержат αβ Т-клетки. В некоторых вариантах реализации разнообразные популяции Т-клеток содержат γδ Т-клетки. Разнообразные популяции Т-клеток могут содержать Т-клетки естественные киллеры (NKT) и ассоциированные со слизистой оболочкой инвариантные Т-клетки (MAIT). Популяция Т-клеток может представлять собой часть смеси различных типов клеток или часть образца ткани, такой как, например, кровь или опухолевая ткань. Разнообразные популяции Т-клеток могут содержать смеси Т-клеток различных линий дифференцировки или смеси Т-клеток и не являющихся Т-клетками клеток.

[0216] В некоторых вариантах реализации последовательности нуклеотидов TCRα и β определяют в образце из организма субъекта. Последовательности нуклеотидов TCRα и β можно определить, используя ДНК или РНК, полученные из образца. В некоторых вариантах реализации определение последовательностей нуклеотидов TCRα и β включает применение мультиплексной ПЦР. В некоторых вариантах реализации определение последовательностей нуклеотидов TCRα и β включает получение последовательностей TCR с помощью направленного обогащения. Например, для направленного обогащения можно использовать захват гена TCR (Linnemann et al, Nat Med 2013). В некоторых вариантах реализации получение последовательностей TCR включает получение с помощью 5'-RACE и ПЦР. В некоторых вариантах реализации получение последовательностей TCR включает получение с помощью пространственного секвенирования.

[0217] В некоторых вариантах реализации ДНК или РНК выделяют из жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах реализации ДНК или РНК выделяют из консервированных клеток или консервированных образцов ткани. Консервированные клетки и консервированные образцы ткани могут быть жизнеспособными или нежизнеспособными. Консервированные образцы ткани могут содержать жизнеспособные или нежизнеспособные клетки или комбинацию как жизнеспособных, так и нежизнеспособных клеток. ДНК или РНК можно выделить из образца или материала, консервированного с помощью любого способа консервирования, включая быстрозамороженные клетки или ткань и фиксированные или фиксированные формалином/заключенные в парафин (FFPE) образцы. Способы консервирования клеток и образцов ткани и способы выделения ДНК и РНК известны специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах реализации образец представляет собой образец опухоли. В некоторых вариантах реализации образец опухоли представляет собой образец FFPE. В некоторых вариантах реализации образец опухоли представляет собой быстрозамороженный образец. В некоторых вариантах реализации популяция Т-клеток является частью смеси различных типов клеток или частью образца ткани или биологической жидкости, такой как, например, кровь, моча, дренирующий лимфатический узел или опухолевая ткань. В некоторых вариантах реализации образец представляет собой нежизнеспособный образец опухоли. В некоторых вариантах реализации нежизнеспособный образец опухоли представляет собой быстрозамороженный образец или образец FFPE.

[0218] В некоторых вариантах реализации одну или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара выбирают на основании по меньшей мере одного критерия: a) частоты встречаемости в популяции Т-клеток, b) относительного обогащения по сравнению со второй популяцией Т-клеток, c) биологических свойств цепи TCR, причем указанные свойства выбраны из по меньшей мере одного из следующих свойств: (предсказанной) специфичности к антигену, (предсказанной) HLA-рестрикции, аффинности, зависимости от корецептора или исходной Т-клеточной линии дифференцировки (например, CD4 или CD8 Т-клетка), d) пространственных паттернов экспрессии генов, причем пространственные паттерны экспрессии генов получают из по меньшей мере одной из: областей происхождения в ткани

или паттернов экспрессии других генов, включая, например, коэкспрессию, e) совместной встречаемости или встречаемости со сходной частотой во множестве образцов, например, встречаемости во множестве очагов опухоли, f) выбора во множество групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR, g) комбинации множества критериев, приведенных в различных вариантах реализации.

[0219] В некоторых вариантах реализации критерии выбора можно использовать для исключения вместо включения (включая, например, варианты b или c в абзаце выше). Это можно применять по отношению к любому из вариантов реализации, предложенных в настоящей заявке. Таким образом, их можно применять, чтобы не вводить или не предоставлять субъекту или чтобы исключить их включение в совокупность TCR.

[0220] В некоторых вариантах реализации последовательности цепей TCRα и TCRβ выбраны общего репертуара на основании относительного различия числа копий ДНК и РНК данной цепи TCR. Например, отношение между полученным по РНК и геномным числом копий можно получить на основании количественного анализа геномной ДНК и РНК для данной цепи TCR. В некоторых вариантах реализации цепь TCR выбирают, когда число копий РНК гораздо выше, чем число копий геномной ДНК, что приводит к отношению, которое больше 1. В некоторых вариантах реализации полученное в результате этого отношение любого из данных TCR можно ранжировать и выбрать относительно всех других TCR в образце. Например, TCR с более высоким рангом на основании более высокого отношения можно выбрать относительно TCR с более низким рангом на основании более низкого отношения, тем самым выбирая цепи TCR с большим числом копий РНК. В некоторых вариантах реализации TCR с более низким рангом на основании более низкого отношения можно выбрать относительно TCR с более высоким рангом на основании более высокого отношения, тем самым осуществляя выбор цепей TCR с более низким числом копий РНК. Порядок ранжирования можно подогнать под любое численное значение для отношения между полученным по РНК и геномным числом копий.

[0221] В некоторых вариантах реализации выбирают любое количество цепей TCRα и любое количество цепей TCRβ, вплоть до и включая 1000 каждой из цепей TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации выбирают более чем 1000 каждой из цепей TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации выбирают множество цепей TCRα и TCRβ,

чтобы получить приблизительно $1x10^6$ пар TCRαβ. В некоторых вариантах реализации выбирают множество цепей TCRα и TCRβ, чтобы получить более чем $1x10^6$ пар TCRαβ.

[0222] В некоторых вариантах реализации одну или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара выбирают на основании частоты встречаемости в популяции Т-клеток. В некоторых вариантах реализации данные по частоте встречаемости последовательностей TCR используют для создания отдельных порядков ранжирования цепей TCRα и TCRβ. Например, абсолютное количество молекул нуклеиновых кислот, кодирующих (часть) различные(-х) последовательности(-ей) аминокислот цепей TCR, можно определить для содержащего Т-клетку образца, применяя мультиплексную ПЦР, направленное обогащение или 5'-RACE и ПЦР. В некоторых вариантах реализации в способах, описанных в настоящей заявке, используют ДНК. В некоторых вариантах реализации в способах, описанных в настоящей заявке, используют РНК. Полученную в результате этого совокупность последовательностей цепей TCR разделяют на совокупность последовательностей TCRα- и совокупность последовательностей TCRβ-цепей. Любые непродуктивные последовательности цепей TCR, в которых фрагменты TCR соединены не в рамке считывания на уровне последовательностей аминокислот, и/или в которые введены стоп-кодоны, и/или в которых присутствуют мутации со сдвигом рамки считывания, и/или в которых присутствуют дефектные сайты сплайсинга, удаляют из совокупности. В некоторых вариантах реализации абсолютные количества молекул нуклеиновых кислот, кодирующих (часть) определенную(-ой) последовательность(-и) аминокислот цепи TCR, определяют на основании подсчета уникальных молекул с применением «уникального молекулярного идентификатора» (UMI), и сортируют в порядке убывания с получением порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации каждую совокупность сортируют в порядке убывания, используя либо абсолютные количества молекул нуклеиновых кислот, кодирующих определенную цепь TCR, либо соответствующий процент из всех TCRα- или TCRβ-цепей, соответственно, с получением порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ.

[0223] В любом из вариантов реализации, предложенных в данной заявке, можно собрать или создать РНК и можно секвенировать РНК вместо секвенирования ДНК.

[0224] В некоторых вариантах реализации данные по частоте встречаемости последовательностей TCR используют, чтобы создать комбинированный порядок ранжирования цепей TCRα и TCRβ. Например, абсолютное количество молекул нуклеиновых кислот, кодирующих (часть) различные(-х) последовательности(-ей) аминокислот цепей TCR, можно определить для содержащего Т-клетку образца, применяя мультиплексную ПЦР, направленное обогащение или 5'-RACE и ПЦР. В некоторых вариантах реализации в способах, описанных в настоящей заявке, используют ДНК. В некоторых вариантах реализации в способах, описанных в настоящей заявке, используют РНК. Любые непродуктивные последовательности цепей TCR, в которых фрагменты TCR соединены не в рамке считывания на уровне последовательностей аминокислот, и/или в которые введены стоп-кодоны, и/или в которых присутствуют мутации со сдвигом рамки считывания, и/или в которых присутствуют дефектные сайты сплайсинга, удаляют из совокупности. Остальные последовательности цепей TCR сортируют в порядке убывания, используя либо абсолютные количества молекул нуклеиновых кислот, возможно определенные с применением «уникального молекулярного идентификатора» (UMI), кодирующих определенную цепь TCR, либо соответствующий процент из общей группы цепей TCR, с получением ранга цепей TCR.

[0225] В некоторых вариантах реализации порог частоты встречаемости определяют на основании желательной глубины получения репертуара TCR. Например, абсолютное количество молекул нуклеиновых кислот, кодирующих (часть) различные(-х) последовательности(-ей) аминокислот цепей TCR, можно определить для содержащего Т-клетку образца, применяя мультиплексную ПЦР, направленное обогащение или 5'-RACE и ПЦР, и возможно применяя «уникальный молекулярный идентификатор» (UMI). В некоторых вариантах реализации в способах, описанных в настоящей заявке, используют ДНК. В некоторых вариантах реализации в способах, описанных в настоящей заявке, используют РНК. Полученную в результате этого совокупность последовательностей цепей TCR будут подразделять на совокупность последовательностей TCRα-цепей и совокупность последовательностей TCRβ-цепей. Любые непродуктивные последовательности цепей TCR, в которых фрагменты TCR соединены не в рамке считывания на уровне последовательностей аминокислот, и/или в которые введены стоп-кодоны, и/или в которых присутствуют мутации со сдвигом рамки считывания, и/или в

которых присутствуют дефектные сайты сплайсинга, удаляют из совокупности. Каждую совокупность сортируют в порядке убывания, используя либо абсолютные количества молекул нуклеиновых кислот, кодирующих определенную цепь TCR, либо соответствующий процент от всех TCRα- или TCRβ-цепей, соответственно, с получением порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ. Если целью является получить десять наиболее часто встречающихся TCR в образце, можно выбрать только верхние 10 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ. Наоборот, если желательно получить большую часть репертуара TCR в образце, можно выбрать больше, чем верхние 10 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ. Более низкий порог частоты встречаемости может приводить к большей глубине, но также к более высокому разнообразию пула выбранных цепей TCR и полученной в результате этого библиотеки TCR. Важно отметить, что TCRα- или TCRβ-цепи также можно выбрать из комбинированного порядка ранжирования, описанного в одном из предложенных вариантов реализации.

[0226] В некоторых вариантах реализации более низкий порог частоты встречаемости используют для выбора совокупностей цепей TCRα и TCRβ на основании частоты встречаемости. В некоторых вариантах реализации нет необходимости в выборе равных количеств цепей TCRα и TCRβ. Например, абсолютное количество молекул нуклеиновых кислот, кодирующих (часть) различные(-х) последовательности(-ей) аминокислот цепей TCR, можно определить для содержащего Т-клетку образца, применяя мультиплексную ПЦР, направленное обогащение или 5'-RACE и ПЦР, и возможно применяя «уникальный молекулярный идентификатор» (UMI). В некоторых вариантах реализации в способах, описанных в настоящей заявке, используют ДНК. В некоторых вариантах реализации в способах, описанных в настоящей заявке, используют РНК. Полученную в результате этого совокупность последовательностей цепей TCR будут подразделять на совокупность последовательностей TCRα-цепей и совокупность последовательностей TCRβ-цепей. Любые непродуктивные последовательности цепей TCR, в которых фрагменты TCR соединены не в рамке считывания на уровне последовательностей аминокислот, и/или в которые введены стоп-кодоны, и/или в которых присутствуют мутации со сдвигом рамки считывания, и/или в которых присутствуют дефектные сайты сплайсинга, удаляют из совокупности. Каждую совокупность сортируют в порядке убывания, используя либо абсолютные количества молекул нуклеиновых кислот,

кодирующих определенную цепь TCR, либо соответствующий процент от всех TCRα- или TCRβ-цепей, соответственно, с получением порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ. Полученные в результате этого порядки ранжирования могут содержать отличающиеся количества TCRα- или TCRβ-цепей, что предотвращает выбор равных количеств TCRα- и TCRβ-цепей, или может потребоваться выбор большего количества цепей TCR из одной категории, чем из другой, например, вследствие склонности обоих локусов TCRα в клетке претерпевать продуктивную перестройку. Более того, если выбраны все цепи TCR выше или ниже некоторой частоты встречаемости (выраженной в виде абсолютного количества или процента), это может привести к выбору отличающихся количеств TCRα- и TCRβ-цепей, соответственно. Важно отметить, что TCRα- или TCRβ-цепи также можно выбрать из комбинированного порядка ранжирования, описанного в одном из описанных выше вариантов реализации.

[0227] В некоторых вариантах реализации выбирают верхние 100 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ на основании количественных данных о частоте встречаемости. В некоторых вариантах реализации выбирают больше, чем верхние 100 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ, на основании количественных данных о частоте встречаемости. В некоторых вариантах реализации выбирают верхние 100, верхние 200, верхние 300, верхние 400, верхние 500, верхние 600, верхние 700, верхние 800, верхние 900, верхние 1000 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ, или любое число или диапазон между указанными значениями, на основании данных о частоте встречаемости. В некоторых вариантах реализации выбирают больше, чем верхние 1000 наиболее часто встречающиеся цепей TCRα и TCRβ, на основании данных о частоте встречаемости. В некоторых вариантах реализации выбирают верхние 5%, верхние 10%, верхние 20%, верхние 30%, верхние 40%, верхние 50%, верхние 60%, верхние 70%, верхние 80%, верхние 90%, верхние 100% цепей TCRα и TCRβ, или любое число или диапазон между указанными значениями, на основании данных о частоте встречаемости. В некоторых вариантах реализации выбранные цепи служат в качестве строительных блоков для сборки совокупности пар TCRαβ.

[0228] В некоторых вариантах реализации осуществляют выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании относительного обогащения по сравнению со второй популяцией Т-клеток. В некоторых

вариантах реализации выбирают верхние 100 цепей TCRα и TCRβ на основании наиболее высокой кратности обогащения в указанном образце по сравнению с другим образцом. В некоторых вариантах реализации выбирают верхние 100 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ на основании относительного обогащения. В некоторых вариантах реализации наиболее высокую кратность обогащения определяют по сравнению с другим образцом. В некоторых вариантах реализации выбирают больше, чем верхние 100 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ, на основании относительного обогащения. В некоторых вариантах реализации выбирают верхние 100, верхние 200, верхние 300, верхние 400, верхние 500, верхние 600, верхние 700, верхние 800, верхние 900, верхние 1000 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ, или любое число или диапазон между указанными значениями, на основании относительного обогащения. В некоторых вариантах реализации выбирают больше, чем верхние 1000 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ, на основании относительного обогащения. В некоторых вариантах реализации выбирают верхние 5%, верхние 10%, верхние 20%, верхние 30%, верхние 40%, верхние 50%, верхние 60%, верхние 70%, верхние 80%, верхние 90%, верхние 100% цепей TCRα и TCRβ, или любое число или диапазон между указанными значениями, на основании относительного обогащения. В некоторых вариантах реализации выбирают цепи TCR из очага опухоли на основании относительного обогащения по сравнению с соответствующей частотой встречаемости в крови. В некоторых вариантах реализации выбирают цепи TCR из очага опухоли на основании относительного обогащения по сравнению со вторым очагом опухоли. В некоторых вариантах реализации количественный анализ цепей TCR проводят во множестве образцов параллельно. Например, множество очагов опухоли, соответствующие образцы очага опухоли и крови из одного и того же индивида или множество отдельно полученных срезов более крупного очага опухоли можно проанализировать параллельно. Путем анализа множества образцов или соответствующих образцов из одного и того же индивида, можно определить биологическую значимость цепей TCR. Например, обогащение частоты встречаемости цепи TCR в опухоли по сравнению с кровью или встречаемость во множестве очагов опухоли более вероятно связана с распознаванием опухолевого антигена по сравнению с цепью TCR, которая также встречается с высокой частотой встречаемости в периферической крови или которая встречается в одном очаге опухоли. В некоторых вариантах реализации выбор цепей TCR

осуществляют на основании частоты встречаемости цепей TCR в центре опухоли по сравнению с таковой на границе опухоли или на крае опухоли, которые могут содержать окружающую опухоль нормальную ткань. В любом из описанных вариантов реализации различия в относительной частоте встречаемости можно использовать, чтобы создать порядок ранжирования на основании кратности различия в относительной частоте встречаемости. Кратность различия в относительной частоте встречаемости может представлять собой любое число между 10^{-6} и 10^{6}. В некоторых вариантах реализации цепи TCR, которые обнаружены исключительно в одном из по меньшей мере двух сравниваемых образцов, можно предпочтительно выбрать или исключить при получении библиотеки TCR. В некоторых вариантах реализации для получения библиотеки TCR используют верхние 100 ранжированных цепей TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации для получения библиотеки TCR используют больше, чем верхние 100 ранжированных цепей TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации сравнивают репертуары цепей TCR в различных образцах для направленного выбора цепей TCR с высокой вероятностью специфичности к неоантигену. В некоторых вариантах реализации последовательности цепей TCR упорядочивают на основании относительного обогащения, а затем выбирают в соответствии с порядком ранжирования на основании частоты, например, как описано выше. Для выбора цепей TCR можно использовать любой порядок критериев и любую комбинацию критериев.

[0229] В любом из вариантов реализации, предложенных в данной заявке, можно также использовать составную метрику. То есть, ранжирование можно осуществить, комбинируя два или более аспектов, например, ранжирование по частоте встречаемости, а также по обогащению в опухоли. В некоторых вариантах реализации TCR как встречается с высокой частотой в опухоли, так и обогащен в опухоли.

[0230] В некоторых вариантах реализации осуществляют выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании биологических свойств или особенностей последовательности цепи TCR. В некоторых вариантах реализации биологические свойства или особенности последовательности цепи TCR выбраны из по меньшей мере одного из: (предсказанной) антигенспецифичности, (предсказанной) HLA-рестрикции, аффинности, зависимости от корецептора или исходной Т-клеточной линии дифференцировки (например, CD4 или CD8 Т-клетка). В некоторых

вариантах реализации информацию о биологических свойствах получают с помощью предсказания на основе алгоритма *in silico*.

[0231] В некоторых вариантах реализации алгоритмы используют, чтобы определить TCR кластеры в образце. Информацию о кластерах TCR можно использовать для направленного выбора цепей TCR, например, для последующего создания библиотеки TCR. В некоторых вариантах реализации информацию о кластерах TCR используют для выбора кластеров с определенными свойствами. В некоторых вариантах реализации информацию о кластерах TCR используют для сравнения кластеров с общедоступными базами данных TCR. В некоторых вариантах реализации информацию о кластерах TCR используют для удаления кластеров или цепей TCR с высокой вероятностью посторонней специфичности TCR. В некоторых вариантах реализации кластеры удаляют на основании сравнения кластеров с общедоступными базами данных TCR. Примеры специфичностей TCR, которые с высокой вероятностью являются посторонними, включают, например, распознавание вирусных эпитопов, происходящих из вирусов гриппа, CMV, EBV и других вирусных и бактериальных инфекционных агентов. Полученные группы цепей TCR, из которых были удалены посторонние цепи TCR, можно впоследствии использовать для получения библиотеки TCR. В некоторых вариантах реализации информацию о кластерах TCR используют для преимущественного включения кластеров цепей TCR с родственными последовательностями аминокислот.

[0232] В некоторых вариантах реализации свойства TCR идентифицируют на основании последовательности аминокислот цепей TCR. В некоторых вариантах реализации свойства TCR идентифицируют на основании структурных особенностей комплекса TCRαβ. Примеры свойств включают, например, HLA-рестрикцию, специфичность к антигену, зависимость от корецептора, исходную Т-клеточную линию дифференцировки, общие свойства среди кластеров TCR и другие свойства.

[0233] В некоторых вариантах реализации осуществляют выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании пространственной информации. В некоторых вариантах реализации осуществляют выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании пространственных паттернов экспрессии генов или белков, причем пространственные паттерны экспрессии генов или белков получают из по меньшей мере

одного из перечисленных: области происхождения в ткани или паттернов коэкспрессии других генов или белков (что, во избежание неправильного толкования, включает возможное отсутствие коэкспрессии). В некоторых вариантах реализации выбор цепей TCR осуществляют на основании локализации внутри опухоли. В некоторых вариантах реализации выбор цепей TCR осуществляют на основании обогащения пространствами, в которых выявили сверхэкспрессию (или отсутствие экспрессии) некоторых фенотипических маркеров. Фенотипический маркер может представлять собой любой маркер, ассоциированный с фенотипом, включая, но не ограничиваясь одним или более маркерами на поверхности или их фрагментами, одним или более белками или их фрагментами, одной или более РНК, такой как микроРНК, миРНК или любая другая РНК.

[0234] В некоторых вариантах реализации способы пространственного секвенирования используют для отфильтровывания цепей TCR. Пространственное секвенирование позволяет получить информацию о транскриптоме или генетическую информацию, включая информацию о последовательности TCR, о клетке, а также информацию о положении клетки внутри ткани. Например, получают и метят группы соседних клеток, чтобы маркировать место их происхождения внутри ткани, чтобы связать информацию о транскриптоме или генетическую информацию с пространственными координатами. Клетки, которые получают из одного и того же или близлежащего пространственного положения в ткани, образуют пространственный кластер. Цепи TCR из некоторых пространственных кластеров можно предпочтительно выбрать на основании некоторой информации. Информация, которую можно использовать, включает, например, анатомическую информацию. Например, кластеры клеток, расположенные в центре опухоли или в третичных лимфоидных структурах, могут представлять более высокий интерес, чем кластеры на границе опухоли. Информация, которую можно использовать, включает, например, информацию о транскриптоме и/или экспрессии белка. Например, пространственные кластеры с высокой экспрессией PD-1 и CD39 более вероятно обогащены специфическими к неоантигену цепями TCR, чем кластеры с низкой экспрессией таких маркеров. Таким образом, кластеры с высокой экспрессией PD-1 и CD39 можно выбрать для отфильтровывания цепей TCR. В некоторых вариантах реализации кластер выбирают, например, на основании сверхэкспрессии в центре опухоли по

сравнению с экспрессией на границе опухоли. Типичные параметры выбора представлены в таблице 1.

Таблица 1. Типичные параметры выбора маркеров (включая любую их комбинацию)

Генетический маркер	**Значимость экспрессии в пространственном кластере**
PD-1, Tim-3, LAG-3, CD109, CD200, GITR, TNFRSF18, CD39, CD103, IFN-γ, IL-2, TNF-α, Ki67, гранзим B, CXCL13 CD8, CD4, CTLA-4, FoxP3, RBPJ, ZBED2, ETV1, ID3, MAF, PRDM1, EOMES, ITM2A, KIR2DL4, PTMS, FAM3C, AKAP5, CD7, PHLDA1, ENTPD1, CCL3, CCL4, TNFRSF9, ZBED2, XCL2, HMGB1P17, ILDR1, C10orf113, BTNL8, DLGAP5, MIR4298, CDC25C, KIF20A, E2F2, TSHZ2	Сверхэкспрессия может маркировать возможный интересующий кластер
CD45RA, KLRG1, IL7R, TCF7, CCR7	Сверхэкспрессия может маркировать кластеры меньшего интереса

[0235] Выбранные группы цепей TCR можно использовать для получения библиотеки TCR. В некоторых вариантах реализации используют пространственно разрешенное секвенирование РНК или ДНК. В некоторых вариантах реализации получают, например, общие популяции цепей TCR вместе с дополнительными транскриптами, относящимися к фенотипу Т-клеток. Типичные транскрипты, относящиеся к фенотипу Т-

клеток, включают CTLA-4, PD-1, CD103, CD39, FoxP3, IFN-γ, IL-2, CXCL13 и другие транскрипты. В некоторых вариантах реализации анатомическую локализацию и специфический для Т-клеток транскриптом, полученные из множества пространственных кластеров, используют для идентификации интересующих кластеров.

[0236] В некоторых вариантах реализации осуществляют выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании совместной встречаемости или встречаемости со сходной частотой во множестве образцов. В некоторых вариантах реализации осуществляют выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании встречаемости во множестве очагов опухоли. В некоторых вариантах реализации информацию о частоте встречаемости цепей TCR во множестве очагов опухоли используют, чтобы отфильтровать интересующие цепи TCR. В некоторых вариантах реализации специфическая информация, которую используют, чтобы отфильтровать интересующие цепи TCR, включает исключение цепей TCR, встречающихся только в одном очаге опухоли. В некоторых вариантах реализации специфическая информация, которую используют, чтобы отфильтровать интересующие цепи TCR, включает селективное включение цепей TCR, встречающихся во всех исследованных очагах опухоли.

[0237] В некоторых вариантах реализации осуществляют выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании выбора во множество групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR. В некоторых вариантах реализации все последовательности цепей TCRα и TCRβ с частотой встречаемости выше определенного порога выбирают вместе в одну группу. Например, можно выбрать все последовательности цепей TCRα и TCRβ, составляющие некоторый процент от всех последовательностей цепей TCRα и TCRβ, например, выше и/или равный 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01%, или любое другое промежуточное число в данном диапазоне, в одну группу. Используя аналогичный принцип, например, можно выбрать все последовательности цепей TCRα и TCRβ с ранговым положением выше и равном 10 (верхние 10), 100 (верхние 100), 1000 (верхние 1000) или 10000 (верхние 10000) в одну группу. В некоторых вариантах реализации выбирают все последовательности цепей TCRα и TCRβ ниже определенного порога или между двумя определенными порогами в одну группу. Например, можно

выбрать все последовательности цепей TCRα и TCRβ ниже 1% или между 1% и 0,1% в одну группу. Используя аналогичный принцип, например, можно выбрать все последовательности цепей TCRα и TCRβ ниже рангового положения 10 или между ранговыми положениями 10 и 100 в одну группу. В некоторых вариантах реализации осуществляют выбор всех последовательностей цепей TCRα и TCRβ с частотой встречаемости выше определенного порога совместно в одну группу, и выбирают все последовательности цепей TCRα и TCRβ ниже определенного порога в другую группу. Например, выбирают все последовательности цепей TCRα и TCRβ с ранговым положением, выше и равным 1%, в одну группу, и выбирают все последовательности цепей TCRα и TCRβ с ранговым положением ниже 1% во вторую группу. Используя аналогичный принцип, например, выбирают все последовательности цепей TCRα и TCRβ с ранговым положением, выше и равным 10, в одну группу, и выбирают все последовательности цепей TCRα и TCRβ ниже рангового положения 10 во вторую группу.

[0238] В некоторых вариантах реализации проводят скрининг больших количеств TCR без создания библиотек TCR значительной сложности. В качестве примера, можно получить множество подбиблиотек. В некоторых вариантах реализации сложность библиотек TCR меньше, чем сложность, возникшая в результате произвольного образования пары всех входящих последовательностей цепей TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации полученная библиотека TCR не содержит все возможные комбинации TCRa и TCRb. В некоторых вариантах реализации группы цепей TCR разделяют на отдельные пулы, чтобы создать одну или более библиотек с более низкой сложностью, чем получили бы при произвольном образовании пары последовательностей цепей TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации цепи TCR объединяют на основании порога ранжирования. В некоторых вариантах реализации все TCR в некотором положении в порядке ранжирования образуют пул для получения библиотеки TCR. Например, верхние 50 ранжированных цепей TCRα и TCRβ можно включить в пул 1; верхние 25 – верхние 75 ранжированных цепей TCRα и TCRβ можно включить в пул 2 и так далее. В качестве дополнительного примера, верхние 50 – верхние 100 ранжированных цепей TCRα и TCRβ можно включить в пул 2 и так далее. Можно использовать любые критерии ранжирования, включая различные пороги для цепей TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации ранжирование основано на частоте встречаемости. В некоторых

вариантах реализации ранжирование основано на относительном обогащении относительно контрольного образца. В некоторых вариантах реализации цепи TCR объединяют на основании пространственной информации. Например, все цепи TCRα и TCRβ из данного пространственного кластера могут образовать определенный пул. В некоторых вариантах реализации цепи TCR объединяют на основании свойств TCR. Для объединения TCR в пул можно использовать любое свойство TCR. Например, все TCR с определенными особенностями последовательностей или предсказанным свойством могут образовать определенный пул. Примеры предсказанных свойств включают, например, зависимость от корецептора, Т-клеточную линию дифференцировки, из которой они происходят, HLA-рестрикцию, специфичность и другие свойства.

[0239] В некоторых вариантах реализации осуществляют выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании комбинации множества критериев, приведенных в различных вариантах реализации.

[0240] В некоторых вариантах реализации репертуар TCR создают путем комбинаторного получения пар выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации комбинаторное образование пары включает произвольное образование пары всех выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ. Библиотеку цепей TCRαβ можно создать путем комбинаторного получения пар выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации выбранные последовательности цепей TCR используют для синтеза библиотеки фрагментов ДНК или РНК цепей TCRα и TCRβ. Используя стратегии клонирования, известные квалифицированному специалисту (например, включая, но не ограничиваясь молекулярной сборкой Gibson и сборкой Golden Gate), искусственные гены TCR можно создать путем соединения ровно одного фрагмента ДНК или РНК TCRα- и одного фрагмента ДНК или РНК β-цепи. В некоторых вариантах реализации комбинации цепей TCRα и TCRβ получают путем непосредственного синтеза фрагментов ДНК или РНК, в которых соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь. В некоторых вариантах реализации комбинации цепей TCRα и TCRβ создают внутри клетки путем модификации пула клеток отдельными совокупностями генов TCRα и β таким образом, что клетки экспрессируют приблизительно одну TCRα- и одну β-цепь.

[0241] В некоторых вариантах реализации создание репертуара TCR путем комбинаторного получения пар выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ, тем самым создавая библиотеку пар TCRαβ, осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов: a) последовательности цепей TCR используют для синтеза отдельных библиотек фрагментов ДНК или РНК цепей TCRα и TCRβ, которые впоследствии соединяют в единый фрагмент ДНК или РНК, в котором соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь, b) комбинации цепей TCRα и TCRβ получают путем непосредственного синтеза фрагментов ДНК или РНК, в которых соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь, c) комбинации цепей TCRα и TCRβ создают внутри клетки путем модификации пула клеток отдельными совокупностями генов TCRα и β таким образом, что клетки будут экспрессировать по меньшей мере одну TCRα- и одну β-цепь, и/или d) комбинации цепей TCRα и TCRβ соединяют в одноцепочечную конструкцию TCR, в которой слиты оба фрагмента вариабельной области TCRα- и TCRβ-цепей и в которой указанная одноцепочечная конструкция TCR может быть слита с (i) трансмембранным доменом отдельно или (ii) дополнительно содержит внутриклеточные сигнальные домены, включая, но не ограничиваясь сигнальными доменами CD3ε или CD3ζ отдельно или в комбинации с сигнальным доменом CD28.

[0242] Для любого из вариантов реализации, предложенных в данной заявке, в некоторых вариантах реализации получают последовательности TCR, рестриктированного по I классу и/или II классу.

[0243] Для любого из вариантов реализации, предложенных в данной заявке, в некоторых вариантах реализации получают по меньшей мере одну из: специфических к неоантигену последовательностей TCR, специфических к вирусу последовательностей TCR, специфических к общим антигенам опухоли последовательностей TCR и/или специфических к собственным антигенам последовательностей TCR.

[0244] В некоторых вариантах реализации маркер активации можно выбрать из группы, состоящей из: CD25, CD69, CD62L, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF, OX40.

[0245] В некоторых вариантах реализации репертуар TCR представляет все последовательности цепей TCRα и TCRβ в образце. В некоторых вариантах реализации репертуар TCR представляет все последовательности цепей TCRα и TCRβ, полученные из образца. В некоторых вариантах реализации репертуар TCR выбран как подгруппа

последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара последовательностей TCR, присутствующих в образце. В некоторых вариантах реализации репертуар TCR выбран как подгруппа последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара последовательностей TCR, полученных из образца.

[0246] В некоторых вариантах реализации указанный способ включает идентификацию по меньшей мере одной пары TCRαβ из созданного репертуара TCR. В некоторых вариантах реализации пара TCRαβ представляет собой комбинацию, которая получена впервые. В некоторых вариантах реализации пара TCRαβ представляет собой комбинацию, которая получена не впервые. В некоторых вариантах реализации пул репортерных клеток или Т-клеток модифицируют библиотекой полученных пар TCRαβ. В некоторых вариантах реализации пул модифицированных репортерных клеток или Т-клеток можно стимулировать антигенпрезентирующими клетками, нагруженными по меньшей мере одним интересующим антигеном. Можно применять любой анализ со стимуляцией репортерных клеток или Т-клеток. Способы анализа со стимуляцией репортерных клеток или Т-клеток известны специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах реализации антигенреактивные репортерные клетки или Т-клетки выделяют на основании по меньшей мере одного маркера активации. Можно применять любой маркер активации, например, CD4 или CD8 Т-клеток. В некоторых вариантах реализации можно применять любой маркер CD. В некоторых вариантах реализации маркеры активации могут включать такие маркеры как, например, CD69, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF. В некоторых вариантах реализации антигенреактивные репортерные клетки или Т-клетки выделяют на основании пролиферации. В некоторых вариантах реализации антигенреактивные репортерные клетки или Т-клетки выделяют на основании устойчивости к селекции антибиотиком, которую приобретают посредством зависимой от активации репортерной клетки или Т-клетки экспрессии гена устойчивости. Можно применять любой способ выделения репортерной клетки или Т-клетки, включая, но не ограничиваясь обогащением с помощью магнитных гранул или проточной цитометрией, например, которые известны квалифицированному специалисту. В некоторых вариантах реализации может не потребоваться выделение репортерной клетки или Т-клетки. Например, пролиферация репортерных клеток или Т-клеток или использование селекции антибиотиком может устранить потребность в селекции. В некоторых вариантах

реализации РНК получают из общей популяции антигенреактивных репортерных клеток или Т-клеток. РНК, полученную из общей популяции антигенреактивных репортерных клеток или Т-клеток, можно применять для получения специфической кДНК TCRαβ. В некоторых вариантах реализации специфическую кДНК TCRαβ анализируют путем секвенирования ДНК, чтобы определить последовательности генов TCRαβ антигенреактивных репортерных клеток или Т-клеток. В некоторых вариантах реализации ДНК получают из общей популяции антигенреактивных репортерных клеток или Т-клеток, чтобы получить TCRα/β-специфический продукт ПЦР, который анализируют путем секвенирования ДНК, чтобы определить последовательности генов TCRαβ антигенреактивных репортерных клеток или Т-клеток. В некоторых вариантах реализации определенные пары TCRαβ могут быть ассоциированы с молекулярным идентификатором на основе нуклеиновых кислот («штрихкодом»), который можно детектировать путем секвенирования специфического продукта ПЦР, полученного из РНК или ДНК.

[0247] В некоторых вариантах реализации пары TCRαβ определяют, применяя подходы на основе отдельных клеток. Подходы на основе отдельных клеток включают, например, капельную ПЦР (Droplet-PCR). Применяя подходы на основе отдельных клеток можно проанализировать последовательности генов TCRαβ антигенреактивных Т-клеток. В некоторых вариантах реализации антигенреактивные Т-клетки идентифицируют по одному или более маркерам активации. Можно использовать любой маркер CD, включая, например, маркер активации CD4 или CD8 Т-клеток. В некоторых вариантах реализации маркеры активации включают, например, CD69, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF. В некоторых вариантах реализации антигенреактивные Т-клетки идентифицируют по профилю их транскрипции.

[0248] В некоторых вариантах реализации пары TCRαβ определяют с помощью геномной ПЦР вставок гена TCRαβ в общей популяции Т-клеток. В некоторых вариантах реализации проводят анализ секвенирования ДНК полученного продукта ПЦР.

[0249] В некоторых вариантах реализации активацию трансдуцированных TCR репортерных клеток или Т-клеток идентифицируют, применяя репортерные гены. Репортерные гены могут сообщить о стимуляции TCR. Типичные репортерные гены включают, например, NFAT-GFP или NFAT-YFP. В некоторых вариантах реализации антигенреактивные репортерные клетки или Т-клетки выделяют на основании

устойчивости к селекции антибиотиком, которая приобретается посредством зависимой от активации Т-клеток экспрессии гена устойчивости. Типичные репортерные гены включают, например, NFAT-устойчивость к пуромицину или NFAT-устойчивость к гигромицину. В некоторых вариантах реализации используют комбинации репортерных генов.

[0250] В некоторых вариантах реализации антигенреактивные клетки идентифицируют по связыванию с комплексами ГКГС, которые несут интересующий антиген.

[0251] В любом из описанных выше вариантов реализации идентифицируют по меньшей мере одну пару TCRαβ из созданного репертуара TCR. Желательные свойства пары TCRαβ могут включать антигенспецифичность, аффинность TCR, зависимость TCR от корецептора, HLA-рестрикцию, перекрестную реактивность TCR, противоопухолевую реактивность TCR или любую комбинацию перечисленных свойств.

[0252] В любом из описанных выше вариантов реализации может быть установлено, что полученная последовательность цепи TCR содержит последовательность нуклеотидов CDR3 вместе с достаточной информацией о 5'- и 3'-последовательности нуклеотидов для выбора семейства по меньшей мере одного TCR V- и одного TCR J-сегмента на основании выравнивания последовательностей нуклеотидов, чтобы собрать полноразмерную последовательность цепи TCR. В некоторых вариантах реализации ген J идентифицируют с разрешением 2 или 4 разряда. В некоторых вариантах реализации выравнивание последовательностей нуклеотидов основано на 65%-ной идентичности последовательностей, 70%-ной идентичности последовательностей, 75%-ной идентичности последовательностей, 80%-ной идентичности последовательностей, 85%-ной идентичности последовательностей, 90%-ной идентичности последовательностей, 95%-ной идентичности последовательностей, 96%-ной идентичности последовательностей, 97%-ной идентичности последовательностей, 98%-ной идентичности последовательностей, 99%-ной идентичности последовательностей, 100%-ной идентичности последовательностей, и любом числе или диапазоне между указанными значениями. В некоторых вариантах реализации получают достаточную информацию о последовательности, чтобы определить цепи TCRα и TCRβ из созданной библиотеки TCR с желательным(и) свойством(-ами).

[0253] В некоторых вариантах реализации полученная цепь TCR определяется последовательностью нуклеотидов CDR3. В некоторых вариантах реализации полученная цепь TCR определяется последовательностью аминокислот CDR3.

[0254] В некоторых вариантах реализации полученную цепь TCR определяют по достаточной информации о 5'- и 3'-последовательности нуклеотидов для выбора семейства по меньшей мере одного TCR V- и одного TCR J-сегмента. В некоторых вариантах реализации полученную цепь TCR определяют по достаточной информации о последовательности аминокислот для выбора семейства по меньшей мере одного TCR V- и одного TCR J-сегмента. В некоторых вариантах реализации полученную цепь TCR определяют по достаточной информации о последовательности нуклеотидов или аминокислот, чтобы однозначно идентифицировать пару TCRαβ в созданной библиотеке TCR. В некоторых вариантах реализации полученную цепь TCR определяют по уникальному молекулярному идентификатору, такому как штрихкод на основе нуклеотидов, который позволяет однозначно идентифицировать пару TCRαβ в созданной библиотеке TCR.

[0255] В некоторых вариантах реализации последовательность цепи TCR определяют на основании выравнивания последовательностей нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации последовательность цепи TCR определяют на основании выравнивания последовательностей аминокислот. Используя выравнивание последовательностей нуклеотидов или аминокислот, можно собрать полноразмерную последовательность цепи TCR.

[0256] В некоторых вариантах реализации можно использовать образец из организма субъекта, который содержит нежизнеспособный исходный материал, как описано выше. В качестве примера, нежизнеспособный исходный материал может включать нежизнеспособные клетки или образцы нежизнеспособных тканей. Нежизнеспособный исходный материал может быть законсервирован с помощью любого способа, известного в данной области техники.

[0257] В любом из описанных выше вариантов реализации можно получить определенную часть идентифицированного репертуара TCR. В некоторых вариантах реализации определенная часть идентифицированного репертуара TCR включает получение выбранной части репертуара TCR вместо полного репертуара TCR. Выбранный

репертуар TCR может быть определен с помощью любого из критериев, описанных выше, таких как определенная частота встречаемости в популяции Т-клеток, относительное обогащение по сравнению со второй популяцией Т-клеток, биологические свойства цепи TCR, пространственные паттерны экспрессии генов, встречаемость или совместная встречаемость со сходной частотой во множестве образцов, выбор во множество групп или пулов цепей TCR, или любая их комбинация. В некоторых вариантах реализации выбранный репертуар TCR определяется конкретной антигенспецифичностью. В некоторых вариантах реализации антигенспецифичность включает специфичность к неоантигену. В некоторых вариантах реализации антигенспецифичность включает предсказанную антигенспецифичность.

[0258] В некоторых вариантах реализации получают последовательности антигенспецифического TCR. В некоторых вариантах реализации получают последовательности специфических к неоантигену TCR. В качестве примера, неоантигены могут представлять собой мутированные белки, обнаруженные в опухоли, которые распознаются антигенспецифическими Т-клетками. Таким образом, могут существовать антигенспецифические Т-клетки, направленные против опухоли, с последовательностями TCR, которые специфичны к опухоли или к опухолевым антигенам.

[0259] В любом из описанных выше вариантов реализации Т-клетки, экспрессирующие последовательности антигенспецифического TCR, можно применять для диагностики или лечения инфекции или аутоиммунного расстройства.

[0260] В любом из описанных выше вариантов реализации Т-клетки, экспрессирующие специфические к неоантигену последовательности TCR, можно вводить в качестве терапии рака. Например, специфические к неоантигену Т-клетки можно применять для нацеливания на опухоль, которая экспрессирует неоантиген. В некоторых вариантах реализации специфические к неоантигену Т-клетки получают путем введения специфических к неоантигену цепей TCR в Т-клетки. В некоторых вариантах реализации Т-клетки, экспрессирующие специфические к неоантигену последовательности TCR, могут быть аутологическими или аллогенными.

[0261] В любом из описанных выше вариантов реализации указанный способ можно применять для диагностики. Например, присутствие антигенспецифических TCR против некоторого тканевого антигена может указывать на аутоиммунное заболевание. В

качестве дополнительного примера, присутствие антигенспецифических TCR против некоторых патогенов может указывать на инфекционное заболевание.

[0262] В некоторых вариантах реализации диагностика представляет собой получение репертуаров TCR из патологических очагов инфекции. В некоторых вариантах реализации диагностика представляет собой получение репертуаров TCR из очагов аутоиммунитета. Например, клетки или ткань в очагах инфекции или аутоиммунитета могут экспрессировать определенный антиген, который распознается некоторыми Т-клетками. Путем определения последовательностей TCR Т-клеток, которые могут детектировать определенный антиген в очаге инфекции или аутоиммунитета, можно получить репертуары TCR, ассоциированные или специфические к очагу инфекции или аутоиммунитета. Для того чтобы определить последовательности TCR против опосредующих аутоиммунитет собственных антигенов или патогенов, можно исследовать реактивность полученной библиотеки комбинаторных TCRαβ из выбранных цепей TCRα и TCRβ против группы выбранных собственных антигенов или происходящих из патогенов антигенов.

[0263] В любом из описанных выше вариантов реализации способ можно применять для получения репертуаров BCR/антител. Например, можно получить В-клетки, экспрессирующие рецептор BCR или продуцирующие антитела, специфические к определенному антигену. Таким образом, репертуар BCR/антител полученных В-клеток можно определить путем применения любого из описанных выше способов получения, выбора и комбинаторного образования пары тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, чтобы создать репертуар антител. Можно выбрать антитела с интересующими свойствами из созданного репертуара антител.

[0264] В любом из описанных выше вариантов реализации способ может включать выделение нуклеиновых кислот из образца из организма пациента, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот TCRα и β. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК. Нуклеиновая кислота может быть выделена из любой ткани или клетки субъекта, включая, но не ограничиваясь перечисленными: кровь, кожу, печень, костный мозг, биопсийный материал и другие материалы. В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах реализации

субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой животное.

[0265] В любом из описанных в настоящей заявке вариантов реализации образец из организма субъекта может содержать клетки, выделенные из биологической жидкости. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой опухолеспецифические Т-клетки или инфильтрирующие опухоль лимфоциты. В некоторых вариантах реализации биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из крови, мочи, сыворотки, серозной жидкости, плазмы, лимфы, спинномозговой жидкости, слюны, мокроты, секрета слизистой, вагинальной жидкости, асцитной жидкости, плевральной жидкости, перикардиальной жидкости, перитонеальной жидкости и жидкости брюшной полости.

[0266] В некоторых вариантах реализации осуществляют выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании по меньшей мере одного критерия: частоты встречаемости в популяции Т-клеток, относительного обогащения по сравнению со второй популяцией Т-клеток, относительного различия числа копий ДНК и РНК данной цепи TCR, биологических свойств цепи TCR, причем указанные свойства выбраны из по меньшей мере одного из следующих свойств: (предсказанной) специфичности к антигену, (предсказанной) HLA-рестрикции, аффинности, зависимости от корецептора, исходной Т-клеточной линии дифференцировки (например, CD4 или CD8 Т-клетка) или мотивов последовательности TCR, пространственных паттернов экспрессии генов, причем пространственные паттерны экспрессии генов получают из по меньшей мере одного из: области происхождения в ткани или паттернов коэкспрессии других генов, совместной встречаемости или встречаемости со сходной частотой во множестве образцов, например, встречаемости во множестве очагов опухоли, распределения по множеству групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR, комбинации множества критериев, приведенных в различных вариантах реализации.

[0267] В некоторых вариантах реализации определение последовательностей TCRα- и β осуществляют с помощью по меньшей мере одного из способов: мультиплексной ПЦР; получения последовательностей TCR с помощью направленного обогащения; получения последовательностей TCR с помощью 5'-RACE и ПЦР; получения последовательностей TCR с помощью пространственного секвенирования; получения

последовательностей TCR с помощью секвенирование РНК, и применения уникального молекулярного идентификатора (UMI).

[0268] В некоторых вариантах реализации этап III осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов: последовательности цепей TCR используют для синтеза библиотеки фрагментов ДНК или РНК цепей TCRα и TCRβ, которые соединяют в один фрагмент ДНК или РНК (в котором необязательно соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь), комбинации цепей TCRα и TCRβ получают путем непосредственного синтеза фрагментов ДНК или РНК, в которых соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь, или комбинации цепей TCRα и TCRβ создают внутри клетки путем модификации пула клеток отдельными совокупностями генов TCRα и β таким образом, что клетки будут экспрессировать одну TCRα- и одну β-цепь, комбинации цепей TCRα и TCRβ соединены в одноцепочечную TCR конструкцию, содержащую фрагменты обеих цепей TCR, а также сигнальные домены CD3ζ или/и CD3ε отдельно или в комбинации с сигнальными доменами CD28.

[0269] В некоторых вариантах реализации этап IV осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов: пул репортерных Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки выделяют на основании по меньшей мере одного маркера активации для выделения TCR; пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, метят флуоресцентным красителем, подходящим для отслеживания пролиферации клеток, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и выделяют антигенреактивные репортерные клетки на основании пролиферации для выделения TCR; пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, разделяют на по меньшей мере два образца; образцы стимулируют антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген или нет; после стимуляции обе популяции репортерных клеток инкубируют в течение некоторого периода времени и впоследствии обе популяции репортерных клеток анализируют путем выделения TCR; сравнение пар TCRαβ, полученных из обоих образцов, позволит идентифицировать гены TCR с большей

распространенностью в образце, приведенном в контакт с по меньшей мере одним антигеном; пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки выделяют для выделения TCR на основании по меньшей мере одного репортерного гена, такого как NFAT-GFP или NFAT-YFP, который свидетельствует о стимуляции TCR; пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки выделяют для выделения TCR на основании селекции антигенспецифических репортерных клеток на основании селективной выживаемости, включая, но не ограничиваясь приобретенной устойчивостью к антибиотику, в результате сигнализации TCR, например, путем применения трансгена NFAT-пуромицин; пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, приводят в контакт с одним или множеством комплексов ГКГС, которые несут интересующий антиген; репортерные клетки, связавшиеся с комплексом ГКГС, выделяют для выделения TCR; пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген; затем интересующие пары TCRαβ идентифицируют, применяя основанные на отдельных клетках капельную ПЦР или микрофлюидные подходы, чтобы комбинировать выделение TCR с детектированием уровней транскрипта по меньшей мере одного маркера активации; таким образом детектируют отдельные репортерные клетки в пуле Т-клеток, в которых транскрипты TCRαβ коэкспрессируются с повышенными уровнями маркера активации.

[0270] В некоторых вариантах реализации маркер активации выбран из группы, состоящей из: маркеров активации CD4 или CD8 Т-клеток, CD69, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF, OX40.

[0271] В некоторых вариантах реализации маркер активации представляет собой CD69, и выделяют две популяции клеток для дальнейшего анализа: одну популяцию клеток с высокой экспрессией CD69 и другую популяцию клеток с низкой экспрессией CD69.

[0272] В некоторых вариантах реализации этап IV осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов: идентификации или селекции на основании по меньшей мере одного маркера активации; идентификации или селекции на основании пролиферации в ответ на антиген; идентификации или селекции на основании идентификации генов TCR с большей распространенностью в стимулированных антигеном клетках по сравнению с нестимулированными клетками; идентификации или селекции на основании активации репортерного гена путем стимуляции TCR; идентификации или селекции на основании селективной выживаемости, включая, но не ограничиваясь приобретенной устойчивостью к антибиотику в результате сигнализации TCR; идентификации или селекции на основании связывания с одним или более комплексами ГКГС; идентификации или селекции с применением основанных на отдельных клетках капельной ПЦР или микрофлюидных способов; или любой их комбинации.

[0273] В некоторых вариантах реализации репортерные клетки представляют собой Т-клетки.

[0274] В некоторых вариантах реализации идентификация или селекция с применением основанных на отдельных клетках капельной ПЦР или микрофлюидных способов или любая их комбинация дополнительно включает определение коэкспрессии ассоциированных с активацией генов.

[0275] В настоящей заявке предложены, в некоторых вариантах реализации, способы создания множества библиотек Т-клеток, указанные способы включают: (a) получение репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке; (b) выбор последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара во множество групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR, при этом создается множество библиотек Т-клеток, которые имеют меньшую сложность или которые позволяют получить определенные части репертуара TCR.

[0276] В некоторых вариантах реализации выбор последовательностей цепей TCRα и TCRβ осуществляют на основании диапазона частот.

[0277] В некоторых вариантах реализации осуществляют селекцию или сортировку клеток на основании установки дискриминационного окна. В некоторых вариантах реализации клетки сортируют на основании наиболее верхних 0,1%, 0,5%, 1%,

5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99,9%, или любое число или диапазон между указанными значениями, живых отдельных клеток в образце. В некоторых вариантах реализации клетки сортируют на основании наиболее нижних 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99,9%, или любое число или диапазон между указанными значениями, живых отдельных клеток в образце.

[0278] В некоторых вариантах реализации библиотеку нуклеиновых кислот вводят в популяцию клеток. В некоторых вариантах реализации популяция клеток диплоидная. В некоторых вариантах реализации популяция клеток имеет любую плоидность. В некоторых вариантах реализации первая популяция клеток выбрана из популяции из клеток в библиотеке. В некоторых вариантах реализации измеряют обогащение и/или обеднение последовательностей нуклеиновых кислот в первой популяции клеток, чтобы определить интересующие последовательности нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации обогащение и/или обеднение последовательностей нуклеиновых кислот в первой популяции измеряют путем сравнения популяции с референсом. В некоторых вариантах реализации референс может представлять собой вторую популяцию клеток или библиотеку последовательностей нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации измеряют обогащение и/или обеднение последовательностей нуклеиновых кислот в первой популяции клеток путем сравнения более чем с одним референсом.

[0279] В некоторых вариантах реализации первую и/или вторую популяцию выделяют на основании сортировки с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах реализации сортировку с помощью проточной цитометрии осуществляют на основании детектирования изменения фенотипа. В некоторых вариантах реализации изменение фенотипа вызывают путем осуществления контакта популяции из библиотеки клеток с другой популяцией клеток.

[0280] В некоторых вариантах реализации изменение фенотипа детектируют по связыванию меченого флуоресцентной меткой зонда с клетками. В некоторых вариантах реализации сортировку с помощью проточной цитометрии осуществляют на основании порога. В некоторых вариантах реализации порог основывается на намерении получить процент клеток с наиболее высоким флуоресцентным сигналом из фракции всех клеток путем сортировки с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах реализации

выделяют верхние 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99,9% клеток на основании флуоресцентного сигнала. В некоторых вариантах реализации порог основывается на намерении получить процент клеток с низким флуоресцентным сигналом из фракции всех клеток путем сортировки с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах реализации выделяют нижние 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99,9% клеток на основании флуоресцентного сигнала. В некоторых вариантах реализации используют множество порогов, чтобы разделить образец на первую и вторую популяцию.

[0281] В некоторых вариантах реализации порог основывается на намерении получить минимальное количество клеток из общего пула клеток с помощью проточной цитометрии на основании силы флуоресцентного сигнала, например, если нужно получить по меньшей мере 1x10e6 клеток из 10x10e6 клеток, то выделяют верхние 10% или нижние 10% клеток на основании флуоресцентного сигнала.

[0282] В некоторых вариантах реализации порог основывается на силе флуоресцентного сигнала второй популяции клеток. В некоторых вариантах реализации порог основывается на силе флуоресцентного сигнала, которая выше, чем в референсной популяции. В некоторых вариантах реализации порог основывается на силе флуоресцентного сигнала, которая ниже, чем в референсной популяции. В некоторых вариантах реализации сила флуоресцентного сигнала в референсной популяции основывается на подгруппе из популяции с экспрессией вторичного маркера.

[0283] В некоторых вариантах реализации первую и/или вторую популяцию выделяют на основании обогащения с помощью магнитных гранул. В некоторых вариантах реализации обогащение с помощью магнитных гранул осуществляют на основании изменения фенотипа. В некоторых вариантах реализации изменение фенотипа вызывают путем осуществления контакта популяции из библиотеки клеток с другой популяцией клеток.

[0284] В некоторых вариантах реализации приведение в контакт популяции из библиотеки клеток с другой популяцией клеток (которую могут называть ‘другая популяция клеток’) осуществляют с другой популяцией клеток, которые генетически сконструированы, чтобы изменить фенотип. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток представляет собой поликлональный пул генетически

сконструированных клеток. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток генетически сконструирована для экспрессии вариантов молекул. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток генетически сконструирована для экспрессии одного или более антигенов. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток генетически сконструирована для экспрессии одного или более антигенов в виде минигенов. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток генетически сконструирована для экспрессии одного или более антигенов в виде последовательно расположенных минигенов.

[0285] В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток представляет собой клетки, которые презентируют антиген (антигенпрезентирующие клетки; АПК). В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток представляет собой дендритные клетки. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток представляет собой моноциты. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток представляет собой сконструированные клетки с аллелями ГКГС I класса и/или II класса. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток может представлять собой В-клетки. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток может представлять собой аутологические клетки. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток может представлять собой аутологические В-клетки. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток может представлять собой иммортализованные аутологические В-клетки. В некоторых вариантах реализации другая популяция клеток может представлять собой аутологические В-клетки, иммортализованные путем инфицирования EBV.

[0286] В некоторых вариантах реализации приведение в контакт популяции из библиотеки клеток с другой популяцией клеток запускает специфические взаимодействия между факторами, экспрессированными на клетках, принадлежащих любой из указанных популяций клеток. В некоторых вариантах реализации взаимодействие между факторами представляет собой взаимодействие рецептор/лиганд. В некоторых вариантах реализации рецептор во взаимодействии рецептор/лиганд представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах реализации лиганд во взаимодействии рецептор/лиганд представляет собой антиген, презентированный на главном комплексе гистосовместимости (ГКГС). В некоторых вариантах реализации взаимодействия рецептор/лиганд между

популяцией из библиотеки клеток и другой популяцией клеток запускают фенотипическое изменение, которое можно детектировать.

[0287] В некоторых вариантах реализации совокупность вариантов, экспрессированных в популяции из библиотеки клеток, представляет собой библиотеку плазмид, каждая из которых экспрессирует комбинацию одной TCR-альфа и одной TCR-бета цепи. В некоторых вариантах реализации библиотеку TCR конструируют путем комбинаторного соединения совокупности TCR-альфа и TCR-бета цепей. В некоторых вариантах реализации все комбинации TCR-альфа и TCR-бета могут присутствовать в библиотеке TCR. В некоторых вариантах реализации используют множество библиотек меньшей сложности, чтобы создать библиотеку большей сложности. В некоторых вариантах реализации сложность объединенной библиотеки большей сложности меньше, чем у библиотеки, содержащей все комбинации TCR-альфа и TCR-бета, которые присутствуют в объединенной библиотеке большей сложности. В некоторых вариантах реализации информацию об образовании пар или информацию о вероятности образования пар используют при разработке множества библиотек меньшей сложности, чтобы максимизировать вероятность того, что данная пара TCR-альфа-TCR-бета будет присутствовать в библиотеке TCR. В некоторых вариантах реализации библиотека меньшей сложности может содержать все комбинации одной или более TCR-альфа и одной или более TCR-бета цепей. В некоторых вариантах реализации библиотеку TCR конструируют путем сначала получения множества вариантов единых нуклеотидных молекул, кодирующих обе цепи TCR-альфа и TCR-бета, а затем смешивания двух или более различных вариантов молекул, кодирующих обе цепи TCR-альфа и TCR-бета.

[0288] В некоторых вариантах реализации изменение фенотипа детектируют по связыванию зонда с клетками. В некоторых вариантах реализации клетки не требуют обработки каким-либо фиксатором перед связыванием зонда. В некоторых вариантах реализации зонд позволяет соединить магнитную гранулу с клеткой. В некоторых вариантах реализации обогащение с помощью магнитных гранул позволяет выделить первую и/или вторую популяцию клеток из популяции клеток из библиотеки. В некоторых вариантах реализации первая или вторая популяция клеток представляют собой клетки, удерживаемые магнитом. В некоторых вариантах реализации первая или вторая популяция клеток представляют собой клетки, не удерживаемые магнитом. В некоторых вариантах

реализации связывание множества зондов используют для выделения первой и/или второй популяции путем последовательного обогащения с помощью магнитных гранул. В некоторых вариантах реализации зонд связывается с CD62L. В некоторых вариантах реализации зонд связывается с CD69. В некоторых вариантах реализации первая популяция клеток статистически значимо обогащена или обеднена по меньшей мере одной последовательностью нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации статистически значимое обогащение или обеднение определяют относительно референса. В некоторых вариантах реализации первая популяция клеток статистически значимо обогащена по меньшей мере одной последовательностью нуклеотидов относительно второй популяции клеток. В некоторых вариантах реализации комбинируют сортировку с помощью проточной цитометрии и обогащение с помощью магнитных гранул.

[0289] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов из библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает введение указанной библиотеки в популяцию клеток; приведение в контакт библиотеки клеток со второй популяцией клеток, селекцию первой популяции клеток из библиотеки на основании экспрессии по меньшей мере одного маркера путем обогащения с помощью магнитных гранул, идентификацию по меньшей мере одной последовательности нуклеотидов на основании статистически значимого обогащения или обеднения последовательностью нуклеотидов выбранной первой популяции относительно контроля. В некоторых вариантах реализации единица, обогащение или обеднение которой наблюдают, представляет собой последовательность нуклеотидов, которая содержится в библиотеке нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере некоторые из первой популяции клеток сконструированы для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем библиотеки нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации экспрессия маркера связана с введенной нуклеиновой кислотой из библиотеки. В некоторых вариантах реализации «связана» означает, что введенная нуклеиновая кислота изменяет экспрессию маркера.

[0290] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов из библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает: введение указанной библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, чтобы получить библиотеку клеток; приведение в контакт библиотеки клеток с первой

популяцией клеток; селекцию субпопуляции из библиотеки клеток на основании экспрессии по меньшей мере одного маркера путем обогащения с помощью магнитных гранул; и идентификацию по меньшей мере одной последовательности нуклеотидов на основании статистически значимого обогащения или обеднения субпопуляции указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере некоторые из субпопуляции клеток сконструированы для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем библиотеки нуклеиновых кислот.

[0291] В некоторых вариантах реализации селекцию осуществляют на основании экспрессии маркера выше первого порогового уровня. В некоторых вариантах реализации маркер доступен для обогащения с помощью магнитных гранул, что может означать, но не ограничено тем, что маркер поддается мечению с помощью магнитной гранулы путем внеклеточной экспрессии (например, он должен быть доступен вне клетки). В некоторых вариантах реализации последовательности нуклеотидов кодируют экспрессируемые полипептиды.

[0292] В некоторых вариантах реализации библиотека нуклеиновых кислот, введенная в популяцию клеток, приводит к экспрессии вариантов молекул. В некоторых вариантах реализации такие варианты молекул представляют собой последовательности Т-клеточного рецептора. В некоторых вариантах реализации такие варианты молекул представляют собой рецепторы-переключатели. В некоторых вариантах реализации такие варианты молекул представляют собой молекулы CAR.

[0293] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей цепи Т-клеточного рецептора α(TCRα) и TCRβ, в (необязательно) комбинаторной библиотеке нуклеиновых кислот. Указанный способ включает: введение библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, чтобы получить библиотеку клеток; и определение по меньшей мере одной последовательности нуклеотидов или идентичности нуклеиновых кислот из первой популяции вариантных нуклеиновых кислот на основании обогащения подгруппы последовательностью нуклеотидов относительно контроля. В некоторых вариантах реализации указанную по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту выделяют из первой популяции клеток. В некоторых вариантах реализации первую

популяцию клеток подвергают селекции на основании экспрессии маркера выше первого порогового уровня в ответ на антиген.

[0294] В некоторых вариантах реализации любой из способов, предложенных в настоящей заявке, дополнительно включает этап введения Т-клеток, экспрессирующих последовательности антигенспецифического TCR, для диагностики или лечения инфекции или аутоиммунитета.

[0295] В некоторых вариантах реализации любого из способов или композиций, предложенных в настоящей заявке, Т-клетки могут быть аутологическими или аллогенными.

[0296] В некоторых вариантах реализации любого из способов или композиций, предложенных в настоящей заявке, маркер активации представляет собой CD69.

[0297] В некоторых вариантах реализации любого из способов или композиций, предложенных в настоящей заявке, выделяют две популяции клеток: одну популяцию клеток с высокой экспрессией CD69 и другую популяцию клеток с низкой экспрессией CD69.

[0298] В некоторых вариантах реализации любого из способов или композиций, предложенных в настоящей заявке, предложена нуклеотидная библиотека, содержащая репертуар Т-клеточных рецепторов, полученных в соответствии с любым из способов, предложенных в настоящей заявке.

[0299] В некоторых вариантах реализации любого из способов или композиций, предложенных в настоящей заявке, предложена нуклеотидная конструкция, содержащая последовательность нуклеотидов, идентифицированную в соответствии с любым из способов, предложенных в настоящей заявке.

[0300] В некоторых вариантах реализации любого из способов или композиций, предложенных в настоящей заявке, предложена клетка, содержащая нуклеотидную конструкцию в соответствии с описанием выше.

[0301] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, в образце. Указанный способ включает: a) секвенирование цепей TCRα и TCRβ в образце, b) выбор и комбинаторное образование пары последовательностей цепей TCRα и TCRβ для создания библиотеки пар TCRαβ, c) введение указанной библиотеки пар TCRαβ

в пул репортерных клеток, d) стимулирование репортерных клеток, которые модифицированы библиотекой пар TCRαβ, антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген (что можно осуществить посредством процесса объединения ровно двух пулов, описанного в настоящей заявке, в некоторых вариантах реализации), e) определение пар TCRαβ, специфических к по меньшей мере одному интересующему антигену, и f) введение пар TCRαβ в клетки и селекцию клеток, содержащих пары TCRαβ.

[0302] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих пары цепей антигенспецифического Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает: a) введение библиотеки в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, кодируемые представителем множества вариантных нуклеиновых кислот, b) селекцию субпопуляции из популяции клеток на основании экспрессии маркера выше порогового уровня в ответ на антиген (который необязательно может находиться в антигенпрезентирующих клетках), причем указанная субпопуляция содержит множество клеток, c) выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции, d) определение последовательностей нуклеотидов вариантных нуклеиновых кислот, и e) идентификацию по меньшей мере одной вариантной последовательности нуклеотидов на основании обогащения подгруппы указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, кодирующих цепи TCR-альфа и TCR-бета.

[0303] В некоторых вариантах реализации процент клеток, которые отсортировывают, основан на сравнении процента Т-клеток с экспрессией маркера в контрольных культурах и культурах с экспрессирующими неоантиген клетками. Для сортировки клеток можно использовать любой маркер. В некоторых вариантах реализации маркеры для сортировки клеток включают, например, CD4, CD8 и CD69.

[0304] Дополнительные варианты реализации представлены на ФИГ. 35A - 35E, на которых показано получение антигенспецифических TCR из библиотеки TCR, полученной путем синтеза генов. В данных вариантах реализации представлена идея

повышения чувствительности платформы для скрининга библиотеки TCR путем увеличения соотношения Э:М. Эти объекты также входят в некоторые приведенные ниже Примеры.

[0305] Количество «этапов», используемых в данной заявке, обозначает только вариант реализации, обсуждаемый в данном конкретном разделе, буква обозначает этап самого процесса. Таким образом, например, «этап 35» обозначает вариант реализации, названный 35, тогда как «а» обозначает этап «а» указанного варианта реализации. Термин «этап» обозначает часть процесса, и нет обязательного требования, чтобы любой этап был завершен перед началом другого этапа.

[0306] **Этап 35А) Схема дизайна скрининга.** Пять охарактеризованных TCR и 95 неохарактеризованных TCR из образцов рака яичников (РЯ) или колоректального рака (КРР) использовали для создания комбинаторных библиотек TCR дизайна 100 x 100. Библиотеку составляли в Twist Bioscience, применяя человеческие фрагменты V, CDR3 и J, тогда как константная (С) область была мышиного происхождения. Указанную библиотеку использовали для ретровирусной трансдукции репортерных Т-клеток Jurkat. Поликлональные репортерные Т-клетки совместно культивировали с антигенпрезентирующими клетками (АПК), которые были сконструированы для презентации распознаваемых антигенов в формате TMG. В данном примере в совместных культурах использовали клетки EBV-LCL, экспрессирующие TMG, и EBV-LCL, которые не подвергали генетической инженерии для презентации специфических антигенов.

[0307] **Этап 35В) Стратегия сортировки для скрининга.** Репортерные Т-клетки Jurkat, экспрессирующие библиотеку TCR с дизайном 100x100, полученные, как описано на 35А), совместно культивировали в течение 21 часа при соотношении 1:1/1:2 и 1:3 с АПК, упомянутыми в 35А). После совместного культивирования АПК удаляли, применяя селекцию на магнитных гранулах, на основании экспрессии CD20 на В-клетках. После удаления В-клеток, клетки затем сортировали по активации Т-клеток с помощью FACS, используя маркер CD69. В некоторых вариантах реализации библиотеку можно сортировать с помощью любого способа. Стратегия сортировки включала (слева направо) последовательную установку дискриминационного окна для селекции лимфоцитов, установку дискриминационного окна для селекции отдельных клеток, установку дискриминационного окна для исключения $CD20^{+}$-клеток и установку двух

дискриминационных окон сортировки (‘верхних’ и ‘нижних’ популяций), которые захватывают клетки, экспрессирующие высокие и низкие уровни CD69, соответственно. Результаты представлены на диаграмме на ФИГ. 35B.

[0308] **Этап 35C) Получение кассет экспрессии TCR.** В некоторых вариантах реализации можно получить соответствующие кассеты экспрессии TCR с помощью любой из различных методик. В некоторых вариантах реализации кассеты экспрессии TCR верхних и нижних образцов из ФИГ. 35B) можно получить, применяя стратегию ПЦР, описанную в 10C), с последующей штрихкодирующей ПЦР. Также была включена контрольная ПЦР плазмидной библиотеки TCR. Продукты ПЦР после второго раунда ПЦР анализировали с применением Agilent TapeStation. Результаты представлены на ФИГ. 35C.

[0309] **Этап 35D) Анализ обогащения TCR по результатам скрининга.** В некоторых вариантах реализации пул продуктов ПЦР из этапа 35C) можно проанализировать любым количеством способов. Например, пул продуктов ПЦР из 35C) использовали для получения библиотеки и секвенировали, применяя технологию Nanopore. Получали идентичности цепей TCR-альфа и -бета и идентифицировали дифференциально представленные комбинации TCR, применяя пакет DESeq2 R. Средние Rlog-преобразованные количества прочтений для скрининга в присутствии (ось x) и отсутствие (ось y) экспрессии TMG B-клетками представлены для соотношений эффектора и мишени (Э:М), составляющих 1:1, 1:2 и 1:3. Пять охарактеризованных антигенреактивных TCR изображены в виде более крупных серых точек на ФИГ. 35D.

[0310] **Этап 35E) Свойства пяти охарактеризованных антигенреактивных TCR.** Ранг наиболее дифференциально представленных комбинаций TCR-альфа x бета-цепей по результатам в 35D), а также соответствующее p-значение, идентифицировали, применяя пакет DESeq2 R. Анализ дифференциальной представленности известен квалифицированному специалисту и основан на линейной модели, предполагающей, что обогащенный TCR определяют как обогащенный в ‘верхнем’ образце и обедненный в ‘нижнем’ образце, где презентированы антигены, по сравнению как с ‘верхним’, так и с ‘нижним’ образцами, где не презентированы антигены. Характеристики сведены в таблицу на ФИГ. 35E.

[0311] Дополнительные варианты реализации представлены на ФИГ. 36, на которой показано получение антигенспецифических TCR из библиотеки TCR, полученной

путем синтеза генов. В этих вариантах реализации представлена идея применения сортировки на основе гранул вместо проточной сортировки в качестве способа разделения клеток для скрининга библиотеки TCR. Преимуществом сортировки клеток на основе гранул является повышенная масштабируемость по сравнению с сортировкой клеток на основе FACS.

[0312] Этап 36A) Схема дизайна скрининга. Пять охарактеризованных TCR и 95 неохарактеризованных TCR из образцов рака яичников (РЯ) или колоректального рака (КРР) использовали для создания комбинаторных библиотек TCR дизайна 100 x 100. Библиотеку составляли в Twist Bioscience, применяя человеческие фрагменты V, CDR3 и J, тогда как константная (C) область была мышиного происхождения. Указанную библиотеку использовали для ретровирусной трансдукции репортерных Т-клеток Jurkat. Поликлональные репортерные Т-клетки совместно культивировали с антигенпрезентирующими клетками (АПК), которые были сконструированы для презентации специфических антигенов в формате TMG.

[0313] Этап 36B) Стратегия сортировки для скрининга. Репортерные Т-клетки Jurkat, экспрессирующие библиотеку TCR с дизайном 100x100, полученные, как описано на 36A), совместно культивировали в течение 21 часа при соотношении 1:1 с АПК, упомянутыми в 36A). После совместного культивирования использовали AutoMACS от Miltenyi для последовательных разделений клеток. Во-первых, удаляли мертвые клетки с применением набора для удаления мертвых клеток. Из живых клеток удаляли АПК, применяя селекцию на магнитных гранулах, на основании экспрессии CD20 на В-клетках. После удаления В-клеток, CD20- клетки разделяли, используя экспрессию CD62L - маркера, который экспрессируется на неактивированных клетках Jurkat. CD62L- и CD62L+ затем отдельно окрашивали меченым биотином антителом против CD69, после чего клетки разделяли, используя микрогранулы против биотина. Окончательные фракции, которые применяли для получения из них кассет TCR, представляли собой CD20-, CD62L-, CD69+ клетки, представляющие «верхнюю» фракцию, и CD20-, CD62L+, CD69- клетки, представляющий «нижнюю» фракцию. Схематическое представление процесса разделения клеток изображено на ФИГ. 36B).

[0314] Этап 36C) Получение кассет экспрессии TCR. В некоторых вариантах реализации можно получить соответствующие кассеты экспрессии TCR с помощью любой

из различных методик. В некоторых вариантах реализации кассеты экспрессии TCR верхних и нижних образцов из ФИГ. 36B) получали, применяя стратегию ПЦР, описанную в 10C), с последующей штрихкодирующей ПЦР. Также была включена контрольная ПЦР плазмидной библиотеки TCR. Продукты ПЦР после второго раунда ПЦР анализировали с применением Agilent TapeStation. Результаты представлены на ФИГ. 36C.

[0315] Этап 36D) Анализ обогащения TCR по результатам скрининга. В некоторых вариантах реализации пул продуктов ПЦР из этапа 36C) можно проанализировать любым количеством способов. Например, пул продуктов ПЦР из 36C) использовали для получения библиотеки и секвенировали, применяя технологию Nanopore. Получали идентичности цепей TCR-альфа и -бета путем выравнивания с цепями, присутствующими в библиотеке, и определяли дифференциально экспрессированные комбинации TCR, применяя пакет DESeq2 R. Средние Rlog-преобразованные количества прочтений для скрининга в присутствии (ось x) и отсутствие (ось y) экспрессии TMG B-клетками представлены для каждого TCR серым цветом, и пять охарактеризованных антигенреактивных TCR представлены в виде черных точек.

[0316] Этап 36E) Характеристики верхних 7 наиболее значительно обогащенных TCR. Дифференциально представленные комбинации TCR-альфа x бета-цепей по результатам в 36D) идентифицировали, применяя пакет DESeq2 R. Анализ дифференциальной представленности известен квалифицированному специалисту и основан на линейной модели, предполагающей, что обогащенный TCR определяют как обогащенный в ‘верхнем’ образце, где экспрессировались TMG, и обедненный в ‘нижнем’ образце, где экспрессировались TMG, по сравнению как с ‘верхним’, так и с ‘нижним’ образцами, где не экспрессировались TMG. Цепи альфа и бета верхних 7 наиболее значительных выявленных TCR (попаданий), а также их представленность, их log2-преобразованная кратность изменения и значимость дифференциальной представленности сведены в таблицу на ФИГ. 36E).

[0317] Дополнительные варианты реализации представлены на ФИГ. 37, на которой показаны дополнительные анализы методом генетического скрининга, чтобы определить неоантигенреактивные TCR у пациентов 2 и 4 (pt2/pt4) с колоректальным раком (КРР). В этих вариантах реализации представлена идея применения комбинаторного кодирования последовательно расположенных (тандемных) минигенов (TMG), чтобы

осуществить эффективный скрининг библиотек TCR против большого количества минигенов.

[0318] Этап 37A) Схематическое представление дизайна комбинаторного кодирования TMG 6x6. Учитывая способ скрининга, при котором библиотеку TCR необходимо подвергнуть скринингу против АПК, экспрессирующих 36 TMG, можно создать пулы АПК, каждый из которых экспрессирует уникальную комбинацию 6 TMG. Например, пул C1 состоит из АПК, экспрессирующих TMG1, TMG2, TMG3, TMG4, TMG5 и TMG6. Пул R1 состоит из АПК, экспрессирующих TMG1, TMG7, TMG13, TMG19, TMG25 и TMG31. Можно осуществить отдельный скрининг библиотеки TCR против каждого из пулов АПК. По объединению двух пулов, которые распознаются TCR в скрининговом подходе, можно определить TMG, который был распознан как TMG, представленный в обоих пулах.

[0319] Этап 37B) Анализ порядка ранжирования всех комбинаций TCR-альфа x бета как функции количества повторов скрининга библиотеки TCR из pt2. Результаты скрининга библиотеки TCR pt2 с ФИГ. 10G) анализировали, используя либо все 3 повтора, либо 2 из 3 повторов. Определяли дифференциально экспрессированные комбинации TCR, применяя пакет DESeq2 R, для обоих условий. Ранги для значимости обогащения были основаны на статистие Вальда, что рассчитывали, применяя DESeq2, причем наиболее высокий ранг (ранг 1) присваивали наиболее высокому значению статистики Вальда. Ранги, основанные на анализе на основе 2 или 3 повторов, представлены на оси y и x, соответственно. Лидирующие неоантигенреактивные TCR, идентифицированные на ФИГ. 10G), представлены в виде более крупных черных точек.

[0320] Этап 37C) Сводная таблица статистического анализа на основании 2 или 3 повторов скрининга библиотеки TCR КРР. Способы анализа с ФИГ. 37B) применяли ко всем скринингам библиотеки TCR из пациента, осуществленным на ФИГ. 10G). Все лидирующие неоантигенреактивные TCR, идентифицированные на ФИГ. 37B), сводили в таблицу, вместе со скорректированным по методу Бонферрони p-значением для определения статистической значимости обогащения TCR в верхних образцах относительно нижних образцов. Данное p-значение представлено для анализов на основании 3 повторов скрининга, или любой из комбинаций 2 из 3 повторов скрининга. Галочки в последней колонке обозначают, что будут выбраны одни и те же лидирующие

TCR с наивысшим рангом независимо от того, будут ли включены в скрининговый анализ 2 или 3 повторных скрининга, а также независимо от того, какую из комбинаций 2 из 3 повторов выберут. Пример представлен на ФИГ. 37B), где 7 неоантигенреактивных TCR с наивысшим рангом из pt4, выбранных для дополнительного подтверждения (см. ФИГ. 10G), такие же, как 7 TCR с наивысшим рангом на основании анализа с использованием только 2 повторов.

[0321] Этап 37D) таблица образцов из pt4, используемых для анализа попарного обогащения TCR. Шесть образцов (каждый из которых был представлен как верхним, так и нижним образцом) были включены в анализ попарного обогащения TCR. Образцы содержали совместные культуры репортерных Т-клеток, экспрессирующих библиотеку TCR, вместе с линиями В-клеток, которые экспрессируют TMG1, TMG2, TMG3 или TMG4 отдельно (образцы 1 - 4, соответственно), а также совместную культуру с пулом указанных линий В-клеток, смешанным в соотношении 1:1:1:1 (образец 5). Для образца 6, совместную культуру вели с В-клетками, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии каких-либо экзогенных антигенов.

[0322] Этап 37E) Результаты анализа попарного обогащения TCR. Все возможные пары образцов, представленных на ФИГ. 19D), анализировали на обогащение TCR верхних образцов по сравнению с нижными образцами, применяя DESeq2. Анализ дифференциальной представленности известен квалифицированному специалисту и основан на линейной модели, предполагающей, что обогащенный TCR определяют как обогащенный в ‘верхнем’ образце, где экспрессировались TMG, и обедненный в ‘нижнем’ образце, где экспрессировались TMG, по сравнению как с ‘верхним’, так и с ‘нижним’ образцами, где не экспрессировались TMG. Скорректированные по методу Бонферрони p-значения сортировали и наносили на график в порядке возрастания. Светло-серые точки представляют p-значения для анализа альфа43.бета16 TCR, и темно-серые точки представляют p-значения для анализа с альфа9.бета14 TCR. Верхние выбросы представляли собой те же TCR, которые идентифицировали на ФИГ. 10G). Реактивность TCR-альфа9.бета14 может объясняться антигеном, экспрессированным с TMG4, так как это был общий TMG среди образцов 4 и 5. Реактивность TCR-альфа43.бета16 может объясняться TMG3, так как это был общий TMG среди образцов 3 и 5.

[0323] Дополнительные варианты реализации представлены на ФИГ. 38, на которой показаны дополнительные анализы методом генетического скрининга, чтобы определить неоантигенреактивные TCR у пациента 2 с колоректальным раком (КРР). В этих вариантах реализации представлена чувствительность платформы и подтверждение принципа, что характеристики TCR, такие как чувствительность TCR, можно определить по результатам генетического скрининга.

[0324] **Этап 38A) Взаимосвязь активации TCR и фоновой активации TCR между результатами скрининга и проверки.** Шестнадцать TCR КРР из pt2, отличающиеся по реактивности TCR в подходе генетического скрининга, идентифицировали на основании результатов, представленных на ФИГ. 10G). Во-первых, рассчитывали Rlog-преобразованные количества прочтений, применяя пакет DESeq2 R, и Rlog-значения нижнего образца вычитали из Rlog-значений верхних образцов, и представили для совместных культур, которые вели в присутствии (ось x) и отсутствие (ось y) экспрессии TMG B-клетками (ФИГ. 38). Эти TCR экспрессировали в репортерных T-клетках, и совместно культивировали с EBV-B-клетками, экспрессирующими соответствующий TMG (TMG2), в независимых проверочных экспериментах. Активацию T-клеток измеряли, используя маркер CD69, с помощью анализа FACS. Для сравнения результатов проверки с результатами скрининга библиотеки TCR, кратность активации TCR в результатах скрининга определяли как различие между Rlog-значениями верхних образцов и нижних образцов, полученными для совместной культуры с EBV-B-клетками, экспрессирующими TMG2 (ось y; середняя панель). Кратность активации в проверочном эксперименте определяли как отношение CD69+ клеток после совместного культивирования с экспрессирующими TMG2 по сравнению с не подвергнутыми генетической инженерии EBV-B-клетками (ось x; середняя панель). Фоновый уровень для скрининга определяли как обогащение указанными TCR верхних по сравнению с нижними образцами, полученными из совместной культуры с не подвергнутыми генетической инженерии EBV-B-клетками (ось y; правая панель). Фоновый уровень для проверочного эксперимента определяли как процент CD69+ клеток после совместного культивирования с не подвергнутыми генетической инженерии EBV-B-клетками (ось x; правая панель).

[0325] В некоторых вариантах реализации получение антигенреактивных TCR из библиотек TCRαβ можно осуществить путем выделения одной или более субпопуляций на

основании ответа на антиген. В некоторых вариантах реализации этот подход включает один или более из следующих этапов: i) генную инженерию репортерных Т-клеток, чтобы позволить экспрессию TCR из библиотек TCRαβ; ii) ведение совместной культуры указанных клеток с антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один антиген; iii) разделение клеток на основании маркеров активации Т-клеток на a) 'верхнюю' популяцию, экспрессирующую один или множество маркеров активации Т-клеток; и b) 'нижнюю' популяцию без экспрессии (или с низкой экспрессией) одного или множества маркеров активации Т-клеток; iv) идентификацию TCR из верхних и нижних образцов, применяя ПЦР с геномной ДНК и последующее глубокое секвенирование; и v) идентификацию по меньшей мере одного антигенреактивного TCR, которым обогащен верхний образец по сравнению с нижним образцом. Экспрессия маркера активации Т-клеток может представлять собой относительно высокую экспрессию маркера, позволяющего отделить активированные Т-клетки (например, CD69), или относительно низкие уровни экспрессии маркера, позволяющего отделить неактивированные Т-клетки (например, CD62L).

[0326] В некоторых вариантах реализации верхние образцы представляют собой верхние 1, 5, 10, 20, 30, 40 или 50%, и нижние образцы представляют собой нижние 1, 5, 10, 20, 30, 40 или 50%, включая любую пару диапазонов между любыми двумя указанными значениями для верхних и нижних образцов. В некоторых вариантах реализации подход с верхними/нижними образцами представляет собой подход, при котором используют как верхнюю популяцию, так и нижнюю популяцию в любом из вариантов реализации, предложенных в настоящей заявке.

[0327] В некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей пары цепей антигенспецифического Т-клеточного рецептора α(TCRα) и TCRβ из библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает a) введение библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, чтобы получить библиотеку клеток; b) селекцию первой популяции клеток из библиотеки на основании экспрессии маркера выше первого порогового уровня в ответ на антиген; и c) выделение первой популяции вариантных нуклеиновых кислот из первой популяции из библиотеки. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает a) определение по меньшей мере

одной последовательности нуклеотидов или идентичности нуклеиновых кислот из первой популяции вариантных нуклеиновых кислот; и b) идентификацию по меньшей мере одной вариантной последовательности нуклеотидов на основании обогащения подгруппы указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля. В некоторых вариантах реализации пороговый уровень основан на по меньшей мере одном из:

a) получения процента от общего пула клеток на основании экспрессии маркера; или
b) получения минимального количества клеток из общего пула клеток; или
c) получения клеток, задержанных магнитом на основании связывания магнитного зонда с по меньшей мере одним маркером, экспрессированным в ответ на антиген.

[0328] В некоторых вариантах реализации контроль представляет собой вторую популяцию клеток, которая ниже второго порога. В некоторых вариантах реализации контроль представляет собой одну или более из: референсной популяции клеток, комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, которую ввели в популяцию клеток, популяции клеток, отсортированных из той же популяции клеток, что и первая популяция, на основании экспрессии маркера ниже второго порога, и/или по меньшей мере одной популяции клеток, полученной из совместных культур репортерных Т-клеток, экспрессирующих соответствующую библиотеку TCR, с В-клетками, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии экзогенных антигенов. В некоторых вариантах реализации нижний (или контрольный) образец сортируют из той же популяции клеток, что и верхний образец, но он содержит низкий уровень экспрессии маркера активации, или нижний образец получают из совместных культур репортерных Т-клеток, экспрессирующих соответствующую библиотеку TCR, и В-клеток, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии экзогенных антигенов. В некоторых вариантах реализации нет перекрывания между верхней фракцией и нижней фракцией. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает добавление антигена в популяцию клеток. В некоторых вариантах реализации выделение первой популяции и/или контроля осуществляют с помощью по меньшей мере одного из способов: a) обогащения с помощью магнитных гранул, b) сортировки с помощью проточной цитометрии или c) обоих. В некоторых вариантах реализации контроль представляет собой одну или более из: референсной популяции клеток, комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, которую ввели в популяцию клеток, популяции клеток, отсортированных из той же популяции

клеток, что и первая популяция, на основании экспрессии маркера ниже второго порога, или по меньшей мере одной популяции клеток, полученной из совместных культур репортерных Т-клеток, экспрессирующих соответствующую библиотеку TCR, с антигенпрезентирующими клетками, такими как В-клетки, которые не презентируют никакие экзогенные антигены.

[0329] В некоторых вариантах реализации подход с верхними/нижними образцами спланирован так, что антигенреактивные TCR станут положительными по маркерам активации после стимуляции антигеном, и, следовательно, такими TCR будет обогащена верхняя популяция относительно нижней популяции. Подход с верхними/нижними образцами проиллюстрирован на различных сопроводительных фигурах, как описано в Примере 24.

[0330] В некоторых вариантах реализации нижний образец (или контроль) может представлять собой любую референсную популяцию клеток или референсную библиотеку плазмид TCR. Нижний образец может быть отсортирован из той же популяции клеток, что и верхний образец, но содержит низкий уровень экспрессии маркеров активации. Нижний образец можно получить из совместных культур репортерных Т-клеток, экспрессирующих соответствующую библиотеку TCR, и В-клеток, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии экзогенных антигенов. Нижний образец может представлять собой библиотеку плазмид TCR, которые применяли, чтобы создать репортерные Т-клетки, из которых сортировали верхний образец. В некоторых вариантах реализации представленность TCR в верхних и нижних образцах можно сравнить с представленностью TCR в любом другом дополнительном образце в процессе дифференциального анализа представленности TCR. В некоторых вариантах реализации такие дополнительные образцы могут представлять собой библиотеку плазмид TCR. В некоторых вариантах реализации такие дополнительные образцы могут быть получены из совместных культур репортерных Т-клеток, экспрессирующих соответствующую библиотеку TCR, и В-клеток, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии экзогенных антигенов.

[0331] В некоторых вариантах реализации способ представляет собой способ получения репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) из разнообразных популяций Т-клеток. Указанный способ может включать определение последовательностей нуклеотидов или аминокислот спаренных цепей TCRα и TCRβ в образце из организма субъекта; выбор

последовательностей пар TCRαβ из общего репертуара; создание репертуара TCR путем создания библиотек выбранных пар TCR-альфа/бета; и идентификацию по меньшей мере одной пары TCR-альфа/бета с желательными свойствами из созданной библиотеки TCR.

[0332] В некоторых вариантах реализации пары TCR-альфа/бета могут содержать мотивы последовательностей TCR.

[0333] В некоторых вариантах реализации в данной заявке предложены библиотеки пар TCRαβ. В некоторых вариантах реализации данные библиотеки могут быть созданы с помощью любого из способов, предложенных в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации библиотеки получены из образца, который был нежизнеспособен.

[0334] В некоторых вариантах реализации в данной заявке предложены популяции и/или библиотеки клеток, которые содержат библиотеку пар TCRαβ, введенную в пул репортерных клеток. Таким образом, в некоторых вариантах реализации предложен пул репортерных клеток, которые содержат выбранные и комбинаторно спаренные последовательности цепей TCRα и TCRβ (библиотеку пар TCRαβ).

[0335] В некоторых вариантах реализации библиотека может представлять собой стимулированную библиотеку. В некоторых вариантах реализации библиотека может содержать репортерные клетки, которые модифицированы библиотекой пар TCRαβ, и может дополнительно содержать антигенпрезентирующие клетки, презентирующие по меньшей мере один интересующий антиген. В некоторых вариантах реализации указанный по меньшей мере один интересующий антиген может быть аутологическим или аллогенным.

[0336] В некоторых вариантах реализации в данной заявке предложены библиотеки, содержащие одну или более пар TCRαβ из образца или характерных для нежизнеспособного образца.

Дополнительные варианты реализации, относящиеся к скринингу.

[0337] Описаны дополнительные варианты реализации настоящего изобретения. Любой из описанных в настоящей заявке вариантов реализации можно комбинировать с любым из других вариантов реализации, предложенных в настоящей заявке. В настоящей заявке предложены способы (также описанные в настоящей заявке как «способы скрининга») идентификации с помощью высокопроизводительного секвенирования нуклеиновых кислот интересующих последовательностей в библиотеке вариантных

последовательностей путем генетического скрининга приобретения функции/утраты функции (также называемого «генетическим скринингом библиотеки вариантов»). Указанные способы скрининга можно применять для скрининга библиотек вариантных последовательностей нуклеотидов, в которых отдельные последовательности нуклеиновых кислот можно однозначно различить только путем идентификации по меньшей мере 600 п.о. варианта последовательности нуклеотидов.

[0338] В некоторых вариантах реализации любой из подходящих способов может включать способ идентификации, в котором используются объединенные в пул антигены. Например, в некоторых вариантах реализации идентификация или стимуляция включает: a) селекцию множества антигенов; b) создание пулов антигенов, из которых каждый антиген присутствует ровно в двух пулах антигенов; c) оценку реактивности репортерных клеток, экспрессирующих по меньшей мере один Т-клеточный рецептор, против каждого из пулов антигенов; и d) определение того, реактивен ли по меньшей мере один Т-клеточный рецептор по отношению к любому из прошедших селекцию антигенов, путем оценки реактивности против ровно двух пулов антигенов. В некоторых вариантах реализации реактивность против ровно двух пулов антигенов детектируют путем анализа попарного обогащения. В некоторых вариантах реализации библиотека представляет собой библиотеку TCR. В некоторых вариантах реализации используют маркер активации. В некоторых вариантах реализации используют сравнение верхних и нижних образцов (описанное в настоящей заявке), чтобы оценить реактивность. В некоторых вариантах реализации, тогда как в других подходах может использоваться реактивность против отдельных пулов, чтобы создать уникальные паттерны реактивности, в данном процессе может использоваться попарный анализ для повышения силы сигнала путем специфического анализа повторов.

[0339] Способы скрининга в соответствии с настоящим изобретением могут представлять собой высокопроизводительные способы. Скрининг поликлональной генетической библиотеки может обеспечить возможность скрининга больших количеств (например, нескольких десятков тысяч) вариантов белка в одном эксперименте, не требуя получения и анализа отдельных клонов. Кроме того, получение библиотеки вариантов генов может быть менее дорогостоящим и требующим меньших затрат времени по сравнению с синтезом отдельных вариантов генов. Некоторые варианты реализации

способов скрининга позволяют функциональную селекцию вариантов, и можно осуществить селекцию вариантов белков на основании одного или более функциональных свойств. Способы скрининга в соответствии с настоящим изобретением могут представлять собой чувствительные способы скрининга. Тогда как селекцию интересующих вариантов осуществляют на основании функциональных фенотипов, идентичность последовательностей интересующих вариантов определяют на основании способов секвенирования ДНК, которые могут детектировать даже редкие варианты с высокой чувствительностью. В некоторых вариантах реализации чувствительность вариантов реализации, предложенных в настоящей заявке, позволит провести различие на желательном уровне, включая 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000 или еще меньше. В некоторых вариантах реализации более высокая чувствительность возможна в том случае, если: (i) анализируют достаточные количества клеток и (ii) можно получить достаточное количество прочтений последовательности. В некоторых вариантах реализации фактором для рассмотрения является демультиплексирование. Тем не менее, это можно решить путем, например: i) отсутствия мультиплексирования или ii) повышения порога штрихкодирования за счет отбрасывания большего количества прочтений (например, большего секвенирования).

[0340] Некоторые варианты реализации способов скрининга представляют собой способы осуществления высокопроизводительного скрининга библиотеки вариантов генов для выявления вариантов белков, причем различие между вариантами основано на участках из >200 аминокислот и на поликлональном анализе популяции. Представленные в настоящей заявке способы скрининга в некоторых вариантах реализации включают протокол скрининга и биоинформационный процесс, которые позволяют преодолеть высокую частоту ошибок в некоторых прочтениях секвенирования NGS, таких как полученные с помощью платформы Oxford Nanopore.

[0341] Способы скрининга в соответствии с настоящим изобретением могут включать идентификацию любых подходящих вариантов белка, независимо от размера и без ограничения в расположении разнообразия последовательности. В некоторых вариантах реализации способ включает выбор интересующих последовательностей Т-клеточного рецептора (TCR) из больших совокупностей TCR, в которых образование пары различных цепей TCRα и TCRβ либо неизвестно, либо сомнительно, и включает

определение полноразмерной последовательности кассет вариантных генов, которые кодируют вариабельную область TCRα и TCRβ. В некоторых вариантах реализации представленные в настоящей заявке способы скрининга позволяют скрининг библиотек TCR с высокой производительностью (например, избегая образования клонов) на основании функционального ответа репортерных клеток (например, повышения экспрессии CD69), который опосредован TCR.

[0342] В некоторых вариантах реализации способ включает идентификацию последовательностей химерного антигенного рецептора (CAR) с улучшенными свойствами из большой совокупности вариантов CAR, которые в значительной степени отличаются по молекулярному дизайну, например, путем комбинаторной сборки вплоть до трех различных сигнальных доменов, выбранных из пула из нескольких различных сигнальных доменов. В некоторых вариантах реализации, представленные в настоящей заявке способы скрининга позволяют всестороннее улучшение CAR с помощью скрининга вариантов с мутационным разнообразием по всей молекуле CAR.

[0343] Для любого из вариантов реализации, предложенных в данной заявке, при необходимости, может присутствовать более чем один внутриклеточный сигнальный домен CAR. В некоторых вариантах реализации присутствуют по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена CAR. В некоторых вариантах реализации указанные по меньшей мере два домена представляют собой по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена CAR: CD3ε, CD3ζ ITAM1, CD3ζ ITAM12, CD3ζ ITAM123, CD3ζ с любым ITAM из CD3δ, CD3ε и CD3γ, CD8α, CD28, ICOS, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD27 и CD2.

[0344] В некоторых вариантах реализации способы скрининга в соответствии с настоящим изобретением включают анализ поликлональных популяций репортерных клеток без получения клонов отдельных клеток. В некоторых вариантах реализации способы скрининга можно применять для скрининга библиотеки, содержащей >10000 вариантов, чтобы идентифицировать интересующие комбинации (например, при покрытии 100x) без получения клонов отдельных клеток.

[0345] В некоторых вариантах реализации величина покрытия зависит от множества факторов, включая главную цель скрининга (скрининг для обогащения (более низкое покрытие) или обеднения (более высокое покрытие)), разброс представленности

отдельных вариантов внутри библиотеки, утрату клеток в процессе селекции и т.д. Как правило, можно использовать диапазон 50 - 10000, включая 100 – 2000, или, например, скрининг для обогащения при 100 - 400х.

[0346] В некоторых вариантах реализации в способах скрининга в соответствии с настоящим изобретением предложена методика генетического скрининга с идентификацией лидирующей молекулы и улучшением для более крупных белков с мутационным разнообразием по всему белку. По сравнению с другими доступными способами, указанный способ в некоторых вариантах реализации может обеспечить высокую производительность (с меньшими затратами и сроками) и высокую чувствительность идентификации лидирующих молекул.

[0347] В общих чертах, способ скрининга может включать (1) создание библиотеки вариантных последовательностей нуклеотидов, содержащей по меньшей мере две вариантные последовательности нуклеотидов, которые можно (или можно только) однозначно идентифицировать путем определения по меньшей мере 600 п.о. из их полноразмерной последовательности нуклеотидов; (2) введение указанной библиотеки вариантных последовательностей нуклеотидов в репортерные клетки; (3) селекцию репортерных клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства; (4) выделение вариантных последовательностей нуклеотидов из прошедших селекцию репортерных клеток; (5) определение по меньшей мере 600 п.о. из полноразмерной последовательности нуклеотидов из выделенных вариантных последовательностей нуклеотидов; и (6) выбор по меньшей мере одной интересующей вариантной последовательности нуклеотидов.

[0348] Для любого из вариантов реализации, предложенных в настоящей заявке (в которых упоминается участок 600 п.о. или эквивалентная длина последовательности аминокислот), вариабельность последовательностей в библиотеке может быть представлена участками, вся длина которых составляет более 600 п.о. В некоторых вариантах реализации библиотека будет содержать ампликоны, или состоять из ампликонов или состоять по существу из ампликонов, или включать ампликоны, которые длиннее 1500 п.о. В некоторых вариантах реализации библиотека будет содержать/состоять или состоять по существу из по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 или 100% ампликонов, которые будут длиннее 1500 п.о.

[0349] В соответствии с Фиг. 8, предложены некоторые варианты реализации способа скрининга в соответствии с настоящим изобретением. Способ может включать предоставление **810** комбинаторной библиотеки **811**, которая содержит множество вариантных нуклеиновых кислот (примерами которых здесь являются **812a, 812b**, **812c**). Каждая из вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке может содержать непрерывный участок **814**, длина которого составляет по меньшей мере 600 п.о.

[0350] «Непрерывный» в настоящей заявке по отношению к биополимеру (например, нуклеиновой кислоте или полипептиду) относится к последовательности отдельных элементов структуры (например, нуклеотидов или аминокислот) биополимера без промежуточных последовательностей (например, к последовательности нуклеотидов без промежуточных нуклеотидов или последовательности нуклеотидов, к последовательности аминокислот без промежуточных аминокислот или последовательностей аминокислот). Непрерывный участок **814** может содержать две или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов.

[0351] В настоящей заявке «вариантная подпоследовательность нуклеотидов» может включать любую из семейства последовательностей нуклеотидов, которая определяет единицу функциональной активности нуклеиновой кислоты и/или полипептида(-ов), кодируемого(-ых) нуклеиновой кислотой. В некоторых случаях, вариантная подпоследовательность нуклеотидов может придавать отдельную функциональную активность и/или способствовать отдельной функциональной активности (например, аффинности, специфичности связывания) нуклеиновой кислоты и/или полипептида(-ов), кодируемого(-ых) нуклеиновой кислотой. В некоторых случаях, семейство последовательностей нуклеотидов придает и/или способствует отдельной функциональной активности благодаря: положению вариантной подпоследовательности нуклеотидов внутри нуклеиновой кислоты; подобию последовательности с консенсусной последовательностью; и/или содержанию вариабельных и невариабельных участков, причем невариабельные участки являются общими с таковыми у других представителей того же семейства последовательностей нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации библиотека TCR содержит вариантные нуклеиновые кислоты, содержащие вариантную подпоследовательность нуклеотидов, которая соответствует цепи TCRα, или один или более ее функциональных доменов (например, V-область TCRα, определяющую

комплементарность область 3 (CDR3) TCRα, J-сегмент TCRα, константную область TCRα), и вариантную подпоследовательность нуклеотидов, которая соответствует цепи TCRβ, или ее функциональный домен (например, V-область TCRβ, определяющую комплементарность область 3 (CDR3) TCRβ, J-сегмент TCRβ, константную область TCRβ). В некоторых вариантах реализации библиотека CAR содержит вариантные нуклеиновые кислоты, содержащие вариантную подпоследовательность нуклеотидов, которая соответствует одному или более функциональным доменам CAR (например, связывающему антиген домену, шарнирному домену, трансмембранному домену и внутриклеточному сигнальному домену, которые могут содержать 2 – 3 сигнальных модуля).

[0352] Дополнительно, в соответствии с Фиг. 8, нуклеиновая кислота **812a** из библиотеки может содержать вариантную подпоследовательность нуклеотидов **816a**, которая представляет собой один из множества возможных вариантов (**816a, 816b**) в библиотеке. Нуклеиновая кислота **812a** может также содержать в отличном положении другую вариантную подпоследовательность нуклеотидов **818a**, которая представляет собой один из множества возможных вариантов (**818a, 818b**). Другая нуклеиновая кислота **812b** в библиотеке может содержать отличную комбинацию, **816a/818b**, вариантных подпоследовательностей нуклеотидов из первой комбинации, **816a/818a**. Кроме того, третья нуклеиновая кислота **812c** может содержать отличную комбинацию, **816b/818b**, вариантных подпоследовательностей нуклеотидов из первой комбинации, **816a/818a**, или второй комбинации, **816a/818b**. Кроме того, один конец (например, 5'- или 3'-конец) непрерывного участка можно определить по одной из вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, а другой конец (например, 3' или 5'-конец, соответственно) непрерывного участка можно определить по другой из вариантных подпоследовательностей нуклеотидов.

[0353] Непрерывный участок может быть представлен формулой: 5'-A*-X-B*-3', где A* и B* представляют собой различные семейства вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, и X может отсутствовать (в данном случае, непрерывный участок представляет собой 5'-A*-B*-3') или, если он присутствует, может представлять собой любую последовательность нуклеотидов любой длины. В некоторых вариантах реализации A* может быть любым представителем семейства вариантных подпоследовательностей нуклеотидов (например, A1, A2, A3, . . . , и т.д.). В некоторых вариантах реализации B*

может быть любым представителем семейства вариантных подпоследовательностей нуклеотидов (например, B1, B2, B3, . . . , и т.д.). В некоторых вариантах реализации X может включать представителей одного или более семейств вариантных подпоследовательностей нуклеотидов (например, C, D, . . . , и т.д.).

[0354] Способ скрининга может дополнительно включать введение **820** библиотеки в популяцию клеток **822**, которые могут экспрессировать один или более продуктов генов (например, полипептидов), **824a**, **824b**, кодируемых представителем **826a, 826b** множества вариантных нуклеиновых кислот.

[0355] Способ скрининга может включать селекцию **830** субпопуляции из популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства **832**, например, связывания экспрессированного(-ых) полипептида(-ов) с лигандом, причем функциональное свойство зависит от комбинации вариантных подпоследовательностей нуклеотидов в представителе нуклеиновой кислоты **826a, 826b**, который был введен в клетку. Субпопуляция клеток может содержать множество клеток. В некоторых вариантах реализации субпопуляция клеток может содержать множество различных представителей множества вариантных нуклеиновых кислот, где различные представители отличаются друг от друга тем, что содержат различные комбинации вариантных подпоследовательностей нуклеотидов.

[0356] В некоторых вариантах реализации способ скрининга может включать выделение **840** подгруппы **842** из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции клеток, например, путем экстракции геномной ДНК из клеток.

[0357] В некоторых вариантах реализации способ скрининга может дополнительно включать определение **850** последовательности нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот, например, путем высокопроизводительного секвенирования по меньшей мере непрерывного участка вариантных нуклеиновых кислот в подгруппе **842**.

[0358] В некоторых вариантах реализации способ может дополнительно включать идентификацию **860** комбинации вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, **816a/818a**, которая присутствовала в клетках из субпопуляции. В некоторых вариантах реализации идентификация включает анализ того, есть ли обогащение некоторой комбинацией вариантных подпоследовательностей нуклеотидов из двух или более

комбинаций, находящихся в субпопуляции клеток, относительно заранее определенного порогового уровня или относительно распространенности данной конкретной комбинации в контрольной субпопуляции клеток. В некоторых вариантах реализации комбинацию, обогащение которой наблюдают, идентифицируют как придающую клеткам функциональное свойство, на основании которого была выбрана путем селекции данная субпопуляция клеток.

[0359] На Фиг. 9 предложены некоторые варианты реализации представленных в настоящей заявке способов скрининга. Указанный способ **900** может включать предоставление **910** комбинаторной библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит комбинацию двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, причем первая вариантная подпоследовательность нуклеотидов из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет первый конец непрерывного участка и вторая вариантная подпоследовательность нуклеотидов из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу. Комбинаторную библиотеку можно ввести **920** в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот. Затем способ может включать селекцию **930** субпопуляции из популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, зависящего от комбинации двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток. Способ может включать выделение **940** подгруппы (например, одной или более) из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции, и определение **950** последовательности нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы. Затем можно идентифицировать одну или более комбинаций из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов **960** на основании установленных последовательностей нуклеотидов.

[0360] В некоторых вариантах реализации присутствует «референсный» и «верхний» образец для каждого скрининга. «Верхний» образец содержит сортированные клетки, которые демонстрируют наиболее высокую экспрессию CD69, тогда как

«референсный» образец содержит сортированные клетки, который демонстрируют низкую экспрессию CD69. В некоторых вариантах реализации образцы можно разделить на основании любого другого маркера активации, включая, но не ограничиваясь перечисленными маркерами: CD25, CD62L, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF, репортерные маркеры на основе синтетического промотора или маркеры пролиферации. Для этого можно выделить варианты с минимальным покрытием 100 - 200x для каждого из вариантов в библиотеке со сложностью Y. Это даст всего >100 - 200*Y вариантов/клетки на образец.

[0361] Одну нуклеиновую кислоту можно считать «непохожей» или «отличной» от другой нуклеиновой кислоты в комбинаторной библиотеке, когда вариантная последовательность нуклеотидов одной нуклеиновой кислоты кодирует последовательность аминокислот, которая отлична от последовательности аминокислот, кодируемой соответствующей вариантной последовательностью нуклеотидов другой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации одну нуклеиновую кислоту можно считать «непохожей» или «отличной» от другой нуклеиновой кислоты в комбинаторной библиотеке на основании различия их последовательности нуклеотидов, хотя они кодируют одинаковые последовательность аминокислот.

[0362] Комбинаторная библиотека может содержать любое подходящее количество различных (или «вариантных») нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации комбинаторная библиотека содержит приблизительно 100 или более, например, приблизительно 200 или более, приблизительно 300 или более, приблизительно 400 или более, приблизительно 500 или более, приблизительно 600 или более, приблизительно 700 или более, приблизительно 800 или более, приблизительно 900 или более, приблизительно 1000 или более, приблизительно 2000 или более, приблизительно 3000 или более, приблизительно 4000 или более, приблизительно 5000 или более, приблизительно 7500 или более, приблизительно 10000 или более, приблизительно 20000 или более, приблизительно 50000 или более, приблизительно $1x10^5$ или более, приблизительно $2x10^5$ или более, приблизительно $5x10^5$ или более, приблизительно $1x10^6$ или более, приблизительно $1x10^7$ или более, приблизительно $1x10^8$ или более, приблизительно $1x10^9$ или более, приблизительно $1x10^{10}$ или более, включая приблизительно $1x10^{11}$ или более различных нуклеиновых кислот, или множество различных нуклеиновых кислот в пределах диапазона,

ограниченного любыми двумя из указанных выше значений. В некоторых вариантах реализации комбинаторная библиотека содержит от приблизительно 100 до приблизительно 200, от приблизительно 200 до приблизительно 500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 5000 до приблизительно $1x10^4$, от приблизительно $1x10^4$ до приблизительно $2x10^4$, от приблизительно $2x10^4$ до приблизительно $5x10^4$, от приблизительно $5x10^4$ до приблизительно $1x10^5$, от приблизительно $1x10^5$ до приблизительно $1x10^6$, от приблизительно $1x10^6$ до приблизительно $1x10^7$, от приблизительно $1x10^7$ до приблизительно $1x10^8$, от приблизительно $1x10^8$ до приблизительно $1x10^9$, от приблизительно $1x10^9$ до приблизительно $1x10^{10}$, от приблизительно $1x10^{10}$ до приблизительно $1x10^{11}$, или более различных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации библиотека содержит по меньшей мере 100, например, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 600, по меньшей мере 700, по меньшей мере 800, по меньшей мере 900, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 2000, по меньшей мере 3000, по меньшей мере 4000, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 7500, по меньшей мере 10000, по меньшей мере 20000, по меньшей мере 50000, по меньшей мере $1x10^5$, по меньшей мере $2x10^5$, по меньшей мере $5x10^5$, по меньшей мере $1x10^6$, по меньшей мере $1x10^7$, по меньшей мере $1x10^8$, по меньшей мере $1x10^9$, по меньшей мере $1x10^{10}$, включая по меньшей мере $1x10^{11}$ различных комбинаций двух вариантных подпоследовательностей нуклеотидов.

[0363] В некоторых вариантах реализации один или более полипептидов (в некоторых вариантах реализации кодируемых вариантами нуклеиновых кислот комбинаторной библиотеки) содержит: цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ; химерный антигенный рецептор (CAR); рецептор-переключатель; или одну или более цепей антитела или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации первая вариантная подпоследовательность нуклеотидов кодирует вариантную последовательность аминокислот TCRα и вторая вариантная подпоследовательность нуклеотидов кодирует вариантную последовательность аминокислот TCRβ. В некоторых вариантах реализации две или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов кодируют одну или более из: V-области TCR, определяющей комплементарность области 3 (CDR3) TCR, J-сегмента TCR и константной области TCR. В некоторых вариантах

реализации каждая из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов кодирует антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен или один или более внутриклеточных сигнальных доменов CAR.

[0194] В некоторых вариантах реализации редакционное расстояние между непрерывными участками множества вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке максимизировано. В некоторых вариантах реализации редакционное расстояние между любыми двумя вариантными нуклеиновыми кислотами комбинаторной библиотеки максимизировано, например, путем контролирования использования кодонов. В некоторых вариантах реализации это может включать оптимизацию кодонов. В некоторых вариантах реализации любой из способов, предложенных в настоящей заявке, предусматривающих библиотеку, может включать последовательность(-и) нуклеотидов в библиотеке (например, из множества вариантных нуклеиновых кислот), которая(-ые) оптимизирована(-ы) на основании по меньшей мере одного из следующего: введения предпочтительно используемых клеткой-хозяином кодонов, оптимизации структурной стабильности мРНК, исключения повторяющихся последовательностей, исключения длинных участков гомополимеров и исключения большого различия в локальном содержании GC в данной вариантной последовательности нуклеиновой кислоты.

[0364] В некоторых вариантах реализации последовательность нуклеотидов из множества вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке оптимизирована на основании по меньшей мере одного из: 1) любого способа, предложенного в настоящей заявке, в котором клетки из популяции клеток генетически модифицированы, или 2) любого способа, предложенного в настоящей заявке, в котором в клетках восстанавливают экспрессию CD4 и/или CD8 и используют их для скрининга на рестриктированные по I классу и/или II классу последовательности TCR.

[0365] В некоторых вариантах реализации используемые клетки представляют собой Т-клетки.

[0366] В некоторых вариантах реализации указанная субпопуляция и контрольная популяция клеток являются неперекрывающимися. В некоторых вариантах реализации неперекрывающиеся означает, что клетки в обеих популяциях имеют различные статусы активации, но могут нести одинаковую вариантную нуклеиновую кислоту.

[0367] В некоторых вариантах реализации один или более полипептидов содержит TCRα- и TCRβ-цепи, и при этом неизменная последовательность аминокислот содержит константную область TCRβ.

[0368] В некоторых вариантах реализации определение включает получение среднего покрытия, составляющего по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500 или по меньшей мере 1000 для каждой из последовательностей нуклеотидов непрерывного участка.

[0369] В некоторых вариантах реализации в любом из способов, включающем оценку реактивности, или который может дополнительно включать оценку реактивности, может использоваться сравнение верхних и нижних образцов для оценки реактивности.

[0370] В некоторых вариантах реализации любой из способов, предложенных в настоящей заявке, предусматривающий библиотеку, может включать последовательность(-и) нуклеотидов в библиотеке (например, из множества вариантных нуклеиновых кислот), которая(-ые) оптимизирована(-ы) на основании по меньшей мере одного следующего: введения предпочтительно используемых клеткой-хозяином кодонов, оптимизации структурной стабильности мРНК, исключения повторяющихся последовательностей, исключения длинных участков гомополимеров и исключения большого различия в локальном содержании GC в данной вариантной последовательности нуклеиновой кислоты.

[0371] В некоторых вариантах реализации антиген презентируется посредством антигенпрезентирующей клетки.

[0372] В некоторых вариантах реализации библиотека представляет собой комбинаторную библиотеку.

[0373] В некоторых вариантах реализации источником антигена является клетка.

[0374] В некоторых вариантах реализации процесс подразумевает высокую степень разнообразия и/или сложности антигенов.

[0375] В некоторых вариантах реализации, предусматривающем библиотеку, указанная библиотека представляет собой комбинаторную библиотеку. В некоторых вариантах реализации комбинаторная библиотека представляет собой библиотеку TCR.

[0376] Непрерывный участок может быть любой подходящей длины, составляющей по меньшей мере 600 п.о. В некоторых вариантах реализации длина непрерывного участка зависит от длины прочтения (например, длины точного прочтения) секвенирующей платформы, применяемой для секвенирования непрерывного участка после селекции субпопуляции клеток на основании функционального свойства. В некоторых вариантах реализации длина непрерывного участка составляет по меньшей мере 600 п.о., например, по меньшей мере 700 п.о., по меньшей мере 800 п.о., по меньшей мере 900 п.о., по меньшей мере 1000 п.о., по меньшей мере 1100 п.о., по меньшей мере 1200 п.о., по меньшей мере 1300 п.о., по меньшей мере 1400 п.о., по меньшей мере 1500 п.о., по меньшей мере 1750 п.о., по меньшей мере 2000 п.о., по меньшей мере 2500 п.о., по меньшей мере 3000 п.о., по меньшей мере 4000 п.о., по меньшей мере 5000 п.о., по меньшей мере 6000 п.о., по меньшей мере 7000 п.о., по меньшей мере 8000 п.о., по меньшей мере 9000 п.о., по меньшей мере 10000 п.о., по меньшей мере 11000 п.о., по меньшей мере 12000 п.о., по меньшей мере 13000 п.о., по меньшей мере 14000 п.о., или по меньшей мере 15000 п.о., или длина находится в пределах диапазона, ограниченного любыми двумя из указанных выше значений. В некоторых вариантах реализации длина непрерывного участка составляет от приблизительно 600 п.о. до приблизительно 15000 п.о., например, от приблизительно 800 п.о. до приблизительно 12000 п.о., от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 10000 п.о., от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 8000 п.о., от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 6000 п.о., от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 5000 п.о., включая от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 4000 п.о.

[0377] Варианты нуклеиновых кислот в комбинаторной библиотеке могут содержать любое подходящее количество вариантных последовательностей нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации все нуклеиновые кислоты в комбинаторной библиотеке содержат одинаковые количество вариантных последовательностей нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации вариантные нуклеиновые кислоты в комбинаторной библиотеке содержат 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 или более вариантных последовательностей нуклеотидов, у каждой из которых могут быть варианты, которые можно собрать комбинаторным способом, чтобы собрать непрерывный участок из вариантных нуклеиновых кислот.

[0378] Комбинаторная библиотека может содержать любое подходящее количество вариантов для каждой вариантной последовательности нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации количество вариантов для вариантной последовательности нуклеотидов в комбинаторной библиотеке составляет 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 12 или более, 14 или более, 16 или более, 18 или более, 20 или более, 25 или более, 30 или более, 35 или более, 40 или более, 45 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 125 или более, 150 или более, 175 или более, 200 или более, 250 или более, 300 или более, 350 или более, 400 или более, 450 или более, 500 или более, 600 или более, 700 или более, 800 или более, 900 или более, 1000 или более, 1500 или более, 2500 или более, 3000 или более, 4000 или более, 5000 или более, 7500 или более, включая 10000 или более, или некоторое количество вариантов в пределах диапазона, ограниченного любыми двумя из указанных выше значений. В некоторых вариантах реализации количество вариантов для вариантной последовательности нуклеотидов в комбинаторной библиотеке составляет от 2 до 10, от 10 до 20, от 20 до 30, от 30 до 40, от 40 до 50, от 50 до 100, от 100 до 200, от 200 до 500, от 500 до 1000, от 1000 до 2000, от 2000 до 5000 или от 5000 до 10000. В некоторых вариантах реализации распределение частот отдельных вариантов внутри библиотеки такое, что у > 80% указанных вариантов частота встречаемости находится в пределах диапазона, начинающегося с медианы частоты встречаемости/8 и заканчивающегося медианой частоты встречаемости*8.

[0379] В некоторых вариантах реализации для любого из способов с использованием скрининга и/или библиотеки, предложенных в настоящей заявке, пары TCR и/или Т-клетки, экспрессирующие пары TCR, выбирают путем селекции или идентифицируют по связыванию с антигеном (таким как неоантиген), причем антиген экспрессируется В-клеткой или антигенпрезентирующей клеткой.

[0380] В некоторых вариантах реализации для любого из способов с использованием скрининга и/или библиотеки, предложенных в настоящей заявке, антиген или неоантиген происходит из опухоли из организма субъекта, и каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета из пар TCR также происходит из организма субъекта (это означает, что один субъект содержит как последовательность антигена, так и обе последовательности TCR-альфа и TCR-бета).

[0381] В некоторых вариантах реализации для любого из способов с использованием скрининга и/или библиотеки, предложенных в настоящей заявке, присутствует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион пар TCR (или клеток, содержащих данные пары) и присутствует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион антигенов.

[0382] В некоторых вариантах реализации для любого из способов с использованием скрининга и/или библиотеки, предложенных в настоящей заявке, a) пары TCR и/или Т-клетки, экспрессирующие пары TCR, выбирают путем селекции или идентифицируют по связыванию с антигеном (таким как неоантиген), причем антиген экспрессируется В-клеткой или антигенпрезентирующей клеткой, b) антиген или неоантиген происходит из опухоли из организма субъекта, и каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета из пар TCR также происходит из организма субъекта (это означает, что один субъект содержит как последовательность антигена, так и обе последовательности TCR-альфа и TCR-бета), и c) присутствует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион пар TCR (или клеток, содержащих данные пары) и присутствует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион антигенов.

[0383] Комбинаторная библиотека может представлять собой библиотеку любой подходящей биомолекулы (например, белка, нуклеиновой кислоты, нуклеопротеина и т.д.). В некоторых вариантах реализации подходящими биомолекулами являются такие биомолекулы, в которых последовательность (например, последовательность белка и/или нуклеиновой кислоты) может быть изменена на протяжении непрерывного участка из звеньев последовательности (например, аминокислот или нуклеотидов), соответствующего по меньшей мере 600 нуклеотидам. Подходящая комбинаторная библиотека включает, без ограничения, комбинаторную библиотеку TCR, CAR, антител, направляемых РНК нуклеаз и т.д.

[0384] В некоторых вариантах реализации комбинаторная библиотека содержит репертуар Т-клеточных рецепторов (TCR) из разнообразных популяций Т-клеток. В некоторых вариантах реализации множество нуклеиновых кислот из комбинаторной библиотеки включает вариантные последовательности нуклеотидов, которые кодируют один или более функциональных доменов TCRα (например, V-область TCRα,

определяющую комплементарность область 3 (CDR3) TCRα, J-сегмент TCRα, константную область TCRα), и один или более функциональных доменов TCRβ (например, V-область TCRβ, определяющую комплементарность область 3 (CDR3) TCRβ, J-сегмент TCRβ, константную область TCRβ). В некоторых вариантах реализации длина непрерывного участка нуклеиновой кислоты TCR из комбинаторной библиотеки составляет от 600 п.о. до 2000 п.о., например, от 800 п.о. до 1900 п.о., от 1000 п.о. до 1900 п.о., от 1200 п.о. до 1900 п.о., от 1400 п.о. до 1900 п.о., от 1500 п.о. до приблизительно 1900 п.о., от 1600 п.о. до 1900 п.о., от 1700 п.о. до 1900 п.о. или приблизительно 1800 п.о.

[0385] В некоторых вариантах реализации множество нуклеиновых кислот из комбинаторной библиотеки включает вариантные последовательности нуклеотидов, которые кодируют один или более функциональных доменов химерного антигенного рецептора (CAR) (например, связывающий антиген домен, шарнирный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, который может содержать 2 – 3 сигнальных модуля). В некоторых вариантах реализации длина непрерывного участка нуклеиновой кислоты CAR из комбинаторной библиотеки составляет от 600 п.о. до 2000 п.о., например, от 800 п.о. до 1900 п.о., от 1000 п.о. до 1800 п.о., от 1200 п.о. до 1800 п.о., от 1400 п.о. до 1700 п.о., или приблизительно 1500 п.о.

[0386] В некоторых вариантах реализации комбинаторная библиотека содержит репертуар последовательностей тяжелой и легкой цепей антитела. В некоторых вариантах реализации множество нуклеиновых кислот из комбинаторной библиотеки включает вариантные последовательности нуклеотидов, которые кодируют один или более функциональных доменов тяжелой цепи антитела (например, вариабельные области тяжелой цепи (включая один или более CDR, каркасные области), и/или константные области тяжелой цепи (включая один или более CH1, CH2, CH3 и шарнирные области). В некоторых вариантах реализации множество нуклеиновых кислот из комбинаторной библиотеки включает вариантные последовательности нуклеотидов, которые кодируют один или более функциональных доменов легкой цепи антитела (например, вариабельные области легкой цепи (включая один или более CDR, каркасные области), и/или константную область легкой цепи.

[0387] В некоторых вариантах реализации нуклеиновые кислоты комбинаторной библиотеки включают подходящий вектор, который содержит вариантные нуклеиновые

кислоты. В некоторых вариантах реализации нуклеиновые кислоты комбинаторной библиотеки содержат подходящие регуляторные и/или некодирующие последовательности. Подходящие некодирующие последовательности включают, без ограничения, последовательности промотора, сигнального пептида, сайта сплайсинга, стоп-кодона и поли(А)-сигнала. В некоторых вариантах реализации нуклеиновые кислоты содержат селективный маркер (например, ген устойчивости к антибиотику, флуоресцентную молекулу или маркер поверхности клетки).

[0388] В некоторых вариантах реализации способ скрининга включает создание комбинаторной библиотеки. Комбинаторную библиотеку можно создать, используя любые подходящие возможности. В некоторых вариантах реализации создание комбинаторной библиотеки включает идентификацию двух или более групп вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, кодирующих две или более групп вариантных последовательностей аминокислот одного или более полипептидов, причем по меньшей мере одно функциональное свойство зависит от комбинации вариантных последовательностей аминокислот из каждой из двух или более групп вариантных последовательностей аминокислот; и сборку непрерывного участка путем комбинирования вариантной подпоследовательности нуклеотидов из каждой из двух или более групп вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, чтобы тем самым получить представителя множества вариантных нуклеиновых кислот.

[0389] В некоторых вариантах реализации создание комбинаторной библиотеки включает идентификацию множества вариантов вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, кодирующих вариантные последовательности аминокислот полипептида, который должен экспрессироваться репортерными клетками. Если полипептид содержит две или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, непрерывный участок можно собрать путем комбинирования варианта каждой из вариантных подпоследовательностей нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации создание комбинаторной библиотеки включает дизайн нуклеиновых кислот из библиотеки *in silico*, например, чтобы максимизировать редакционное расстояние путем контролирования использования кодонов. Можно использовать любой подходящий алгоритм, чтобы максимизировать редакционное расстояние. Комбинаторную библиотеку можно синтезировать, используя любые подходящие возможности на основании, например,

разработанного дизайна *in silico*. В некоторых вариантах реализации комбинаторная библиотека содержит репертуар TCR из разнообразных популяций Т-клеток.

[0390] Можно использовать любые подходящие возможные варианты введения комбинаторной библиотеки в клетки. Подходящие возможные варианты включают, без ограничения, вирусную трансдукцию, опосредованную транспозонами доставку генов, трансформацию, электропорацию, опосредованное нуклеазой сайт-специфическое встраивание (например, CRISPR/Cas9, TALEN). В некоторых вариантах реализации введение комбинаторной библиотеки в клетки включает вирусную трансдукцию, доставку генов на основе транспозонов или опосредованное нуклеазой сайт-специфическое встраивание.

[0391] Комбинаторную библиотеку можно ввести в любые подходящие клетки, например, репортерные клетки, сконструированные для экспрессии полипептида(-ов), кодируемого(-ых) нуклеиновыми кислотами из библиотеки. Подходящие клетки включают, без ограничения, клетки млекопитающих, клетки насекомого, дрожжи и бактерии. В некоторых вариантах реализации подходящие носители включают вирусы, дрожжи, бактерии и фаг. Хотя по всему настоящему описанию для упрощения используется термин «клетки», в настоящей заявке предполагается, что все такие описания «клеток» в настоящей заявке не только включают различные формы Т-клеток (такие как иммортализованные Т-клетки), дрожжи и бактерии, но также могут применяться в более общем смысле по отношению к любому носителю, включая вирусы и фаг. Соответственно, упоминание «клеток» в настоящей заявке (по отношению к клеткам, в которые можно ввести комбинаторную библиотеку) может включать эукариотические клетки, прокариотические клетки, и может служить обозначением в варианте, когда вирусы и фаги также могут использоваться в качестве носителей. Клетки могут представлять собой линию клеток, иммортализованные клетки или первичные клетки. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой клетки человека или получены из клетки человека. В некоторых вариантах реализации популяция клеток содержит иммортализованные Т-клетки или первичные Т-клетки. В некоторых вариантах реализации иммортализованные Т-клетки или первичные Т-клетки представляют собой Т-клетки человека. В некоторых вариантах реализации комбинаторную библиотеку вводят в иммортализованные Т-клетки или первичные Т-клетки (например, путем вирусной трансдукции). В некоторых вариантах

реализации клетки не проявляют или проявляют на низком уровне функциональное свойство, на основании которого будут проводить селекцию указанных клеток, чтобы идентифицировать комбинацию интересующих вариантных подпоследовательностей нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации клетки не проявляют или проявляют на низком уровне функциональное свойство, опосредованное полипептидом, кодируемым нуклеиновыми кислотами из библиотеки, и зависящее от комбинации вариантных подпоследовательностей нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации клетки из популяции клеток сконструированы, например, генетически модифицированы. В некоторых вариантах реализации клетки сконструированы, например, генетически модифицированы, чтобы снизить или устранить эндогенную или фоновую экспрессию функционального свойства клетками. В некоторых вариантах реализации клетки сконструированы, например, генетически модифицированы, чтобы повысить способность клеток проявлять функциональное свойство, когда в них вводят комбинаторную библиотеку. В некоторых вариантах реализации клетки сконструированы, например, генетически модифицированы, чтобы стимулировать рост и/или поддержание популяции в культуре. В некоторых вариантах реализации клетки в популяции не содержат эндогенный полипептид, придающий клеткам по меньшей мере одно функциональное свойство. В некоторых вариантах реализации клетки генетически модифицированы, чтобы внедрить, или повысить, или устранить, или снизить экспрессию одного или более CD4, CD8 и CD28. В некоторых вариантах реализации генетически модифицированные клетки представляют собой Т-клетки.

[0392] В некоторых вариантах реализации каждая клетка из популяции клеток, в которую вводят комбинаторную библиотеку, содержит в среднем одну нуклеиновую кислоту из множества нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации популяцию клеток трансдуцируют комбинаторной библиотекой при множественности заражения (MOI), составляющей 10 или менее, например, 7 или менее, 5 или менее, 3 или менее, 2 или менее, включая 1 или менее. В некоторых вариантах реализации введение включает вирусную трансдукцию популяции клеток при множественности заражения (MOI), составляющей 5 или менее. В некоторых вариантах реализации опосредованное нуклеазой сайт-специфическое встраивание (например, CRISPR/Cas9, TALEN) используют, чтобы ввести ровно одну или две нуклеиновые кислоты в каждую клетку из популяции клеток.

[0393] Размер популяции клеток, в которую вводят комбинаторную библиотеку, может включать любое подходящее количество клеток. В некоторых вариантах реализации количество клеток зависит от одного или более из факторов: размера библиотеки, относительной представленности вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке, желательного уровня представленности каждой вариантной нуклеиновой кислоты в популяции (также называют «покрытием»), типа проводимого скрининга (например, осуществляют либо скрининг 'обогащения' (главной целью является определение обогащенных вариантов), либо скрининг 'обеднения' (главной целью является определение обедненных вариантов)), представленности и вероятности ошибки отдельных вариантов в библиотеке и этапов процесса, необходимых для селекции субпопуляции из общей популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, которое связано с утратой клеток. Примеры таких этапов процесса включают, но не ограничены селекцией успешно трансдуцированных клеток и/или селекцией по функциональному свойству, опосредованному экспрессированным полипептидом, с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах реализации способ скрининга включает регулирование размера популяции клеток на основании количества различных комбинаций из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов в библиотеке.

[0394] В некоторых вариантах реализации способ скрининга включает идентификацию клеток, которые были успешно модифицированы путем получения нуклеиновой кислоты из библиотеки, на основании селективного маркера, который включен в указанные нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах реализации способ скрининга включает применение маркера для селекции или скрининга клеток в популяции клеток, экспрессирующих по меньшей мере одну из множества вариантных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации маркер представляет собой маркер устойчивости к цитотоксину и/или маркер поверхности клетки. Можно осуществить селекцию успешно модифицированных клеток, применяя любой подходящий способ, в зависимости от используемого селектируемого маркера. В некоторых вариантах реализации селекцию клеток осуществляют на основании устойчивости к антибиотику, например, без ограничения, устойчивости к пуромицину или бластицидину. В некоторых вариантах реализации селекцию клеток осуществляют на основании экспрессии

детектируемого маркера, например, без ограничения, с помощью маркера на поверхности клетки или флуоресцентной молекулы, которые можно применять для сортировки с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах реализации селекцию клеток осуществляют на основании маркера на поверхности клетки, например, подходящего для обогащения на основе магнитных гранул.

[0395] Селекцию субпопуляции из популяции клеток можно проводить на основании любого подходящего функционального свойства полипептида, кодируемого вариантными нуклеиновыми кислотами. Подходящие функциональные свойства включают, без ограничения, связывание лиганда (например, связывание антигена), передачу сигнала в ответ на стимул (например, в ответ на связывание антигена). Передача сигнала может включать, без ограничения, фосфорилирование, транслокацию, взаимодействие с сигнальным доменом или транскрипционные изменения. Селекцию субпопуляции из популяции клеток на основании функционального свойства, зависящего от комбинации вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, можно осуществить, используя любые подходящие возможности. В некоторых вариантах реализации измерение подходящих функциональных свойств осуществляют, используя, без ограничения, экспрессию маркера или пролиферацию клеток в ответ на стимул.

[0396] В некоторых вариантах реализации селекция включает селекцию субпопуляции на основании экспрессии детектируемого маркера, причем экспрессия зависит от по меньшей мере одного функционального свойства одного или более полипептидов. В некоторых вариантах реализации детектируемый маркер включает маркер поверхности клетки, маркерный цитокин, маркер пролиферации клеток, транскрипционный репортер, репортер передачи сигнала и/или репортер цитотоксичности. В некоторых вариантах реализации маркер поверхности клетки включает один или более из: CD69, CD62L, CD137; маркерный цитокин включает один или более из: IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF; транскрипционный репортер включает один или более из: NF-κB, NFAT, AP-1; репортер передачи сигнала включает один или более из: ZAP70, ERK1/2; и репортер цитотоксичности включает один или более из: CD107A, CD107B, гранзима B.

[0397] В некоторых вариантах реализации селекция субпопуляции из популяции клеток включает селекцию клеток, которые проявляют функциональное свойство (например, дают положительный ответ в функциональном анализе). В некоторых вариантах

реализации селекция субпопуляции из популяции клеток включает селекцию клеток, которые не проявляют функциональное свойство (например, дают отрицательный ответ в функциональном анализе). В некоторых вариантах реализации способ скрининга включает селекцию субпопуляции из популяции клеток, которая проявляет функциональное свойство, и селекцию другой субпопуляции из популяции клеток, которая не проявляет функциональное свойство. В некоторых вариантах реализации селекция субпопуляции из популяции клеток включает селекцию множества субпопуляций клеток на основании разделения на группы по уровню или мере функционального свойства, проявляемого клетками каждой субпопуляции.

[0398] В некоторых вариантах реализации селекция субпопуляции включает приведение популяции клеток в контакт с одним или более из: второй популяции клеток; лиганда одного или более полипептидов; агониста или антагониста одного или более полипептидов; и малой молекулы, причем изменение в субпопуляции, вызванное указанным приведением в контакт, зависит от указанного по меньшей мере одного функционального свойства одного или более полипептидов. В некоторых вариантах реализации селекция субпопуляции включает детектирование присутствия или отсутствия изменения, и/или величины изменения; и селекцию субпопуляции на основании указанного детектирования. В некоторых вариантах реализации вторая популяция клеток включает антигенпрезентирующие клетки. В некоторых вариантах реализации антигенпрезентирующие клетки включают В-клетки и/или дендритные клетки. В некоторых вариантах реализации вторая популяция клеток содержит первичные клетки или иммортализованные клетки. В некоторых вариантах реализации варианты подпоследовательностей нуклеотидов из библиотеки получены из клеток, экспрессирующих вариантный полипептид, содержащий аминокислоту, кодируемую вариантными подпоследовательностями нуклеотидов, причем клетки получены из организма субъекта, и причем вторая популяция клеток происходит из организма указанного субъекта.

[0399] В некоторых вариантах реализации селекция включает селекцию первой субпопуляции из популяции клеток на основании меры по меньшей мере одного функционального свойства выше или ниже порога. В некоторых вариантах реализации порог определяют на основании меры указанного функционального свойства в

невыбранной субпопуляции из популяции клеток. В некоторых вариантах реализации селекция дополнительно включает селекцию второй субпопуляции из популяции клеток на основании второй меры по меньшей мере одного функционального свойства выше или ниже второго порога, причем первая и вторая субпопуляции являются неперекрывающимися. В некоторых вариантах реализации идентификация по меньшей мере одной комбинации включает сравнение распространенности по меньшей мере одной комбинации между первой и второй субпопуляциями.

[0400] В некоторых вариантах реализации, в которых комбинаторная библиотека представляет собой библиотеку TCR, содержащую варианты TCRα и TCRβ, осуществляют селекцию субпопуляции клеток на основании способности клеток отвечать на презентацию антигена путем изменения экспрессии одного или более маркеров. Подходящие маркеры включают, без ограничения, CD69, CD62L, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α и GM-CSF. В некоторых вариантах реализации маркер представляет собой репортер активности промотора, включая, без ограничения, NF-κB, NFAT и AP-1.

[0401] В некоторых вариантах реализации антиген презентируется антигенпрезентирующими клетками, включая, но не ограничиваясь В-клетками (например, иммортализованными В-клетками) и дендритными клетками. В некоторых вариантах реализации природа антигена неизвестна. В некоторых вариантах реализации антиген представляет собой неоантиген.

[0402] В некоторых вариантах реализации, в которых комбинаторная библиотека представляет собой библиотеку CAR, содержащую варианты функциональных доменов CAR, осуществляют селекцию субпопуляции клеток на основании способности клеток отвечать на презентацию антигена изменениями пролиферации клеток и/или изменениями экспрессии маркера. Подходящие маркеры включают, без ограничения, CD69, CD62L, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α и GM-CSF. В некоторых вариантах реализации маркер представляет собой репортер передачи сигнала, включая, без ограничения, фосфорилирование ZAP70 и ERK1/2. В некоторых вариантах реализации маркер представляет собой репортер цитотоксичности, такой как, без ограничения, CD107A и CD107B. В некоторых вариантах реализации маркер представляет собой репортер активности промотора, такой как, без ограничения, NF-κB, NFAT и AP-1.

[0403] В некоторых вариантах реализации указанная субпопуляция содержит множество клеток. В некоторых вариантах реализации выделение не включает выделение отдельных клонов из субпопуляции на основании по меньшей мере одного функционального свойства. В некоторых вариантах реализации указанная субпопуляция содержит по меньшей мере 1000 клеток (например, 10x покрытие 100 вариантов).

[0404] В некоторых вариантах реализации субпопуляция, выбранная в результате селекции на основании функционального свойства, зависящего от комбинации вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, содержит приблизительно 1000 или более клеток, например, приблизительно 2000 или более клеток, приблизительно 3000 или более клеток, приблизительно 4000 или более клеток, приблизительно 5000 или более клеток, приблизительно 7500 или более клеток, приблизительно 10000 или более клеток, приблизительно 20000 или более клеток, приблизительно 50000 или более клеток, приблизительно $1x10^5$ или более клеток, приблизительно $2x10^5$ или более клеток, приблизительно $5x10^5$ или более клеток, приблизительно $1x10^6$ или более клеток, приблизительно $1x10^7$ или более клеток, приблизительно $1x10^8$ или более клеток, приблизительно $1x10^9$ или более клеток, приблизительно $1x10^{10}$ или более клеток, приблизительно $1x10^{11}$ или более клеток, включая приблизительно $1x10^{12}$ или более клеток, или множество клеток в диапазоне, ограниченном любыми двумя из указанных выше значений. В некоторых вариантах реализации субпопуляция, выбранная в результате селекции на основании функционального свойства, зависящего от комбинации вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, содержит от приблизительно 1000 до приблизительно $1x10^{12}$ клеток, например, от приблизительно 2000 до приблизительно $1x10^{12}$ клеток, от приблизительно 3000 до приблизительно $1x10^{10}$ клеток, от приблизительно 5000 до приблизительно $1x10^9$ клеток, от приблизительно 5000 до приблизительно $1x10^9$ клеток, включая от приблизительно $1x10^4$ до приблизительно $1x10^9$ клеток.

[0405] В некоторых вариантах реализации функция пары TCR состоит в связывании с антигеном.

[0406] В некоторых вариантах реализации указанная субпопуляция представляет собой фракцию исходной популяции, например, менее чем 10^{-14}, 10^{-13}, 10^{-12}, 10^{-11}, 10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8}, 0,0000001, 0,000001, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 4,0 50,

60, 70, 80 или 90% от исходной популяции (включая любой диапазон, установленный между любыми двумя из перечисленных выше значений).

[0407] В некоторых вариантах реализации размер субпопуляции, выбранной путем селекции на основании функционального свойства, зависящего от комбинации вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, достаточно большой, чтобы вариантные нуклеиновые кислоты в библиотеке были соразмерно представлены в субпопуляции. В некоторых вариантах реализации размер указанной субпопуляции такой, что он позволяет кратность покрытия, составляющую приблизительно 10 или более, например, приблизительно 20 или более, приблизительно 30 или более, приблизительно 40 или более, приблизительно 50 или более, приблизительно 60 или более, приблизительно 70 или более, приблизительно 80 или более, приблизительно 90 или более, приблизительно 100 или более, приблизительно 120 или более, приблизительно 140 или более, приблизительно 160 или более, приблизительно 180 или более, приблизительно 200 или более, приблизительно 250 или более, приблизительно 300 или более, приблизительно 400 или более, приблизительно 500 или более, включая приблизительно 1000 или более, или кратность покрытия в пределах диапазона, ограниченного любыми двумя из указанных выше значений, для суммарного количества вариантов вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке. В некоторых вариантах реализации размер указанной субпопуляции такой, что он позволяет кратность покрытия, составляющую от приблизительно 10 до приблизительно 1000, например, от приблизительно 20 до приблизительно 1000, от приблизительно 30 до приблизительно 750, от приблизительно 40 до приблизительно 500, от приблизительно 50 до приблизительно 500, от приблизительно 50 до приблизительно 400, приблизительно 60 до приблизительно 300, от приблизительно 70 до приблизительно 250, включая от приблизительно 80 до приблизительно 200, для суммарного количества вариантов вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке.

[0408] Выделение вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции можно осуществить, применяя любые подходящие подходы. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот включает экстракцию геномной ДНК из субпопуляции с применением любого подходящего способа. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот включает экстракцию из субпопуляции общей геномной ДНК. В некоторых вариантах реализации выделение

вариантных нуклеиновых кислот не включает выделение отдельных клонов из субпопуляции и выделение геномной ДНК из отдельного клона. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот не включает выделение отдельных клонов из субпопуляции и размножение отдельных клонов, чтобы посредством этого выделить геномную ДНК из размноженной популяции клонов. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот включает экстракцию общей геномной ДНК из субпопуляции без выделения из субпопуляции или размножения отдельных клонов. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот включает экстракцию РНК из субпопуляции с применением любого подходящего способа. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот включает экстракцию общей РНК из субпопуляции. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот включает экстракцию мРНК из субпопуляции. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот не включает выделение отдельных клонов из субпопуляции и выделение РНК из отдельного клона. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот не включают анализ отдельных клеток с помощью способов ПЦР отдельных клеток. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот не включает выделение отдельных клонов из субпопуляции и размножение отдельных клонов, чтобы посредством этого выделить РНК из размноженной популяции клонов. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот включает экстракцию РНК из субпопуляции без выделения из субпопуляции или размножения отдельных клонов. Термин «РНК» представляет собой родовой термин и включает, например, природные и искусственные варианты РНК. Хотя в настоящем описании часто описываются возможные варианты в отношении «ДНК», очевидно, что все такие возможные варианты и варианты реализации вместо этого могут применяться в отношении РНК.

[0409] В некоторых вариантах реализации количества геномной ДНК, экстрагированной из субпопуляции, достаточно для обеспечения достаточного покрытия каждого варианта среди вариантных нуклеиновых кислот из библиотеки. В некоторых вариантах реализации количества геномной ДНК, экстрагированной из субпопуляции, достаточно для обеспечения кратности покрытия, составляющей приблизительно 10 или

более, например, приблизительно 20 или более, приблизительно 30 или более, приблизительно 40 или более, приблизительно 50 или более, приблизительно 60 или более, приблизительно 70 или более, приблизительно 80 или более, приблизительно 90 или более, приблизительно 100 или более, приблизительно 120 или более, приблизительно 140 или более, приблизительно 160 или более, приблизительно 180 или более, приблизительно 200 или более, приблизительно 250 или более, приблизительно 300 или более, приблизительно 400 или более, приблизительно 500 или более, включая приблизительно 1000 или более, или кратность покрытия в пределах диапазона, ограниченного любыми двумя из указанных выше значений, для суммарного количества вариантов вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке. В некоторых вариантах реализации количества геномной ДНК, экстрагированной из субпопуляции, достаточно для обеспечения кратности покрытия, составляющей от приблизительно 10 до приблизительно 1000, например, от приблизительно 20 до приблизительно 1000, от приблизительно 30 до приблизительно 750, от приблизительно 40 до приблизительно 500, от приблизительно 50 до приблизительно 500, от приблизительно 50 до приблизительно 400, приблизительно 60 до приблизительно 300, от приблизительно 70 до приблизительно 250, включая от приблизительно 80 до приблизительно 200, для суммарного количества вариантов вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке. В некоторых вариантах реализации определение включает получение среднего покрытия, составляющего по меньшей мере 10, для каждой из последовательностей нуклеотидов непрерывного участка, до или в отсутствие какой-либо амплификации отдельных представителей.

[0410] В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции включает амплификацию экстрагированных вариантных нуклеиновых кислот. Можно амплифицировать любую подходящую часть вариантных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации по существу амплифицируется только непрерывный участок вариантных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации амплифицируется часть вариантных нуклеиновых кислот, кодирующих полноразмерный полипептид. В некоторых вариантах реализации размер продуктов амплификации (или ампликонов) составляет по меньшей мере 600 п.о., например, по меньшей мере 700 п.о., по меньшей мере 800 п.о., по меньшей мере 900 п.о., по меньшей мере 1000 п.о., по меньшей мере 1100 п.о., по меньшей мере 1200 п.о., по меньшей мере

1300 п.о., по меньшей мере 1400 п.о., по меньшей мере 1500 п.о., по меньшей мере 1750 п.о., по меньшей мере 2000 п.о., по меньшей мере 2500 п.о., по меньшей мере 3000 п.о., по меньшей мере 4000 п.о., по меньшей мере 5000 п.о., по меньшей мере 6000 п.о., по меньшей мере 7000 п.о., по меньшей мере 8000 п.о., по меньшей мере 9000 п.о., по меньшей мере 10000 п.о., по меньшей мере 11000 п.о., по меньшей мере 12000 п.о., по меньшей мере 13000 п.о., по меньшей мере 14000 п.о., или по меньшей мере 15000 п.о., или длина находится в пределах диапазона, ограниченного любыми двумя из указанных выше значений. В некоторых вариантах реализации размер продуктов амплификации (или ампликонов) составляет от приблизительно 600 п.о. до приблизительно 15000 п.о., например, от приблизительно 800 п.о. до приблизительно 12000 п.о., от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 10000 п.о., от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 8000 п.о., от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 6000 п.о., от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 5000 п.о., от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 4000 п.о., от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 3000 п.о., включая от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 2000 п.о.

[0411] В некоторых вариантах реализации определение включает амплификацию по меньшей мере непрерывного участка отдельных представителей множества нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах реализации амплификация включает применение праймера для амплификации, который гибридизуется с неизменной подпоследовательностью нуклеотидов, причем каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит неизменную подпоследовательность нуклеотидов, и при этом неизменная подпоследовательность нуклеотидов кодирует неизменную последовательность аминокислот одного или более полипептидов. В некоторых вариантах реализации амплификация включает применение праймера для амплификации, который гибридизуется с подпоследовательностью нуклеотидов вне вариантной последовательности нуклеотидов, включая, но не ограничиваясь некодирующими последовательностями нуклеотидов генетического вектора. В некоторых вариантах реализации один или более полипептидов содержит TCRα- и TCRβ-цепи, и при этом неизменная последовательность аминокислот содержит константную область TCRα.

[0412] В некоторых вариантах реализации амплификацию проводят, чтобы обеспечить достаточное покрытие каждого варианта из вариантных нуклеиновых кислот

комбинаторной библиотеки в библиотеке амплифицированных ампликонов. В некоторых вариантах реализации выделенные вариантные нуклеиновые кислоты амплифицируют, чтобы обеспечить кратность покрытия, составляющую приблизительно 1000 или более, например, приблизительно 2000 или более, приблизительно 3000 или более, приблизительно 4000 или более, приблизительно 5000 или более, приблизительно 6000 или более, приблизительно 7000 или более, приблизительно 8000 или более, приблизительно 9000 или более, приблизительно 10000 или более, приблизительно 12000 или более, приблизительно 14000 или более, приблизительно 16000 или более, приблизительно 18000 или более, приблизительно 20000 или более, приблизительно 25000 или более, приблизительно 30000 или более, приблизительно 40000 или более, приблизительно 50000 или более, включая приблизительно 100000 или более, или кратность покрытия в пределах диапазона, ограниченного любыми двумя из указанных выше значений, для суммарного количества вариантов вариантных нуклеиновых кислот комбинаторной библиотеки в полученной в результате этого библиотеке ампликонов. В некоторых вариантах реализации выделенные вариантные нуклеиновые кислоты амплифицируют для обеспечения кратности покрытия, составляющей от приблизительно 1000 до приблизительно 100000, например, от приблизительно 2000 до приблизительно 100000, от приблизительно 3000 до приблизительно 75000, от приблизительно 4000 до приблизительно 50000, от приблизительно 5000 до приблизительно 50000, от приблизительно 5000 до приблизительно 40000, от приблизительно 6000 до приблизительно 30000, от приблизительно 7000 до приблизительно 25000, включая от приблизительно 8000 до приблизительно 20000, для суммарного количества вариантов вариантных нуклеиновых кислот комбинаторной библиотеки в полученной в результате этого библиотеке ампликонов. В некоторых вариантах реализации определение включает получение среднего покрытия, составляющего по меньшей мере 1000, для каждой из последовательностей нуклеотидов непрерывного участка.

[0413] В некоторых вариантах реализации амплификацию проводят таким образом, чтобы уменьшить смещение амплификации в полученной в результате этого библиотеке ампликонов. В некоторых вариантах реализации смещение амплификации уменьшают путем уменьшения количества циклов амплификации. В некоторых вариантах реализации смещение амплификации уменьшают путем использования достаточно

большой субпопуляции клеток, что уменьшает количество циклов амплификации. В некоторых вариантах реализации используют уникальные молекулярные идентификаторы (UMI), чтобы уменьшить смещение в результатах секвенирования вследствие смещения амплификации.

[0414] В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции не включает амплификацию выделенных вариантных нуклеиновых кислот.

[0415] В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции включает применение селективной библиотеки на основе CRISPR. Можно использовать любую подходящую возможность получения селективной библиотеки на основе CRISPR. В некоторых вариантах реализации выделение включает применение опосредованного CRISPR/Cas9 направленного фрагментирования геномной ДНК из субпопуляции. В некоторых вариантах реализации выделение вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции включает дефосфорилирование геномной ДНК, экстрагированной из субпопуляции, введение опосредованных CRISPR/Cas9 двухцепочечных разрывов в положения, фланкирующие интересующую последовательность (например, непрерывный участок вариантной нуклеиновой кислоты), и лигирование адаптеров (например, адаптеров секвенирования) в сайты двухцепочечных разрывов. Последовательности с лигированными адаптерами затем можно секвенировать, применяя любые подходящие подходы. В некоторых вариантах реализации определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы включает штрихкодирование каждого отдельного представителя подгруппы.

[0416] Определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы можно осуществить, используя любые подходящие возможности. В некоторых вариантах реализации определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка включает секвенирование непрерывного участка. Можно применять любую подходящую платформу секвенирования. Подходящие платформы секвенирования включают, без ограничения, секвенирование по Сэнгеру, пиросеквенирование, одномолекулярное секвенирование, ионное полупроводниковое секвенирование, секвенирование путем синтеза, секвенирование путем

синтеза с помощью комбинаторного зонда-якоря, секвенирование путем лигирования, одномолекулярное секвенирование в реальном времени (SMRT) и/или нанопоровое секвенирование. В некоторых вариантах реализации определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка включает применение платформы секвенирования, которая позволяет длинные прочтения секвенирования. В некоторых вариантах реализации определение включает секвенирование отдельных представителей путем получения прочтений секвенирования по меньшей мере 600 п.о. непрерывного участка. В некоторых вариантах реализации длина прочтений секвенирования составляет от 600 п.о. до 15000 п.о. В некоторых вариантах реализации определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка включает создание или получение прочтений секвенирования непрерывного участка длиной по меньшей мере 600 п.о., например, по меньшей мере 700 п.о., по меньшей мере 800 п.о., по меньшей мере 900 п.о., по меньшей мере 1000 п.о., по меньшей мере 1100 п.о., по меньшей мере 1200 п.о., по меньшей мере 1300 п.о., по меньшей мере 1400 п.о., по меньшей мере 1500 п.о., по меньшей мере 1750 п.о., по меньшей мере 2000 п.о., по меньшей мере 2500 п.о., по меньшей мере 3000 п.о., по меньшей мере 4000 п.о., по меньшей мере 5000 п.о., по меньшей мере 6000 п.о., по меньшей мере 7000 п.о., по меньшей мере 8000 п.о., по меньшей мере 9000 п.о., по меньшей мере 10000 п.о., по меньшей мере 11000 п.о., по меньшей мере 12000 п.о., по меньшей мере 13000 п.о., по меньшей мере 14000 п.о., или по меньшей мере 15000 п.о., или длина прочтений секвенирования непрерывного участка находится в пределах диапазона, ограниченного любыми двумя из указанных выше значений. В некоторых вариантах реализации прочтения секвенирования составляют от приблизительно 600 п.о. до приблизительно 1000 п.о. от приблизительно 1000 п.о. до приблизительно 2000 п.о., от приблизительно 2000 п.о. до приблизительно 3000 п.о., от приблизительно 3000 п.о. до приблизительно 4000 п.о., от приблизительно 4000 п.о. до приблизительно 5000 п.о., от приблизительно 5000 п.о. до приблизительно 7000 п.о., от приблизительно 7000 п.о. до приблизительно 10000 п.о., и/или от приблизительно 10000 п.о. до приблизительно 15000 п.о. непрерывного участка.

[0417] Идентификацию по меньшей мере одной комбинации из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании последовательностей нуклеотидов можно осуществить, используя любую подходящую возможность. В некоторых вариантах реализации интересующую комбинацию идентифицируют путем

определения того, что указанной комбинацией обогащена или обеднена субпопуляция, выбранная в результате селекции на основании функционального свойства. Относительную распространенность комбинации можно определить на основании любого подходящего сравнения определенной в субпопуляции распространенности комбинации в последовательностях нуклеотидов с референсным уровнем распространенности. Подходящие референсные уровни распространенности включают, без ограничения, распространенность комбинации в другой субпопуляции клеток, выбранной путем селекции на основании отсутствия функционального свойства, различного уровня ответа или различного типа ответа; или распространенность комбинации в субпопуляции, которая не была выбрана. В некоторых вариантах реализации интересующую комбинацию идентифицируют путем определения того, что наблюдают обогащение или обеднение комбинацией выбранной как положительная субпопуляции по сравнению с выбранной как отрицательная субпопуляцией. В некоторых вариантах реализации интересующую комбинацию идентифицируют путем определения того, что указанной комбинацией обогащена или обеднена субпопуляция, выбранная в результате селекции на основании функционального свойства, по сравнению с распространенностью комбинации в комбинаторной библиотеке.

[0418] В некоторых вариантах реализации идентификация по меньшей мере одной комбинации включает измерение обогащения субпопуляции по меньшей мере одной комбинацией относительно контрольной популяции клеток. В некоторых вариантах реализации популяция клеток включает контрольную популяцию клеток, и при этом указанная субпопуляция и контрольная популяция клеток являются неперекрывающимися. В некоторых вариантах реализации селекцию контрольной популяции клеток осуществляют на основании второго функционального свойства, которое отлично от указанного по меньшей мере одного функционального свойства.

[0419] В некоторых вариантах реализации способ скрининга включает: предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит: комбинацию первой вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей вариантную последовательность аминокислот TCRα и определяющей первый конец непрерывного

участка, и второй вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей вариантную последовательность аминокислот TCRβ и определяющей второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу; введение указанной библиотеки в популяцию иммортализованных Т-клеток, сконструированных для экспрессии TCRα- и TCRβ-цепей, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот; селекцию субпопуляции из популяции иммортализованных Т-клеток на основании экспрессии маркера активации Т-клеток выше порогового уровня в ответ на приведение в контакт иммортализованных Т-клеток с иммортализованными В-клетками, экспрессирующими антиген, причем указанная субпопуляция содержит множество Т-клеток; выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции; определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и идентификацию по меньшей мере одной комбинации первой и второй вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании обогащения подгруппы по меньшей мере одной комбинацией последовательностей нуклеотидов относительно контроля. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает: селекцию второй субпопуляции из популяции иммортализованных Т-клеток на основании экспрессии маркера активации Т-клеток ниже второго порогового уровня в ответ на приведение в контакт иммортализованных Т-клеток с иммортализованными В-клетками, причем вторая субпопуляция содержит второе множество Т-клеток, и при этом указанная субпопуляция и вторая субпопуляция являются неперекрывающимися; выделение второй подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из второй субпопуляции; и определение второй последовательности нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей второй подгруппы, причем по меньшей мере одну комбинацию идентифицируют на основании обогащения подгруппы указанной по меньшей мере одной комбинацией относительно по меньшей мере одной комбинации во вторых последовательностях нуклеотидов второй подгруппы.

[0420] В некоторых вариантах реализации способ скрининга включает: предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит комбинацию двух или более из: первой вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей

шарнирный домен CAR; второй вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей трансмембранный домен CAR; и третьей вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей внутриклеточный сигнальный домен CAR, причем одна из первой, второй или третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет первый конец непрерывного участка, и при этом другая одна из первой, второй или третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу; введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии CAR, кодируемого представителем множества вариантных нуклеиновых кислот, причем популяция клеток включает популяцию иммортализованных Т-клеток или первичных Т-клеток человека; селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании пролиферации клеток выше порогового уровня в ответ на приведение клеток в контакт с антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими антиген, специфичный к связывающему антиген домену CAR, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток; выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции; определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и идентификацию по меньшей мере одной комбинации первой, второй и третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании обогащения подгруппы по меньшей мере одной комбинацией последовательностей нуклеотидов относительно контроля. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает: селекцию второй субпопуляции из популяции клеток на основании пролиферации клеток ниже второго порогового уровня в ответ на приведение клеток в контакт с антигенпрезентирующими клетками, причем вторая субпопуляция содержит второе множество клеток, и при этом указанная субпопуляция и вторая субпопуляция являются неперекрывающимися; выделение второй подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из второй субпопуляции; определение второй последовательности нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей второй подгруппы, и причем по меньшей мере одну комбинацию идентифицируют на основании обогащения подгруппы указанной по меньшей мере одной комбинацией относительно по меньшей мере одной комбинации во вторых последовательностях нуклеотидов второй подгруппы.

[0421] В рамках настоящего описания, различные варианты реализации часто описаны как включающие непрерывный участок, который содержит комбинацию двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов. Более того, данные варианты реализации часто включают первую вариантную подпоследовательность нуклеотидов и вторую вариантную подпоследовательность нуклеотидов и селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, зависящего от комбинации двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов. Тем не менее, альтернативный вариант реализации, явно предполагаемый для всех таких вариантов реализации, включающих два или более вариантных нуклеотидов, представляет собой вариант реализации, включающий единую функциональную последовательность (т.е., единую вариантную последовательность нуклеотидов). В таких вариантах реализации последовательность из 600 п.о. будет относиться к последовательности в одной последовательности нуклеиновой кислоты, которая может кодировать, например, один белок с одной функцией. Таким образом, для всех вариантов реализации, описанных в настоящей заявке, включающих «две или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов», также предусмотрено применение способа(-ов) по отношению к ситуации, когда снова есть только «вариантная подпоследовательность нуклеотидов», где длина самой последовательности составляет 600 п.о. или более. Например, в некоторых вариантах реализации предложен способ идентификации последовательности нуклеотидов из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. Указанный способ включает предоставление комбинаторной библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о. Способ дополнительно включает введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот. Способ дополнительно включает селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, зависящего от непрерывного участка из по меньшей мере 600 п.о., причем указанная субпопуляция содержит множество клеток. Способ дополнительно включает выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции. Способ дополнительно включает определение

последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы. Способ дополнительно включает идентификацию непрерывного участка из по меньшей мере 600 п.о. на основании последовательностей нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации способ также может представлять собой способ, в котором непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о. распределен по всей длине 600 пар оснований.

[0422] Предложены дополнительные варианты реализации представленных в настоящей заявке способов скрининга. В некоторых вариантах реализации способы скрининга в соответствии с настоящим изобретением можно применять для скрининга любого варианта белка, в указанных способах: (a) предполагается, что белковая последовательность является вариантной на участке последовательности длиной 200 аминокислот или более; (b) варианты белков могут экспрессироваться в репортерной клетке (включая дрожжи и бактерии) или с другого функционального носителя (например, вирусов, фагов), которые можно подвергнуть селекционному давлению; и (c) можно осуществить селекцию репортерных клеток, экспрессирующих интересующие варианты белков, по меньшей мере одному функциональному свойству после селекционного давления (например, по связыванию с антигеном, экспрессии генов в ответ на антиген и т.д.).

Создание библиотеки вариантных последовательностей нуклеотидов, содержащей по меньшей мере две вариантные подпоследовательности нуклеотидов, которые можно однозначно идентифицировать лишь путем определения по меньшей мере 600 п.о. от их полноразмерной последовательности нуклеотидов

[0423] В некоторых вариантах реализации библиотеку вариантных последовательностей нуклеотидов получают с помощью любого подходящего дизайна *in silico* и подхода белковой инженерии. Каждый вариант может кодироваться генетическим вектором, что будет приводить к экспрессии вариантной последовательности нуклеотидов внутри клетки. В зависимости от конкретного способа скрининга, который будут проводить, вариантные последовательности нуклеотидов можно объединить с подходящими последовательностями промотора, сигнального пептида, донора/акцептора сплайсинга, стоп-кодона и поли(A)-сигнала. Экспрессионная конструкция может также

содержать селективный маркер, например, ген устойчивости к антибиотику, флуоресцентную молекулу или маркер поверхности клетки.

[0424] В некоторых вариантах реализации, для того чтобы улучшить способность идентифицировать варианты с высокой достоверностью, можно применять алгоритмы *in silico* для контролирования использования кодонов, тем самым максимизируя редакционное расстояние (которое может представлять собой количество изменений нуклеотидов, необходимых для превращения данной последовательности нуклеотидов в любую другую вариантную последовательность нуклеотидов в библиотеке) между любыми двумя вариантами и улучшая способность различать вариантные последовательности нуклеотидов. Библиотеку вариантных последовательностей можно получить с помощью любых подходящих возможных способов, таких как, но не ограниченных синтезом ДНК.

[0425] Способы скрининга в соответствии с настоящим изобретением в некоторых вариантах реализации можно применять для скрининга любого подходящего белка, варианты которого можно с уверенностью идентифицировать лишь путем определения более чем 200 аминокислот. Примеры включают, но не ограничены перечисленными: TCR, CAR, антитела, направляемые РНК нуклеазы, синтетические рецепторы-переключатели и направленную эволюцию белка.

[0426] В некоторых вариантах реализации библиотека представляет собой библиотеку TCR, содержащую варианты TCRα и TCRβ. Библиотека TCR может представлять собой любую подходящую библиотеку, в которой любая данная цепь TCRα и TCRβ либо может встречаться с более чем одним комплементарным партнером по димеризации, либо партнер по димеризации неизвестен. В обоих случаях, вариант TCR можно однозначно идентифицировать лишь путем секвенирования обеих вариабельных последовательностей TCRα и TCRβ.

[0427] В некоторых вариантах реализации библиотека представляет собой библиотеку CAR, содержащую варианты CAR. Библиотека CAR может представлять собой любую подходящую библиотеку, в которой необходимо секвенировать более 200 аминокислот, чтобы достоверно идентифицировать любой данный вариант CAR. Примеры включают любые библиотеки CAR с высоким разнообразием связывающих антиген доменов или с любой другой комбинаторной конструкцией с использованием некоторых или всех доменов белка CAR, например, библиотеку, в которой комбинируют варианты

шарнирных доменов, трансмембранных доменов и двух сигнальных доменов, чтобы создать библиотеку с 500 или более вариантами.

[0428] В некоторых вариантах реализации библиотека представляет собой библиотеку антител, содержащую варианты антител. Вариантные последовательности нуклеотидов могут включать нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела, которые спарены в одной экспрессионной конструкции, которую можно однозначно идентифицировать лишь путем секвенирования обеих последовательностей тяжелой и легкой цепей. В некоторых вариантах реализации библиотеки вариантов антител можно ввести в репортерные клетки (или другой функциональный носитель) и осуществить селекцию на основании по меньшей мере одного функционального свойства (такого как связывание антигена).

Введение указанной библиотеки вариантных последовательностей нуклеотидов в репортерные клетки.

[0429] Библиотеку вариантных последовательностей нуклеотидов можно ввести в репортерные клетки с помощью любого подходящего подхода. В некоторых вариантах реализации для введения библиотеки в репортерные клетки применяют ретро- или лентивирусную доставку генов (или, как было отмечено в настоящей заявке, любой носитель). Для введения библиотеки в репортерные клетки можно применять любой подходящий подход. Репортерная клетка может представлять собой любую подходящую клетку (или носитель). В некоторых вариантах реализации репортерную клетку можно выбрать на основании нескольких критериев: (1) ее способности демонстрировать измеримое приобретение или утрату функции в зависимости от введенной вариантной последовательности нуклеотидов и в ответ на внешнее селекционное давление; (2) минимальной фоновой экспрессии маркерной молекулы, используемой для измерения ответа на селекционное давление, и (3) пролиферации и выживаемости репортерных клеток в культуре. Подходящие репортерные клетки для скрининга, например, библиотек иммунных рецепторов (TCR/CAR), включают, без ограничения, иммортализованные Т-клетки Jurkat или первичные Т-клетки человека. Другие варианты носителей также обсуждались в настоящей заявке.

[0430] В некоторых вариантах реализации в среднем каждая репортерная клетка трансдуцирована только одной вариантной последовательностью нуклеотидов,

следовательно, вирусную трансдукцию осуществляют при низкой MOI. В некоторых вариантах реализации для сохранения уровня представленности каждой вариантной последовательностью нуклеотидов в поликлональном пуле репортерных клеток (далее: покрытие), количество репортерных клеток, подлежащих трансдукции, непосредственно связано с количеством вариантов в библиотеке.

[0431] В некоторых вариантах реализации после модификации библиотекой, можно осуществить селекцию успешно модифицированных репортерных клеток, например, на основании устойчивости к антибиотику (например, пуромицину или бластицидину). Такая селекция может уменьшить суммарное количество клеток путем удаления нетрансдуцированных клеток из популяции после трансдукции при низкой MOI. В некоторых вариантах реализации эффективность селекции зависит от разнообразия библиотеки вариантных последовательностей. В некоторых вариантах реализации библиотеку внедряют в более многочисленную популяцию репортерных клеток, где библиотека имеет большее разнообразие для сохранения покрытия библиотеки в популяции. В некоторых вариантах реализации используют достаточное количество поликлональных репортерных клеток для сохранения определенного уровня покрытия после селекции.

[0432] В некоторых вариантах реализации библиотеку можно внедрить в репортерные клетки путем опосредованной транспозонами доставки генов. В некоторых вариантах реализации библиотеку можно внедрить в репортерные клетки путем опосредованного ДНК-нуклеазой сайт-специфического встраивания (например, применяя CRISPR/Cas9 и TALEN).

[0433] В некоторых вариантах реализации селекцию модифицированных репортерных клеток можно осуществить на основании обогащения на основе гранул по маркеру поверхности клетки на модифицированных репортерных клетках. В некоторых вариантах реализации селекцию модифицированных репортерных клеток можно осуществить путем сортировки с помощью проточной цитометрии по маркеру поверхности клетки или флуоресцентной молекуле.

[0434] В некоторых вариантах реализации репортерные клетки генетически модифицированы, чтобы (1) повысить их способность демонстрировать приобретение или утрату функции в ответ на внешнее селекционное давление; (2) снизить фоновую

экспрессию маркерной молекулы, которую использовали для измерения ответа на селекционное давление; и/или (3) повысить способность поддержания популяции репортерных клеток в культуре клеток.

Селекция репортерных клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства.

[0435] В некоторых вариантах реализации оказывали селекционное давление на поликлональную популяцию репортерных клеток, чтобы измерить приобретение или утрату функции репортерными клетками в зависимости от экспрессируемого варианта белка. Например, репортерные клетки можно стимулировать экспрессирующими антиген клетками. Затем в ответ на стимул репортерные клетки можно выделить на основании подходящего маркера. Например, повышение экспрессии CD69 на трансдуцированных TCR клетках Jurkat в ответ на экспрессирующие антиген клетки можно использовать для проведения сортировки репортерных клеток с помощью проточной цитометрии. Как отвечающую, так и неотвечающую популяции можно выделить с достаточным покрытием и анализировать отдельно. Таким образом, относительную кратность обогащения данной вариантной последовательностью нуклеотидов можно измерить путем определения обогащения в положительной и обеднения в отрицательной популяциях.

[0436] В некоторых вариантах реализации оказывали селекционное давление на репортерные клетки одним или более из следующих способов: стимуляцией агонистами или антагонистами рецепторов; воздействием малыми молекулами; воздействием более чем одним стимулом одновременно. В некоторых вариантах реализации репортерные клетки выделяют на основании повышения экспрессии или снижения экспрессии белкового маркера, например, применяемого для проточной цитометрии или сортировки на основе гранул положительных и отрицательных по указанному маркеру репортерных клеток. В некоторых вариантах реализации репортерные клетки выделяют на основании устойчивости/чувствительности к лекарственному средству, которая приводит к селективной выживаемости или гибели репортерных клеток. В некоторых вариантах реализации репортерные клетки выделяют на основании множества маркерных молекул.

[0437] В некоторых вариантах реализации вместо выделения как положительно, так и отрицательно отвечающих репортерных клеток выделяют только одну популяцию. Кратность обогащения данной вариантной последовательностью нуклеотидов можно

установить путем сравнения с поликлональными репортерными клетками, которые не были подвергнуты селекционному давлению.

[0438] Можно применять любой подход или комбинацию описанных выше подходов для селекции репортерных клеток.

Выделение вариантных последовательностей нуклеотидов из прошедших селекцию репортерных клеток.

[0439] В некоторых вариантах реализации, для того чтобы проанализировать выделенные поликлональные популяции репортерных клеток на общем уровне, выделяли геномную ДНК (гДНК), применяя любые подходящие подходы. Затем вариантные последовательности нуклеотидов амплифицировали с помощью ПЦР. Такую амплификацию можно осуществить для полноразмерной вариантной последовательности нуклеотидов или только для участка, на котором указанные варианты проявляют мутационное разнообразие. Ампликоны ПЦР можно подготовить для анализа путем секвенирования нового поколения (NGS) на платформе, которая может обеспечить достаточную длину прочтения и суммарное количество прочтений секвенирования, такой как, но не ограничиваясь технологией Nanopore Oxford. В некоторых вариантах реализации протокол ПЦР можно улучшить, чтобы избежать любого смещения амплификации в сторону определенных вариантных последовательностей нуклеотидов, используя любые подходящие возможности (например, использование уникальных молекулярных идентификаторов (UMI) и минимальных количеств циклов ПЦР).

[0440] В некоторых вариантах реализации в качестве средства предотвращения смещения амплификации вариантных последовательностей нуклеотидов, выделяют гДНК из прошедших селекцию репортерных клеток и используют для селективного получения из нее библиотеки с помощью CRISPR. Геномную ДНК можно дефосфорилировать, и можно ввести опосредованные CRISPR/Cas9 двухцепочечные разрывы в последовательности, фланкирующие интересующие последовательности. Нуклеотиды, расположенные непосредственно рядом с двухцепочечным разрывом, могут оставаться фосфорилированными после такой обработки, что может позволить зависимое от фосфорилирования лигирование адаптера на следующем этапе создания библиотеки. В зависимости от ориентации мотива, смежного с протоспейсером (PAM), и используемой последовательности протоспейсера, вставку можно специфически секвенировать с

применением подходящих возможностей секвенирования (например, технологии Nanopore Oxford).

Определение по меньшей мере 600 п.о. из полноразмерной последовательности нуклеотидов из выделенных вариантных последовательностей нуклеотидов.

[0441] В некоторых вариантах реализации ампликоны ПЦР секвенируют с применением подходящей платформы NGS. Можно применять любую подходящую платформу секвенирования для секвенирования ампликонов, в зависимости от свойств библиотеки генетических вариантов. Подходящие платформы секвенирования включают, без ограничения, технологию Nanopore Oxford.

Селекция по меньшей мере одной интересующей вариантной последовательности нуклеотидов.

[0442] В некоторых вариантах реализации интересующую вариантную последовательность нуклеотидов, например, TCR и CAR, выбирают путем селекции на основании относительного обогащения путем определения обогащения вариантом выбранной как положительная (положительной по маркерной молекуле) популяции репортерных клеток и обеднения вариантом выбранной как отрицательная (отрицательной по маркерной молекуле) популяции репортерных клеток, что определяют по количествам прочтений варианта в обеих популяциях клеток. В некоторых вариантах реализации осуществляют селекцию интересующей вариантной последовательности нуклеотидов на основании одного или более из: относительного обогащения; относительного обогащения, происходящего под различными селекционными давлениями, например, при различных дозах антигена; относительного обогащения во множестве популяций клеток, выделенных на основании различных маркерных молекул; относительного обогащения в популяциях клеток, которые выделяют на основании комбинации маркерных молекул; относительного обогащения, встречающегося во множестве популяций клеток, такие популяции клеток содержат различные типы репортерных клеток; обогащения вариантными последовательностями нуклеотидов, например, TCR или CAR, выделенной популяции репортерных клеток относительно исходной библиотеки вариантов генов.

[0443] В некоторых вариантах реализации любые из следующих вариантов или их подразделов могут являться частью или могут быть скомбинированы с вариантами

реализации, предложенными в настоящей заявке. Варианты пронумерованы 1 - 145, как описано далее:

1. Способ получения репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) из разнообразных популяций Т-клеток, указанный способ включает:

определение последовательностей нуклеотидов или аминокислот TCRα и β в образце из организма субъекта;

выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара;

создание репертуара TCR путем комбинаторного получения пар выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ, тем самым создавая библиотеку пар TCRαβ; и

идентификацию по меньшей мере одной пары TCRαβ с желательными свойствами из созданного репертуара TCR.

2. Способ согласно варианту 1, отличающийся тем, что осуществляют выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании по меньшей мере одного критерия:

частоты встречаемости в популяции Т-клеток,

относительного обогащения по сравнению со второй популяцией Т-клеток,

относительного различия числа копий ДНК и РНК данной цепи TCR,

биологических свойств цепи TCR, причем указанные свойства выбраны из по меньшей мере одного из следующих свойств: (предсказанной) специфичности к антигену, (предсказанной) HLA-рестрикции, аффинности к антигену, зависимости от корецептора, исходной Т-клеточной линии дифференцировки (например, CD4 или CD8 Т-клетка) или мотивов последовательности TCR,

пространственных паттернов экспрессии генов, причем пространственные паттерны экспрессии генов получают из по меньшей мере одного из: области происхождения в ткани или паттернов коэкспрессии других генов,

совместной встречаемости или встречаемости со сходной частотой во множестве образцов, например, встречаемости во множестве очагов опухоли,

распределения по множеству групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR,

комбинации множества критериев, приведенных в различных вариантах реализации.

3. Способ согласно варианту 2, отличающийся тем, что выбор на основании частоты встречаемости в популяции Т-клеток основан на данных о частоте встречаемости последовательностей TCR, которые используют для создания отдельного порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ или комбинированного порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ.

4. Способ согласно любому из вариантов 1 - 3, дополнительно включающий определение порога частоты встречаемости, который определяют на основании желательной глубины получения репертуара TCR и используют для выбора совокупностей цепей TCRα и TCRβ на основании частоты встречаемости.

5. Способ согласно любому из вариантов 1 - 4, отличающийся тем, что определение последовательностей TCRα- и β осуществляют с помощью по меньшей мере одного из способов:

мультиплексной ПЦР;

получения последовательности TCR путем направленного обогащения;

получения последовательности TCR с помощью 5'-RACE и ПЦР;

получения последовательности TCR путем пространственного секвенирования;

получения последовательности TCR путем секвенирования РНК;

и применения уникального молекулярного идентификатора (UMI)

6. Способ согласно любому из вариантов 1 - 5, отличающийся тем, что полученную последовательность цепи TCR определяют как последовательность нуклеотидов CDR3 вместе с достаточной информацией о 5'- и 3'-последовательности нуклеотидов для выбора семейства по меньшей мере одного TCR V- и одного TCR J-сегмента на основании выравнивания последовательностей нуклеотидов, чтобы собрать полноразмерную последовательность цепи TCR.

7. Способ согласно любому из вариантов 1 - 6, отличающийся тем, что создание репертуара TCR путем комбинаторного получения пар выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ, тем самым создавая библиотеку пар TCRαβ, осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов:

последовательности цепей TCR используют для синтеза отдельных библиотек фрагментов ДНК или РНК цепей TCRα и TCRβ, которые впоследствии соединяют в один фрагмент ДНК или РНК, в котором соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь,

комбинации цепей TCRα и TCRβ получают путем непосредственного синтеза фрагментов ДНК или РНК, в которых соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь,

комбинации цепей TCRα и TCRβ создают внутри клетки путем модификации пула клеток отдельными совокупностями генов TCRα и β таким образом, что клетки будут экспрессировать по меньшей мере одну TCRα- и одну β-цепь, и/или

комбинации цепей TCRα и TCRβ соединяют в одноцепочечную конструкцию TCR, в которой слиты фрагменты вариабельных областей обеих цепей TCRα и TCRβ, и в которой одноцепочечная конструкция TCR может быть слита с (i) трансмембранным доменом отдельно или (ii) дополнительно содержит внутриклеточные сигнальные домены, включая, но не ограничиваясь сигнальными доменами CD3ε или CD3ζ, отдельно или в комбинации с сигнальным доменом CD28.

8. Способ согласно любому из вариантов 1 - 7, отличающийся тем, что идентификацию по меньшей мере одной пары TCRαβ с желательными свойствами из созданного репертуара TCR осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов:

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки выделяют на основании по меньшей мере одного маркера активации для выделения TCR;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, метят флуоресцентным красителем, подходящим для отслеживания пролиферации клеток, стимулируют антигенпрезентирующими клетками,

экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и выделяют антигенреактивные репортерные клетки на основании пролиферации для выделения TCR;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, разделяют на по меньшей мере два образца; образцы стимулируют антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген или нет; после стимуляции обе популяции репортерных клеток инкубируют в течение некоторого периода времени и впоследствии обе популяции репортерных клеток анализируют путем выделения TCR; сравнение пар TCRαβ, полученных из обоих образцов, используют, чтобы определить гены TCR с большей распространенностью в образце, приведенном в контакт с по меньшей мере одним антигеном;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки выделяют для выделения TCR на основании по меньшей мере одного репортерного гена, такого как NFAT-GFP или NFAT-YFP, который свидетельствует о стимуляции TCR;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки выделяют для выделения TCR на основании селекции антигенспецифических репортерных клеток на основании селективной выживаемости, включая, но не ограничиваясь приобретенной устойчивостью к антибиотику, в результате сигнализации TCR, например, путем применения трансгена NFAT-пуромицин;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, приводят в контакт с одним или множеством комплексов ГКГС, которые несут интересующий антиген; репортерные клетки, связавшиеся с комплексом ГКГС, выделяют для выделения TCR;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по

меньшей мере один интересующий антиген; затем интересующие пары TCRαβ идентифицируют, применяя основанные на отдельных клетках капельную ПЦР или микрофлюидные подходы, чтобы комбинировать выделение TCR с детектированием уровней транскрипта по меньшей мере одного маркера активации; таким образом детектируют отдельные репортерные клетки в пуле Т-клеток, в которых транскрипты TCRαβ коэкспрессируются с повышенными уровнями маркера активации.

9. Способ согласно любому из вариантов 1 - 8, отличающийся тем, что образец из организма субъекта содержит нежизнеспособный исходный материал.

10. Способ согласно любому из вариантов 1 - 9, отличающийся тем, что получают определенную часть идентифицированного репертуара TCR.

11. Способ согласно любому из вариантов 1 - 10, отличающийся тем, что получают последовательности антигенспецифического TCR.

12. Способ согласно любому из вариантов 1 - 11, отличающийся тем, что получают последовательности TCR, рестриктированного по I классу и/или II классу.

13. Способ согласно любому из вариантов 1 - 12, отличающийся тем, что получают по меньшей мере одну из:

специфических к неоантигену последовательностей TCR,

специфических к вирусу последовательностей TCR,

специфических к общим антигенам опухоли последовательностей TCR,

специфических к собственным антигенам последовательностей TCR.

14. Способ согласно варианту 12, дополнительно включающий этап введения Т-клеток, экспрессирующих специфические к неоантигену последовательности TCR, в качестве терапии рака.

15. Способ согласно любому из вариантов 1 - 13, отличающийся тем, что указанный способ предназначен для диагностики.

16. Способ согласно варианту 15, отличающийся тем, что диагностика представляет собой получение репертуаров TCR из патологических очагов инфекции или аутоиммунитета.

17. Способ согласно любому из вариантов 1 - 15, отличающийся тем, что указанный способ предназначен для получения репертуаров BCR/антител.

18. Способ согласно любому из вариантов 1 - 16, дополнительно включающий выделение из организма субъекта нуклеиновых кислот, которые содержат последовательности нуклеотидов TCR-α и -β.

19. Способ согласно варианту 8, отличающийся тем, что маркер активации выбирают из группы, состоящей из: CD25, CD69, CD62L, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF, OX40.

20. Способ согласно любому из вариантов 1 - 18, отличающийся тем, что выделение ДНК и РНК осуществляют из популяции Т-клеток, которая представляет собой смесь различных типов клеток или часть образца ткани (такой как кровь или опухолевая ткань).

21. Способ согласно любому из вариантов 1 - 19, отличающийся тем, что образец из организма субъекта содержит клетки, выделенные из биологической жидкости.

22. Способ согласно варианту 20, отличающийся тем, что клетки представляют собой опухолеспецифические Т-клетки или инфильтрирующие опухоль лимфоциты.

23. Способ согласно вариантам 20 - 21, отличающийся тем, что биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из крови, мочи, сыворотки, серозной жидкости, плазмы, лимфы, спинномозговой жидкости, слюны, мокроты, секрета слизистой, вагинальной жидкости, асцитной жидкости, плевральной жидкости, перикардиальной жидкости, перитонеальной жидкости и жидкости брюшной полости.

24. Способ согласно варианту 1, дополнительно включающий применение последовательностей цепей TCRαβ для лечения субъекта, страдающего от рака,

иммунологического расстройства, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания.

25. Способ согласно любому из вариантов 1 - 7, отличающийся тем, что идентификацию по меньшей мере одной пары TCRαβ с желательными свойствами из созданного репертуара TCR осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов:

идентификации или селекции на основании по меньшей мере одного маркера активации;

идентификации или селекции на основании пролиферации в ответ на антиген;

идентификации или селекции на основании идентификации генов TCR с большей распространенностью в стимулированных антигеном клетках по сравнению с нестимулированными клетками;

идентификации или селекции на основании активации репортерного гена путем стимуляции TCR;

идентификации или селекции на основании селективной выживаемости, включая, но не ограничиваясь приобретенной устойчивостью к антибиотику в результате сигнализации TCR;

идентификации или селекции на основании связывания с одним или более комплексами ГКГС;

идентификации или селекции с применением основанных на отдельных клетках капельной ПЦР или микрофлюидных способов;

и любой их комбинации.

26. Способ согласно варианту 8, отличающийся тем, что выделение TCR осуществляют путем выделения ДНК или РНК из общей популяции антигенреактивных Т-клеток, чтобы получить специфический продукт ПЦР TCRαβ, который анализируют путем секвенирования ДНК или секвенирования РНК, чтобы определить последовательности генов TCRαβ антигенреактивных Т-клеток, или с помощью основанных на отдельных клетках капельной ПЦР или микрофлюидных подходов, чтобы проанализировать последовательности генов TCRαβ, экспрессированные в анализируемых отдельных Т-клетках.

27. Способ согласно варианту 8, отличающийся тем, что репортерные клетки представляют собой Т-клетки.

28. Способ согласно варианту 24, отличающийся тем, что идентификация или селекция с применением основанных на отдельных клетках капельной ПЦР или микрофлюидных способов дополнительно включает определение коэкспрессии ассоциированных с активацией генов.

29. Способ создания множества библиотек Т-клеток, указанный способ включает: получение репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) в соответствии со способом, описанным в варианте 1; выбор последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара во множество групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR, при этом создается множество библиотек Т-клеток, которые имеют меньшую сложность или которые позволяют получить определенные части репертуара TCR.

30. Способ согласно варианту 29, отличающийся тем, что выбор последовательностей цепей TCRα и TCRβ осуществляют на основании диапазона частот.

31. Способ идентификации последовательности нуклеотидов из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

предоставление комбинаторной библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит комбинацию двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, причем первая вариантная подпоследовательность нуклеотидов из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет первый конец непрерывного участка и вторая вариантная подпоследовательность нуклеотидов из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу;

введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот;

селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, зависящего от комбинации двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток;

выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции;

определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и

идентификацию по меньшей мере одной комбинации из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании последовательностей нуклеотидов.

32. Способ согласно варианту 1, отличающийся тем, что один или более полипептидов включают:

цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ;

химерный антигенный рецептор (CAR);

рецептор-переключатель; или

одну или более цепей антитела или его связывающего антиген фрагмента.

33. Способ согласно варианту 31 или **Error! Reference source not found.**, отличающийся тем, что первая вариантная подпоследовательность нуклеотидов кодирует вариантную последовательность аминокислот TCRα и вторая вариантная подпоследовательность нуклеотидов кодирует вариантную последовательность аминокислот TCRβ.

34. Способ согласно любому из вариантов 31 - 33, отличающийся тем, что две или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов кодируют одну или более из: V-области TCR, определяющей комплементарность области 3 (CDR3) TCR, J-сегмента TCR и константной области TCR.

35. Способ согласно варианту 31 или **Error! Reference source not found.**, отличающийся тем, что каждая из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов кодирует связывающий антиген домен, шарнирный домен, трансмембранный домен или один или более внутриклеточных сигнальных доменов CAR.

36. Способ согласно любому из вариантов 31 - 35, отличающийся тем, что длина указанных непрерывных участков составляет от 600 п.о. до 15000 п.о.

37. Способ согласно любому из вариантов 31 - 36, отличающийся тем, что предоставление включает создание библиотеки.

38. Способ согласно варианту 37, отличающийся тем, что создание библиотеки включает:

идентификацию двух или более групп вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, кодирующих две или более групп вариантных последовательностей аминокислот одного или более полипептидов, причем по меньшей мере одно функциональное свойство зависит от комбинации вариантных последовательностей аминокислот из каждой из двух или более групп вариантных последовательностей аминокислот; и

сборку непрерывного участка путем комбинирования вариантной подпоследовательности нуклеотидов из каждой из двух или более групп вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, чтобы тем самым получить представителя множества вариантных нуклеиновых кислот.

39. Способ согласно любому из вариантов 31 - 38, отличающийся тем, что редакционное расстояние между непрерывными участками из множества вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке максимизировано.

40. Способ согласно любому из вариантов 31 - 39, отличающийся тем, что библиотека содержит по меньшей мере 100 различных комбинаций из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов.

41. Способ согласно любому из вариантов 31 - 40, отличающийся тем, что введение включает введение указанной библиотеки посредством вирусной трансдукции,

доставки генов на основе транспозонов или опосредованного нуклеазой сайт-специфического встраивания.

42. Способ согласно варианту 41, отличающийся тем, что введение включает вирусную трансдукцию популяции клеток при множественности заражения (MOI), составляющей 5 или менее.

43. Способ согласно любому из вариантов 31 - 42, включающий регулирование размера популяции клеток на основании количества различных комбинаций из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов в библиотеке.

44. Способ согласно любому из вариантов 31 - 43, отличающийся тем, что популяция клеток содержит иммортализованные Т-клетки или первичные Т-клетки.

45. Способ согласно варианту 44, отличающийся тем, что иммортализованные Т-клетки или первичные Т-клетки представляют собой Т-клетки человека.

46. Способ согласно любому из вариантов 31 - 45, дополнительно включающий применение маркера для селекции или скрининга клеток в популяции клеток, экспрессирующих по меньшей мере одну из множества вариантных нуклеиновых кислот.

47. Способ согласно варианту 46, отличающийся тем, что маркер представляет собой маркер устойчивости к цитотоксину и/или маркер поверхности клетки.

48. Способ согласно любому из вариантов 31 - 47, отличающийся тем, что клетки из популяции клеток генетически модифицированы.

49. Способ согласно любому из вариантов 31 - 47, отличающийся тем, что клетки из популяции не содержат эндогенный полипептид, придающий клеткам по меньшей мере одно функциональное свойство.

50. Способ согласно любому из вариантов 1 - 49, отличающийся тем, что клетки генетически модифицированы, чтобы устранить или уменьшить экспрессию одного или более из CD4, CD8 и CD28.

51. Способ согласно варианту 48 или 49, отличающийся тем, что в клетках восстанавливают экспрессию CD4 и/или CD8 и используют их для скрининга на рестриктированные по I классу и/или II классу последовательности TCR.

52. Способ согласно варианту 50 или 51, отличающийся тем, что клетки представляют собой Т-клетки.

53. Способ согласно любому из вариантов 31 - 52, отличающийся тем, что селекция включает селекцию субпопуляции на основании экспрессии детектируемого маркера, причем указанная экспрессия зависит от по меньшей мере одного функционального свойства одного или более полипептидов.

54. Способ согласно варианту 53, отличающийся тем, что детектируемый маркер включает маркер поверхности клетки, маркерный цитокин, маркер пролиферации клеток, транскрипционный репортер, репортер передачи сигнала и/или репортер цитотоксичности.

55. Способ согласно варианту 54, отличающийся тем, что

маркер поверхности клетки включает один или более из: CD25, CD69, CD62L, CD137, OX40;

маркерный цитокин включает один или более из: IFN-γ, IL-2, TNF-α, IL-8, GM-CSF;

транскрипционный репортер включает один или более из: NF-κB, NFAT, AP-1;

репортер передачи сигнала включает один или более из: ZAP70, ERK1/2; и

репортер цитотоксичности включает один или более из: CD107A, CD107B.

56. Способ согласно любому из вариантов 31 - 55, отличающийся тем, что селекция включает приведение популяции клеток в контакт с одним или более из:

второй популяции клеток;

лиганда одного или более полипептидов;

агониста или антагониста одного или более полипептидов; и

малой молекулы,

причем изменение в субпопуляции, вызванное указанным приведением в контакт, зависит от указанного по меньшей мере одного функционального свойства одного или более полипептидов.

57. Способ согласно варианту 56, отличающийся тем, что селекция дополнительно включает:

детектирование присутствия или отсутствия изменения, и/или величины изменения; и

селекцию субпопуляции на основании указанного детектирования.

58. Способ согласно варианту 56 или 57, отличающийся тем, что вторая популяция клеток содержит антигенпрезентирующие клетки.

59. Способ согласно варианту 58, отличающийся тем, что антигенпрезентирующие клетки включают В-клетки и/или дендритные клетки.

60. Способ согласно любому из вариантов 56 - 59, отличающийся тем, что вторая популяция клеток содержит первичные клетки или иммортализованные клетки.

61. Способ согласно любому из вариантов 56 - 60, отличающийся тем, что варианты последовательностей нуклеотидов из библиотеки получены из клеток, экспрессирующих вариантный полипептид, содержащий аминокислоту, кодируемую вариантными подпоследовательностями нуклеотидов, причем клетки получены из организма субъекта, и причем вторая популяция клеток происходит из организма указанного субъекта.

62. Способ согласно любому из вариантов 31 - 61, отличающийся тем, что селекция включает селекцию первой субпопуляции из популяции клеток на основании меры по меньшей мере одного функционального свойства выше или ниже порога.

63. Способ согласно варианту 62, отличающийся тем, что порог определяют на основании меры функционального свойства в невыбранной субпопуляции из популяции клеток.

64. Способ согласно варианту 62, отличающийся тем, что селекция дополнительно включает селекцию второй субпопуляции из популяции клеток на основании второй меры по меньшей мере одного функционального свойства выше или ниже второго порога, причем первая и вторая субпопуляции являются неперекрывающимися.

65. Способ согласно варианту 64, отличающийся тем, что идентификация по меньшей мере одной комбинации включает сравнение распространенности по меньшей мере одной комбинации между первой и второй субпопуляциями.

66. Способ согласно любому из вариантов 31 - 64, отличающийся тем, что идентификация по меньшей мере одной комбинации включает измерение обогащения субпопуляции по меньшей мере одной комбинацией относительно контрольной популяции клеток.

67. Способ согласно варианту 66, отличающийся тем, что популяция клеток включает контрольную популяцию клеток.

68. Способ согласно варианту 67, отличающийся тем, что субпопуляция и контрольная популяция клеток являются неперекрывающимися, причем неперекрывающиеся означает, что клетки в обеих популяциях имеют различные статусы активации, но могут нести одинаковую вариантную нуклеиновую кислоту.

69. Способ согласно варианту 66, отличающийся тем, что селекцию контрольной популяции клеток осуществляют на основании второго функционального свойства, которое отлично от указанного по меньшей мере одного функционального свойства.

70. Способ согласно любому из вариантов 31 - 69, отличающийся тем, что указанная субпопуляция содержит множество клеток.

71. Способ согласно любому из вариантов 31 - 70, отличающийся тем, что выделение не включает выделение отдельных клонов из субпопуляции на основании по меньшей мере одного функционального свойства.

72. Способ согласно любому из вариантов 31 - 71, отличающийся тем, что указанная субпопуляция содержит по меньшей мере 1000 клеток.

73. Способ согласно любому из вариантов 31 - 72, отличающийся тем, что определение включает секвенирование отдельных представителей путем получения прочтений секвенирования по меньшей мере 600 п.о. непрерывного участка.

74. Способ согласно варианту 73, отличающийся тем, что длина прочтений секвенирования составляет от 600 п.о. до 15000 п.о.

75. Способ согласно любому из вариантов 31 - 74, отличающийся тем, что определение включает амплификацию по меньшей мере непрерывного участка отдельных представителей.

76. Способ согласно варианту 75, отличающийся тем, что амплификация включает применение праймера для амплификации, который гибридизуется с неизменной подпоследовательностью нуклеотидов, причем каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит неизменную подпоследовательность нуклеотидов, и при этом неизменная подпоследовательность нуклеотидов кодирует неизменную последовательность аминокислот одного или более полипептидов.

77. Способ согласно варианту 76, отличающийся тем, что один или более полипептидов содержат TCRα- и TCRβ-цепи, и при этом неизменная последовательность аминокислот содержит константную область TCRα.

78. Способ согласно варианту 76, отличающийся тем, что один или более полипептидов содержат TCRα- и TCRβ-цепи, и при этом неизменная последовательность аминокислот содержит константную область TCRβ.

79. Способ согласно любому из вариантов 31 - 78, отличающийся тем, что выделение включает применение опосредованного CRISPR/Cas9 направленного фрагментирования геномной ДНК из субпопуляции.

80. Способ согласно любому из вариантов 31 - 78, отличающийся тем, что определение включает получение среднего покрытия, составляющего по меньшей мере 10,

для каждой из последовательностей нуклеотидов непрерывного участка, до или в отсутствие какой-либо амплификации отдельных представителей.

81. Способ согласно любому из вариантов 31 - 80, отличающийся тем, что определение включает получение среднего покрытия, составляющего по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500 или по меньшей мере 1000, для каждой из последовательностей нуклеотидов непрерывного участка.

82. Способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит:

комбинацию

первой вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей вариантную последовательность аминокислот TCRα и определяющей первый конец непрерывного участка, и

второй вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей вариантную последовательность аминокислот TCRβ и определяющей второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу;

введение указанной библиотеки в популяцию иммортализованных Т-клеток, сконструированных для экспрессии TCRα- и TCRβ-цепей, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот;

селекцию субпопуляции из популяции иммортализованных Т-клеток на основании экспрессии маркера активации Т-клеток выше порогового уровня в ответ на приведение в контакт иммортализованных Т-клеток с иммортализованными В-клетками, экспрессирующими антиген, причем указанная субпопуляция содержит множество Т-клеток;

выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции;

определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и

идентификацию по меньшей мере одной комбинации первой и второй вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании обогащения подгруппы по меньшей мере одной комбинацией последовательностей нуклеотидов относительно контроля.

83. Способ согласно варианту 82, дополнительно включающий:

селекцию второй субпопуляции из популяции иммортализованных Т-клеток на основании экспрессии маркера активации Т-клеток ниже второго порогового уровня в ответ на приведение в контакт иммортализованных Т-клеток с иммортализованными В-клетками, причем вторая субпопуляция содержит второе множество Т-клеток, и при этом указанная субпопуляция и вторая субпопуляция являются неперекрывающимися;

выделение второй подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из второй субпопуляции; и

определение второй последовательности нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей второй подгруппы,

причем по меньшей мере одну комбинацию идентифицируют на основании обогащения подгруппы указанной по меньшей мере одной комбинацией относительно по меньшей мере одной комбинации во вторых последовательностях нуклеотидов второй подгруппы.

84. Способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей шарнирный домен, трансмембранный домен и/или внутриклеточный сигнальный домен химерного антигенного рецептора (CAR), из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот

содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит комбинацию двух или более из:

первой вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей шарнирный домен CAR;

второй вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей трансмембранный домен CAR; и

третьей вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей внутриклеточный сигнальный домен CAR,

причем одна из первой, второй или третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет первый конец непрерывного участка, и при этом другая одна из первой, второй или третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу;

введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии CAR, кодируемого представителем множества вариантных нуклеиновых кислот, причем популяция клеток включает популяцию иммортализованных Т-клеток или первичных Т-клеток человека;

селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании пролиферации клеток выше порогового уровня в ответ на приведение клеток в контакт с антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими антиген, специфичный к связывающему антиген домену CAR, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток;

выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции;

определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и

идентификацию по меньшей мере одной комбинации первой, второй и третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании обогащения подгруппы по меньшей мере одной комбинацией последовательностей нуклеотидов относительно контроля.

85. Способ согласно варианту 84, отличающийся тем, что присутствует более чем один внутриклеточный сигнальный домен CAR.

86. Способ согласно варианту 85, отличающийся тем, что присутствует по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена CAR.

87. Способ согласно варианту 84, отличающийся тем, что по меньшей мере два из перечисленных далее доменов представляют собой указанные по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена CAR: CD3ε, CD3ζ ITAM1, CD3ζ ITAM12, CD3ζ ITAM123, CD3ζ с любым ITAM из CD3δ, CD3ε и CD3γ, CD8α, CD28, ICOS, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD27 и CD2.

88. Способ согласно варианту 84, включающий:

селекцию второй субпопуляции из популяции клеток на основании пролиферации клеток ниже второго порогового уровня в ответ на приведение клеток в контакт с антигенпрезентирующими клетками, причем вторая субпопуляция содержит второе множество клеток, и при этом указанная субпопуляция и вторая субпопуляция являются неперекрывающимися;

выделение второй подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из второй субпопуляции;

определение второй последовательности нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей второй подгруппы, и

причем по меньшей мере одну комбинацию идентифицируют на основании обогащения подгруппы указанной по меньшей мере одной комбинацией относительно по меньшей мере одной комбинации во вторых последовательностях нуклеотидов второй подгруппы.

89. Способ идентификации последовательности нуклеотидов из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

предоставление комбинаторной библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о.;

введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот;

селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, зависящего от непрерывного участка из по меньшей мере 600 п.о., причем указанная субпопуляция содержит множество клеток;

выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции;

определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и

идентификацию непрерывного участка из по меньшей мере 600 п.о. на основании последовательностей нуклеотидов.

90. Способ согласно варианту 89, отличающийся тем, что вариабельность в непрерывном участке из по меньшей мере 600 п.о. распределена по всей длине 600 пар оснований.

91. Способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих пары цепей антигенспецифического Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ из библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

введение библиотеки в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, кодируемые представителем множества вариантных нуклеиновых кислот,

селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании экспрессии маркера выше порогового уровня в ответ на антиген, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток,

выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции,

определение последовательностей нуклеотидов вариантных нуклеиновых кислот, и

идентификацию по меньшей мере одной вариантной последовательности нуклеотидов на основании обогащения подгруппы указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля.

92. Способ согласно варианту 90, дополнительно включающий предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, кодирующих цепи TCR-альфа и TCR-бета.

93. Способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ из образца, включающий:

секвенирование цепей TCRα и TCRβ в образце,

выбор и комбинаторное образование пары последовательностей цепей TCRα и TCRβ для создания библиотеки пар TCRαβ,

введение указанной библиотеки пар TCRαβ в пул репортерных клеток,

стимулирование репортерных клеток, которые модифицированы библиотекой пар TCRαβ, антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген,

определение пар TCRαβ, специфических к по меньшей мере одному интересующему антигену, и

введение пар TCRαβ в клетки и селекцию клеток, содержащих пары TCRαβ.

94. Способ согласно варианту 14, дополнительно включающий этап введения Т-клеток, экспрессирующих последовательности антигенспецифического TCR, для диагностики или лечения инфекции или аутоиммунитета.

95. Способ согласно варианту 14, отличающийся тем, что Т-клетки могут быть аутологическими или аллогенными.

96. Способ согласно варианту 8, отличающийся тем, что маркер активации представляет собой CD69, и отличающийся тем, что выделяют две популяции клеток: одну популяцию клеток с высокой экспрессией CD69 и другую популяцию клеток с низкой экспрессией CD69.

97. Нуклеотидная библиотека, содержащая репертуар Т-клеточных рецепторов, полученных согласно любому одному из вариантов 1 - 30 и 95, 96.

98. Нуклеотидная конструкция, содержащая последовательность нуклеотидов, идентифицированную согласно любому одному из вариантов 1 - 96.

99. Клетка, содержащая нуклеотидную конструкцию согласно варианту 98.

100. Способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей пару цепей антигенспецифического Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из библиотеки нуклеиновых кислот, указанный способ включает:

введение библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, чтобы получить библиотеку клеток;

селекцию первой популяции клеток из библиотеки на основании экспрессии маркера выше первого порогового уровня в ответ на антиген; и

выделение первой популяции вариантных нуклеиновых кислот из первой популяции из библиотеки.

101. Способ согласно варианту 100, дополнительно включающий:

определение по меньшей мере одной последовательности нуклеотидов или идентичности нуклеиновых кислот из первой популяции вариантных нуклеиновых кислот; и

идентификацию по меньшей мере одной вариантной последовательности нуклеотидов на основании обогащения подгруппы указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля.

102. Способ согласно варианту 100 или 101, отличающийся тем, что пороговый уровень основан на по меньшей мере одном из:

a) получения процента от общего пула клеток на основании экспрессии маркера; или

b) получения минимального количества клеток из общего пула клеток; или

c) получения клеток, удерживаемых магнитом на основании связывания магнитного зонда с по меньшей мере одним маркером, экспрессированным в ответ на антиген.

103. Способ согласно варианту 66 - 69, 82, 84, 91 или 101, отличающийся тем, что контроль представляет собой вторую популяцию клеток, которая ниже второго порога.

104. Способ согласно варианту 66 - 69, 82, 84, 91 или 101, отличающийся тем, что контроль представляет собой одну или более из:

референсной популяции клеток,

комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, которую ввели в популяцию клеток,

популяции клеток, отсортированных из той же популяции клеток, что и первая популяция, на основании экспрессии маркера ниже второго порога,

по меньшей мере одной популяции клеток, полученной из совместных культур репортерных Т-клеток, экспрессирующих соответствующую библиотеку TCR, с антигенпрезентирующими клетками, такими как В-клетки, которые не презентируют никакие экзогенные антигены.

105. Способ согласно варианту 104, отличающийся тем, что контроль (или нижний образец) отсортировывают из той же популяции клеток, что и верхний образец, но у него наблюдается низкая экспрессия маркера активации, или отличающийся тем, что нижний образец получают из совместных культур репортерных Т-клеток, экспрессирующих соответствующую библиотеку TCR, и В-клеток, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии экзогенных антигенов.

106. Способ согласно любому из вариантов 100 - 105, дополнительно включающий добавление антигена в популяцию клеток.

107. Способ согласно любому из вариантов 100 - 106, отличающийся тем, что выделение первой популяции и/или контроля осуществляют с помощью по меньшей мере одного из способов: a) обогащения с помощью магнитных гранул, b) сортировки с помощью проточной цитометрии или c) обоих.

108. Способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей цепь Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из библиотеки нуклеиновых кислот, указанный способ включает:

введение библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, чтобы получить библиотеку клеток; и

определение по меньшей мере одной последовательности нуклеотидов или идентичности нуклеиновых кислот из первой популяции вариантных нуклеиновых кислот на основании обогащения подгруппы последовательностью нуклеотидов относительно контроля.

109. Способ согласно варианту 108, отличающийся тем, что указанную по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту выделяют из первой популяции клеток.

110. Способ согласно варианту 109, отличающийся тем, что первую популяцию клеток подвергают селекции на основании экспрессии маркера выше первого порогового уровня в ответ на антиген.

111. Способ идентификации последовательности нуклеотидов из библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

введение указанной библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, чтобы получить библиотеку клеток;

приведение в контакт библиотеки клеток с первой популяцией клеток;

селекцию субпопуляции из библиотеки клеток на основании экспрессии по меньшей мере одного маркера путем обогащения с помощью магнитных гранул; и

идентификацию по меньшей мере одной последовательности нуклеотидов на основании статистически значимого обогащения или обеднения субпопуляции указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля.

112. Способ согласно варианту 111, отличающийся тем, что по меньшей мере некоторые из субпопуляции клеток сконструированы для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем библиотеки нуклеиновых кислот.

113. Способ согласно варианту 111, отличающийся тем, что экспрессия маркера связана с введенной нуклеиновой кислотой из библиотеки, причем такая связь обозначает, что введенная нуклеиновая кислота изменяет экспрессию маркера.

114. Способ согласно варианту 111, отличающийся тем, что селекцию осуществляют на основании экспрессии маркера выше порогового уровня.

115. Способ согласно варианту 111, отличающийся тем, что селекцию осуществляют на основании экспрессии по меньшей мере двух маркеров выше порогового уровня.

116. Способ согласно любому из вариантов 8, 82, 91, 93 или 100, отличающийся тем, что идентификация, или стимуляция, или предоставление антигена включает одно или более из:

a) селекции множества антигенов;

b) создания пулов антигенов, в которых каждый антиген присутствует ровно в двух пулах антигенов;

c) оценки реактивности репортерных клеток, экспрессирующих по меньшей мере один Т-клеточный рецептор, против каждого из пулов антигенов; и

d) определения того, реактивен ли по меньшей мере один Т-клеточный рецептор по отношению к любому из прошедших селекцию антигенов, путем оценки реактивности против ровно двух пулов антигенов.

117. Способ согласно варианту 116, отличающийся тем, что реактивность против ровно двух пулов антигенов детектируют путем анализа попарного обогащения.

118. Способ согласно варианту 111, отличающийся тем, что библиотека представляет собой библиотеку TCR.

119. Способ согласно варианту 111, отличающийся тем, что используют маркер активации.

120. Способ согласно варианту 111, отличающийся тем, что используют сравнение верхних и нижних образцов, чтобы оценить реактивность.

121. Способ согласно любому из описанных выше вариантов, включающий оценку реактивности или дополнительно включающий оценку реактивности, при которой используют сравнение верхних и нижних образцов, чтобы оценить реактивность.

122. Способ согласно любому из описанных выше вариантов, включающий библиотеку, отличающийся тем, что последовательность нуклеотидов из множества вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке оптимизирована на основании по меньшей мере одного из следующего:

введения предпочтительно используемых клеткой-хозяином кодонов,

оптимизации структурной стабильности мРНК,

исключения повторяющихся последовательностей,

исключения длинных участков гомополимеров, и

исключения большого различия в локальном содержании GC в данной вариантной последовательности нуклеиновой кислоты.

123. Способ согласно варианту 91, отличающийся тем, что антиген презентируется посредством антигенпрезентирующей клетки.

124. Способ согласно варианту 91, отличающийся тем, что библиотека представляет собой комбинаторную библиотеку.

125. Способ согласно любому из описанных выше вариантов, отличающийся тем, что источником антигена является клетка.

126. Способ согласно любому из описанных выше вариантов, отличающийся тем, что процесс подразумевает высокую степень разнообразия и/или сложности антигенов.

127. Способ в соответствии с любым из описанных выше способов, включающий библиотеку, отличающийся тем, что библиотека представляет собой комбинаторную библиотеку.

128. Описанный выше способ, отличающийся тем, что комбинаторная библиотека представляет собой библиотеку TCR.

129. Совокупность клеток, указанная совокупность содержит:

группу из по меньшей мере двух Т-клеток, причем каждая сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета происходит из организма субъекта, причем Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR, и причем указанная группа сконструирована для активации одного или более маркеров активации Т-клеток; и

группу из по меньшей мере двух В-клеток, причем каждая из по меньшей мере двух В-клеток сконструирована для экспрессии по меньшей мере одного экзогенного неоантигена (или антигена), так что способны продуцироваться по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена), и причем по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена) одинаковы с присутствующими у субъекта.

130. Композиция согласно варианту 129, отличающаяся тем, что группа из по меньшей мере двух В-клеток содержит:

по меньшей мере первую В-клетку, которая продуцирует экзогенный неоантиген (или антиген); и

по меньшей мере вторую В-клетку, которая продуцирует второй экзогенный неоантиген (или антиген).

131. Библиотека экспрессирующих TCR клеток, указанная библиотека экспрессирующих TCR клеток содержит: группу из по меньшей мере трех Т-клеток,

в которой по меньшей мере две Т-клетки сконструированы для экспрессии по меньшей мере двух пар TCR-альфа и TCR-бета (по меньшей мере двух пар TCR),

в которой указанные по меньшей мере две пары TCR происходят из организма субъекта,

в которой по меньшей мере три Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR,

в которой указанные по меньшей мере три Т-клетки сконструированы для активации одного или более маркеров активации Т-клеток при связывании с антигеном (или неоантигеном), презентированным В-клеткой,

причем количество геномных копий каждой пары TCR, которое отражается количеством клеток с TCR, такое, что можно узнать количество всех TCR в образце, и

при этом по меньшей мере один из TCR не распределен равномерно по всей композиции, составляющей библиотеку.

132. Библиотека экспрессирующих TCR клеток согласно варианту 131, отличающаяся тем, что распределение по меньшей мере одной Т-клетки изменяется при связывании с антигеном, презентированным В-клеткой.

133. Библиотека экспрессирующих TCR клеток согласно варианту 131, отличающаяся тем, что по меньшей мере две пары TCR приблизительно равномерно присутствуют в библиотеке экспрессирующих TCR клеток.

134. Способ лечения субъекта, указанный способ включает:

идентификацию субъекта, имеющего опухоль;

предоставление группы из по меньшей мере двух Т-клеток, каждая из которых сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной отличной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета происходит из организма указанного субъекта,

предоставление группы из по меньшей мере двух В-клеток, причем указанная группа В-клеток сконструирована для экспрессии по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов, и причем по меньшей мере два экзогенных неоантигена одинаковы с неоантигенами, обнаруженными у субъекта;

объединение группы из по меньшей мере двух Т-клеток с группой из по меньшей мере двух В-клеток и селекцию комбинации из по меньшей мере двух пар TCR на основании активации по меньшей мере двух Т-клеток посредством по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов; и

введение комбинации из по меньшей мере двух пар TCR субъекту, тем самым осуществляя лечение опухоли.

135. Способ согласно варианту 134, отличающийся тем, что лечение уменьшает размер опухоли.

136. Способ лечения субъекта, указанный способ включает:

идентификацию субъекта, имеющего опухоль;

предоставление группы из по меньшей мере двух Т-клеток, каждая из которых сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной отличной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета происходит из организма указанного субъекта,

предоставление группы из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток, причем группа антигенпрезентирующих клеток происходит из организма субъекта, сконструирована для экспрессии по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов, и при этом по меньшей мере два экзогенных неоантигена одинаковы с неоантигенами, обнаруженными у субъекта;

объединение группы из по меньшей мере двух Т-клеток с группой из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток и селекцию комбинации из по меньшей мере двух пар TCR на основании активации по меньшей мере двух Т-клеток посредством по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов; и

введение комбинации из по меньшей мере двух пар TCR субъекту, тем самым осуществляя лечение опухоли.

137 Фармацевтическая композиция, содержащая:

первую пару TCR, которая связывается с первым антигеном (или неоантигеном) в опухоли субъекта; и

вторую пару TCR, которая связывается со вторым антигеном (или неоантигеном) в опухоли субъекта.

138. Фармацевтическая композиция согласно варианту 137, отличающаяся тем, что первая пара TCR рестриктирована по ГКГС I класса, и тем, что вторая пара TCR рестриктирована по ГКГС II класса.

139. Фармацевтическая композиция, содержащая:

первую пару TCR, которая связывается с первым антигеном и рестриктирована по ГКГС I класса; и

вторую пару TCR, которая связывается со вторым антигеном и рестриктирована по ГКГС II класса.

140. Фармацевтическая композиция согласно любому из вариантов 137 - 139, дополнительно содержащая третью пару TCR.

141. Фармацевтическая композиция согласно любому из вариантов 137 - 140, отличающаяся тем, что первая пара TCR связывается с неоантигеном из опухоли, тем, что вторая пара TCR связывается с неоантигеном из указанной опухоли, и тем, что как первая, так и вторая пары TCR присутствуют в организме хозяина опухоли.

142. Совокупность клеток, указанная совокупность содержит:

группу из по меньшей мере двух Т-клеток, причем каждая сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем указанная пара происходит из организма субъекта, в котором Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR, и причем указанная группа сконструирована для активации одного или более маркеров активации Т-клеток; и

группу из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток (АПК), в которой каждая из по меньшей мере двух АПК сконструирована для экспрессии по меньшей мере одного экзогенного неоантигена (или антигена), так что способны продуцироваться по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена), и при этом по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена) одинаковы с присутствующими у субъекта.

143 Способ в соответствии с любым из описанных выше способов, отличающийся тем, что пары TCR и/или Т-клетки, экспрессирующие пары TCR, выбирают путем селекции или идентифицируют по связыванию с антигеном (таким как неоантиген), причем антиген экспрессируется В-клеткой или антигенпрезентирующей клеткой.

144. Способ в соответствии с любым из описанных выше способов, отличающийся тем, что антиген или неоантиген происходит из опухоли из организма субъекта, и отличающийся тем, что каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета из пар TCR также происходит из организма субъекта.

145. Способ в соответствии с любым из описанных выше способов, отличающийся тем, что присутствует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500,

1000, 10000, 100000 или 1 миллион пар TCR (или клеток, содержащих данные пары), и присутствует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион антигенов.

Дополнительные варианты реализации.

[0444] Различные варианты реализации различных способов также представлены на ФИГ. 10A - 10J. В некоторых вариантах реализации на панелях на фигурах 10A - 10J показан способ и сама возможность выделения неоантигенреактивных TCR из опухолей способного к репарации ошибочного образования пары нуклеотидов колоректального рака (MMRp-КРР), в качестве примера других опухолей. У таких опухолей, как правило, низкая мутационная нагрузка. Существуют достаточные доказательства, чтобы полагать, что мутационная нагрузка значительно коррелирует с ответом на иммуноонкологические методы лечения, такие как ингибиторные методы лечения, направленные против контрольных точек PD1/PD-L1. Действительно, в группах MMRp-КРР, которые лечат ингибиторами иммунных контрольных точек, наблюдают слабые уровни ответа.

[0445] Аналогично методам лечения путем ингибирования иммунных контрольных точек, в основе методов лечения Т-клетками лежит распознавание опухолевых клеток иммунной системой. Учитывая низкую мутационную нагрузку при MMRp-КРР, будут ожидать обнаружение ограниченной реактивности Т-клеток против опухолевых неоантигенов. Неожиданно, обнаружили (что коротко описано ниже и продемонстрировано в Примере 13 ниже) TCR, которые распознают опухолевые неоантигены во всех четырех образцах из пациента с MMRp-КРР, которые подвергали скринингу, тем самым позволяя применение методов лечения на основе TCR Т-клеток у этой группы пациентов (у которой в противном случае были бы ограничены возможные методы лечения).

[0446] В некоторых вариантах реализации способ может включать один или более из этапов, кратко описанных ниже в виде процесса 10A - 10J (и на сопроводительных фигурах некоторых из указанных вариантов реализации). Любой из этапов при необходимости можно повторить или заменить на другие варианты реализации, предложенные в настоящей заявке. Также можно добавить дополнительные промежуточные этапы.

[0447] Этап 10A) Схематическое представление процесса скрининга. В некоторых вариантах реализации образцы из организма пациентов со способным к репарации ошибочного образования пары нуклеотидов колоректальным раком (например, MMRp-КРР) приводят в контакт с платформой идентификации TCR, начиная с получения генетической информации о стандартных нежизнеспособных биоптатах опухоли. Информацию, полученную в результате секвенирования всех TCR, получали из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ИОЛ) и применяли для сборки библиотеки комбинаторно соединенных в пары кассет экспрессии альфа- и бета-цепей. Их экспрессировали в репортерных Т-клетках Jurkat и подвергали скринингу против аутологических В-клеток, экспрессирующих опухолевые неоантигены в виде минигенов в формате последовательно расположенных минигенов (TMG). Путем получения активированных репортерных Т-клеток и выделения их TCR можно идентифицировать неоантигенреактивные TCR.

[0448] Этап 10B) Секвенирование всех TCR инфильтрирующих лимфоцитов в образце MMRp-КРР из человека. В некоторых вариантах реализации можно провести секвенирование всех TCR продукта из 10A. В некоторых вариантах реализации проводили секвенирование всех TCR образца опухоли MMRp-КРР человека pt1 в Milaboratory. После выравнивания и идентификации TCR, их объединяли в клонотипы на основании последовательности аминокислот CDR3 и идентичности у них V и J. Количество уникальных клонотипов представлено как для альфа-, так и для бета-цепей. Результаты представлены на диаграмме на ФИГ. 10B.

[0449] Этап 10C) Контроль качества библиотеки TCR. В некоторых вариантах реализации можно осуществить необязательную проверку для контроля качества. В некоторых вариантах реализации выбирали 100 наиболее часто встречающихся альфа- и бета-цепей из образца опухоли в 10A) и использовали для создания комбинаторной библиотеки. Библиотеку составляли в Twist Bioscience, применяя человеческие фрагменты V, CDR3 и J, тогда как константная (C) область была мышиного происхождения. Пару праймеров, фланкирующих вариабельные домены TCR-альфа- и бета-цепей, использовали для амплификации обеих цепей, и нанопоровое секвенирование применяли для определения идентичности обеих цепей. Показана представленность каждой из 10000

комбинаций альфа x бета. Результаты представлены на диаграмме на ФИГ. 10C, где плотность вероятности представлена на оси y.

[0450] Этап 10D) Экспрессия библиотеки в репортерных Т-клетках Jurkat. В некоторых вариантах реализации описанную выше библиотеку можно экспрессировать в репортерной Т-клетке, такой как Jurkat. Библиотекой из 10C) трансфицировали клетки Phoenix для продукции вируса, и полученный в результате этого вирусный супернатант применяли для ретровирусной трансдукции CD8+ TCR-KO репортерных Т-клеток Jurkat. Осуществляли селекцию клеток с применением бластицидина и исследовали положительность по экспрессии TCR, применяя антитело, направленное против мышиной константной области TCR-бета. Результаты представлены на диаграмме на ФИГ. 10D.

[0451] Этап 10E) Стратегия сортировки для скрининга. В некоторых вариантах реализации библиотеку можно сортировать с помощью любого способа. Репортерные Т-клетки Jurkat из 10D), совместно культивировали в течение 21 часа в соотношении 1:1 с В-клетками, экспрессирующими мутаном pt1 в виде множества последовательно расположенных минигенов (TMG). Клетки затем сортировали по активации Т-клеток с помощью FACS, используя маркер CD69. Стратегия сортировки включала (слева направо) последовательную установку дискриминационного окна для селекции лимфоцитов, установку дискриминационного окна для селекции отдельных клеток, установку дискриминационного окна для исключения $CD20^{+}$-клеток и установку двух дискриминационных окон сортировки (‘верхних’ и ‘нижних’ популяций), которые захватывают клетки, экспрессирующие высокие и низкие уровни CD69, соответственно. Результаты представлены на диаграмме на ФИГ. 10E.

[0452] Этап 10F) Получение кассет экспрессии TCR. В некоторых вариантах реализации можно получить соответствующие кассеты экспрессии TCR с помощью любой из различных методик. В некоторых вариантах реализации кассеты экспрессии TCR верхних и нижних образцов из 10E) (три повтора, и включая три контрольных скрининга совместной культуры репортерных Т-клеток Jurkat с В-клетками, которые не экспрессируют TMG) получали, применяя стратегию ПЦР, описанную в 10C), с последующей штрихкодирующей ПЦР. Также была включена контрольная ПЦР плазмидной библиотеки TCR. Продукты ПЦР анализировали с применением Agilent

TapeStation (слева). Продукты ПЦР объединяли в пул в соотношении 1:1 и анализировали на TapeStation (справа). Результаты представлены на ФИГ. 10F.

[0453] **Этап 10G) Скрининговый анализ.** В некоторых вариантах реализации пул продуктов ПЦР из этапа F можно проанализировать любым количеством способов. Например, пул продуктов ПЦР из 10F) использовали для получения библиотеки и секвенировали. Получали идентичности цепей TCR-альфа и -бета и определяли дифференциально экспрессированные комбинации TCR, применяя пакет DESeq2 R. Средние Rlog-преобразованные количества прочтений для скрининга в присутствии (ось x) и отсутствие (ось y) экспрессии TMG B-клетками представлены для образца опухоли pt1, описанного в 10B) — 10F), а также для трех дополнительных образцов MMRp-KPP (pt2, pt3 и pt4), обработанных идентичным способом. Лидирующие неоантигенреактивные TCR изображены в виде обведенных более крупных черных точек на ФИГ. 10G.

[0454] **Этап 10H) Деконволюция значимых TMG.** В некоторых вариантах реализации можно осуществить деконволюцию соответствующих TMG любым количеством способов. Например, осуществляли повторный скрининг (один повтор) неоантигенреактивных TCR, идентифицированных в 10G), применяя B-клетки, экспрессирующие одну конструкцию TMG. В качестве примера представлены демультиплексированные результаты скрининга для образца из pt1. Лидирующий TCR из pt1 распознает pt1-TMG1, но не pt1-TMG2. Результаты представлены на графике на ФИГ. 10H.

[0455] **Этап 10I) Идентификация лидирующего антигена TCR из pt1.** Лидирующий антиген TCR (например, pt1) можно идентифицировать любым количеством способов. Например, неоантиген, который распознается лидирующим TCR из pt1, идентифицировали путем нагрузки B-клеток пептидами отдельных минигенов, представленных в pt1-TMG1. В качестве положительного контроля использовали экспрессирующие pt1-TMG1 B-клетки. АПК совместно культивировали с репортерными T-клетками Jurkat, которые экспрессируют лидирующий реактивный по отношению к неоантигену pt1 TCR, идентифицированный в 10G). Активацию измеряли как положительность по CD69 по сравнению с положительным контролем (обработкой PMA/иономицином). Активация контрольным пептидом (PARVA-P70R), а также пептидом AKAP8L-R191W показана на ФИГ. 10I.

[0456] Этап 10J) Идентификация лидирующего антигена TCR из pt3. Лидирующий антиген TCR (например, из pt3) можно идентифицировать любым количеством способов. Например, неоантиген, который распознается лидирующим TCR из pt3, идентифицировали путем нагрузки B-клеток пептидами отдельных минигенов, представленных в pt3-TMG1. В качестве положительного контроля использовали экспрессирующие pt3-TMG1 B-клетки. АПК совместно культивировали с репортерными T-клетками Jurkat, которые экспрессируют лидирующий реактивный по отношению к неоантигену pt3 TCR, идентифицированный в 10G). Активацию измеряли как положительность по CD69 по сравнению с положительным контролем (обработкой PMA/иономицином). Показана активация контрольным пептидом (ETS1-R70W), а также пептидом TP53-R282W на ФИГ. 10J.

[0457] Этап 10K) Идентификация первого лидирующего антигена TCR из pt4. Первый лидирующий TCR антиген (например, из pt4) можно идентифицировать любым количеством способов. Например, неоантиген, который распознается первым лидирующим TCR из pt4, идентифицировали по экспрессии минигена (MG91, кодирующего HSPA9-p.K654RfsX42) в B-клетках. В качестве положительного контроля использовали экспрессирующие pt4-TMG3 B-клетки. АПК совместно культивировали с репортерными T-клетками Jurkat, которые экспрессируют первый лидирующий реактивный по отношению к неоантигену pt4 TCR, идентифицированный в 10G). Активацию измеряли как положительность по CD69 по сравнению с положительным контролем (обработкой PMA/иономицином). Активация контрольным образцом (B-клетками, которые не экспрессируют MG или TMG), а также образцами MG91/TMG3 представлена на ФИГ. 10K.

[0458] Этап 10L) Идентификация второго лидирующего антигена TCR из pt4. Второй лидирующий TCR антиген (например, из pt4) можно идентифицировать любым количеством способов. Например, неоантиген, который распознается вторым лидирующим TCR из pt4, идентифицировали по экспрессии минигена (MG132, кодирующего ITPR3-p.L2379M) в B-клетках. В качестве положительного контроля использовали экспрессирующие pt4-TMG4 B-клетки. АПК совместно культивировали с репортерными T-клетками Jurkat, которые экспрессируют второй лидирующий реактивный по отношению к неоантигену pt4 TCR, идентифицированный в 10G). Активацию измеряли как

положительность по CD69 по сравнению с положительным контролем (обработкой PMA/иономицином). Активация контрольным образцом (B-клетками, которые не экспрессируют MG или TMG), а также образцами MG132/TMG4 представлена на ФИГ. 10L.

[0459] Некоторые дополнительные варианты реализации изображены на фигурах 12A - 12C: Получение репертуаров TCR из меланомы для создания библиотек TCRαβ. На ФИГ. 12A изображено секвенирование всех TCR инфильтрирующих лимфоцитов в образцах меланомы человека. Проводили секвенирование всех TCR в двух образцах опухоли человека (pt5 и pt6) в Milaboratory (Москва, Россия). После выравнивания и идентификации TCR, их объединяли в клонотипы на основании последовательности аминокислот их CDR3 и идентичности их V и J. Количество уникальных клонотипов представлено как для альфа-, так и для бета-цепей для каждого образца опухоли. На ФИГ. 12B представлен контроль качества библиотек 100 x 100. Выбирали 100 наиболее часто встречающихся альфа- и бета-цепей для каждого образца из A) и использовали для создания комбинаторной библиотеки. Области TCR-бета и TCR-альфа в B) синтезировали и встраивали в ретровирусную конструкцию, представленную на ФИГ. 11B, в подходе комбинаторного клонирования, осуществленного в Twist Bioscience. Пару праймеров, фланкирующих вариабельные домены TCR-альфа- и бета-цепей, использовали для амплификации обеих цепей, и нанопоровое секвенирование применяли для определения идентичности обеих цепей. Показана представленность каждой из 10000 комбинаций альфа x бета для библиотеки из каждого пациента. На фигуре 12C) показаны характеристики представленности TCR в библиотеках из пациента**.** Для каждой библиотеки из пациента в 12B) представлен диапазон количеств прочтений на TCR, среднее покрытие и процент TCR, которые находятся в пределах диапазона медианы +/- ^{2}log-единица.

[0460] Некоторые дополнительные варианты реализации представлены на ФИГ. 13A - 13E (в качестве этапов для некоторых вариантов реализации). На Фигуре 13 (A - E) показано получение антигенспецифических TCR из библиотеки TCR, полученной путем искусственного смешивания плазмид. На этапе 13A) осуществляли получение библиотеки путем искусственного смешивания плазмид TCR. Библиотеку TCR получали путем искусственного смешивания плазмид. Шесть плазмид, каждая из которых экспрессирует один охарактеризованный TCR, смешивали с пулом из 11 плазмид, каждая из которых экспрессирует один неохарактеризованный TCR рака яичников (РЯ), и 13 плазмид, каждая

из которых экспрессирует один неохарактеризованный TCR колоректального рака (КРР). Из охарактеризованных TCR, плазмиды TCR CMV1 и CDK4-8 смешивали с данным пулом в молярном отношении 1:10000, и плазмиды TCR CMV2, CDK4-17, GCN1L1 и NY-ESO 1G4 смешивали с данным пулом в молярном отношении 1:100000. Частоты представлены на ФИГ. 13А. На этапе 13В) осуществляли экспрессию библиотеки в репортерных Т-клетках Jurkat. В некоторых вариантах реализации смесь TCR из этапа 13А) можно экспрессировать в репортерной Т-клетке, такой как Jurkat. Пулом плазмид TCR из этапа 13А) трансфицировали клетки Phoenix для продукции вируса, и полученный в результате этого вирусный супернатант применяли для ретровирусной трансдукции репортерных TCR-KO Т-клеток Jurkat. Осуществляли селекцию клеток, применяя пуромицин, и исследовали положительность по экспрессии TCR, применяя антитело, направленное против мышиной константной области TCR-бета. Результаты представлены на диаграмме на ФИГ. 13В. На этапе 13С) предложена стратегия сортировки для скрининга. В некоторых вариантах реализации библиотеку можно сортировать с помощью любого способа. Репортерные Т-клетки Jurkat из этапа 13В) совместно культивировали в течение 21 часа в соотношении 1:1 с В-клетками, экспрессирующими каждый из распознаваемых охарактеризованными TCR антигенов в виде множества последовательно расположенных минигенов (TMG). Клетки затем сортировали по активации Т-клеток с помощью FACS, используя маркер CD69. Стратегия сортировки включала (слева направо) последовательную установку дискриминационного окна для селекции лимфоцитов, установку дискриминационного окна для селекции отдельных клеток, установку дискриминационного окна для исключения $CD20^{+}$-клеток и установку двух дискриминационных окон сортировки (‘верхних’ и ‘нижних’ популяций), которые захватывают клетки, экспрессирующие высокие и низкие уровни CD69, соответственно. Результаты представлены на диаграмме на ФИГ. 13С.

[0461] На этапе 13D) представлена информация, касающаяся кассет экспрессии TCR. В некоторых вариантах реализации можно получить соответствующие кассеты экспрессии TCR с помощью любой из различных методик. В некоторых вариантах реализации получали кассеты экспрессии TCR верхних и нижних образцов из этапа 13С) (один повтор скрининга с В-клетками, экспрессирующими TMG, и один повтор скрининга с В-клетками, которые не экспрессируют экзогенные антигены), применяя стратегию ПЦР, описанную в 10С), с последующей штрихкодирующей ПЦР. Также была включена

контрольная ПЦР плазмидной библиотеки TCR. Продукты ПЦР после второго раунда ПЦР анализировали с применением Agilent TapeStation. Результаты представлены на ФИГ. 13D.

[0462] На этапе 13E) предложен анализ результатов скрининга. В некоторых вариантах реализации пул продуктов ПЦР из этапа 13D) можно проанализировать любым количеством способов. Например, пул продуктов ПЦР из 13D) использовали для получения библиотеки и секвенировали, применяя технологию Nanopore. Получали идентичности цепей TCR-альфа и -бета и идентифицировали дифференциально экспрессированные комбинации TCR-альфа x бета-цепей, применяя пакет DESeq2 R. Представлено log2-преобразованное отношение между нормированными количествами прочтений в верхнем образце и нижнем образце (ось y) в зависимости от измеренной частоты встречаемости TCR (ось x). Охарактеризованные (антигенспецифические) TCR представлены в сером цвете, тогда как неохарактеризованные (посторонние) TCR представлены в черном цвете на ФИГ. 13E.

[0463] Дополнительные варианты реализации представлены на ФИГ. 14, на которой показано получение антигенспецифических TCR из библиотеки TCR, полученной путем синтеза генов. На этапе 14A (ФИГ. 14A) предложена схема дизайна скрининга. Пять охарактеризованных TCR и 45 или 95 неохарактеризованных TCR из образцов рака яичников (РЯ) или колоректального рака (КРР) использовали для создания комбинаторных библиотек TCR дизайна 50 x 50 и 100 x 100, соответственно. Библиотеку составляли в Twist Bioscience, применяя человеческие фрагменты V, CDR3 и J, тогда как константная область I была мышиного происхождения. Указанную библиотеку использовали для ретровирусной трансдукции репортерных Т-клеток Jurkat. Поликлональные репортерные Т-клетки совместно культивировали с антигенпрезентирующими клетками (АПК), которые были сконструированы, чтобы презентировать антигены различными способами. АПК включали клетки JY, нагруженные пептидом, смесь линий клеток EBV-LCL, каждая из которых экспрессирует отличный миниген, клетки EBV-LCL, экспрессирующие TMG, и EBV-LCL, которые не подвергали генетической инженерии для презентации специфических антигенов.

[0464] На этапе 14B предложена стратегия сортировки для скрининга. Репортерные Т-клетки Jurkat, экспрессирующие библиотеку TCR дизайна 50 x 50, полученные, как описано в 14A), совместно культивировали в течение 21 часа при

соотношении 1:1 с АПК, упомянутыми в 14A). Клетки затем сортировали по активации Т-клеток с помощью FACS, используя маркер CD69. В некоторых вариантах реализации библиотеку можно сортировать с помощью любого способа. Стратегия сортировки включала (слева направо) последовательную установку дискриминационного окна для селекции лимфоцитов, установку дискриминационного окна для селекции отдельных клеток, установку дискриминационного окна для селекции живых клеток, установку дискриминационного окна для исключения $CD20^{+}$-клеток и установку двух дискриминационных окон сортировки (‘верхних’ и ‘нижних’ популяций), которые захватывают клетки, экспрессирующие высокие и низкие уровни CD69, соответственно. Результаты представлены на диаграмме на ФИГ. 14B.

[0465] На этапе 14C (ФИГ. 14C) показано получение кассет экспрессии TCR. В некоторых вариантах реализации можно получить соответствующие кассеты экспрессии TCR с помощью любой из различных методик. В некоторых вариантах реализации кассеты экспрессии TCR верхних и нижних образцов из ФИГ. 14B) получали, применяя стратегию ПЦР, описанную в 10C), с последующей штрихкодирующей ПЦР. Также была включена контрольная ПЦР плазмидной библиотеки TCR. Продукты ПЦР после второго раунда ПЦР анализировали с применением Agilent TapeStation. Результаты представлены на ФИГ. 14C.

[0466] На этапе 14D) показан анализ результатов скрининга 50 x 50. В некоторых вариантах реализации пул продуктов ПЦР из этапа 14C) можно проанализировать любым количеством способов. Например, пул продуктов ПЦР из 14C) использовали для получения библиотеки и секвенировали, применяя технологию Nanopore. Получали идентичности цепей TCR-альфа и -бета, и кратность изменения представленности TCR между верхними и нижними образцами (ось y) представили в виде функции средней представленности TCR (ось x) для каждого TCR.

[0467] На этапе 14E) показаны характеристики верхних 10 наиболее значительно обогащенных TCR. Дифференциально представленные комбинации TCR-альфа x бета-цепей по результатам в 14D) идентифицировали, применяя пакет DESeq2 R. Анализ дифференциальной представленности известен квалифицированному специалисту и основан на линейной модели, предполагающей, что обогащенный TCR определен как обогащенный в ‘верхнем’ образце, где были презентированы антигены, и обедненный в ‘нижнем’ образце, где не были презентированы антигены, по сравнению как с ‘верхним’,

так и с ‘нижним’ образцами, где не были презентированы антигены. Альфа- и бета-цепи верхних 10 наиболее значительных выявленных TCR, а также их представленность, их log2-преобразованная кратность изменения и значимость дифференциальной представленности сведены в таблицу на ФИГ. 14E.

[0468] На этапе 14F) показан анализ результатов скрининга 100 x 100. Осуществляли скрининг библиотеки 100 x 100 аналогично скринингу библиотеки 50 x 50, описанному в 14)—) - 14E). После идентификации TCR-альфа- и бета-цепей определяли дифференциально экспрессированные комбинации TCR, применяя пакет DESeq2 R. Анализ дифференциальной представленности известен квалифицированному специалисту. Средние Rlog-преобразованные количества прочтений для скрининга библиотеки 100 x 100 в присутствии (ось x) и отсутствие (ось y) экспрессии TMG B-клетками представлен на ФИГ. 14F. 5 добавленных охарактеризованных TCR изображены в виде обведенных более крупных черных точек.

[0469] На этапе 14G показано упорядочивание по рангу охарактеризованных TCR. Порядок ранжирования значимости обогащения всеми комбинациями TCR, представленными в библиотеке 100 x 100, где статистическую обработку проводили, как описано в 14E). Статистику Вальда рассчитывали, применяя пакет DESeq2 R, и представили в виде упорядоченного графика в порядке уменьшения статистики Вальда (вероятностная мера; ось y). Добавленные охарактеризованные TCR представлены в оттенках серого цвета. Вставка: увеличение верхних 20 наиболее статистически значимо обогащенных TCR.

[0470] На Фигурах 15A - 15D изображены некоторые варианты реализации создания репертуара TCR с применением синтеза генов. На этапе 15A) (ФИГ. 15A) представлено схематическое изображение библиотеки TCR. Ретровирусную конструкцию, содержащую как бета-, так и альфа-цепи TCR, а также маркер селекции пуромицином, использовали в качестве каркаса для создания библиотеки. Вариабельные области либо альфа-, либо бета-цепей TCR (V-CDR3-J) синтезировали в виде пула по 100 олигонуклеотидных пулов каждая. Затем пулы альфа- и бета-цепей использовали в реакции комбинаторного клонирования с получением библиотеки с совокупной сложностью, составляющей 10000. Как синтез цепей TCR, так и комбинаторное клонирование проводили в Twist Bioscience (Сан-Франциско, США). Ретровирусная трансдукция с применением данной конструкции в конечном счете приводила к экспрессии единого транскрипта, что

приводило к трансляции бета- и альфа-цепей TCR, а также маркера устойчивости puro, благодаря расщеплению пептида в сайтах 2A.

[0471] На этапе 15B) представлен контроль качества комбинаторной библиотеки TCR 100 альфа- и 100 бета-цепей. Пару праймеров, фланкирующих вариабельные домены TCR-альфа- и бета-цепей, использовали для амплификации обеих цепей, и нанопоровое секвенирование применяли для определения идентичности обеих цепей. Показана представленность каждой из 100 альфа-цепей (левый график), 100 бета-цепей (средний график) или комбинаций 10000 альфа x бета.

[0472] На этапе 15C) представлено создание библиотеки большей сложности из множества библиотек меньшей сложности. На схеме представлена идея создания более сложной библиотеки из множества библиотек меньшей сложности. В некоторых вариантах реализации библиотеки меньшей сложности не содержат никакие возможные перекрывающиеся комбинации альфа- и бета-цепей. В некоторых других вариантах реализации библиотеки меньшей сложности содержат возможную перекрывающуюся комбинацию альфа- и бета-цепей. В данном примере комбинаторную библиотеку из 200 альфа- и 200 бета-цепей (библиотека 200 x 200) создают путем смешивания четырех библиотек 100 x 100 в эквимолярных соотношениях. В данном примере указанные четыре подбиблиотеки получают в виде комбинаторных библиотек из i) TCR-альфа номер 1-100 и TCR-бета номер 1-100; ii) TCR-альфа номер 101-200 и TCR-бета номер 1-100; iii) TCR-альфа номер 1-100 и TCR-бета номер 101-200; и iv) TCR-альфа номер 101-200 и TCR-бета номер 101-200. В некоторых вариантах реализации сложность библиотеки может изменяться от 50x50 до 2000x2000.

[0473] Этап 15D) (изображенный на ФИГ. 15D). Уменьшение библиотеки TCR благодаря дизайну на основе информации об образовании пары или о вероятности образования пары. На данной схеме представлена идея уменьшения сложности библиотеки TCR без оказания влияния или с оказанием ограниченного влияния на количество антигенспецифических пар цепей TCR, присутствующих в библиотеке. В качестве примера, сложность 10000 библиотеки 100 x 100 можно уменьшить путем эквимолярного смешивания 10 комбинаторных подбиблиотек дизайна 10 x 10. Это приведет к 10-кратному уменьшению сложности библиотеки TCR. Информацию об образовании пар TCR-альфа- и бета-цепей или информацию о вероятности образования пар между альфа- и бета-цепями

можно включить в дизайн данной библиотеки таким образом, что все альфа- и бета-цепи из идентифицированных в эксперименте или иным образом известных пар TCR-альфа-бета, или вероятных пар, представлены внутри одной комбинаторной подбиблиотеки. В некоторых вариантах реализации данный принцип можно применять по отношению к смешанным библиотекам более высокой или более низкой сложности. В некоторых вариантах реализации сложность комбинаторных подбиблиотек может быть выше или ниже. В некоторых вариантах реализации комбинаторные подбиблиотеки могут содержать перекрывающиеся комбинации цепей TCR. В некоторых вариантах реализации смешанная библиотека может быть в диапазоне 100 (10 x 10) – 90000 (300 x 300). В некоторых вариантах реализации диапазон размеров подбиблиотек может составлять 1 (1 x 1) – 100 (50 x 50).

[0474] Дополнительные варианты реализации показаны на фигурах 16A - 16E, на которых представлены условия совместного культивирования, используемые для идентификации пар TCR-альфа/бета из репертуара TCR.

[0475] На ФИГ. 16A) изображены результаты использования CD69 в качестве селективного маркера активированных клеток Jurkat. Клетки Jurkat, экспрессирующие hCD8, трансдуцировали TCR CMV#1 с эффективностью трансдукции 21%. Клетки JY стимулировали различными количествами пептида CMV_{pp65} (диапазон 0 – 10 мкг/мл, как указано) или 1 мкг/мл постороннего пептида MART-1 (IRR) в течение 1 часа при 37^0C. Через 1 час клетки промывали и $1x10^5$ клеток совместно культивировали с $1x10^5$ трансдуцированных клеток Jurkat/лунку в 96-луночном планшете с U-образным дном лунок при 37^0C в течение 20 часов. Клетки собирали, окрашивали антителом против CD69 человека (клон: FN50) и анализировали с помощью FACS.

[0476] На ФИГ. 16B) изображена фоновая экспрессия CD69 в зависимости от плотности посева. Клетки Jurkat, экспрессирующие hCD8 и TCR CMV#1, культивировали в течение 2 дней при различных плотностях ($0,25x10^6$/мл, $0,5x10^6$/мл и $1x10^6$/мл). Клетки собирали, окрашивали антителом против CD69 человека (клон: FN50) и анализировали с помощью FACS.

[0477] На ФИГ. 16C изображена экспрессия CD69 активированных клеток Jurkat в различных культуральных сосудах и при различных соотношениях эффектора и мишени. Клетки Jurkat, экспрессирующие hCD8 и библиотеку TCR (комбинаторную библиотеку 4x4,

состоящую из альфа- и бета-цепей 4 охарактеризованных антигенспецифических TCR) совместно культивировали с B-клетками-мишенями, экспрессирующими распознаваемые минигены (TMG2.1), при сохранении $2,5x10^5$ эффекторных клеток на 0,32 $см^2$ площади культуры. Клетки культивировали в 96-луночном планшете с U-образным дном лунок, используя соотношение эффектора к клеткам-мишеням 1:1 или 1:2. В качестве альтернативы, клетки культивировали в культуральном флаконе T25 при 1/3 или 1/2 от общего количества клеток, которые в противном случае использовали бы для данной площади поверхности, при этом сохраняя соотношение 1:1 эффекторных клеток к клеткам-мишеням. Кроме того, клетки культивировали в культуральном флаконе T75 при соотношениях эффекторных клеток к клеткам-мишеням 1:2 и 3:1. После 20 часов инкубации клетки собирали, окрашивали антителом против CD69 человека (клон: FN50) и анализировали с помощью FACS.

[0478] На ФИГ. 16D изображена экспрессия CD69 при различной плотности совместной культуры. Клетки Jurkat, экспрессирующие hCD8 и TCR CDK4-17 или CDK4-8, совместно культивировали в 96-луночном планшете с U-образным дном лунок в соотношении 1:1 с клетками JY, стимулированными указанным количеством пептида $CDK4_{23-32(24L)}$ или посторонним пептидом $MART\text{-}1_{26-35(27L)}$. Плотность посева эффекторных клеток составляла либо $125x10^3$, либо $250x10^3$, либо $500x10^3$ на лунку. Через 20 ч клетки собирали, окрашивали антителом против CD69 человека (клон: FN50) и анализировали с помощью FACS.

[0479] На ФИГ. 16E изображено применение CD69 в качестве маркера активации T-клеток при генетическом скрининге, чтобы определить реактивные TCR. Пул клеток Jurkat hCD8+, экспрессирующих TCR с неизвестной специфичностью при равных соотношениях смешивали с hCD8+ клетками Jurkat, экспрессирующими любой из TCR CDK4-17, CDK4-8, CMV#1, CMV#2 или GCN1L1 при указанных частотах встречаемости. Эту смесь клеток совместно культивировали с целевыми B-клетками, экспрессирующими все распознаваемые минигены. Через 20 часов клетки собирали, окрашивали антителом против CD69 человека (клон: FN50) и сортировали на ‘верхнюю’ и ‘нижнюю’ популяции клеток, экспрессирующие высокие и низкие уровни CD69, соответственно. Каждый из данных образцов содержал приблизительно 10% от общего количества сортированных клеток. Геномную ДНК получали из данных клеток, и вариабельные домены TCRB

амплифицировали с помощью ПЦР. Образцы подвергали секвенированию Illumina, и полученные в результате этого прочтения картировали на референсную последовательность TCRB. Кратность обогащения рассчитывали как нормированное количество прочтений в верхнем образце относительно нижнего образца.

[0480] Дополнительные варианты реализации показаны на фигурах 17 – 27.

[0481] На ФИГ. 17 и ФИГ. 27 описано применение CD69 для детектирования активированных антигеном Т-клеток. Информация о паттернах экспрессии CD69 позволяет детектирование и селекцию активированных Т-клеток при скрининге библиотеки Т-клеточного рецептора (TCR).

[0482] На ФИГ. 18, ФИГ. 25a и 25b и ФИГ. 26 описано применение бластицидина для селекции репортерных Т-клеток Jurkat, трансдуцированных генами TCR, тем самым обеспечивая эффективную селекцию репортерных Т-клеток после введения библиотек TCR.

[0483] На ФИГ. 19 описана стимуляция репортерных Т-клеток Jurkat в мешках для культур клеток, позволяющих стимуляцию больших количеств репортерных Т-клеток, трансдуцированных библиотеками TCR, в процессе скрининга библиотек TCR. Применение большого количества клеток может повысить чувствительность скрининга библиотеки TCR путем сохранения достаточного покрытия.

[0484] На ФИГ. 20 описан динамический анализ экспрессии CD69, CD25 и CD62L на репортерных Т-клетках Jurkat, трансдуцированных различными TCR. Понимание динамики экспрессии маркеров экспрессии позволяет селекцию отдельных (или множества) маркеров активации, чтобы специфически детектировать активированные антигеном Т-клетки и провести двухэтапные процедуры селекции, например, путем обогащения с помощью магнитных гранул.

[0485] На ФИГ. 21 - ФИГ. 24 описано применение различных систем репортеров NFAT для детектирования активированных антигеном Т-клеток, дающее понимание, что разработка кассет репортерных генов NFAT, тип доставки и сайт их вставки в геном контролирует функциональные свойства и уровень антиген-независимой фоновой экспрессии репортерного гена. Результаты демонстрируют, что различные векторы вирусной доставки, клональные популяции репортерных Т-клеток, различные репортерные

Т-клетки или различные репортерные системы могут приводить к более оптимальной функции репортера.

[0486] В некоторых вариантах реализации способ может включать этапы (1) - (7), описанные ниже (и на ФИГ. 31). Этап (1) получения образца. Образец может представлять собой ткани, кровь или биологические жидкости из пациента, страдающего инфекционными заболеваниями, аутоиммунными заболеваниями или раком. Образец может быть жизнеспособным или нежизнеспособным. Этап (2) Секвенирование цепей TCRα и TCRβ в образце. Этап (3) Выбор и комбинаторное образование пары последовательностей цепей TCRα и TCRβ для создания библиотеки пар TCRαβ. Этап (4) Введение указанной библиотеки пар TCRαβ в пул репортерных клеток, например, репортерных Т-клеток Jurkat. Этап (5) Стимулирование репортерных клеток, которые модифицированы библиотекой пар TCRαβ, антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген. Указанный по меньшей мере один интересующий антиген может быть аутологическим или аллогенным. Этап (6) Определение пар TCRαβ, специфических к по меньшей мере одному интересующему антигену. Этап (7) Введение пар TCRαβ в клетки и селекция клеток, содержащих пары TCRαβ.

[0487] В некоторых вариантах реализации способ может включать один или более из этапов (1) - (7), описанных выше. Любой из этапов можно опустить, повторить или заменить на другие варианты реализации, предложенные в настоящей заявке, в случае необходимости. Также можно добавить дополнительные промежуточные этапы. Например, некоторые варианты реализации включают этапы (2) и (3). Другие варианты реализации включают этапы (5) и (6). Еще другие включают этап (7). Некоторые варианты реализации включают этапы (1) - (7), и дополнительно включают введение клеток, содержащих пары TCRαβ, пациентам для лечения. В некоторых вариантах реализации антигенпрезентирующие клетки можно получить путем введения библиотеки неоантигенов в В-клетки. Библиотека неоантигенов может быть аутологической или аллогенной. В некоторых вариантах реализации предложено создание репертуаров TCR путем выбора подгрупп цепей TCR. В некоторых вариантах реализации предложена В-клетка, содержащая любой неоантиген из библиотеки неоантигенов. В некоторых вариантах реализации предложено применение генетического скрининга на основании

обогащения/обеднения. В некоторых вариантах реализации предложено осуществление генетического скрининга с ампликонами большого размера. В некоторых вариантах реализации предложен способ детектирования модифицированных TCR Т-клеток. В некоторых вариантах реализации объединены любой один или более из описанных выше вариантов реализации.

[0488] В некоторых вариантах реализации предложена нуклеотидная библиотека, которая содержит репертуар Т-клеточных рецепторов, полученных в соответствии с любым из описанных выше вариантов реализации.

[0489] В некоторых вариантах реализации предложена нуклеотидная конструкция, содержащая последовательность нуклеотидов, идентифицированную в соответствии с любым из описанных выше вариантов реализации. В некоторых вариантах реализации клетка содержит нуклеотидную конструкцию, описанную в данной заявке.

[0490] Некоторые варианты реализации представлены на ФИГ. 28. В некоторых вариантах реализации идентификацию специфических к неоантигену TCR осуществляют путем применения подхода генетического скрининга, который масштабируется и является минимально инвазивным. Небольшое количество нежизнеспособной архивной опухолевой ткани используют в качестве источника внутриопухолевых последовательностей TCR вместо ИОЛ. Затем используют ретровирусный перенос генов, чтобы ввести идентифицированную библиотеку внутриопухолевых TCR в иммортализованную линию Т-лимфоцитов, названную линией репортерных Т-клеток Jurkat. Осуществляют обогащение экспрессирующими библиотеку TCR клетками Jurkat (эффекторными клетками, сокращенно Э) и последующий скрининг их реактивности против экспрессирующих мутаном полученных из пациента АПК (клеток-мишеней, сокращенно М). Путем сортировки методом проточной цитометрии, осуществляли селекцию клеток Jurkat на основании экспрессии ими раннего маркера активации Т-клеток CD69 (в качестве примера), который вовлечен в пролиферацию клеток и последующую передачу сигналов[32]. В некоторых вариантах реализации образцы можно разделить на основании любого другого маркера активации, включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD25, CD62L, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF, репортерные маркеры на основе синтетического промотора или маркеры пролиферации. На последнем этапе идентифицировали специфические к неоантигену TCR с помощью секвенирования нового поколения. Современная платформа

для выделения TCR позволяет скрининг библиотеки из 10000 TCR. Для того чтобы иметь возможность идентифицировать специфический(-е) к неоантигену TCR из такой библиотеки с высокой чувствительностью и гарантировать, что TCR не утратятся в процессе различных этапов обработки, каждый уникальный TCR должен быть представлен множество раз в процессе скрининга, чтобы сохранить покрытие TCR. Следовательно, необходимо провести скрининг большого количества трансдуцированных TCR клеток Jurkat и АПК[33].

[0491] После трансдукции ретровирусной библиотекой TCR клеток Jurkat TCR KO, целесообразно провести эффективную и высокопроизводительную процедуру селекции, чтобы добиться успешного обогащения трансдуцированными TCR клетками Jurkat (>80% mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток), не вызывая токсичности и не утрачивая покрытия TCR. В некоторых вариантах реализации для совместного культивирования АПК-Jurkat можно применять 96-луночные планшеты со скругленным дном лунок. В некоторых вариантах реализации для совместного культивирования АПК-Jurkat можно применять мешки GMP. В некоторых вариантах реализации совместное культивирование можно осуществить в замкнутой системе. В некоторых вариантах реализации совместное культивирование 168x10^6 клеток Jurkat и АПК можно провести в мешке GMP. В некоторых вариантах реализации совместное культивирование может длиться 16, 20, 24, 48 или 32 часа. В некоторых вариантах реализации можно осуществить считывание CD69, CD25 или CD62L. В некоторых вариантах реализации можно осуществить считывание комбинации CD69 и CD25. В некоторых вариантах реализации можно осуществить считывание комбинации CD69 и CD62L. В некоторых вариантах реализации предложена селекция CD25$^+$ CD62L$^-$ клеток Jurkat в комбинации с CD69. В некоторых вариантах реализации можно использовать мешок GMP.

[0492] Селекция антибиотиком является привлекательной стратегией для обогащения трансдуцированными TCR Т-клетками Jurkat. В некоторых вариантах реализации можно применять селекцию бластицидином. Некоторые варианты реализации представлены на ФИГ. 30. В некоторых вариантах реализации на 4 день селекции клетки пересевали при исходной плотности в среду с добавлением или без соответствующей концентрации бластицидина. В некоторых вариантах реализации концентрация бластицидина составляла 4 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации селекцию

проводили в течение 7 дней при исходной плотности клеток 0,25 x 10^6 клеток/мл, концентрации бластицидина на уровне 4 мкг/мл и удалении антибиотика на 4 день. В некоторых вариантах реализации посев можно осуществить при концентрации 0,5 е6/мл клеток, добавить 6 мкг/мл бластицидина и пересеять клетки при концентрации 0,5 е6/мл на 4 день без добавления бластицидина.

[0493] В некоторых вариантах реализации репортерные системы могут представлять собой сигнальные пути AP-1 или NFkB.

[0494] Некоторые варианты реализации представлены на ФИГ. 29. В некоторых вариантах реализации одной целью являлось увеличение количества TCR в библиотеке, чтобы позволить скрининг с высокой чувствительностью более чем 10000 TCR. Это подчеркивает необходимость увеличения масштабируемости платформы для обнаружения TCR путем оптимизации различных этапов процесса, чтобы позволить более эффективную обработку большого количества клеток, при этом все еще сохранив покрытие TCR. В некоторых вариантах реализации использовали четыре известных HLA-A*02:01-рестриктированных TCR: клон 8 и 17 TCR CDK4 (сокращенно CDK4-8 и 17) и Клон 1 и 2 TCR CMV (сокращенно CMV-1 и 2). Два CDK4 TCR специфичны к мутированному пептиду циклин-зависимой киназы 4 ($CDK4_{R24C}$). Этот эпитоп образовавшегося в результате мутации неоантигена обнаружили у многих пациентов с меланомой[34]. Более того, указанные два TCR CMV нацелены на пептид, кодируемый компонентом цитомегаловируса человека (CMV) - pp65[35]. Для обоих эпитопов CDK4 и CMV использовали два различных клона TCR с потенциально различными аффинностями в исследованиях. Это позволяет оценить роль аффинности TCR к распознаваемому пептиду в процессе скрининга.

Дополнительные варианты реализации: результаты в Примере 19.

[0495] Генотерапия TCR включает конструирование аутологических Т-клеток для экспрессии TCR с желательной специфичностью против раковых антигенов. Один класс раковых антигенов представляет собой неоантигены, возникшие в результате несинонимичной соматической мутации, которые экспрессируются исключительно на злокачественных клетках и, следовательно, являются привлекательной мишенью для генотерапии TCR. Тем не менее, большинство неоантигенов уникальны для данной опухоли пациента, и нацеливание на них делает необходимым персонализированный

подход. Для того чтобы преодолеть данную проблему, предложена полностью персонализированная специфическая к неоантигену генотерапия TCR путем применения подхода генетического скрининга для идентификации таких TCR из библиотеки генов TCR пациента, выделенных из биоптата опухоли. Современная платформа для выделения TCR позволяет скрининг 10000 TCR, который включает обработку большого количества трансдуцированных библиотекой TCR репортерных Т-клеток Jurkat и экспрессирующих неоантиген антигенпрезентирующих клеток (АПК), чтобы максимизировать чувствительность скрининга. Тем не менее, обработка большого количества клеток может влиять на масштабируемость платформы. Следовательно, целью данного исследования является повышение масштабируемости платформы для скрининга, при сохранении ее чувствительности, путем изучения альтернативных способов обработки большого количества клеток. Во-первых, было показано, что селекция бластицидином приводит к эффективному и минимально токсичному обогащению экспрессирующими TCR клетками Jurkat. Затем, увеличение масштаба совместных культур клеток Jurkat-АПК с обычного формата 96-луночного планшета до более высокопроизводительной схемы с использованием мешка MACS GMP Cell Differentiation Bag приводило к сопоставимой активации клеток Jurkat. Более того, исследовали различные способы замены сортировки методом проточной цитометрии, которую на сегодняшний день применяют в процессе скрининга, на более масштабируемую селекцию на основе гранул. Следовательно, дополнительно к CD69, исследовали профили экспрессии двух дополнительных маркеров активации Т-клеток CD25 и CD62L, и обнаружили, что они являются потенциально подходящими кандидатами для двухэтапного обогащения на основе гранул в комбинации с CD69. Кроме того, оценивали репортерную систему на основе NFAT (семейство ядерных факторов активированных Т-клеток), которая позволит обойти использование сортировки методом проточной цитометрии путем применения репортерного гена, такого как кассета устойчивости к антибиотику или маркер поверхности клетки, подходящего для селекции на основе гранул. Тем не менее, для NFAT-репортерной системы выявили высокий уровень фонового сигнала.

[0496] В микроокружении опухоли цитотоксические Т-лимфоциты ($CD8^+$ Т-клетки) преимущественно отвечают за регрессию опухоли[1]. Т-клетки экспрессируют уникальные Т-клеточные рецепторы (TCR), которые представляют собой гетеродимеры,

состоящие из α- и β-цепей. Каждая α- и β-цепь состоит из константной и вариабельной области[2]. Вариабельные области придают данной Т-клетке специфичность и аффинность к распознаваемому пептиду, презентированному антигенпрезентирующей клеткой (АПК) на ее главном комплексе гистосовместимости (ГКГС). Молекулы ГКГС у людей также называют антигенами лейкоцитов человека (HLA)[2,3]. CD8/CD4 и CD28 являются примерами корецепторов Т-клеток, которые стабилизируют комплекс TCR-HLA и вместе с CD3ζ вызывают последующую передачу сигналов, включающую фосфорилирование тирозина белков и высвобождение цитоплазматического кальция. Эта последующая передача сигналов вызывает перемещение в ядро факторов транскрипции NFAT (семейство ядерных факторов активированных Т-клеток), AP-1 и NF-κB и последующую транскрипцию генов, специфичных для активации Т-клеток[4,5]. Активированные $CD8^+$ Т-клетки способны убивать клетки-мишени, экспрессирующие вирусные, бактериальные или раковые антигены, путем продуцирования различных воспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-2 (IL-2), IFN-γ и TNF-α. Секретированный IL-2 связывается с рецептором IL-2 на Т-клетках, приводя к петле положительной обратной связи путем стимуляции продукции больших количеств IL-2 и повышения пролиферации Т-клеток[5,6].

[0497] На сегодняшний день было показано, что иммунотерапия рака является наиболее эффективным способом лечения распространенных опухолей. Во множестве подходов иммунотерапии используют способность цитотоксических Т-клеток к киллингу[7,8]. Одним примером является блокирование молекул иммунных контрольных точек CTLA-4 и PD-1, которые подавляют цитотоксическую активность $CD8^+$ Т-клеток в микроокружении опухоли[9,10]. Блокирование контрольных точек является масштабируемой обычно применяемой терапией, которая наиболее эффективна при раках с высоким уровнем несинонимичных мутаций[11], таких как меланома[12,13] и немелкоклеточный рак легких (НМРЛ)[14,15]. Более того, для адоптивного переноса клеток аутологических инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ИОЛ), размноженных *in vitro* и снабженных IL-2, продемонстрировали лечебный потенциал при меланоме[16,17] и раке шейки матки[18,19]. Тем не менее, опухолевые антигенспецифические ИОЛ часто представляют собой окончательно дифференцированные Т-клетки и могут жить короткое время и утрачиваться в процессе размножения *in vitro*[7,20].

[0498] Ни в одном из приведенных выше способов иммунотерапии не идентифицируют опухолевые антигенреактивные TCR, вовлеченные в регрессию опухоли. Детектирование таких TCR полезно для генетической инженерии Т-клеток с внедрением TCR против опухолевых антигенов. Такую терапию называют генотерапией TCR, и она обеспечивает преимущество над другими иммунотерапевтическими стратегиями, поскольку она позволяет получить множество 'приспособленных' Т-клеток с желательной специфичностью к антигену[21]. Опухолевые антигены могут представлять собой несобственные антигены или собственные антигены[7,21]. Собственные антигены были основной целью испытаний вакцины от рака, но, возможно, вследствие центральной толерантности по отношению к собственным антигенам эти испытания оказались неэффективными[22]. Тем не менее, некоторые испытания генотерапии TCR, нацеленные на аберрантно экспрессированные собственные антигены, показали клиническую эффективность. Например, для нацеливания на зародышевый эпитоп рака NY-ESO-1 у пациентов с саркомой синовиальных клеток и меланомой выявили лечебный потенциал[23]. Тем не менее, нацеливание на связанные с опухолью собственные антигены также часто приводит к тяжелой специфической токсичности[24,25], что подразумевает потребность в иммунотерапевтических средствах для нацеливания на несобственные антигены. Одним типом таких антигенов являются возникшие в результате мутаций неоантигены[7,8,21].

[0499] Неоантигены возникают в результате несинонимичных соматических мутаций и приводят к образованию новых полипептидов, отсутствующих в здоровой ткани. Благодаря этому неоантигены являются пригодными мишенями для иммунотерапии, так как их полное отсутствие в здоровой ткани будет предотвращать специфическую токсичность. Кроме того, на обнаружение специфических к неоантигену Т-клеток не будет влиять центральная толерантность, направленная против высокоаффинных реактивных по отношению к собственным антигенам Т-клеток. Неоантигены по большей части возникают в результате мутаций в генах-пассажирах, которые не придают злокачественным клеткам какое-либо преимущество в выживаемости. Эти мутации обычно уникальны для каждого пациента и, следовательно, нацеливание на неоантигены требует персонализированного лечения, включающего подход секвенирования генома[8,26].

[0500] С помощью недавно разработанного полноэкзомного секвенирования (WES) и секвенирования РНК, стало очевидно, что неоантигенреактивные Т-клетки

обнаруживаются среди ИОЛ и могут опосредовать регрессию опухоли[27,28]. Например, WES в сочетании с высокоспецифическими и высокочувствительными мультимерами пептид-ГКГС (пГКГС) [29] позволило идентифицировать специфические к неоантигену Т-клетки из материала ИОЛ у пациентов с меланомой[13,30]. Даже несмотря на то, что данный способ масштабируется, он зависит от ограниченного покрытия аллелей HLA и требует алгоритмов прогнозирования связывания пГКГС. Эти ограничения могут привести к тому, что некоторые неоантигенреактивные TCR будут пропущены. Для того чтобы обойти ограничения мультимеров пГКГС, в исследованиях использовали масс-спектрометрию, чтобы определить связанные с ГКГС неоантигены. Комбинирование этого подхода с WES и секвенированием транскриптома в качестве референса привело к обнаружению неоантигенов в линиях опухолевых клеток мыши[31]. Тем не менее, у данной схемы эксперимента низкая пропускная способность, и она часто приводит к ложноотрицательным результатам[8]. Несмотря на возможность одновременной идентификации множества специфических к неоантигену TCR с помощью приведенных выше способов, сохраняется потребность в более масштабируемой и чувствительной платформе для обнаружения таких TCR.

[0501] Идентификацию специфических к неоантигену TCR осуществляют путем применения подхода генетического скрининга, который масштабируется и является минимально инвазивным. Небольшое количество нежизнеспособной архивной опухолевой ткани используют в качестве источника внутриопухолевых последовательностей TCR вместо ИОЛ. Затем используют ретровирусный перенос генов, чтобы ввести идентифицированную библиотеку внутриопухолевых TCR в иммортализованную линию Т-лимфоцитов, названную линией репортерных Т-клеток Jurkat. Осуществляют обогащение экспрессирующими библиотеку TCR клетками Jurkat (эффекторными клетками, сокращенно Э) и последующий скрининг их реактивности против экспрессирующих мутаном полученных из пациента АПК (клеток-мишеней, сокращенно М). После сортировки методом проточной цитометрии, осуществляют селекцию клеток Jurkat на основании экспрессии ими раннего маркера активации Т-клеток CD69, который вовлечен в пролиферацию клеток и последующую передачу сигналов[32]. На последнем этапе идентифицировали специфические к неоантигену TCR с помощью секвенирования нового поколения. В некоторых вариантах реализации современная платформа для выделения TCR

позволяет скрининг библиотеки из 10000 TCR. В соответствии с описанием выше, в Примере 19 представлены дополнительные результаты и доказательства, подтверждающие данный подход.

[0502] Выбор TCR можно осуществить множеством способов. Обогащение вариантом можно определить, применяя подходящие аналитические средства, включая, но не ограничиваясь пакетом программ DESeq2 R. Обогащение вариантом может включать сравнение пар верхних и нижних образцов, в которых репортерные Т-клетки приводили в контакт с В-клетками, которые экспрессируют TMG, с парами верхних и нижних образцов, в которых репортерные Т-клетки приводили в контакт с В-клетками, не подвергнутыми генетической инженерии для экспрессии TMG. Обогащение вариантом может включать ранжирование комбинаций TCR на основании статистического критерия Вальда в DESeq2 в порядке уменьшения. Обогащение вариантом может включать определение статистической значимости на основании скорректированных по методу Бонферрони p-значений для комбинаций TCR с более высоким рангом. Выбор по меньшей мере одной комбинации TCR можно осуществить на основании скорректированных p-значений и других статистических показателей. Процедура в данном примере может выполняться в виде одного повтора или двух повторов, трех повторов или более чем трех повторов, чтобы повысить чувствительность реактивности TCR. Количество повторов может изменяться для образцов, которые были получены из совместных культур с АПК, экспрессирующими TMG, и для образцов, которые были получены из совместных культур с АПК, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии TMG. Любые из этих возможных вариантов можно комбинировать с любым из способов, предложенных в настоящей заявке.

[0503] Варианты реализации настоящего изобретения дополнительно проиллюстрированы следующими Примерами, которые приведены исключительно с целью иллюстрирования и не предназначены для ограничения каким-либо образом объема заявленного объекта изобретения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

[0504] В данном примере описано получение репертуаров TCR из нежизнеспособных образцов опухоли, чтобы идентифицировать специфические к неоантигену последовательности TCR.

[0505] ДНК или РНК выделяли из свежезамороженного, или фиксированного, или фиксированного формалином/заключенного в парафин (FFPE) образца опухоли и использовали для проведения секвенирования всех цепей TCRα и TCRβ. Абсолютные количества молекул нуклеиновых кислот, кодирующих (часть) определенную(-ой) последовательность(-и) аминокислот цепи TCR, определяли на основании подсчета уникальных молекул с применением «уникального молекулярного идентификатора» (UMI). В качестве альтернативы, UMI не включали в секвенирование цепей TCRα и TCRβ, и частоту встречаемости цепей TCR измеряли на основании количества прочтений, полученных путем секвенирования нового поколения, вместо подсчета UMI. Применив такие критерии, как распространенность цепи TCR внутри опухоли, например, выбирали определенную группу цепей TCRα и TCRβ из общей группы идентифицированных последовательностей TCR. Затем получали фрагменты ДНК или РНК выбранных цепей TCRα и TCRβ путем синтеза ДНК или РНК, соответственно. Фрагменты РНК можно превратить в кДНК с помощью стандартных методик. Посредством комбинаторного образования пары всех выбранных цепей TCRα и TCRβ в единые экспрессионные конструкции, кодирующие гены TCRαβ, воссоздавали определенную часть исходного репертуара внутриопухолевых пар TCRαβ. Единую экспрессионную конструкцию можно применять для экспрессии данной комбинации одной TCRα- и одной TCRβ-цепи. В качестве альтернативы, цепи TCRα и TCRβ можно экспрессировать с отдельных экспрессионных конструкций. Можно применять любой подходящий вектор экспрессии, включая вирусные векторы. Для стабильной экспрессии применяли ретровирусные или лентивирусные векторы или частицы. Полученную в результате этого библиотеку генов TCRαβ экспрессировали в пуле репортерных Т-клеток. Экспрессирующие библиотеку Т-клетки активировали путем стимуляции неоантигеном и проводили обогащение специфическими к неоантигену Т-клетками на основании маркеров активации Т-клеток. Затем экспрессированные гены специфических к неоантигену TCRαβ идентифицировали

по обогащению в стимулированных антигеном образцах по сравнению с образцами, которые не были стимулированы антигеном. Идентифицированный(-е) ген(ы) TCR или группу генов TCR использовали для конструирования специфических к неоантигену Т-клеток для терапии рака.

ПРИМЕР 2

[0506] В данном примере описано получение репертуаров TCR для создания библиотек TCRαβ.

[0507] ДНК или РНК выделяли из свежезамороженного, или фиксированного, или фиксированного формалином/заключенного в парафин (FFPE) образца и использовали для проведения секвенирования всех цепей TCRα и TCRβ. Абсолютные количества молекул нуклеиновых кислот, кодирующих (часть) определенную(-ой) последовательность(-и) аминокислот цепи TCR, определяли на основании подсчета уникальных молекул с применением «уникального молекулярного идентификатора» (UMI). Применив такие критерии, как, например, распространенность цепей TCR, выбирали определенную группу цепей TCRα и TCRβ из общей группы идентифицированных последовательностей TCR. Затем получали фрагменты ДНК или РНК выбранных цепей TCRα и TCRβ путем синтеза ДНК или РНК, соответственно. Фрагменты РНК можно превратить в кДНК с помощью стандартных методик. Посредством комбинаторного образования пары всех выбранных цепей TCRα и TCRβ с получением генов TCRαβ, воссоздавали определенную часть исходного репертуара пар TCRαβ. Спаренные цепи TCRα и TCRβ представляют собой библиотеку TCRαβ, содержащую выбранный репертуар TCR.

ПРИМЕР 3

[0508] В данном примере описано лечение страдающих раком пациентов с помощью иммунотерапии с применением библиотек полученных репертуаров TCR.

[0509] Получали репертуары TCR и создавали библиотеки TCRαβ с помощью способов, перечисленных в Примерах 1 и 2. Библиотеку генов TCRαβ экспрессировали в пуле репортерных Т-клеток. Специфические к неоантигену Т-клетки активировали путем стимуляции антигеном и выделяли на основании активации Т-клеток. Затем идентифицировали экспрессированные гены специфических к неоантигену TCRαβ.

Идентифицированный(-е) ген(ы) TCR или группы генов TCR использовали для конструирования специфических к неоантигену Т-клеток для терапии рака путем экспрессирования генов TCR в Т-клетках. Сконструированные специфические к неоантигену Т-клетки вводили путем инфузии страдающему раком пациенту в качестве иммунотерапии для лечения рака. Страдающий раком пациент может представлять собой пациента, репертуар TCRαβ которого секвенируют, или пациента, рак которого содержит или экспрессирует тот же неоантиген. Клетки, которые использовали для терапии, могут быть аутологическими или аллогенными.

ПРИМЕР 4

[0510] В данном примере описано получение репертуаров TCR из очагов инфекции или аутоиммунитета.

[0511] ДНК или РНК выделяли из свежезамороженного, или фиксированного, или фиксированного формалином/заключенного в парафин (FFPE) образца, полученного из очага инфекции или аутоиммунитета, и использовали для проведения секвенирования всех цепей TCRα и TCRβ. Применив такие критерии, как, например, распространенность цепей TCR, выбирали определенную группу цепей TCRα и TCRβ из общей группы идентифицированных последовательностей TCR. Затем получали фрагменты ДНК или РНК выбранных цепей TCRα и TCRβ путем синтеза ДНК или РНК, соответственно. Фрагменты РНК можно превратить в кДНК с помощью стандартных методик. Посредством комбинаторного образования пары всех выбранных цепей TCRα и TCRβ с получением генов TCRαβ, воссоздавали определенную часть исходного репертуара пар TCRαβ. Путем определения последовательностей TCR Т-клеток, которые могут детектировать определенный антиген в очаге инфекции или аутоиммунитета, можно получить репертуары TCR, ассоциированные с очагом инфекции или аутоиммунитета или специфические к нему.

[0512] Полученную в результате этого библиотеку генов TCRαβ экспрессировали в пуле репортерных Т-клеток. Антигенспецифические Т-клетки активировали путем стимуляции антигеном и выделяли на основании активации Т-клеток. Затем идентифицировали экспрессированные гены антигенспецифических TCRαβ. Идентифицированный(-е) ген(ы) TCR или группы генов TCR использовали для диагностики или лечения инфекции или аутоиммунитета.

ПРИМЕР 5

[0513] В данном примере описано получение антигенспецифических TCR из библиотеки TCR, полученной путем искусственного смешивания плазмид TCR.

[0514] Кассеты экспрессии TCR получали в формате TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину (на Фиг. 6 показан схематический пример кассеты TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину; пример TCR, экспрессированного в таком формате, приведен в SEQ ID NO: 1, ФИГ. 32, ФИГ. 40). Множество библиотек TCR создавали путем смешивания одного специфического к неоантигену TCR с различными неродственными TCR в нескольких соотношениях. Полученные в результате этого библиотеки TCR содержали один рестриктированный по HLA-A*02:01 специфический к неоантигену TCR с частотой встречаемости 1:10, 1:100, 1:1000 и 1:10000. Для того чтобы создать библиотеку TCR, содержащую специфические к неоантигену TCR с частотой встречаемости 1:10, одну копию плазмиды, кодирующей специфические к неоантигену TCR в ретровирусном векторе экспрессии, смешивали с одной копией плазмиды каждого из девяти других ретровирусных векторов, каждый из которых кодировал отличный TCR с другой специфичностью. Соответственно, одну копию плазмиды, кодирующей специфические к неоантигену TCR в ретровирусном векторе экспрессии, смешивали с 1, 11, 111 и 1111 копиями плазмид каждого из девяти других ретровирусных векторов, каждый из которых кодировал отличный TCR с другой специфичностью, с получением библиотеки TCR, содержащей специфические к неоантигену TCR с частотой встречаемости 1:10, 1:100, 1:1000 и 1:10000, соответственно.

[0515] В некоторых вариантах реализации можно использовать любую одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации можно изменить описанный выше способ путем смешивания с 5 охарактеризованными TCR и используя частоты встречаемости 1:16, 1:100, 1:2500 и 1:10000. Наконец можно использовать для смешивания 24 плазмиды с другими TCR вместо 9.

[0516] Каждой библиотекой TCR отдельно трансфицировали клетки, продуцирующие амфотропный вирус, такие как Phoenix-Ampho (ATCC CRL-3213), с помощью способов, известных квалифицированному специалисту. Полученные в результате этого ретровирусные вирионы использовали для трансдукции линии репортерных Т-клеток Jurkat. В линии репортерных Т-клеток Jurkat отсутствует эндогенная

экспрессия TCR (например, как описано в Mezzadra et al Nature 2017), и она модифицирована для экспрессии CD8α и CD8β человека после трансдукции трансгеном CD8α-P2A-CD8β (SEQ ID NO: 2) с применением способов, известных квалифицированному специалисту. Репортерные Т-клетки Jurkat трансдуцировали отдельными библиотеками TCR с использованием низкой MOI, чтобы ограничить частоту встречаемости трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat до 25 – 30% от общего количества Т-клеток. Осуществляли положительную селекцию Т-клеток Jurkat, модифицированных для экспрессии трансгена TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину, путем добавления пуромицина в среды для культивирования клеток после трансдукции. Селекция антибиотиком генетически модифицированных клеток известна специалисту со средней квалификацией в данной области техники.

[0517] В некоторых вариантах реализации можно использовать любую одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 2 (ФИГ. 33). На ФИГ. 41 изображена диаграмма SEQ ID NO: 2 - трансгена CD8α-P2A-CD8β.

[0518] Специалист со средней квалификацией в данной области техники также поймет, что способы, описанные в настоящей заявке, могут включать селекцию без пуромицина, такую как сортировка трансдуцированных TCR клеток, например, с помощью FACS или магнитной селекции на основе гранул. Таким образом, в кассете TCR может отсутствовать ген для селекции пуромицином.

[0519] Трансдуцированные TCR Т-клетки Jurkat стимулировали нагруженными антигеном клетками K562, экспрессирующими рекомбинантный трансген HLA-A*02:01-IRES-FusionRed (K562-HLA-A*02:01-IRES-FusionRed; SEQ ID NO: 3; ФИГ. 34, ФИГ. 42). Получение экспрессирующих трансген клеток K562 было описано (например, Hirano et al. Clin Canc Res 2006; Butler et al Int Immunol 2010; Butler et al Clin Canc Res 2007; Lorenz et al. Hum Gene Ther 2017) и известно квалифицированному специалисту. Нагруженные пептидом клетки K562-HLA-A2 получали путем примирования интересующим пептидом в течение 90 минут при 37 ˚C и последующей промывки. Для квалифицированного специалиста должно быть очевидно, что линия клеток K562, положительных по презентирующим пептид HLA-A*02:01, упомянутая в настоящей заявке, может быть заменена на другие положительные по HLA-A*02:01 антигенпрезентирующие клетки. В

качестве альтернативы, можно использовать вариант экспрессии TMG в трансдуцированных HLA-A02*01 клетках K562.

[0520] Следующие условия стимуляции будут использовать для каждой библиотеки TCR, соответственно:

1. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $4e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг пептида неоантигена
2. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $8e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг пептида неоантигена

[0521] Затем совместные культуры собирали и окрашивали мечеными флуорохромом антителами против CD4, CD8 и CD69. Применяя устройство для сортировки клеток методом проточной цитометрии ARIAFusion от BD Biosciences, сортировали следующие популяции для каждого условия стимуляции:

1. Живые, отдельные клетки, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD69^{hi}$ ($CD69^{hi}$ включали 5 – 50% живых, отдельных, $CD4^+$, $CD8^+$ клеток с наиболее высоким сигналом на основании сигнала флуоресценции CD69)
2. Живые, отдельные клетки, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD69^{lo}$ ($CD69^{lo}$ включали 5 – 50% живых, отдельных, $CD4^+$, $CD8^+$ клеток на основании низкого сигнала флуоресценции CD69)

[0522] В качестве альтернативы, для каждой библиотеки TCR можно использовать следующие условия стимуляции, соответственно:

1. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $4e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг пептида неоантигена
2. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $8e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг пептида неоантигена
3. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $4e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг постороннего контрольного пептида
4. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $8e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг постороннего контрольного пептида

[0523] Затем совместные культуры собирали и окрашивали мечеными флуорохромом антителами против CD4, CD8 и CD69. Применяя устройство для сортировки

клеток методом проточной цитометрии ARIAFusion от BD Biosciences, из каждого образца сортировали живые, отдельные, CD4+, CD8+, CD69+ клетки.

[0524] Из сортированных трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat выделяли геномную ДНК и использовали в качестве матрицы для ПЦР, чтобы амплифицировать часть кассеты TCRβ-P2A-TCRα. Размер полученного в результате этого продукта ПЦР составлял приблизительно 1,5 т.п.н., и указанный продукт можно было секвенировать с применением секвенатора MinIon Oxford Nanopore для сравнения относительной распространенности специфических к неоантигену последовательностей TCR в сортированных популяциях Т-клеток (либо $CD69^{lo}$ и $CD69^{hi}$, либо $CD69^{+}$).

[0525] В некоторых вариантах реализации секвенатор MinIon Oxford Nanopore можно заменить на другие секвенирующие устройства, или можно использовать другие стратегии секвенирования.

ПРИМЕР 6

[0526] В данном примере описано получение антигенспецифических TCR из библиотеки TCR, полученной путем синтеза генов.

[0527] Множество библиотек TCR, содержащих два рестриктированных по HLA-A*02:01, специфических к неоантигену TCR, получали путем синтеза генов. Для этого синтезировали два фрагмента цепи TCRα и два фрагмента цепи TCRβ, полученных из специфических к неоантигену TCR, и 98 фрагментов цепи TCRα и 98 фрагментов цепи TCRβ, полученных из TCR с другой специфичностью. В качестве альтернативы, можно использовать 5 + 95 TCR. Затем полученные в результате этого фрагменты использовали для создания библиотек TCR, содержащих кассеты экспрессии TCR в формате TCRβ-P2A-TCRα. Для создания библиотеки все выбранные фрагменты TCRα и TCRβ смешивали и соединяли в непрерывные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие кассеты TCRβ-P2A-TCRα. Важно отметить, что можно присоединить только один TCRβ- и TCRα-фрагмент на каждую кассету TCR. Путем выбора и смешивания различных количеств фрагментов TCRα и TCRβ, можно создать библиотеки TCR различной сложности:

1. два фрагмента цепи TCRα и два фрагмента цепи TCRβ, полученных из специфических к неоантигену TCR, позволят создать библиотеку TCR со сложностью 4 (4 различные пары TCRαβ)

2. два фрагмента цепи TCRα и два фрагмента цепи TCRβ, полученных из специфических к неоантигену TCR, и восемь фрагментов цепи TCRα и восемь фрагментов цепи TCRβ, полученных из TCR с другой специфичностью, позволят создать библиотеку TCR со сложностью 100 (100 различных пар TCRαβ)
3. два фрагмента цепи TCRα и два фрагмента цепи TCRβ, полученных из специфических к неоантигену TCR, и 48 фрагментов цепи TCRα и 48 фрагментов цепи TCRβ, полученных из TCR с другой специфичностью, позволят создать библиотеку TCR со сложностью 2500 (2500 различных пар TCRαβ)
4. два фрагмента цепи TCRα и два фрагмента цепи TCRβ, полученных из специфических к неоантигену TCR, и 98 фрагментов цепи TCRα и 98 фрагментов цепи TCRβ, полученных из TCR с другой специфичностью, позволят создать библиотеку TCR со сложностью 10000 (10000 различных пар TCRαβ)

[0528] В качестве альтернативы, возможные варианты могут представлять собой дизайны для фрагментов цепей TCRα и TCRβ: 4 + 0; 5 + 5; 5 + 45 и 5 + 95.

[0529] Полученные в результате этого библиотеки TCR будут содержать кассеты экспрессии TCR в формате TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину (SEQ ID NO: 1, ФИГ. 40).

[0530] Каждой библиотекой TCR отдельно трансфицировали клетки, продуцирующие амфотропный вирус, такие как Phoenix-Ampho (ATCC CRL-3213), с помощью способов, известных квалифицированному специалисту. Полученные в результате этого ретровирусные вирионы использовали для трансдукции линии репортерных Т-клеток Jurkat. В линии репортерных Т-клеток Jurkat отсутствует эндогенная экспрессия TCR (например, как описано в Mezzadra et al Nature 2017), и она модифицирована для экспрессии CD8α и CD8β человека после трансдукции трансгеном CD8α-P2A-CD8β (SEQ ID NO: 2) с применением способов, известных квалифицированному специалисту. Репортерные Т-клетки Jurkat трансдуцировали отдельными библиотеками TCR с использованием низкой MOI, чтобы ограничить частоту встречаемости трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat до 25 – 30% от общего количества Т-клеток.

Осуществляли положительную селекцию Т-клеток Jurkat, модифицированных для экспрессии трансгена TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину, путем добавления пуромицина в среды для культивирования клеток после трансдукции. Селекция антибиотиком генетически модифицированных клеток известна специалисту со средней квалификацией в данной области техники.

[0531] Специалист со средней квалификацией в данной области техники также поймет, что способы, описанные в настоящей заявке, могут включать селекцию без пуромицина, такую как сортировка трансдуцированных TCR клеток, например, с помощью FACS или магнитной селекции на основе гранул. Таким образом, в кассете TCR может отсутствовать ген для селекции пуромицином.

[0532] Трансдуцированные TCR Т-клетки Jurkat стимулировали нагруженными антигеном клетками K562, экспрессирующими рекомбинантный трансген HLA-A*02:01-IRES-FusionRed (K562-HLA-A*02:01-IRES-FusionRed; SEQ ID NO: 3), в течение 6 часов. Получение экспрессирующих трансген клеток K562 было описано (например, Hirano et al. Clin Canc Res 2006; Butler et al Int Immunol 2010; Butler et al Clin Canc Res 2007; Lorenz et al. Hum Gene Ther 2017) и известно квалифицированному специалисту. Нагруженные пептидом клетки K562-HLA-A2 получали путем примирования интересующим пептидом в течение 90 минут при 37 °C и последующей промывки. Для квалифицированного специалиста должно быть очевидно, что линия клеток K562, положительных по презентирующим пептид HLA-A*02:01, упомянутая в настоящей заявке, может быть заменена на другие положительные по HLA-A*02:01 антигенпрезентирующие клетки.

[0533] Будут использовать следующие условия стимуляции:

1. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $4e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг пептида неоантигена
2. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $8e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг пептида неоантигена

[0534] Затем совместные культуры собирали и окрашивали мечеными флуорохромом антителами против CD4, CD8 и CD69. Применяя устройство для сортировки клеток методом проточной цитометрии ARIAFusion от BD Biosciences, сортировали следующие популяции для каждого условия стимуляции:

1. Живые, отдельные, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD69^{hi}$ ($CD69^{hi}$ включали 5 - 60% живых, отдельных, $CD4^+$, $CD8^+$ клеток с наиболее высоким сигналом на основании сигнала флуоресценции CD69)
2. Живые, отдельные, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD69^{lo}$ ($CD69^{lo}$ включали 5 - 50% живых, отдельных, $CD4^+$, $CD8^+$ клеток на основании низкого сигнала флуоресценции CD69)

[0535] В качестве альтернативы, для каждой библиотеки TCR можно использовать следующие условия стимуляции, соответственно:

1. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $4e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг пептида неоантигена
2. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $8e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг пептида неоантигена
3. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $4e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг постороннего контрольного пептида
4. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $8e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг постороннего контрольного пептида

[0536] Затем совместные культуры собирали и окрашивали мечеными флуорохромом антителами против CD4, CD8 и CD69. Применяя устройство для сортировки клеток методом проточной цитометрии ARIAFusion от BD Biosciences, из каждого образца сортировали живые, отдельные, CD4+, CD8+, CD69+ клетки.

[0537] Из сортированных трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat выделяли геномную ДНК и использовали в качестве матрицы для ПЦР, чтобы амплифицировать часть кассеты TCRβ-P2A-TCRα. Размер полученного в результате этого продукта ПЦР составлял приблизительно 1,5 т.п.н., и указанный продукт можно было секвенировать с применением секвенатора MinIon Oxford Nanopore для сравнения относительной распространенности специфических к неоантигену последовательностей TCR в сортированных популяциях Т-клеток (либо $CD69^{lo}$ и $CD69^{hi}$, либо $CD69^+$).

[0538] В некоторых вариантах реализации секвенатор MinIon Oxford Nanopore можно заменить на другие секвенирующие устройства, или можно использовать другие стратегии секвенирования.

ПРИМЕР 7

[0539] В данном примере описано получение специфических к неоантигену TCR из библиотеки TCR, созданной из свежезамороженного образца из очага меланомы.

[0540] ДНК и РНК выделяли из свежезамороженного образца меланомы и использовали в двух экспериментах.

[0541] Во-первых, ДНК и/или РНК использовали для проведения секвенирования всех цепей TCRα и TCRβ. Абсолютные количества молекул нуклеиновых кислот, кодирующих (часть) определенную(-ой) последовательность(-и) аминокислот цепи TCR, определяли на основании подсчета уникальных молекул с применением «уникального молекулярного идентификатора» (UMI). В качестве альтернативы, можно использовать количества прочтений. Полученную в результате этого совокупность последовательностей цепей TCR разделяли на совокупность последовательностей TCRα-цепей и совокупность последовательностей TCRβ-цепей. Любые непродуктивные последовательности цепей TCR, в которых фрагменты TCR соединены не в рамке считывания на уровне последовательностей аминокислот, и/или в которые введены стоп-кодоны, и/или в которых присутствуют мутации со сдвигом рамки считывания, и/или в которых присутствуют дефектные сайты сплайсинга, удаляли из совокупности. Каждую совокупность сортировали в порядке убывания, используя либо абсолютные количества молекул нуклеиновых кислот, кодирующих определенную цепь TCR, либо соответствующий процент от всех TCRα- или TCRβ-цепей, соответственно, с получением порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ. Выбирали верхние 100 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ и получали в виде фрагментов путем синтеза ДНК. Для создания библиотеки все выбранные фрагменты TCRα и TCRβ смешивали и соединяли в непрерывные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие кассеты TCRβ-P2A-TCRα. Важно отметить, что можно соединить только один TCRβ- и TCRα-фрагмент на кассету. Полученные в результате этого библиотеки TCR будут содержать приблизительно 10000 кассет экспрессии TCR в формате TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину (SEQ ID NO: 1).

[0542] Во-вторых, поученные из опухоли, а также из здоровой ткани ДНК и РНК используют, чтобы определить группу опухолеспецифических мутаций, применяя полноэкзомное секвенирование (WES), и чтобы установить группу экспрессированных мутированных генов, применяя секвенирование РНК. Можно создать конструкции

последовательно расположенных минигенов (TMG), которые кодируют множество происходящих из опухоли мутированных пептидов в виде тандемных массивов. Конструкции TMG используют для получения транскрибированных *in vitro* мРНК (например, Stevanović et al. Science 2017). В качестве альтернативы, конструкции экспрессии TMG можно применять для продукции вируса/трансдукции В-клеток (АПК).

[0543] Параллельно, соответствующую аутологическую кровь из организма пациента с меланомой использовали для получения иммортализованных В-клеток. Иммортализация В-клеток человека с помощью EBV известна квалифицированному специалисту (например, Traggiai et al Method Mol Biol 2012). Иммортализованные аутологические В-клетки использовали для получения экспрессирующих антиген В-клеток путем электропорации В-клеток TMG-мРНК. Электропорация антигенпрезентирующих клеток (АПК) была описана ранее и известна квалифицированному специалисту. Средний специалист в данной области техники поймет, что другие способы также позволят иммортализовать аутологические В-клетки и вызвать экспрессию антигенов такими аутологическими иммортализованными В-клетками, например, примирование пептидом, трансфекция кодирующими TMG плазмидами ДНК или трансдукция кодирующими TMG вирусными частицами.

[0544] Библиотекой TCR трансфицировали клетки, продуцирующие амфотропный вирус, такие как Phoenix-Ampho (ATCC CRL-3213), с помощью способов, известных квалифицированному специалисту. Полученные в результате этого ретровирусные вирионы использовали для трансдукции линии репортерных Т-клеток Jurkat. В линии репортерных Т-клеток Jurkat отсутствует эндогенная экспрессия TCR (например, как описано в Mezzadra et al Nature 2017), и она модифицирована для экспрессии CD8α и CD8β человека после трансдукции трансгеном CD8α-P2A-CD8β (SEQ ID NO: 2) с применением способов, известных квалифицированному специалисту. Репортерные Т-клетки Jurkat трансдуцировали библиотекой TCR с использованием низкой MOI, чтобы ограничить частоту встречаемости трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat до 25 – 30% от общего количества Т-клеток. Осуществляли положительную селекцию Т-клеток Jurkat, модифицированных для экспрессии трансгена TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину, путем добавления пуромицина в среды для культивирования клеток. Селекция антибиотиком генетически модифицированных клеток известна специалисту со

средней квалификацией в данной области техники. Специалист со средней квалификацией в данной области техники также поймет, что способы, описанные в настоящей заявке, могут включать селекцию без пуромицина, такую как сортировка трансдуцированных TCR клеток, например, с помощью FACS или магнитной селекции на основе гранул. Таким образом, в кассете TCR может отсутствовать ген для селекции пуромицином.

[0545] Трансдуцированные TCR Т-клетки Jurkat стимулировали нагруженными антигеном В-клетками в течение 6 часов, используя следующие условия:

1. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $4e^7$ нагруженных антигеном аутологических В-клеток
2. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $4e^7$ аутологических В-клеток

[0546] Затем совместные культуры собирали и окрашивали мечеными флуорохромом антителами против CD4, CD8 и CD69. Применяя устройство для сортировки клеток методом проточной цитометрии ARIAFusion от BD Biosciences, сортировали следующие популяции для каждого условия стимуляции:

1. Живые, отдельные клетки, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD69^{hi}$ ($CD69^{hi}$ включали 5 - 50% живых, отдельных, $CD4^+$, $CD8^+$ клеток с наиболее высоким сигналом на основании сигнала флуоресценции CD69)
2. Живые, отдельные клетки, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD69^{lo}$ ($CD69^{lo}$ включали 5 - 50% живых, отдельных, $CD4^+$, $CD8^+$ клеток на основании низкого сигнала флуоресценции CD69)

[0547] В качестве альтернативы, для каждой библиотеки TCR можно использовать следующие условия стимуляции, соответственно:

1. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $4e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг пептида неоантигена
2. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $8e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг пептида неоантигена
3. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $4e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг постороннего контрольного пептида
4. $4e^7$ трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat + $8e^7$ K562-HLA-A2, нагруженных 1 мкг постороннего контрольного пептида

[0548] Затем совместные культуры собирали и окрашивали мечеными флуорохромом антителами против CD4, CD8 и CD69. Применяя устройство для сортировки клеток методом проточной цитометрии ARIAFusion от BD Biosciences, из каждого образца сортировали живые, отдельные, CD4+, CD8+, CD69+ клетки.

[0549] Из сортированных трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat выделяли геномную ДНК и использовали в качестве матрицы для ПЦР, чтобы амплифицировать часть кассеты TCRβ-P2A-TCRα. Размер полученного в результате этого продукта ПЦР составлял приблизительно 1,5 т.п.н., и указанный продукт можно было секвенировать с применением секвенатора MinIon Oxford Nanopore для сравнения относительной распространенности специфических к неоантигену последовательностей TCR в сортированных популяциях Т-клеток (либо $CD69^{lo}$ и $CD69^{hi}$, либо $CD69^{+}$).

[0550] В некоторых вариантах реализации секвенатор MinIon Oxford Nanopore можно заменить на любое другое секвенирующее устройство, или можно использовать другие стратегии секвенирования.

ПРИМЕР 8

[0551] В данном примере описано создание репертуара TCR с применением синтеза генов.

[0552] TCR можно экспрессировать в дизайне кассеты, как представлено на ФИГ. 3. Для того чтобы синтезировать большие количества таких кассет TCR, высоковариабельные части каждой цепи TCR синтезировали в виде фрагментов, таких как, например, CDR3-J-сегменты. Другие компоненты могут представлять собой «готовые к использованию» элементы структуры. Для того чтобы воссоздать все интересующие цепи TCR, синтезировали вариабельные/уникальные фрагменты и смешивали с «готовыми к использованию» элементами структуры. Принцип представлен на ФИГ. 7. Затем все компоненты смешивали друг с другом, и сборка приводила к получению кассеты TCR, изображенной на ФИГ. 3. Сборка контролировалась специфическими выступами последовательностей: специфические CDR3-J-сегменты соединялись только с определенными V-сегментами, и благодаря перекрыванию между различными фрагментами, каждая кассета TCR в конечном итоге находилась в формате TCRβ-P2A-TCRα. Каждый фрагмент TCRα может образовать пару с каждым фрагментом TCRβ.

Наконец, все кассеты TCRβ-P2A-TCRα клонировали в вектор экспрессии. В некоторых случаях, можно использовать V-CDR3-J (как для альфа-, так и для бета-цепи) в качестве вариабельных частей и Сбета-P2A в качестве готового к использованию элемента структуры.

[0553] В качестве альтернативы, любую и все возможные комбинации TCRβ-P2A-TCRα получали полностью путем синтеза генов. При таком подходе есть возможность комбинаторного образования пары всех фрагментов TCRα и TCRβ.

[0554] Еще один способ включает получение фрагментов TCRα и TCRβ путем комбинаторного синтеза или путем синтеза генов, как описано выше. Тем не менее, вместо создания кассеты TCRβ-P2A-TCRα, полученные в результате этого совокупности цепей TCRα и TCRβ клонировали в отдельные векторы экспрессии. Клетки модифицировали совокупностями векторов таким образом, что каждая Т-клетка экспрессировали в среднем одну TCRα и одну TCRβ, аналогично комбинаторному образованию пары, описанному выше.

[0555] В качестве альтернативного способа, модифицированные TCR, такие как одноцепочечные конструкции TCR, слитые с сигнальными доменами CD3ε или CD3ζ отдельно или в комбинации с сигнальным доменом CD28, можно использовать вместо только TCRα и TCRβ.

ПРИМЕР 9

[0556] В данном примере описана идентификация пар TCRαβ из репертуара TCR.

[0557] Пул Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулировали антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные Т-клетки выделяли на основании по меньшей мере одного маркера активации для выделения TCR. В качестве альтернативы, пул Т-клеток метили флуоресцентным красителем, подходящим для отслеживания пролиферации клеток, стимулировали антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные Т-клетки выделяли на основании пролиферации для выделения TCR. Очистку активированных Т-клеток можно осуществить путем мечения антителом и последующего

выделения путем сортировки с помощью проточной цитометрии, селекции на основе магнитных гранул или любого другого способа селекции на основании связывания с антителом.

[0558] В еще одном способе пул Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, разделяли на по меньшей мере два образца. Образцы стимулировали антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген, или не стимулировали. После стимуляции обе популяции Т-клеток инкубировали в течение некоторого периода времени, а затем обе популяции Т-клеток анализировали путем выделения TCR. Сравнение пар TCRαβ, полученных из обоих образцов, позволяло идентифицировать гены TCR с большей распространенностью в образце, приведенном в контакт с по меньшей мере одним антигеном. Детектирование пролиферации можно осуществить на основании детектирования разбавления флуоресцентного красителя, такого как CFSE или Cell Tracer Violet. Пролиферирующие клетки сортировали на основании разбавленного сигнала флуоресценции с помощью проточной цитометрии.

[0559] В дополнительном способе, пул Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулировали антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные Т-клетки выделяли на основании по меньшей мере одного репортерного гена, такого как NFAT-GFP или NFAT-YFP, который свидетельствует о стимуляции TCR.

[0560] В еще одном способе, пул Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулировали антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные Т-клетки выделяли для выделения TCR, применяя селекцию антигенспецифических Т-клеток на основании приобретенной устойчивости к антибиотику в результате сигнализации TCR, например, путем применения трансгена NFAT-пуромицин. В качестве альтернативы, пул модифицированных Т-клеток приводили в контакт с одним или множеством комплексов ГКГС, которые несут интересующий антиген. Т-клетки, которые связывались с комплексом ГКГС, выделяли для выделения TCR. Выделение на основании связывания с комплексом ГКГС можно осуществить путем сортировки с помощью проточной цитометрии или обогащения с помощью магнитных гранул.

[0561] Выделение TCR в любом из описанных выше способов можно осуществить путем (i) выделения ДНК или РНК из общей популяции антигенреактивных Т-клеток, чтобы получить специфические продукты ПЦР TCRαβ, которые анализировали с помощью секвенирования ДНК или секвенирования РНК, чтобы определить последовательности генов TCRαβ антигенреактивных Т-клеток, или (ii) капельной ПЦР на основе отдельных клеток или микрофлюидных подходов, чтобы проанализировать последовательности генов TCRαβ, экспрессированные в анализируемых отдельных Т-клетках. Таким образом детектировали отдельные Т-клетки в пуле Т-клеток, в которых транскрипты TCRαβ коэкспрессируются с повышенными уровнями маркера активации.

[0562] В дополнительном способе, пул Т-клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулировали антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген. Затем интересующие пары TCRαβ идентифицировали, применяя основанные на отдельных клетках капельную ПЦР или микрофлюидные подходы, чтобы комбинировать выделение TCR с детектированием уровней транскрипта по меньшей мере одного маркера активации. Тем самым, детектировали отдельные Т-клетки в пуле Т-клеток, в которых транскрипты TCRαβ коэкспрессируются с повышенными уровнями одного или более маркеров активации.

ПРИМЕР 10

[0563] В данном примере описан способ скрининга для идентификации функциональной комбинации TCRα/TCRβ из комбинаторной библиотеки последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих варианты полипептидов TCRα и TCRβ.

[0564] Для того чтобы идентифицировать специфические к неоантигену TCR из нежизнеспособных опухолей, разработали процесс создания библиотек TCR путем комбинаторной сборки происходящих из опухоли цепей TCRα и TCRβ. Данные цепи TCR идентифицировали путем секвенирования всех цепей TCR в ДНК или РНК, выделенных из опухолевой ткани. Пары TCRαβ кодировали в виде трансгенов длиной приблизительно 1,5 т.п.н. и вводили в репортерные клетки. Путем стимуляции экспрессирующими антиген клетками, можно осуществить селекцию репортерных клеток, экспрессирующих комбинации антигенреактивных TCRαβ, при скрининге библиотеки генетических

вариантов. Учитывая комбинаторную сборку, каждый вариант TCR можно однозначно идентифицировать лишь путем определения обеих вариабельных последовательностей TCRα и TCRβ. Следовательно, трансгены, кодируемые репортерными клетками, выделенными в процессе генетического скрининга, получали в виде ампликонов ПЦР длиной приблизительно 1,5 т.п.н., секвенировали по всей длине, применяя секвенирование Oxford Nanopore, и анализировали с применением конвейера биоинформационного анализа.

[0565] Этот процесс позволяет идентифицировать лидирующие TCR, потенциальное применение которых в терапии рака можно дополнительно оценить.

1. *Создание библиотеки вариантных последовательностей нуклеотидов*

[0566] Осуществляли выбор TCRα- и TCRβ-цепей, как описано в одном или более из примеров, приведенных в настоящей заявке, и комбинаторно соединяли в пары, тем самым создавая полный набор вариантов TCR. Благодаря комбинаторному образованию пары, любой данный вариант TCR можно однозначно идентифицировать лишь путем определения вариабельных последовательностей TCRα и TCRβ. Это может включать секвенирование ампликона ПЦР длиной приблизительно 1,5 т.п.н.

2. *Введение указанной библиотеки вариантных последовательностей нуклеотидов в репортерную клетку*

[0567] Комбинаторной библиотекой TCR, описанной на этапе 1), трансфицировали продуцирующие вирус клетки Phoenix-ampho для получения ретровируса, кодирующего все варианты TCR, присутствующие в библиотеке. Вирус впоследствии использовали для трансдукции Т-клеток Jurkat, в которых отсутствует экспрессия эндогенного TCR. Маркер селекции бластицидином совместно кодируется в библиотеке TCR и позволяет селекцию антибиотиком трансдуцированных репортерных Т-клеток, экспрессирующих пул TCR.

3. *Селекция репортерных клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства*

[0568] Поликлональную смесь репортерных Т-клеток, экспрессирующих различные TCR, высевали при низкой плотности, а затем совместно культивировали с иммортализованными В-клетками, экспрессирующими потенциальные неоантигены.

Количество репортерных Т-клеток такое, что все варианты TCR представлены со средним покрытием, составляющим по меньшей мере 100. Затем совместные культуры собирали и проводили сортировку методом FACS на основании высокой или низкой экспрессии у них маркера активации Т-клеток CD69. Эти соответствующие ‘верхние’ и ‘нижние’ популяции собирали и дополнительно анализировали. Для сортировки методом FACS можно использовать другие маркеры активации, причем маркеры CD62L, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α и GM-CSF могут либо заменить CD69, либо использоваться в комбинации с ним, для селекции активированных репортерных Т-клеток. Кроме того, для селекции активированных клеток можно применять различные репортеры активности промотора.

4. *Выделение вариантных последовательностей нуклеотидов из прошедших селекцию репортерных клеток.*

[0569] Выделяли геномную ДНК и проводили амплификацию методом ПЦР ретровирусной вставки, кодирующей TCR. Праймеры для ПЦР находились в ретровирусном векторе и в константной области цепи TCR-альфа, позволяя получить ампликон из приблизительно 1500 оснований. Использовали достаточное количество геномной ДНК, чтобы все варианты TCR были представлены со средним покрытием, составляющим по меньшей мере 100. Амплификация минимизирована, чтобы предотвратить смещение амплификации в сторону специфических вариантов TCR, но должна дать среднее покрытие, составляющее по меньшей мере 10000 для каждого TCR, представленного в библиотеке. Амплификацию TCR с геномной ДНК проводили как для верхних, так и для нижних образцов.

5. *Определить по меньшей мере 600 п.о. из полноразмерной последовательности нуклеотидов из выделенных вариантных последовательностей нуклеотидов*

[0570] Амплифицированные последовательности TCR дополнительно обрабатывали для секвенирования Oxford Nanopore. В первой реакции ПЦР использовали праймеры с пришитым концевым олигонуклеотидом. Они содержали новый сайт связывания для второй ПЦР со штрихкодированными внешними праймерами, модифицированными с помощью химии быстрого присоединения. Использовали различные штрихкоды для реакций ПЦР с верхними и нижними образцами. На всех этапах ПЦР амплификация минимизирована, чтобы предотвратить смещение амплификации в

сторону специфических вариантов TCR. Тем не менее, используют достаточное количество продукта ПЦР, чтобы все варианты TCR были представлены со средним покрытием, составляющим по меньшей мере 10000.

[0571] В качестве альтернативы описанному выше, амплифицированные последовательности TCR дополнительно обрабатывали для секвенирования Oxford Nanopore. В первой реакции ПЦР кассеты TCR амплифицировали с праймерами без пришитого концевого олигонуклеотида. В последующем раунде ПЦР использовали праймеры с пришитым концевым олигонуклеотидом. Они содержали новый сайт связывания для третьей ПЦР со штрихкодированными внешними праймерами, модифицированными с помощью химии быстрого присоединения. Использовали различные штрихкоды для реакций ПЦР с верхними и нижними образцами. На всех этапах ПЦР амплификация минимизирована, чтобы предотвратить смещение амплификации в сторону специфических вариантов TCR. Тем не менее, используют достаточное количество продукта ПЦР, чтобы все варианты TCR были представлены со средним покрытием, составляющим по меньшей мере 10000. Специалист со средней квалификацией в данной области поймет, что можно использовать альтернативные стратегии амплификации с помощью ПЦР.

[0572] Штрихкодированные продукты ПЦР из верхних и нижних образцов объединяли в эквимолярных соотношениях, и на последнем этапе адаптеры для быстрого секвенирования 1D лигировали с этим пулом, чтобы получить препарат библиотеки, который готов для секвенирования. Эту библиотеку загружали в проточную кювету R9.4.1 Oxford Nanopore и секвенировали до среднего покрытия, составляющего по меньшей мере 100 прочтений для каждого TCR, кодируемого в библиотеке.

[0573] Для биоинформационного анализа применяли программное обеспечение Guppy Oxford Nanopore. Прочтения последовательности получали из необработанных данных, применяя guppy_basecaller. Образцы демультиплексировали, применяя guppy_barcoder. В качестве альтернативы, для секвенирования на основе GridIon, получали демультиплексированные прочтения последовательностей, применяя пакет программного обеспечения MinKnow. Прочтения последовательностей выравнивали с референсом, состоящим из отдельных последовательностей альфа- и бета-цепей, применяя guppy_aligner, и идентичность альфа- и бета-цепей для каждого прочтения получали из

итоговых файлов выравнивания в формате bam. На последнем этапе рассчитывали частоту встречаемости каждого TCR и использовали для дальнейшего анализа.

6. *Выбор по меньшей мере одной интересующей вариантной последовательности нуклеотидов*

[0574] Для того чтобы идентифицировать интересующую вариантную последовательность нуклеотидов, осуществляли выбор TCR на основании относительного обогащения путем определения обогащения вариантом выбранной как положительная (положительной по маркерной молекуле) популяции репортерных клеток и выбранной как отрицательная (отрицательной по маркерной молекуле) популяции репортерных клеток, что определяли по количеству прочтений варианта в обеих популяциях клеток.

ПРИМЕР 11

[0575] В данном примере описан способ скрининга для идентификации функционального варианта CAR из комбинаторной библиотеки последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих варианты доменов белка CAR.

[0576] Для того чтобы определить дизайн CAR с оптимальными функциональными свойствами, домены молекулы CAR можно собрать комбинаторным способом. Молекула CAR состоит из (i) связывающего антиген домена, (ii) шарнирного домена, (iii) трансмембранного домена и (iv) внутриклеточного сигнального домена (обычно состоящего из 2 – 3 сигнальных модулей), которые образуют синтетическую молекулу длиной приблизительно 1,5 т.п.н. Библиотеку вариантов CAR можно ввести в репортерные клетки, и посредством стимуляции экспрессирующими антиген клетками можно осуществить селекцию репортерных клеток, экспрессирующих вариант CAR, приводящий к желательному фенотипу активации, путем генетического скрининга. Учитывая комбинаторную сборку нескольких доменов молекулы, каждый вариант можно однозначно идентифицировать лишь путем определения последовательности всех вариабельных частей молекулы. Следовательно, трансгены, кодируемые репортерными клетками, выделенными в процессе генетического скрининга, получали в виде ампликонов ПЦР длиной приблизительно 1,5 т.п.н., секвенировали по всей длине, применяя секвенирование Oxford Nanopore, и анализировали с применением приспособленного под требования заказчика конвейера биоинформационного анализа.

[0577] Данный процесс позволяет идентифицировать лидирующие CAR, которые затем можно оценить с точки зрения потенциального терапевтического применения, например, при раке.

1. *Создание библиотеки вариантных последовательностей нуклеотидов*

[0578] Библиотеку вариантов CAR получали путем комбинаторной сборки нескольких доменов белка CAR: 2 шарнирных доменов, 12 трансмембранных доменов и 13 сигнальных доменов (причем в каждый вариант входило 3 сигнальных домена), - что приводило к созданию библиотеки с более чем 50000 вариантов белков. Для того чтобы однозначно идентифицировать любой данный вариант CAR, можно секвенировать ампликон ПЦР длиной 1,3 т.п.н.

2. *Введение указанной библиотеки вариантных последовательностей нуклеотидов в репортерную клетку*

[0579] Библиотекой вариантов CAR, описанной на этапе 1, трансфицировали продуцирующие вирус клетки Phoenix-ampho или клетки 293T с получением ретро- или лентивируса, соответственно, кодирующего все варианты CAR, присутствующие в библиотеке. Вирус впоследствии применяли для трансдукции иммортализованных Т-клеток Jurkat или активированных *in vitro* первичных Т-клеток человека. Библиотекой вариантов CAR также кодировались маркер поверхности клетки и/или маркер селекции антибиотиком, которые позволяли селекцию трансдуцированных репортерных Т-клеток, экспрессирующих пул вариантов CAR.

3. *Селекция репортерных клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства*

[0580] Поликлональную смесь репортерных Т-клеток, экспрессирующих библиотеку вариантов CAR, метили красителем пролиферации клеток, высевали при низкой плотности и совместно культивировали с антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими лиганд, распознаваемый связывающими антиген доменом CAR. Использовали такое количество репортерных Т-клеток, что все варианты CAR были представлены со средним покрытием, составляющим по меньшей мере 100. Затем собирали совместные культуры и проводили сортировку с помощью проточной цитометрии на

основании Т-клеток, которые поделились по меньшей мере один раз или не поделились. Данные соответствующие ‘верхние’ и ‘нижние’ популяции собирали и дополнительно анализировали. Для сортировки на основе проточной цитометрии отвечающих и неотвечающих Т-клеток можно использовать другие маркеры активации, такие как CD69, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α и GM-CSF, либо отдельно, либо в комбинации. Кроме того, для селекции отвечающих и неотвечающих Т-клеток можно использовать различные репортеры активности факторов транскрипции (NF-κB, NFAT, AP-1), репортеры передачи сигналов (фосфорилирование ZAP70, ERK1/2) или репортеры цитотоксичности (экспрессия CD107A).

4. *Выделение вариантных последовательностей нуклеотидов из прошедших селекцию репортерных клеток*

[0581] Из прошедших селекцию экспрессирующих вариант CAR репортерных Т-клеток выделяли геномную ДНК и проводили амплификацию методом ПЦР ретро- или лентивирусных вставок, кодирующих CAR. Праймеры для ПЦР связывались с неизменяющейся областью вставки CAR и приводили к получению ампликона размером в среднем приблизительно 1300 оснований.

[0582] В качестве альтернативы, можно использовать аналогичный подход на основе уникальных молекулярных идентификаторов (UMI). Использовали достаточное количество геномной ДНК, чтобы представить все варианты CAR со средним покрытием, составляющим по меньшей мере 100. Количество циклов ПЦР минимизировали, чтобы предотвратить смещение амплификации в сторону специфических вариантов CAR, но чтобы обеспечить среднее покрытие, составляющее по меньшей мере 10000 для каждого CAR, представленного в библиотеке. Амплификацию вариантов CAR из геномной ДНК проводили как для отвечающих, так и для неотвечающих репортерных Т-клеток (верхних и нижних образцов).

5. *Определить по меньшей мере 600 п.о. из полноразмерной последовательности нуклеотидов из выделенных вариантных последовательностей нуклеотидов*

[0583] Амплифицированные последовательности CAR дополнительно обрабатывали для секвенирования Oxford Nanopore. В первой реакции ПЦР использовали праймеры с пришитым концевым олигонуклеотидом. Они содержали новый сайт

связывания для второй ПЦР со штрихкодированными внешними праймерами, модифицированными с помощью химии быстрого присоединения. Использовали различные штрихкоды для реакций ПЦР с верхними и нижними образцами. На всех этапах, амплификация с помощью ПЦР минимизирована, чтобы предотвратить смещение амплификации в сторону специфических вариантов CAR. Тем не менее, используют достаточное количество продукта ПЦР, чтобы представить все варианты CAR со средним покрытием, составляющим по меньшей мере 10000.

[0584] Штрихкодированные продукты ПЦР из верхних и нижних образцов объединяли в эквимолярных соотношениях, и на последнем этапе лигировали с этим пулом адаптеры для быстрого секвенирования 1D, чтобы получить препарат библиотеки, который готов для секвенирования. Эту библиотеку загружали в проточную кювету R9.4.1 Oxford Nanopore и секвенировали до среднего покрытия, составляющего по меньшей мере 100 прочтений для каждого CAR, кодируемого в библиотеке.

[0585] Для биоинформационного анализа применяли программное обеспечение Guppy Oxford Nanopore. Прочтения последовательности получали из необработанных данных, применяя guppy_basecaller. Образцы демультиплексировали, применяя guppy_barcoder. Прочтения последовательностей выравнивали с референсом, состоящим из отдельных вариантных последовательностей CAR, применяя guppy_aligner, и идентичность вариантов CAR для каждого прочтения получали из полученных файлов выравнивания в формате bam. На последнем этапе, рассчитывали частоту встречаемости каждого варианта CAR и использовали для дальнейшего анализа. В качестве возможного варианта обхода смещения амплификации при реакциях ПЦР, можно применять подсчет вариантов CAR на основе UMI.

6. *Выбор по меньшей мере одной интересующей вариантной последовательности нуклеотидов*

[0586] Для того чтобы идентифицировать интересующую вариантную последовательность нуклеотидов, осуществляли селекцию CAR на основании относительного обогащения путем определения обогащения вариантом выбранной как положительная (положительной по маркерной молекуле) популяции репортерных клеток и выбранной как отрицательная (отрицательной по маркерной молекуле) популяции

репортерных клеток, что определяли по количеству прочтений варианта в обеих популяциях клеток.

ПРИМЕР 12

[0587] В данном примере описан расчет количества клеток, которые подвергали скринингу с помощью представленных в настоящей заявке способов скрининга, описанных в Примерах 10 и 11.

[0588] Для комбинаторной библиотеки размером 100 комбинаций, можно достичь 100x покрытия путем получения 10000 клеток при положительной селекции отвечающих клеток и получения 10000 отрицательно отвечающих клеток. Таким образом, популяция клеток перед селекцией может быть более 20000.

[0589] Для комбинаторной библиотеки размером 1000 комбинаций, можно достичь 100x покрытия путем получения 100000 клеток при положительной селекции отвечающих клеток и получения 100000 отрицательно отвечающих клеток. Таким образом, популяция клеток перед селекцией может быть более 200000.

[0590] Для комбинаторной библиотеки размером $1x10^9$ комбинаций, можно достичь 100x покрытия путем получения $1x10^{11}$ клеток при положительной селекции отвечающих клеток и получения $1x10^{11}$ отрицательно отвечающих клеток. Таким образом, популяция клеток перед селекцией может быть более $2x10^{11}$.

ПРИМЕР 13

[0591] В данном примере описано получение специфических к неоантигену последовательностей Т-клеточного рецептора из опухолей способного к репарации ошибочного образования пары нуклеотидов колоректального рака (MMRp-KPP) (Фиг. 10A).

[0592] ДНК и РНК выделяли из четырех свежезамороженных образцов опухоли MMRp-KPP и использовали следующими двумя способами.

[0593] Во-первых, ДНК и/или РНК использовали для проведения секвенирования всех цепей TCRα и TCRβ (проводили в MiLaboratory; Москва, Россия). Полученную в результате этого совокупность последовательностей цепей TCR разделяли на совокупность последовательностей TCRα-цепей и совокупность последовательностей

TCRβ-цепей, что приводило к получению совокупностей из приблизительно 10000 – 30000 TCRα- и TCRβ-цепей на образец (Фиг. 10B и 11A).

[0594] На ФИГ. 10B и ФИГ. 11A представлено секвенирование всех TCR инфильтрирующих лимфоцитов в образцах опухоли человека. Проводили секвенирование всех TCR в четырех образцах опухоли человека MMRp-KPP в Milaboratory. После выравнивания и идентификации TCR, их объединяли в клонотипы на основании последовательности аминокислот их CDR3 и идентичности их V и J. Количество уникальных клонотипов представлено как для альфа-, так и для бета-цепей для каждого образца опухоли.

[0595] Любые непродуктивные последовательности цепей TCR, в которых фрагменты TCR (также известные как элементы гена TCR) соединены не в рамке считывания на уровне последовательностей аминокислот, и/или в которые введены стоп-кодоны, и/или в которых присутствуют мутации со сдвигом рамки считывания, и/или в которых присутствуют дефектные сайты сплайсинга, удаляли из совокупности. Каждую совокупность сортировали в порядке убывания, используя либо количество прочтений, либо количества уникальных молекулярных идентификаторов (UMI) молекул нуклеиновых кислот, кодирующих определенную цепь TCR (или соответствующий процент от всех TCRα- или TCRβ-цепей, соответственно) с получением порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ.

[0596] Верхние 100 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ выбирали для создания библиотеки TCR (осуществленного в Twist Bioscience; Сан-Франциско, США). Вкратце, выбранные цепи TCRα и TCRβ получали в виде фрагментов путем синтеза ДНК. Для создания библиотеки все выбранные фрагменты TCRα и TCRβ комбинаторно соединяли в непрерывные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие кассеты TCRβ-P2A-TCRα (Фиг. 11B. Схематическое представление плазмиды экспрессии TCR. Ретровирусную конструкцию, содержащую как бета-, так и альфа-цепи TCR, а также маркер селекции бластицидином, можно использовать в качестве каркаса для создания библиотеки). Ретровирусная трансдукция с применением данной конструкции в конечном счете приводит к экспрессии единого транскрипта, что приводит к трансляции TCR-бета и -альфа цепей, а также маркера устойчивости к бластицидину, благодаря расщеплению пептида в сайтах 2A. Можно присоединить один TCRβ- и TCRα-фрагмент на кассету в

формате TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к бластицидину (Фиг. 11B) (SEQ ID NO: 4) (ФИГ. 43). Полученные в результате этого библиотеки TCR, как правило, содержали 10000 вариантов TCR без выпадающих значений в очень узком диапазоне частот встречаемости (Фиг. 10C; Фиг. 11C и 11D). Контроль качества библиотек 100 x 100. 100 наиболее часто встречающихся альфа- и бета-цепей для каждого образца из 11A) выбирали и использовали для создания комбинаторной библиотеки. Области TCR-бета и TCR-альфа из 11B) синтезировали и встраивали в вектор из 11B) в подходе комбинаторного клонирования, осуществленного в Twist Bioscience. Пару праймеров, фланкирующих вариабельные домены TCR-альфа- и бета-цепей, использовали для амплификации обеих цепей, и нанопоровое секвенирование применяли для определения идентичности обеих цепей.

[0597] Представленность каждой из 10000 комбинаций альфа x бета была представлена для библиотеки из каждого пациента (Фиг. 11D). Характеристики представленности TCR в библиотеках из пациента. Для каждой библиотеки из пациента в 11C) представлены диапазон количеств прочтений на TCR, среднее покрытие и процент TCR, которые находятся в пределах диапазона медианы +/- ^{2}log-единица. Во-вторых, поученные из опухоли, а также из здоровой ткани ДНК и РНК использовали для определения группы опухолеспецифических мутаций, применяя полноэкзомное секвенирование (WES) и секвенирование РНК, чтобы установить группу экспрессированных мутированных генов. Конвейер для идентификации и выбора опухолеспецифических мутаций может предоставить возможные варианты. Способы определения таких мутаций на основании WES и секвенирования РНК были описаны ранее и известны специалисту в данной области техники. Затем получали конструкции последовательно расположенных минигенов (TMG), которые кодируют множество происходящих из опухоли мутированных пептидов в виде тандемных массивов. Конструкции TMG кодируют 12 отдельных мутаций опухоли в виде минигенов 25-мерных полипептидов, которые были соединены и содержали сигнальный и трансмембранный домены LAMP-1 (например, как описано в Gros et. Nat Med 2016; за исключением pt4) и маркер устойчивости к пуромицину, слитый с цитоплазматическим доменом LAMP-1 с применением 2A-элемента. Для Pt4 использовали дизайны последовательно расположенных минигенов, кодирующих 33 или 34 различных соединенных минигенов без сигнального и трансмембранного доменов LAMP-1, но содержащих маркер устойчивости к

пуромицину. Параллельно, соответствующую аутологическую кровь из указанного пациента с MMRp-KPP использовали для получения иммортализованных B-клеток. Иммортализация B-клеток человека с помощью EBV известна квалифицированному специалисту (например, Traggiai et al Method Mol Biol 2012). Иммортализованные аутологические B-клетки использовали для получения экспрессирующих антиген B-клеток путем ретровирусной трансдукции кодирующими TMG вирусными частицами. Протоколы ретровирусной трансдукции первичных B-клеток человека генами, отличными от TMG, были описаны в литературе (например, Kwakkenbos et al. Nat Med 2010) и известны квалифицированному специалисту. Можно осуществить селекцию трансдуцированных TMG B-клеток на основании устойчивости к пуромицину. Процесс селекции пуромицином известен квалифицированному специалисту. Библиотекой TCR трансфицировали продуцирующие вирус клетки Phoenix-Ampho (ATCC CRL-3213), используя трансфицирующий реагент Fugene и протоколы, известные квалифицированному специалисту. Полученные в результате этого ретровирусные вирионы применяли для трансдукции линии репортерных T-клеток Jurkat. В линии репортерных T-клеток Jurkat отсутствует эндогенная экспрессия TCR (получение такого генетического нокаута было описано, например, в Mezzadra et al Nature 2017), и она модифицирована для экспрессии CD8α и CD8β человека после трансдукции трансгеном CD8α-P2A-CD8β (SEQ ID NO: 2) с применением способов, известных квалифицированному специалисту. Репортерные T-клетки Jurkat трансдуцировали библиотеками TCR, что приводило к получению 10 - 60% модифицированных TCR T-клеток из всех живых T-клеток (Фиг. 10D). Использование мышиных последовательностей константного домена TCR в библиотеке TCR позволило обнаружить модифицированные TCR T-клетки Jurkat с помощью проточной цитометрии с применением антитела, специфического к мышиному константному домену TCRβ. Проводили положительную селекцию T-клеток Jurkat, модифицированных для экспрессии трансгена TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к бластицидину, до высокой чистоты путем добавления бластицидина в среды для культивирования клеток (Фиг. 10D). Селекция антибиотиком генетически модифицированных клеток известна специалисту со средней квалификацией в данной области техники.

[0598] Затем трансдуцированные TCR T-клетки Jurkat стимулировали путем совместного культивирования с трансдуцированными TMG B-клетками. За три дня до

совместного культивирования репортерные Т-клетки Jurkat высевали при низкой плотности (0,1 x 10^6 клеток на мл). Все В-клетки, экспрессирующие различные TMG, смешивали в равном соотношении (1:1). 90x10^6 объединенных в пул В-клеток (или контрольных В-клеток, в которых отсутствует экспрессия TMG) смешивали с 90x10^6 репортерных Т-клеток Jurkat (соотношение 1:1) в общем объеме среды 72 мл. 200 мкл (0,5 x 10^6 клеток на лунку) данной смеси распределяли по ~360 лункам обработанных ТС 96-луночных планшетов с U-образным дном лунок. Планшеты центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 минуты и инкубировали в течение 20 - 22 часов при 37°C.

[0599] Затем совместные культуры собирали и окрашивали мечеными флуорохромом антителами против CD20 и CD69. Затем клетки фиксировали с применением фиксирующего буфера, содержащего 4% формальдегид. Применяя устройство для сортировки клеток методом проточной цитометрии ARIAFusion от BD Biosciences, сортировали следующие популяции для каждого условия стимуляции (Фиг. 10E):

[0600] Лимфоцит, отдельные клетки, $CD20^-$, $CD69^{hi}$ ($CD69^{hi}$ включали 10 - 15% отдельных, $CD20^-$ клеток с наиболее высоким сигналом на основании сигнала флуоресценции CD69)

[0601] Лимфоцит, отдельные клетки, $CD20^-$, $CD69^{lo}$ ($CD69^{lo}$ включали 10 - 15% отдельных, $CD20^-$ клеток на основании низкого сигнала флуоресценции CD69)

[0602] Геномную ДНК выделяли из сортированных трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat и использовали в качестве матрицы для множества раундов ПЦР с ограниченным количеством циклов, чтобы амплифицировать часть кассеты TCRβ-P2A-TCRα, применяя способы ПЦР, известные квалифицированному специалисту. Размер полученного в результате этого продукта ПЦР составлял приблизительно 1,5 т.п.н. (Фиг. 10F), и продукт секвенировали с применением секвенирующего устройства MinIon Oxford Nanopore или GridIon. Всю процедуру скрининга до этого момента осуществляли с минимальным покрытием 100x, и для трех повторов в контексте экспрессии TMG, и для трех повторов в отсутствие экспрессии TMG. Идентифицировали альфа- и бета-цепи TCR, и дифференциально экспрессированные комбинации TCR идентифицировали, применяя пакет DESeq2 R. Средние Rlog-преобразованные количества прочтений в присутствии и отсутствие экспрессии TMG в В-клетках можно использовать для изображения

лидирующих неоантигенреактивных TCR. Лидирующие неоантигенреактивные TCR изображены в виде обведенных более крупных черных точек (Фиг. 10G).

[0603] Для того чтобы осуществить деконволюцию TMG, распознанных лидирующими TCR, библиотеки TCR подвергали скринингу, применяя B-клетки, экспрессирующие единую конструкцию TMG (вместо смеси экспрессирующих TMG B-клеток), в одном повторе (Фиг. 10H). Затем, чтобы точно определить неоантиген, который распознается лидирующим TCR, использовали B-клетки, нагруженные единым 25-мером пептидов, которые кодируются TMG (Фиг. 10I и 10J). Точный неоантиген, который распознается лидирующим TCR, определяли, применяя B-клетки, экспрессирующие отдельные минигены, которые кодируются в TMG (Фиг. 10K и 10L).

[0604] В целом, в данном примере показали, что описанная платформа может успешно идентифицировать специфические к неоантигену TCR из свежезамороженного материала опухоли.

ПРИМЕР 14

[0605] В данном примере описано получение последовательностей TCR из образцов опухоли меланомы для создания специфических для пациента библиотек TCRαβ (Фиг. 12A - 12C).

[0606] ДНК и РНК выделяли из двух свежезамороженных образцов опухоли меланомы и использовали следующими двумя способами.

[0607] Во-первых, ДНК и/или РНК использовали для проведения секвенирования всех цепей TCRα и TCRβ (проводили в MiLaboratory; Москва, Россия) инфильтрирующих лимфоцитов в образцах опухоли. Полученную в результате этого совокупность последовательностей цепей TCR разделяли на совокупность последовательностей TCRα-цепей и совокупность последовательностей TCRβ-цепей, что приводило к получению совокупностей из приблизительно 5000 – 10000 TCRα- и TCRβ-цепей на образец (Фиг. 12A). Проводили секвенирование всех TCR в двух образцах опухоли меланомы человека в Milaboratory. После выравнивания и идентификации TCR, их объединяли в клонотипы на основании последовательности аминокислот их CDR3 и идентичности их V и J. Количество уникальных клонотипов представлено как для альфа-, так и для бета-цепей для каждого образца опухоли.

[0608] Любые непродуктивные последовательности цепей TCR, в которых фрагменты TCR (также известные как элементы гена TCR) соединены не в рамке считывания на уровне последовательностей аминокислот, и/или в которые введены стоп-кодоны, и/или в которых присутствуют мутации со сдвигом рамки считывания, и/или в которых присутствуют дефектные сайты сплайсинга, удаляли из совокупности. Каждую совокупность сортировали в порядке убывания, используя либо количество прочтений, либо количества уникальных молекулярных идентификаторов (UMI) молекул нуклеиновых кислот, кодирующих определенную цепь TCR (или соответствующий процент от всех TCRα- или TCRβ-цепей, соответственно) с получением порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ. Выбирали верхние 100 наиболее часто встречающихся цепей TCRα и TCRβ для получения библиотеки TCR (проводили в Twist Bioscience; Сан-Франциско, США). Вкратце, выбранные цепи TCRα и TCRβ получали в виде фрагментов путем синтеза ДНК. Для создания библиотеки все выбранные фрагменты TCRα и TCRβ комбинаторно соединяли в непрерывные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие кассеты TCRβ-P2A-TCRα (Фиг. 11B. Схематическое представление плазмиды экспрессии TCR. Ретровирусную конструкцию, содержащую как бета-, так и альфа-цепи TCR, а также маркер селекции бластицидином, можно использовать в качестве каркаса для создания библиотеки. Ретровирусная трансдукция с применением данной конструкции в конечном счете приводила к экспрессии единого транскрипта, что приводило к трансляции бета- и альфа-цепей TCR, а также маркера устойчивости к бластицидину, благодаря расщеплению пептида в сайтах 2A). Можно присоединить один TCRβ- и TCRα-фрагмент на кассету в формате TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к бластицидину (Фиг. 11B) (SEQ ID NO: 4). Полученные в результате этого библиотеки TCR, как правило, будут содержать 10000 вариантов TCR без выпадающих значений в очень узком диапазоне частот встречаемости (Фиг. 12B). Контроль качества библиотек 100 x 100. Можно выбрать 100 наиболее часто встречающихся альфа- и бета-цепей для каждого образца из 12A) и использовать их для создания комбинаторной библиотеки. Области TCR-бета и TCR-альфа из 12A) можно синтезировать и встроить в вектор из 11B) в подходе комбинаторного клонирования, осуществленного в Twist Bioscience. Пару праймеров, фланкирующих вариабельные домены TCR-альфа- и бета-цепей, можно применять для амплификации обеих цепей, и нанопоровое секвенирование применяли для определения идентичности обеих цепей.

Показана представленность каждой из 10000 комбинаций альфа x бета для библиотеки из каждого пациента. 12C) Характеристики представленности TCR в библиотеках из пациента. Для каждой библиотеки из пациента в 12B) представлены диапазон количеств прочтений на TCR, среднее покрытие и процент TCR, которые находятся в пределах диапазона медианы +/- ^{2}log-единица.

[0609] В целом, в данном примере показали, что комбинаторные библиотеки TCR можно синтезировать и клонировать на основании секвенирования всех TCR.

ПРИМЕР 15

[0610] В данном примере описано получение антигенспецифических TCR из библиотеки TCR, полученной путем смешивания плазмид TCR.

[0611] Библиотеку TCR получали путем смешивания 6 плазмид, каждая из которых кодировала один охарактеризованный TCR, с 24 плазмидами, каждая из которых кодировала один неохарактеризованный TCR (Фиг. 13A). Дизайн плазмиды экспрессии TCR представлен на ФИГ. 15A. Указанной библиотекой TCR трансфицировали продуцирующие вирус клетки Phoenix-Ampho (ATCC CRL-3213), используя трансфицирующий реагент Fugene и протоколы, известные квалифицированному специалисту. Полученные в результате этого ретровирусные вирионы применяли для трансдукции линии репортерных Т-клеток Jurkat. В линии репортерных Т-клеток Jurkat отсутствует эндогенная экспрессия TCR (получение такого генетического нокаута было описано, например, в Mezzadra et al Nature 2017), и она модифицирована для экспрессии CD8α и CD8β человека после трансдукции трансгеном CD8α-P2A-CD8β (SEQ ID NO: 2) с применением способов, известных квалифицированному специалисту. Репортерные Т-клетки Jurkat трансдуцировали библиотекой TCR, что приводило к 80% модифицированных TCR Т-клеток из всех живых Т-клеток. Использование мышиных последовательностей константного домена TCR в библиотеке TCR (Фиг. 15A) позволяло обнаружение модифицированных TCR Т-клеток Jurkat с помощью проточной цитометрии с применением антитела, специфического к мышиному константному домену TCRβ. Проводили положительную селекцию Т-клеток Jurkat, модифицированных для экспрессии трансгена TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину, до высокой чистоты путем добавления пуромицина в среды для культивирования клеток (Фиг. 13B). Селекция

антибиотиком генетически модифицированных клеток известна специалисту со средней квалификацией в данной области техники.

[0612] Затем трансдуцированные TCR Т-клетки Jurkat стимулировали путем совместного культивирования с трансдуцированными TMG В-клетками. За три дня до совместного культивирования репортерные Т-клетки Jurkat высевали при низкой плотности (0,1 x 10^6 клеток на мл). 90x10^6 объединенных в пул В-клеток, экспрессирующих TMG (или контрольных В-клеток, в которых отсутствует экспрессия TMG) смешивали с 90x10^6 репортерных Т-клеток Jurkat (соотношение 1:1) в общем объеме среды 72 мл. 200 мкл (0,5 x 10^6 клеток на лунку) данной смеси распределяли по ~360 лункам обработанных ТС 96-луночных планшетов с U-образным дном лунок. Планшеты центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 минуты и инкубировали в течение 20 - 22 часов при 37°C.

[0613] Затем совместные культуры собирали и окрашивали мечеными флуорохромом антителами против CD20 и CD69. Затем клетки фиксировали с применением фиксирующего буфера, содержащего 4% формальдегид. Применяя устройство для сортировки клеток методом проточной цитометрии ARIAFusion от BD Biosciences, сортировали следующие популяции для каждого условия стимуляции (Фиг. 13C):

1. Лимфоцит, отдельные клетки, $CD20^-$, $CD69^{hi}$ ($CD69^{hi}$ включали 10 - 15% отдельных, $CD20^-$ клеток с наиболее высоким сигналом на основании сигнала флуоресценции CD69)
2. Лимфоцит, отдельные клетки, $CD20^-$, $CD69^{lo}$ ($CD69^{lo}$ включали 10 - 15% отдельных, $CD20^-$ клеток на основании низкого сигнала флуоресценции CD69)

[0614] Геномную ДНК выделяли из сортированных трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat и использовали в качестве матрицы для множества раундов ПЦР с ограниченным количеством циклов, чтобы амплифицировать часть кассеты TCRβ-P2A-TCRα, применяя способы ПЦР, известные квалифицированному специалисту. Размер полученного в результате этого продукта ПЦР составлял приблизительно 1,5 т.п.н. (Фиг. 13D), и его можно было секвенировать с применением секвенирующего устройства MinIon Oxford Nanopore или GridIon, применяя методики, известные специалисту в данной области техники. TCR идентифицировали, применяя методики выравнивания, известные квалифицированному специалисту, и для каждого TCR log2-преобразованная кратность обогащения нормированных количеств прочтений в верхних образцах относительно

нижних представлена как функция log10-преобразованной частоты встречаемости TCR (Фиг. 13E; один повтор в контексте экспрессии TMG; один повтор в отсутствие экспрессии TMG).

[0615] В целом, в данном примере показали, что антигенреактивный TCR можно выделить из смеси плазмид TCR.

ПРИМЕР 16

[0616] В данном примере описано получение антигенспецифических TCR из библиотеки TCR, полученной путем синтеза генов.

[0617] Пять охарактеризованных TCR с известной антигенной реактивностью, а также 45 или 95 неохарактеризованных TCR (для библиотек 50 x 50 и 100 x 100, соответственно; Фиг. 14A) выбирали для создания библиотеки TCR (проводили в Twist Bioscience; Сан-Франциско, США). Вкратце, цепи TCRα и TCRβ из указанных TCR синтезировали в виде фрагментов путем синтеза ДНК. Для создания библиотеки все выбранные фрагменты TCRα и TCRβ комбинаторно соединяли в непрерывные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие кассеты TCRβ-P2A-TCRα (SEQ ID 1). Ретровирусную конструкцию, содержащую как бета-, так и альфа-цепи TCR, а также маркер селекции пуромицином, использовали в качестве каркаса для создания библиотеки. Ретровирусная трансдукция с применением данной конструкции в конечном счете приводила к экспрессии единого транскрипта, что приводило к трансляции бета- и альфа-цепей TCR, а также маркера устойчивости к пуромицину, благодаря расщеплению пептида в сайтах 2A. Один TCRβ- и TCRα-фрагмент на кассету были соединены в формате TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину (SEQ ID NO: 1). Области TCR-бета и TCR-альфа каждого из 50 или 100 TCR синтезировали и встраивали в указанный вектор в подходе комбинаторного клонирования, осуществленного в Twist Bioscience.

[0618] Библиотекой 50 x 50 трансфицировали продуцирующие вирус клетки Phoenix-Ampho (ATCC CRL-3213), используя трансфицирующий реагент Fugene и протоколы, известные квалифицированному специалисту. Полученные в результате этого ретровирусные вирионы применяли для трансдукции линии репортерных Т-клеток Jurkat. Репортерная Т-клетка Jurkat модифицирована для экспрессии CD8α и CD8β человека после трансдукции трансгеном CD8α-P2A-CD8β (SEQ ID NO: 2) с применением способов,

известных квалифицированному специалисту. Репортерные Т-клетки Jurkat трансдуцировали библиотекой TCR, что приводило к получению 15% модифицированных TCR Т-клеток из всех живых Т-клеток (на основании окрашивания через 4 дня после трансдукции – после селекции пуромицином и в день анализа чистота составляла > 60%). Использование мышиных последовательностей константного домена TCR в библиотеке TCR (SEQ ID NO: 1) позволяло обнаружение модифицированных TCR Т-клеток Jurkat с помощью проточной цитометрии с применением антитела, специфического к мышиному константному домену TCRβ. Проводили положительную селекцию Т-клеток Jurkat, модифицированных для экспрессии трансгена TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину, до высокой чистоты путем добавления пуромицина в среды для культивирования клеток. Селекция антибиотиком генетически модифицированных клеток известна специалисту со средней квалификацией в данной области техники.

[0619] Затем трансдуцированные TCR Т-клетки Jurkat стимулировали с помощью АПК, которые были сконструированы, чтобы презентировать антигены различными способами. АПК включали клетки JY, нагруженные пептидом, смесь линий клеток EBV-LCL, каждая из которых экспрессирует отличный миниген, клетки EBV-LCL, экспрессирующие TMG, и EBV-LCL, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии специфических антигенов. За три дня до совместного культивирования репортерные Т-клетки Jurkat высевали при низкой плотности (0,1 x 10^6 клеток на мл). АПК смешивали с репортерными Т-клетками Jurkat в соотношении 1:1 при концентрации 2,5x10^6 клеток на мл. 200 мкл (0,5x10^6 клеток на лунку) распределяли по ~40 лункам обработанного ТС 96-луночного планшета с U-образным дном лунок. Планшеты центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 минуты и инкубировали в течение 20 - 22 часов при 37°C.

[0620] Затем совместные культуры собирали и окрашивали мечеными флуорохромом антителами против CD8, CD20 и CD69. Применяя устройство для сортировки клеток методом проточной цитометрии ARIAFusion от BD Biosciences, сортировали следующие популяции для каждого условия стимуляции (Фиг. 14B):

1. Лимфоцит, отдельные клетки, живые клетки, $CD20^-$, $CD8^+$, $CD69^{hi}$ ($CD69^{hi}$ включали 10 - 15% отдельных, живых, $CD20^-$, $CD8^+$ клеток с наиболее высоким сигналом на основании сигнала флуоресценции CD69)

2. Лимфоцит, отдельные клетки, живые клетки, $CD20^-$, $CD8^+$, $CD69^{lo}$ ($CD69^{lo}$ включает 10 - 15% отдельных, живых, $CD20^-$, $CD8^+$ клеток на основании низкого сигнала флуоресценции CD69)

[0621] Геномную ДНК выделяли из сортированных трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat и использовали в качестве матрицы для множества раундов ПЦР с ограниченным количеством циклов, чтобы амплифицировать часть кассеты TCRβ-P2A-TCRα, применяя способы ПЦР, известные квалифицированному специалисту. Полученный в результате этого продукт ПЦР имел длину приблизительно 1,5 т.п.н. (Фиг. 14C), и его секвенировали с помощью секвенирующих устройств MinIon Oxford Nanopore, применяя методики, известные специалисту в данной области техники. TCR идентифицировали, применяя методики выравнивания, известные квалифицированному специалисту, и для каждого TCR кратность обогащения нормированных количеств прочтений в верхних образцах относительно нижних (ось y) представляли как функцию средней представленности TCR (ось x; Фиг. 14D). 14D; один повтор для каждого условия в присутствии экзогенного антигена; один повтор - в отсутствие экспрессии экзогенных антигенов). Идентифицировали комбинации TCR, которыми был обогащен ‘верхний’ образец относительно ‘нижнего’, применяя пакет DESeq2 R, как описано, с применением линейной модели с допущением, что обогащенный TCR определяли как обогащенный в ‘верхнем’ образце, где презентированы антигены, и обедненный в ‘нижнем’ образце, где презентированы антигены, по сравнению как с ‘верхним’, так и с ‘нижним’ образцами, где не презентированы антигены. Представлена идентичность альфа- и бета-цепей TCR, а также ключевые статистические показатели (Фиг. 14E).

[0622] Скрининг библиотеки 100 x 100 проводили способом, аналогичным скринингу 50 x 50, за исключением того, что репортерные Т-клетки Jurkat были сконструированы таким образом, чтобы у них отсутствовала эндогенная экспрессия TCR и присутствовала экзогенная экспрессия CD8α и CD8β человека. В противоположность скринингу библиотеки 50x50, осуществляли три повтора скрининга в контексте экспрессирующих TMG В-клеток, и один повтор в контексте В-клеток, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии TMG. Репортерные Т-клетки Jurkat трансдуцировали библиотекой TCR, что приводило к получению 14% модифицированных TCR Т-клеток из всех живых Т-клеток. Rlog-преобразованные количества прочтений

рассчитывали, применяя пакет DESeq2 R, и среднее Rlog-значение для каждого TCR по всем повторам для нижних образцов вычитали из среднего Rlog-значения для каждого TCR по всем повторам для верхних образцов и представляли для совместных культур, которые вели в присутствии (ось x) и отсутствие (ось y) экспрессии TMG B-клетками (Фиг. 14F). 5 добавленных охарактеризованных TCR изображены в виде обведенных более крупных черных точек. Статистику Вальда использовали в качестве статистического показателя для графика сортировки меры вероятности (Фиг. 14G).

[0623] В целом, в данном примере показали, что можно провести скрининг комбинаторных библиотек дизайна 50 x 50 и 100 x 100, чтобы определить антигенреактивные TCR.

ПРИМЕР 17

[0624] В данном примере описано создание репертуара TCR путем применения синтеза генов.

[0625] Выбирали пять охарактеризованных TCR с известной антигенной реактивностью, а также 95 неохарактеризованных TCR для получения библиотеки TCR (проводили в Twist Bioscience; Сан-Франциско, США). Вкратце, выбранные цепи TCRα и TCRβ получали в виде фрагментов путем синтеза ДНК. Для создания библиотеки все выбранные фрагменты TCRα и TCRβ комбинаторно соединяли в непрерывные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие кассеты TCRβ-P2A-TCRα (SEQ ID NO: 1; ретровирусную конструкцию, содержащую как бета-, так и альфа-цепи TCR, а также маркер селекции пуромицином, можно использовать в качестве каркаса для создания библиотеки. Ретровирусная трансдукция с применением данной конструкции в конечном счете приводила к экспрессии единого транскрипта, что приводило к трансляции бета- и альфа-цепей TCR, а также маркера устойчивости к пуромицину, благодаря расщеплению пептида в сайтах 2A). Можно присоединить один TCRβ- и TCRα-фрагмент на кассету в формате TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину (SEQ ID NO: 1; Фиг. 15A). Пару праймеров, фланкирующих вариабельные домены TCR-альфа- и бета-цепей, можно применять для амплификации обеих цепей, и нанопоровое секвенирование применяли для определения идентичности обеих цепей. Идентификация цепей TCR известна специалисту в данной области техники. Показана представленность каждой из 10000 комбинаций альфа

х бета для библиотеки 100 х 100. Полученная в результате этого библиотека TCR содержала все 10000 вариантов TCR без выпадающих значений в очень узком диапазоне частот встречаемости (Фиг. 15B).

[0626] Предусмотрены альтернативные способы составления комбинаторных библиотек, в которых библиотеку большей сложности можно создать с помощью множества перекрывающихся или неперекрывающихся комбинаторных подбиблиотек, которые в совокупности, но не отдельно представляют все комбинации TCR, присутствие которых необходимо в смешанной библиотеке (Фиг. 15C). В качестве альтернативы, сложность библиотек можно уменьшить путем создания большей библиотеки из меньших комбинаторных подбиблиотек таким образом, что в смешанной библиотеке представлены не все возможные комбинации всех альфа- и всех бета-цепей. Используя информацию об образовании пар, или информацию о вероятности образования пар, специалист в данной области может разработать комбинаторные подбиблиотеки таким образом, что все спаренные цепи, или цепи, которые вероятно составят пару, содержатся внутри одной из комбинаторных подбиблиотек (Фиг. 15D).

[0627] На ФИГ. 15E изображена идентификация комбинаций TCR, которые представлены в двух библиотеках TCR 200 х 200, созданных путем синтеза четырех библиотек 100 х 100 и их смешивания в соотношении 1:1:1:1. Встречаемость каждой возможной комбинации TCR (ось х) представлена в виде ее плотности (ось у). Количество комбинаций TCR, которые попадают в диапазон медиана +/- одна log2-единица, составляет 92% и 88%, соответственно. Принцип создания библиотеки 200 х 200 путем смешивания четырех библиотек 100 х 100 в соотношениях 1:1:1:1, представленный на ФИГ. 15C), исследовали для библиотек из двух пациентов (ФИГ. 15E). Это показывает, что комбинаторные библиотеки TCR большей сложности можно создать путем смешивания множества комбинаторных библиотек TCR с меньшей сложностью.

[0628] ФИГ. 15F представлена реактивность TCR pt2 в отсутствие и присутствии неоантигенов при скрининге библиотеки 200x200. Библиотеку 200x200 создавали путем комбинаторного соединения 193 наиболее часто экспрессированных цепей TCR-альфа и TCR-бета, что измеряли, используя результаты секвенирования всех TCR, представленные на ФИГ. 10A) – 10H). Кроме того, включили 7 ранее охарактеризованных цепей TCR-альфа и TCR-бета. Библиотеку 200 х 200 подвергали скринингу аналогично скринингу библиотеки

100 x 100, описанному в 10A) – 10H), за исключением того, что покрытие после выделения гДНК находилось в диапазоне 57 - 133, и что проводили два повтора в контексте экспрессии TMG и проводили два повтора в контексте без TMG. Другое отличие состояло в том, что осуществляли обеднение B-клетками, применяя микрогранулы против CD20 или Ly6G, перед сортировкой методом FACS. После идентификации TCR-альфа- и бета-цепей, идентифицировали дифференциально экспрессированные комбинации TCR, применяя пакет DESeq2 R. Анализ дифференциальной представленности известен квалифицированному специалисту. Средние Rlog-преобразованные количества прочтений для скрининга библиотеки 200 x 200 в присутствии (ось x) и отсутствие (ось y) экспрессии TMG B-клетками представлены на ФИГ. 15F. Шесть добавленных охарактеризованных TCR изображены в виде более крупных темно-серых точек. Один охарактеризованный TCR не представлен, так как он рестриктирован по аллелю HLA, который не экспрессируется в EBV-LCL pt2. TCR, которые идентифицировали в 10A) – 10H) с помощью скрининга библиотеки 100x100, представлены в виде более крупных светло-серых точек. Дополнительные лидирующие TCR, которые i) идентифицированы с помощью скрининга библиотеки 200x200 и ii) не представлены в библиотеке 100x100, представлены в виде более крупных серых точек промеуточного оттенка.

[0629] Это показывает, что шесть TCR, которые добавляли в библиотеку, идентифицировали в подходе скрининга 200x200. Кроме того, это показывает, что новые лидирующие TCR, которые не представлены в библиотеке 100x100, можно идентифицировать с помощью скрининга библиотеки 200x200. Таким образом, можно идентифицировать больше неоантигенреактивных TCR в библиотеках TCR 200x200 или, в других случаях, в более сложных библиотеках, при скрининге насыщенной библиотеки, чем при скрининге с использованием библиотек TCR 100x100.

[0630] ФИГ. 15G представлены статистические показатели шести охарактеризованных TCR, а также TCR, которые идентифицировали в 10A) – 10H) с помощью скрининга библиотеки 100x100, при скрининге обоих библиотек 100x100 и 200x200. Представленность TCR, которые идентифицировали в 10A) – 10H) с помощью скрининга библиотеки 100x100, измеренная по показателю DESeq2 baseMean, ниже более чем в 6 раз при скрининге 200x200, чем при скрининге 100x100. Это, вероятно, может

объяснить невозможность идентификации данных TCR, и подчеркивает важность равной представленности вариантов TCR в библиотеке TCR.

[0631] В целом, в данном примере показано, как можно создать библиотеки TCR с применением синтеза генов, и как можно увеличить или уменьшить сложность библиотеки на основании идеи объединения множества комбинаторных подбиблиотек.

ПРИМЕР 18

[0632] В данном примере описана оптимизация условий совместного культивирования для идентификации пар TCR-альфа/бета из репертуара TCR.

[0633] В данном примере условия совместного культивирования корректировали и использовали для идентификации пар TCRαβ из репертуара TCR сильно разбавленных антигенреактивных TCR. Для того чтобы проверить пригодность CD69 в качестве маркера активации Т-клеток в целях скрининга, Т-клетки Jurkat, экспрессирующие hCD8 и TCR CMV#1, совместно культивировали с клетками JY, нагруженными различными количествами пептида CMV. Способ нагрузки АПК пептидом известен специалисту в данной области техники. Положительность по CD69, измеренная с помощью FACS, возрастает в зависимости от концентрации антигенного пептида (Фиг. 16A).

[0634] Для того чтобы проверить, влияет ли плотность посева на фон окрашивания CD69 Т-клеток Jurkat, клетки высевали при различных плотностях. Посев при низкой плотности снижает фоновую экспрессию CD69, измеренную с помощью FACS (Фиг. 16B). Для того чтобы проверить, какие планшеты были оптимальны для совместного культивирования, TCR+ репортерные Т-клетки Jurkat совместно культивировали с B-клетками, экспрессирующими значимые антигены, во флаконах T75 или T25 или в 96-луночных планшетах с U-образным дном лунок. Активация Т-клеток Jurkat была наиболее заметна, когда совместное культивирование проводили в 96-луночном планшете с U-образным дном лунок (Фиг. 16C). Для того чтобы проверить влияние плотности совместной культуры на активацию Т-клеток, TCR+ Т-клетки Jurkat совместно культивировали при различных плотностях. Активация Т-клеток Jurkat была наиболее эффективна, когда в совместной культуре высевали 250000 или 125000 эффекторных клеток (Фиг. 16D). Для того чтобы проверить условия совместного культивирования, определенные в ходе генетического скрининга и представленные на ФИГ 16A - 16D, создавали поликлональный

пул репортерных Т-клеток Jurkat путем смешивания линий Т-клеток Jurkat, каждая из которых экспрессирует один из пяти охарактеризованных или один из двадцати четырех неохарактеризованных (посторонних) TCR. Смешивание осуществляли таким образом, что клетки, экспрессирующие охарактеризованный TCR, были представлены с частотами между 1:10000 и 1:1000000. Клетки высевали при низкой плотности (100000 клеток/мл) за 3 дня до совместного культивирования, и совместно культивировали при плотности посева 250000 клеток в 96-луночных планшетах с U-образным дном лунок.

[0635] Через 20 часов собирали совместные культуры и окрашивали мечеными флуорохромом антителами против CD20 и CD69. Затем клетки фиксировали с применением фиксирующего буфера, содержащего 4% формальдегид. Применяя устройство для сортировки клеток методом проточной цитометрии ARIAFusion от BD Biosciences, сортировали следующие популяции для каждого условия стимуляции:

1. Лимфоцит, отдельные клетки, $CD20^-$, $CD69^{hi}$ ($CD69^{hi}$ включали 10 - 15% отдельных, $CD20^-$ клеток с наиболее высоким сигналом на основании сигнала флуоресценции CD69)
2. Лимфоцит, отдельные клетки, $CD20^-$, $CD69^{lo}$ ($CD69^{lo}$ включали 10 - 15% отдельных, $CD20^-$ клеток на основании низкого сигнала флуоресценции CD69)

[0636] Геномную ДНК выделяли из сортированных трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat и использовали в качестве матрицы для множества раундов ПЦР с ограниченным количеством циклов, чтобы амплифицировать кассету TCRβ, применяя способы ПЦР, известные квалифицированному специалисту. Размер полученного в результате этого продукта ПЦР составлял приблизительно 0,5 т.п.н., и его можно было секвенировать с применением секвенирующего устройства Illumina, применяя методики, известные специалисту в данной области техники. TCR идентифицировали, применяя методики выравнивания, известные квалифицированному специалисту, и для каждого TCR представлена кратность обогащения нормированных количеств прочтений в верхних образцах относительно нижних (Фиг. 16E).

[0637] В целом, в данном примере показали, что генетический скрининг с использованием описанных условий совместного культивирования можно применять для идентификации антигенреактивных TCR, частоты встречаемости которых составляют 1:1000000 или выше.

ПРИМЕР 19

[0638] Для того чтобы иметь возможность идентифицировать специфический(-е) к неоантигену TCR из такой библиотеки с высокой чувствительностью и гарантировать, что TCR не утратятся в процессе различных этапов обработки, каждый уникальный TCR должен быть представлен множество раз в процессе скрининга, чтобы сохранить покрытие TCR. Следовательно, необходимо провести скрининг большого количества трансдуцированных TCR клеток Jurkat и АПК[33]. Кроме того, одной целью являлось увеличение количества TCR в библиотеке, чтобы позволить скрининг с высокой чувствительностью более чем 10000 TCR. Это подчеркивает необходимость увеличения масштабируемости платформы для обнаружения TCR путем оптимизации различных этапов процесса, чтобы позволить более эффективную обработку большого количества клеток, при этом все еще сохранив покрытие TCR. Следовательно, цель данного исследования состояла в дополнительной оптимизации множества данных этапов процесса, чтобы увеличить масштабируемость, при этом сохранив чувствительность платформы для выделения TCR.

[0639] В данных исследованиях использовали четыре известных HLA-A*02:01-рестриктированных TCR: клоны 8 и 17 TCR CDK4 (сокращенно CDK4-8 и 17) и клоны 1 и 2 TCR CMV (сокращенно CMV-1 и 2). Два CDK4 TCR специфичны к мутированному пептиду циклин-зависимой киназы 4 ($CDK4_{R24C}$). Этот эпитоп образовавшегося в результате мутации неоантигена обнаружили у многих пациентов с меланомой[34]. Более того, указанные два TCR CMV нацелены на пептид, кодируемый компонентом цитомегаловируса человека (CMV) - pp65[35]. Для обоих эпитопов CDK4 и CMV использовали два различных клона TCR с потенциально различными аффинностями в исследованиях. Это, возможно, позволит оценить роль аффинности TCR к распознаваемому пептиду в процессе скрининга.

[0640] В качестве первого этапа при обработке большого количества клеток оценивали селекцию бластицидином, в качестве способа обогащения экспрессирующими TCR клетками Jurkat, с последующей ретровирусной трансдукцией. Наблюдали, что селекция бластицидином приводила к эффективному обогащению трансдуцированными клетками Jurkat и приводила к минимальной токсичности. Кроме того, обнаружили, что увеличение масштаба совместного культивирования с формата 96-луночных (96Л)

планшетов со скругленным дном лунок до мешков GMP позволило провести высокопроизводительную обработку по меньшей мере $170x10^6$ эффекторных клеток и клеток-мишеней, при этом сохранив сопоставимую активацию эффекторных клеток.

[0641] Затем исследовали различные способы замены этапа сортировки методом проточной цитометрии в процессе скрининга библиотеки TCR на этап селекции на основе гранул. Дополнительно к CD69, оценивали маркеры активации Т-клеток CD25 и CD62L в динамическом анализе совместного культивирования. CD25 действует как α-цепь рецептора IL-2, и известно, что он экспрессируется Т-клетками после активации[32], тогда как CD62L экспрессируется на непримированных Т-клетках, и его экспрессия снижена после активации Т-клеток, что позволяет эффекторным Т-клеткам проникнуть обратно в кровоток[36]. У CD25 и CD62L выявили перспективные профили экспрессии, и, следовательно, они являются кандидатами для двухэтапной селекции на основе гранул в комбинации с CD69.

[0642] Наконец, оценивали эффективность репортерной системы на основе NFAT. Были созданы векторы, содержащие множество сайтов связывания NFAT человека, за которыми следовал минимальный промотор и репортерный ген, чтобы исследовать антигенспецифические ответы Т-клеток[37–40]. Минимальный промотор не содержит ни одного сайта связывания NFAT, и единственной его задачей является запуск транскрипции репортерного гена после связывания факторов транскрипции с сайтом(-ами) связывания NFAT. Клетки Jurkat, трансдуцированные данными конструкциями, будут экспрессировать репортерный ген только после активации Т-клеток. Маркер поверхности клетки, подходящий для селекции на основе гранул, или ген устойчивости к антибиотику можно ввести в качестве репортерного гена, чтобы обойти этап селекции методом проточной цитометрии. Тем не менее, полученные результаты указывают на то, что применение данной репортерной системы приводит к высокому фоновому сигналу, и, следовательно, маловероятно, чтобы ее включили в платформу для скрининга.

РЕЗУЛЬТАТЫ

[0643] Анализ титрования пептидов позволил предположить, что отсутствует или присутствует минимальное различие в аффинностях между клонами 8 и 17 CDK4 TCR и между клонами 1 и 2 CMV TCR.

[0644] Аффинность четырех модельных TCR (CDK4 TCR клоны 8 и 17 и CMV TCR клоны 1 и 2) к распознаваемому ими пептиду охарактеризовали перед их применением в исследованиях. Этого добивались путем осуществления титрования пептида в анализе совместного культивирования.

[0645] Четыре TCR вводили в $CD8^+$ линию клеток Jurkat с нокаутом (KO) TCR путем ретровирусного переноса генов. Трансдуцированные клетки Jurkat KO TCR составляли 35 - 45% $mTCR\beta^+$ $CD8^+$, и для них выявили $CD8^-$ популяцию (ФИГ. 17a, верхняя панель). Для того чтобы избежать корректировки по эффективности трансдукции в процессе анализа совместного культивирования, трансдуцированные TCR клетки Jurkat сортировали с получением популяции ~90% $mTCR\beta^+$ $CD8^+$ клеток (ФИГ. 17a, нижняя панель).

[0646] Используя в качестве считываемых данных CD69, 20 часов совместного культивирования трансдуцированных CDK4-8 и -17 клеток Jurkat TCR KO с экспрессирующими HLA-A*02:01 клетками JY, нагруженными ступенчато изменяющимися концентрациями мутантного пептида CDK4, выявили, что у CDK4-17 TCR была несколько более высокая аффинность к распознаваемому пептиду, чем у CDK4-8 TCR (ФИГ. 17b, EC50 для CDK4-8: 43 нг/мл, EC50 для CDK4-17: 23 нг/мл). В случае CMV TCR, для CMV-1 и -2 TCR выявили сопоставимую аффинность к пептиду CMVpp65, когда клетки Jurkat TCR KO, экспрессирующие данные TCR, совместно культивировали с экспрессирующими HLA-A*02:01 клетками JY, нагруженными ступенчато изменяющимися концентрациями пептида CMVpp65 (ФИГ. 17c, EC50 для CMV-1: 2,2 нг/мл, EC50 для CMV-2: 1,2 нг/мл).

[0647] Следовательно, полученные результаты позволяют предположить, что у CDK4-8 и -17 были сходные (или минимально различные) аффинности к мутантному пептиду CDK4 и у CMV-1 и 2 были сопоставимые (или минимально различные) аффинности к пептиду CMVpp65. Тем не менее, данные различные клоны TCR имели ограниченное значение в качестве инструментов для исследования влияния аффинности TCR на процесс скрининга. Следовательно, один из CDK4 TCR и один из CMV TCR стандартно включали в исследования перед тем, как перейти к тестированию библиотеки TCR.

[0648] Клетки Jurkat с различными эффективностями трансдукции TCR эффективно прошли селекцию бластицидином.

[0649] После трансдукции ретровирусной библиотекой TCR клеток Jurkat TCR KO, целесообразно провести эффективную и высокопроизводительную процедуру селекции, чтобы добиться успешного обогащения трансдуцированными TCR клетками Jurkat (>80% mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток), не вызывая токсичности и не утрачивая покрытия TCR. Селекция антибиотиком является привлекательной стратегией для обогащения трансдуцированными TCR Т-клетками Jurkat, и проводили ее оценку.

[0650] Для данной цели, селекцию бластицидином изначально оценивали, используя CDK4-17 TCR. Поскольку эффективности трансдукции библиотек TCR изменяются (обычно 10 - 56% mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток), селекцию бластицидином оценивали с помощью клеток Jurkat TCR KO с различными эффективностями трансдукции CDK4-17 (10 и 30% mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток). Для клеток, высеянных при плотности 0,25x10^6 клеток/мл и прошедших селекцию 6 мкг/мл бластицидина в течение семи дней, выявили наиболее высокую кратность размножения по сравнению с применением более низких концентраций антибиотика (2 и 4 мкг/мл) и более высокие исходные плотности клеток (0,5 и 1x10^6 клеток/мл). Кроме того, указанное выше условие селекции привело к получению ~90% mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток (результаты не представлены).

[0651] Для того, чтобы проверить, можно ли наиболее оптимальное условие селекции бластицидином для CDK4-17 также использовать для других TCR, исследовали один из CMV TCR - CMV-1. Кроме того, оценивали, позволит ли удаление бластицидина в более ранний момент времени продолжить селекцию и улучшить кратность размножения. Для достижения этой цели, на 4 день селекции клетки пересевали при их исходной плотности в среду с добавлением или без соответствующей концентрации бластицидина (обозначили ‘удаляли бластицидин на 4 день’ и ‘добавляли свежий бластицидин на 4 день’, соответственно).

[0652] Клетки Jurkat TCR KO трансдуцировали различными объемами ретровирусного супернатанта, чтобы добиться различных эффективностей трансдукции (6, 20 и 60% mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток, ФИГ. 18a).

[0653] Трансдуцированные TCR клетки высевали в концентрации 0,25x10^6 клеток/мл и проводили селекцию с помощью различных концентраций бластицидина (0, 4,

5 и 6 мкг/мл). Через шесть дней после селекции не наблюдали заметного различия в отношении кратности размножения между клетками в условиях с удалением или без удаления бластицидина на 4 день. В противоположность результатам, полученным для CDK4-17 TCR, у трансдуцированных с различной эффективностью клеток Jurkat, селекцию которых проводили при более низких концентрациях бластицидина (4 и 5 мкг/мл), оказалась несколько более высокая кратность размножения, чем у клеток, селекцию которых проводили при 6 мкг/мл данного антибиотика (На ФИГ. 18b, ФИГ. 25a показана кратность размножения нетрансдуцированных клеток). Несмотря на данные различия в кратности размножения, различные концентрации бластицидина стабильно приводили к эффективности селекции, составляющей 80 - 90% mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток (На ФИГ. 18c, ФИГ. 25b показано, что процент н/т клеток при условиях 4 мкг/мл наблюдался вследствие присутствия очень малого количества выживших клеток, некоторые из которых появились в дискриминационном окне mTCRβ$^+$ CD8$^+$). Наконец, удаление бластицидина на 4 день не оказало никакого влияния на кратность размножения и эффективность селекции (ФИГ. 18b,c). На основании данных результатов, продолжили измерения только на 7 день для клеток Jurkat, проходящих селекцию с помощью 4 мкг/мл бластицидина, так как данная концентрация антибиотика приводила к высокой кратности размножения и 80 - 90% mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток. Более того, пришли к выводу, что применение 4 мкг/мл бластицидина вызовет наименьшую токсичность среди всех трех исследованных концентраций.

[0654] Через семь дней после селекции для трансдуцированных TCR клеток Jurkat, у которых бластицидин удаляли на 4 день, выявили несколько более высокую кратность размножения, чем для клеток, к которым добавляли бластицидин на 4 день, в отношении как всех живых клеток, так и mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток (ФИГ. 18d). Тем не менее, удаление бластицидина на 4 день не оказывало влияния на эффективность селекции, что приводило к >90% mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток при всех исследованных условиях (ФИГ. 18e).

[0655] Примечательно, что наблюдали различия в MFI mTCRβ дважды положительных по CD8 и mTCRβ клеток Jurkat в зависимости от того, был ли бластицидин удален или добавлен на 4 день. Для клеток, к которым добавляли бластицидин, выявили большую MFI, чем для клеток, у которых бластицидин удаляли на 4 день. Это различие было более явным на 7 день после селекции, чем на 6 день (ФИГ. 26).

[0656] В заключение, клетки Jurkat TCR KO с различными эффективностями трансдукции CMV-1 эффективно прошли селекцию тремя различными концентрациями бластицидина (4, 5 и 6 мкг/мл). В отношении кратности размножения, более низкие концентрации бластицидина оказались менее токсичными, хотя различия между тремя исследованными концентрациями антибиотика были минимальными. Более того, было показано, что удаление бластицидина в более ранний момент времени позволяло селекции продолжиться и приводило к несколько лучшей кратности размножения, чем воздействие антибиотика на клетки в течение полной 7-дневной селекции.

[0657] **Совместное культивирование клеток Jurkat с АПК в мешках GMP приводило к экспрессии маркера активации CD69, сопоставимой с таковой в совместных культурах в 96Л планшетах со скругленным дном лунок.**

[0658] Улучшение масштабируемости платформы для скрининга также требует оптимизации обычного формата совместного культивирования в 96Л планшете со скругленным дном лунок до схемы, которая позволит более эффективную обработку большого количества эффекторных клеток и клеток-мишеней при сохранении покрытия TCR. Проведенные ранее исследования продемонстрировали, что ведение совместных культур в сосудах для культивирования клеток с плоским дном с большими площадями поверхностей, чем у лунки 96Л планшета, вызывало снижение экспрессии CD69 в клетках Jurkat. Кроме того, изменение соотношения Э:М и исходной плотности клеток в таких совместных культурах не приводило к большему повышению экспрессии CD69 в эффекторных клетках (результаты не представлены). Данные результаты позволяют предположить, что применение культуральный сосудов со скругленным дном, таких как 96Л планшет со скругленным дном лунок, приводит к более эффективному контакту эффектор-мишень. Следовательно, было решено установить систему совместного культивирования большего масштаба, которая улучшит контакт эффектор-мишень и позволит обработку больших количеств клеток в одном культуральном сосуде.

[0659] Для сравнения различных систем совместного культивирования, $CD8^+$ клетки Jurkat, из которых 40 - 50% были положительными по TCR, использовали в качестве эффекторных клеток для получения чистых положительных и отрицательных по CD69 популяций (ФИГ. 19a, 19b, 19c, 19d – слева). В качестве клеток-мишеней использовали экспрессирующие HLA-A*02:01 иммортализованные с помощью EBV B-клетки (EBV

LCL), которые были сконструированы для экспрессии антигенов, которые распознаются экспрессирующими TCR клетками Jurkat (EBV LCL TMG2.1).

[0660] Улучшение контакта эффектор-мишень сначала исследовали путем ведения совместных культур в пробирках Falcon емкостью 15 и 50 мл, расположенных в штативе. Поскольку пробирки Flacon не обрабатывали для культивирования клеток, использовали небольшое количество клеток ($\leq 2x10^6$ клеток, масштаб был увеличен на основании различия в диаметре между лункой 96Л планшета и пробиркой Falcon емкостью 15/50 мл), чтобы оценить жизнеспособность клеток и активацию эффекторных клеток после 20 ч совместного культивирования. Процент живых и $CD69^+$ клеток был сопоставим между совместными культурами в 96Л планшете и пробирке Falcon (ФИГ. 19 a). Тем не менее, увеличение количества клеток до $38x10^6$ вызвало резкое снижение жизнеспособности клеток (ФИГ. 19a).

[0661] Примечательно, что поскольку повышение экспрессии CD69 было единственной мерой активации клеток Jurkat, проверили, дает ли антитело против CD69 человека (клон FN50) точное представление об экспрессии CD69. Одновременное окрашивание антителом против CD69 человека, направленным против отличного эпитопа (клон CH/4), выявило сопоставимый уровень окрашивания между двумя различными клонами антитела (ФИГ. 27).

[0662] Затем исследовали, была ли утрата клеток в совместной культуре в пробирке Falcon следствием малой площади поверхности среды, контактирующей с атмосферой, предотвращая эффективный газовый обмен. Для того чтобы это оценить, пробирки Falcon центрифугировали и 14 мл среды удаляли из пробирок, оставляя $38x10^6$ клеток в суммарном объеме 1 мл. Тем не менее, наблюдали резкое снижение жизнеспособности клеток в совместной культуре, содержащей $38x10^6$ клеток, в пробирке Falcon (ФИГ. 19b). Кроме того, дополнительно исследовали совместное культивирование в пробирке емкостью 250 мл, поскольку у данных контейнеров был больший диаметр, и они могли позволить происходить более эффективному газовому обмену (не центрифугировали, так как подходящий центрифужный ротор был недоступен). Даже несмотря на то, что совместное культивирование в пробирке емкостью 250 мл приводило к повышению экспрессии CD69, сходному с таковым при совместном культивировании в 96Л планшете, гибель клеток была выше (ФИГ. 19b).

[0663] Пришли к выводу, что совместные культуры большого количества клеток, которые вели в пробирках (Falcon), были нежизнеспособны вследствие повышенной гибели клеток. Такое влияние на жизнеспособность клеток, возможно, является следствием неэффективного газового обмена и больших количеств клеток, помещенных в пробирки (Falcon). Следовательно, жизнеспособность клеток и контакт эффектор-мишень оценивали в мешках MACS GMP Cell Differentiation Bag – 500 (сокращенно - мешки GMP), сосудах для культивирования, которые могут вместить большие количества клеток и позволяют происходить газовому обмену по всей площади поверхности мешка.

[0664] Современная платформа для скрининга библиотеки TCR позволяет скрининг 10000 TCR и требует совместного культивирования $170x10^6$ эффекторных клеток и клеток-мишеней, чтобы сохранить покрытие TCR. Следовательно, совместное культивирование $170x10^6$ клеток Jurkat и АПК вели в мешке GMP.

[0665] В качестве альтернативы, платформа для скрининга может содержать 80x10^6 эффекторных клеток и 80x10^6 клеток-мишеней, чтобы значение могло составлять 160x10^6. В качестве альтернативы, совместные культуры можно вести с 90x10^6 клетками, поскольку может утратиться ~10% вследствие использования множества каналов, и может потребоваться удостовериться в том, что останется по меньшей мере 80x10^6 клеток.

[0666] Для увеличения контакта эффектор-мишень и обеспечения возможности эффективного газового обмена, мешки GMP помещали горизонтально на круглое сито (ФИГ. 19c). После 20 ч совместного культивирования, наблюдали сопоставимые жизнеспособность клеток и повышение экспрессии CD69 между совместными культурами в мешке GMP и 96Л планшете. Тем не менее, MFI CD69 была несколько снижена в условии мешка GMP (ФИГ. 19c). Следовательно, оценивали, повысит ли MFI CD69 центрифугирование мешка GMP. Для того чтобы иметь возможность центрифугировать мешки GMP, их помещали вертикально в центрифужный ротор и переносили в сито, не тревожа клетки. Мешки GMP, которые не были центрифугированы, также помещали в вертикальное положение. Процент и MFI $CD69^+$ клеток Jurkat был сопоставим между совместными культурами в мешке GMP и 96Л планшете. Кроме того, не наблюдали существенных различий в отношении экспрессии CD69 в зависимости от того, осаждали ли эффекторные клетки и клетки-мишени центрифугированием перед проведением 20 ч совместного культивирования (ФИГ. 19d). Тем не менее, жизнеспособность клеток

снижалась после 20 ч совместного культивирования в мешках GMP. Неожиданно, количество утраченных клеток изменялось между различными мешками GMP (ФИГ. 19d).

[0667] В совокупности, полученные результаты позволяют предположить, что совместное культивирование в мешках GMP приводит к активации эффекторных клеток, сходной с таковой в уже принятом формате совместного культивирования в 96Л планшете. Тем не менее, дополнительные исследования — например, отличный способ размещения мешка, — необходимы, чтобы изучить причину повышенной гибели клеток на ФИГ. 19d.

[0668] Для CD25 и CD62L выявили перспективные профили экспрессии для двухэтапной селекции на основе гранул в комбинации с CD69.

[0669] На сегодняшний день, CD69 использовали в качестве маркера активации для селекции активированных клеток Jurkat на платформе для скрининга библиотеки TCR после 20 ч совместного культивирования и сортировки методом проточной цитометрии. Для того чтобы оценить более масштабируемый подход, состоящий в селекции на основе гранул, дополнительно к CD69 исследовали профили экспрессии двух дополнительных маркеров активации Т-клеток - CD25 и CD62L. Для этой цели проводили динамический анализ экспрессии CD69, CD25 и CD62L трансдуцированными TCR клетками Jurkat после совместного культивирования с экспрессирующими распознаваемый антиген клетками-мишенями.

[0670] Повышение экспрессии CD69 в клетках Jurkat, похоже, оставалось стабильным через 16 – 32 ч после начала совместного культивирования (ФИГ. 20a). Для сравнения, в профилях экспрессии $CD25^+$ и $CD69^+CD25^+$ эффекторных клеток выявили некоторое повышение после момента времени 24 ч (ФИГ. 20b, 20c). Дополнительно наблюдали, что снижение экспрессии CD62L немного увеличивалось между моментами времени 16 и 20 ч после начала совместного культивирования и оставалось стабильным до момента времени 32 ч. Тем не менее, фоновый сигнал был высоким при использовании CD62L в качестве маркера активации, так как 20 - 40% нестимулированных трансдуцированных и нетрансдуцированных TCR клеток Jurkat были отрицательными по CD62L в различные моменты времени, проанализированные после начала совместного культивирования (ФИГ. 20d). Анализ коэкспрессии CD69 и CD62L выявил, что эффекторные клетки, в которых была неспецифически понижена экспрессия CD62L, не повышалась экспрессия CD69. Более того, через 16 – 32 ч после начала совместного

культивирования можно было наблюдать популяцию активированных клеток Jurkat с повышенной экспрессией CD69, но с отсутствием экспрессии CD62L (ФИГ. 20e).

[0671] Для CD25 и CD62L выявили перспективные профили экспрессии в данном предварительном динамическом анализе, так как их экспрессия коррелировала с повышением экспрессии CD69, позволяя предложить, что их потенциально можно применять в процессе двухэтапной селекции на основе гранул в комбинации с CD69.

[0672] Лентивирусная репортерная система NFAT приводила к высокому фоновому сигналу в клетках Jurkat и первичных Т-клетках.

[0673] Способом, альтернативным применению эндогенных маркеров активации на поверхности клетки, для селекции реактивных TCR в процессе скрининга библиотеки TCR будет создание репортерной системы на основе NFAT в клетках Jurkat. Создание указанной репортерной системы может позволить селекцию антибиотиком активированных клеток Jurkat, что позволит обойти сортировку методом проточной цитометрии. В качестве альтернативы, кассету устойчивости к антибиотику можно заменить на любой маркер поверхности клетки, который подходит для обогащения на основе гранул.

[0674] Были разработаны четыре различных лентивирусных репортерных вектора на основе NFAT. Самоинактивирующиеся (SIN) лентивирусные плазмиды содержат укороченный неактивный 5'-LTR промотор, и, следовательно, после встраивания в геном, транскрипция репортерного гена устойчивости к пуромицину будет зависеть только от связывания факторов транскрипции NFAT с сайтами связывания NFAT[41]. Три из указанных конструкций содержат либо два, либо четыре или либо шесть идентичных сайтов связывания NFAT, за которыми следует минимальный промотор IL2. Четвертый вектор сделан из полноразмерного промотора IL2, который содержит по меньшей мере три различных сайта связывания NFAT (ФИГ. 21a)[6]. Исследовали различные репортерные плазмиды на основе NFAT, чтобы определить наиболее чувствительный репортер.

[0675] Клетки HEK293T котрансфицировали лентивирусными векторами на основе NFAT и дополнительной плазмидой pmaxGFP. Временную экспрессию GFP продуцирующими вирус клетками через три дня после трансфекции использовали в качестве меры эффективности трансфекции. Клетки HEK293T были на 100% GFP^+, позволяя предложить успешность трансфекций лентивирусами (ФИГ. 21b). Затем

кондиционированным лентивирусом супернатантом трансдуцировали клетки Jurkat TCR KO, которые впоследствии подвергали нефизиологическому стимулу PMA/иономицином в течение 24 ч, чтобы оценить эффективность репортерной системы. Было показано, что активация NFAT достигает максимума через 72 ч после стимуляции[38]. Следовательно, после стимуляции PMA/иономицином проводили 3-дневную селекцию пуромицином. Тем не менее, жизнеспособность трансдуцированных NFAT клеток Jurkat резко снижалась и была сопоставима с таковой для контактировавших с пуромицином трансдуцированных и нетрансдуцированных клеток (ФИГ. 21c, верхняя панель). Активированные клетки были на >99% $CD69^+$, что означало, что стимуляция была эффективной (ФИГ. 21c, нижняя панель).

[0676] Трансдуцированные NFAT прошедшие селекцию пуромицином клетки размножали в течение 20 дней и проводили второй раунд стимуляции и селекции. Стоит отметить, что нетрансдуцированные клетки Jurkat в данном эксперименте отличались от нетрансдуцированных клеток на ФИГ. 21c. Стимуляция PMA/иономицином с последующей 4-дневной селекцией различными концентрациями пуромицина приводила к отсутствию значительных различий в отношении жизнеспособности клеток между стимулированными и нестимулированными трансдуцированными NFAT клетками (ФИГ. 21d). Неожиданно, экспрессия CD69 была ниже в трансдуцированных клетках, чем в нетрансдуцированных клетках (ФИГ. 21d). Одно объяснение может состоять в том, что трансдуцированные NFAT клетки Jurkat не полностью восстановились после первого раунда нефизиологического стимула PMA/иономицин.

[0677] В целом, полученные результаты показали, что не наблюдалось обогащения устойчивыми к пуромицину трансдуцированными NFAT клетками Jurkat после стимуляции Т-клеток. Даже несмотря на то, что трансфекция плазмидой pmaxGFP была эффективной, трансфекция и трансдукция лентивирусными конструкциями могла быть неуспешной (ФИГ. 21b). Другими возможными объяснениями могут быть субоптимальная селекция антибиотиком или пропускающая репортерная система. Для того чтобы рассмотреть некоторые из приведенных выше сценариев, проводили следующие эксперименты с репортерными конструкциями на основе NFAT, содержащими репортерный ген EGFP (ФИГ. 22a). В качестве альтернативы, репортерный ген может представлять собой любой подходящий для селекции на основе гранул маркер поверхности клетки/ген устойчивости к антибиотику.

[0678] С применением плазмид NFAT EGFP, эффективность лентивирусной трансфекции можно непосредственно оценить путем считывания запущенной CMV экспрессии GFP в клетках HEK293T. Это позволило выявить, что PEI представляет собой более эффективный реагент для лентивирусной трансфекции, чем FuGENE (ФИГ. 22b). Для того чтобы исследовать эффективность репортерной системы, трансдуцированные NFAT клетки Jurkat TCR KO (трансфицированные с помощью PEI) стимулировали PMA/иономицином в течение 24 ч и считывали экспрессию GFP каждые 24 ч в течение трех дней. Не наблюдали заметного различия между стимулированными и нестимулированными клетками Jurkat в отношении процента и MFI GFP^+ клеток для любого из векторов на основе NFAT (ФИГ. 22c). Повышение экспрессии CD69 после активации показало, что стимуляция PMA/иономицином была эффективной (ФИГ. 22c). В совокупности, эти результаты позволяют предположить, что у лентивирусной репортерной системы NFAT очень высокий фоновый сигнал в клетках Jurkat.

[0679] Затем оценивали, наблюдается ли сходный фоновый сигнал также в трансдуцированных NFAT первичных Т-клетках. Для этой цели использовали два лентивирусных вектора на основе NFAT – NFAT4x и NFAT4x new. В противоположность NFAT4x, NFAT4x new не содержал минимальный промотор IL2, но содержал менее сложный промотор, названный minP. MinP был описано ранее в Jutz *et al*[38]. Первичные Т-клетки из двух здоровых доноров трансдуцировали кондиционированными лентивирусом NFAT супернатантами, а затем стимулировали PMA/иономицином в течение 24 ч. Экспрессию GFP измеряли каждые 24 ч в течение трех дней. В противоположность результатам для клеток Jurkat, наблюдали несколько более высокий процент и MFI GFP^+ клеток в стимулированных условиях, чем в нестимулированных условиях, даже несмотря на то, что указанные различия не имели высокой значимости (ФИГ. 23). Кроме того, применение конструкции NFAT4x с отличным минимальным промотором не привело к более специфической экспрессии GFP в трансдуцированных Т-клетках. даже несмотря на то, что экспрессия CD69 не повышалась после стимуляции PMA/иономицином, изменение в контексте экспрессии GFP между стимулированными и нестимулированными трансдуцированными NFAT клетками позволяет предположить, что стимуляция была эффективной (ФИГ. 23).

[0680] В совокупности, полученные результаты свидетельствуют о том, что лентивирусная доставка репортерных векторов на основе NFAT приводит к высокому фоновому сигналу как в клетках Jurkat, так и в первичных клетках.

[0681] Невирусная доставка репортерных конструкций на основе NFAT в клетки Jurkat приводит к высокому фоновому сигналу.

[0682] Затем исследовали эффективность невирусной системы доставки репортера NFAT в клетки Jurkat путем разработки двух различных конструкций: NFAT0x и NFAT4x (ФИГ. 24a). NFAT0x не содержит ни одного сайта связывания NFAT и, следовательно, служит в качестве контроля для оценки фонового сигнала минимального промотора. Обе плазмиды содержат репортерный ген EGFP и конститутивно экспрессируемые ген E2-Crimson и ген устойчивости к пуромицину. Путем электропорации клеток Jurkat двумя плазмидами NFAT, указанные конструкции произвольно линеаризуются и встроятся в произвольное положение в геноме. Следовательно, ожидается низкая эффективность трансфекции. Тем не менее, клетки Jurkat со стабильным встраиванием плазмид в геном будут обогащены путем проведения селекции пуромицином. Фоновый сигнал NFAT далее будут оценивать путем стимуляции прошедших селекцию клеток Jurkat.

[0683] Для экспрессирующих CDK4-17 клеток Jurkat TCR KO, трансфицированных конструкциями NFAT, не выявили значительного снижения жизнеспособности клеток с течением времени (ФИГ. 24b). Неожиданно, через два дня после электропорации наблюдали увеличение количества GFP^+ и GFP^+ $E2\text{-}Crimson^+$ клеток, которое было более выраженным для трансфицированных NFAT0x клеток Jurkat. Уменьшение этих двух популяций клеток через шесть дней после трансфекции означает, что дважды положительная и единожды положительная по GFP экспрессия были временными (ФИГ. 24c). Селекцию пуромицином начинали через шесть дней после трансфекции в течение семи дней. В процессе селекции проценты единожды и дважды положительных по E2-Crimson и GFP клеток Jurkat возрастали (ФИГ. 24c). Через семь дней после обработки пуромицином, селекция представлялась завершенной, так как не наблюдали выживших неэлектропорированных клеток Jurkat (ФИГ. 24d). Тем не менее, процент GFP^+ и GFP^+ $E2\text{-}Crimson^+$ клеток был сопоставим с экспрессией E2-Crimson

трансфицированными NFAT клетками Jurkat. Это позволяет предположить, что невирусная доставка репортерных плазмид NFAT также приводит к высокому фоновому сигналу.

ОБСУЖДЕНИЕ, КАСАЮЩЕЕСЯ ПРИМЕРА 19

[0684] Полностью персонализированная генотерапия TCR для лечения рака, сфокусированная на идентификации специфических к неоантигену TCR, весьма целесообразна. Данный подход зависит от генетического скрининга, и, следовательно, требуется обработка большого количества экспрессирующих TCR клеток Jurkat и АПК. Для того чтобы иметь возможность лечить множество пациентов, платформа для скрининга должна позволить эффективный манипулирование эффекторными клетками и клетками-мишенями, не влияя на чувствительность скрининга. В настоящей заявке были представлены исследования, которые проводили для улучшения масштабируемости платформы для выделения неоантигенреактивных TCR.

Селекция бластицидином трансдуцированных TCR клеток Jurkat TCR KO.

[0685] После ретровирусного переноса генов библиотеки TCR в клетки Jurkat TCR KO, пригоден эффективный способ селекции, чтобы осуществить обогащение экспрессирующими TCR клетками Jurkat, не вызывая токсичность и не теряя покрытие TCR. Для этой цели продемонстрировали, что антибиотик бластицидин приводил к эффективной селекции трансдуцированных CMV-1 и CDK4-17 TCR клеток Jurkat TCR KO (ФИГ. 18 и не представленные результаты). Даже несмотря на то, что различия между различными исследованными концентрациями бластицидина и способами селекции бластицидином были несущественными, селекция трансдуцированных CMV-1 клеток в течение семи дней при исходной плотности $0{,}25x10^6$ клеток/мл и 4 мкг/мл бластицидина, который удаляли на 4 день культивирования, приводила к обогащению до >90% $mTCR\beta^+$ $CD8^+$ клеток Jurkat и к наиболее высокой кратности размножения (ФИГ. 18).

[0686] Тем не менее, этот подход к селекции приводил к тому, что ~70% $mTCR\beta^+$ $CD8^+$ клеток Jurkat были трансдуцированы библиотекой из 10000 TCR. Кроме того, процент $mTCR\beta^+$ $CD8^+$ клеток дополнительно снижался после размножения клеток Jurkat перед анализом совместного культивирования (результаты не представлены). Таким образом, для обогащения клетками Jurkat, трансдуцированными библиотекой происходящих из пациента TCR, стандартно использовали селекцию 6 мкг/мл бластицидина и добавление свежего

бластицидина на 4 день, чтобы добиться популяции с >70% mTCRβ$^+$ CD8$^+$ клеток Jurkat (результаты не представлены). Более того, использовали исходную плотность клеток, составляющую 0,5x10^6 клеток/мл, чтобы уменьшить количество необходимых культуральных флаконов.

[0687] Исследование с селекцией бластицидином проводили с двумя известными TCR, тогда как результаты скрининга пациента включали трансдукцию 10000 неохарактеризованных TCR. Следовательно, для селекции антибиотиком клеток Jurkat, экспрессирующих библиотеку TCR, может потребоваться более жесткая обработка, чем для обогащения клетками, экспрессирующими один TCR. Аналогичное наблюдение сделали в исследовании Spindler *et al.*, в котором проводили селекцию пуромицином экспрессирующих библиотеку TCR клеток Jurkat в течение 14 дней. После селекции обогащение CD3$^+$ TCRαβ$^+$ клетками составляло от ~10% до ~50%[42].

[0688] Все еще требуется выяснить, приводит ли добавление бластицидина на 4 день к утрате экспрессирующих TCR клеток с более низкой MFI mTCRβ, или же наблюдаемое различие в MFI является лишь результатом изменения фенотипа клеток Jurkat вследствие более длительной обработки антибиотиком (ФИГ. 26). Более того, будет полезно проверить, вызывают ли низкие эффективности трансдукции (<10% mTCRβ$^+$ CD8$^+$) уменьшение покрытия TCR. Эти вопросы можно решить путем трансдукции клеток Jurkat библиотекой различных TCR и секвенирования TCR обогащенных с помощью бластицидина клеток.

[0689] В заключение, процесс нахождения наиболее оптимального и эффективного способа селекции для обогащения трансдуцированными TCR клетками Jurkat показал, что полезны исследования с известными TCR. Тем не менее, полученные в результате этих экспериментов результаты необходимо дополнительно проверить, и может быть предусмотрена дополнительная корректировка при скрининге библиотеки неизвестных TCR.

Совместные культуры клеток Jurkat-АПК в мешках GMP.

[0690] Для того чтобы дополнительно улучшить масштабируемость платформы для скрининга, формат совместной культуры клеток Jurkat-АПК включает увеличение масштаба от обычного формата 96Л планшета со скругленным дном лунок.

[0691] Авторы настоящего изобретения полагают, что в настоящем исследовании впервые изучается эффективность нового формата совместного культивирования в мешках GMP, который приводил к экспрессии CD69, сходной с таковой в совместных культурах в 96Л планшете (ФИГ. 19c, 19d). Мешки GMP можно сложить таким образом, чтобы имитировать лунку 96Л планшета со скругленным дном и, следовательно, увеличить контакт эффектор-мишень. Более того, мешки GMP позволяют эффективный газовый обмен по всей площади поверхности, чтобы предотвратить утрату клеток. Тем не менее, как видно на ФИГ. 19d, совместное культивирование в мешках GMP приводило к повышенной гибели клеток по сравнению с совместным культивированием в 96Л планшете. Снижение жизнеспособности клеток могло происходить вследствие отличного расположения мешков GMP, которое требовалось для короткого этапа центрифугирования. Клетки собирали со дна мешков GMP, которое может быть единственной частью культурального сосуда, которая не позволяет эффективный газовый обмен. Стоит отметить, что на ФИГ. 19c мешки GMP не центрифугировали и клетки собирали со стороны мешка, что является возможной причиной того, что жизнеспособность клеток не изменилась. Даже несмотря на то, что повторное совместное культивирование в мешках GMP полезно для дальнейшего изучения причины гибели клеток на ФИГ. 19h, указанные наблюдения подчеркивают необходимость установления единообразного способа помещения гибкого мешка GMP в термостат. Например, можно разработать каркас, который имеет подходящую форму, при этом также сохраняя проницаемость для CO_2.

[0692] Другим преимуществом применения мешков GMP для совместного культивирования клеток Jurkat-АПК является то, что можно добавить больше клеток, при этом сохранив сходную плотность клеток. Это может позволить скрининг более 10000 TCR. Кроме того, мешки GMP являются замкнутой системой, которая существенно уменьшит вероятность перекрестной контаминации.

[0693] Примечательно, что эффективность различных систем совместного культивирования оценивали лишь на основании экспрессии маркера активации Т-клеток CD69. Данная постановка эксперимента не учитывает влияние, которое может оказать совместное культивирование в мешке GMP, на покрытие TCR. Для того чтобы это исследовать, клетки Jurkat, экспрессирующие библиотеку TCR, можно совместно культивировать с АПК в мешке GMP и 96Л планшетах параллельно. Затем будет следовать

стандартная сортировка на основании CD69 методом проточной цитометрии активированных клеток Jurkat и секвенирование нового поколения для сравнения обогащения специфическими TCR.

[0694] В дополнительных экспериментах будут оценивать влияние ведения совместных культур в мешках GMP на процесс выделения TCR. Тем не менее, предварительные результаты показали перспективность системы совместного культивирования, которая должна обеспечить эффективную обработку эффекторных клеток и клеток-мишеней при скрининге библиотеки из по меньшей мере 10000 TCR.

Замена сортировки на основе проточной цитометрии на селекцию на основе гранул.

[0695] Некоторые платформы для скрининга TCR на сегодняшний день включают сортировку методом проточной цитометрии экспрессирующих CD69 Т-клеток Jurkat после совместного культивирования, чтобы идентифицировать специфические к неоантигену TCR. Тем не менее, селекция на основе гранул активированных клеток Jurkat улучшит масштабируемость платформы для скрининга TCR. Следовательно, было решено оценить дополнительные или альтернативные маркеры активации для селекции на основе гранул, которые предпочтительно позволят чисто отделить активированные популяции Jurkat от неактивированных.

[0696] Проведение динамического анализа совместного культивирования с двумя дополнительными маркерами активации Т-клеток, CD25 и CD62L, выявили, что гетерогенность экспрессии CD25 больше, чем гетерогенность экспрессии CD69 в активированных клетках Jurkat (ФИГ. 20a, 20b). Кроме того, снижение экспрессии CD62L не было специфическим только для активированных клеток Jurkat, так как некоторые нетрансдуцированные и нестимулированные трансдуцированные TCR эффекторные клетки были отрицательными по CD62L (ФИГ. 20d). Следовательно, данные два маркера активации не являются привлекательными кандидатами для подхода селекции на основе гранул по одному маркеру. Тем не менее, CD25 и CD62L можно использовать в процессе последовательной селекции на основе гранул, включающем обеднение или обогащение $CD62L^+$ или $CD25^+$ эффекторными клетками, соответственно, а затем захват активированных клеток путем селекции положительных по CD69 клеток. Примечательно, что $CD25^+$ и $CD69^+CD25^+$ популяции несколько увеличились после момента времени 24 ч. Тем не менее, это не удивительно, учитывая, что было показано, что CD25 является поздним

маркером активации[43]. Это также позволяет предположить, что более поздние моменты времени будут идеальными для анализа эффекторных клеток с данными двумя маркерами активации. Сообщали, что утрата CD62L достигает пика приблизительно через четыре часа после активации Т-клеток, и, следовательно, является ранним маркером активации[44,45]. В одном исследовании показали, что после пика через 4 ч, у CD62L наблюдается динамический профиль экспрессии[44]. Тем не менее, в данном исследовании наблюдали стабильное снижение экспрессии CD62L после 20 ч совместного культивирования, с паттерном, сходным с таковым для повышения экспрессии CD69 (ФИГ. 20a, 20d). Это позволит авторам настоящего изобретения провести анализ коэкспрессии CD69 и CD62L через 16 - 32 ч после активации клеток Jurkat (ФИГ. 20e). Тем не менее, данный динамический анализ требует повторения путем совместного культивирования трансдуцированных TCR клеток Jurkat TCR KO с EBV LCL, которые не экспрессируют распознаваемый пептид. Это позволит более точную оценку фонового сигнала трех маркеров активации.

[0697] Наконец, исследовали эффективность лентивирусной репортерной системы на основе NFAT в отношении возможности селекции антибиотиком или обогащения на основе гранул активированных клеток Jurkat. Тем не менее, лентивирусная доставка векторов с NFAT приводила к высокому фоновому сигналу как в клетках Jurkat, так и в первичных клетках (Фигура 22 и ФИГ. 24). В исследованиях использования данной репортерной системы обычно полагаются на клональную популяцию с минимальным фоновым сигналом[37,38]. Трансдуцированные NFAT клетки Jurkat с репортерным геном устойчивости к пуромицину подвергали двум раундам селекции антибиотиком (ФИГ. 21). Тем не менее, не наблюдали заметного различия между стимулированными и нестимулированными клетками Jurkat после второй селекции, несмотря на предположение, что после первичной обработки антибиотиком получали полуклональную популяцию. Другим объяснением может быть субоптимальный нефизиологический стимул PMA/иономицином, предшествующий второй селекции пуромицином, который приводил к получению <30% $CD69^+$ трансдуцированных NFAT клеток Jurkat (ФИГ. 21d). Кроме того, не наблюдали заметного различия между стимулированными и нестимулированными трансдуцированными EGFP NFAT клетками Jurkat (Фигура 22). Таким образом, селекция клона будет невозможна вследствие такого отсутствия дифференциальной экспрессии GFP.

Полученные результаты позволяют предположить, что пропускание репортерной системой не вызвано минимальным промотором IL2, так как для другого минимального промотора minP выявили сходный уровень фона (ФИГ. 23). Следовательно, пришли к выводу, что пропускание может быть свойством лентивирусной системы доставки.

[0698] Ретровирусные векторы SIN NFAT успешно применялись и приспособлены для исследования ответов антигенспецифических Т-клеток[37,38,40]. Невирусная доставка плазмид NFAT также приводила к высокому фоновому сигналу, так как экспрессия репортерного гена EGFP была повышена в нестимулированных клетках Jurkat (ФИГ. 24). Тем не менее, активация Т-клеток необходима, чтобы дополнительно оценить пропускание в трансфицированных NFAT клетках Jurkat. Кроме того, можно осуществить сортировку методом проточной цитометрии единожды положительной по E2-Crimson популяции, чтобы впоследствии оценить эффективность и пропускание GFP в данной популяции в анализе Т-клеток со стимуляцией. Областью будущих исследований может стать чувствительность репортерных систем AP-1 и NF-κB. так как данные факторы транскрипции используют различные сигнальные пути, которые могут оказывать отличное влияние на фоновый сигнал[38]. Например, репортерную систему NF-κB успешно применяли для скрининга библиотеки химерных антигенных рецепторов в клетках Jurkat[40].

[0699] Данное исследование нацелено на улучшение масштабируемости платформы для выделения специфических к неоантигену TCR. Данные эксперименты полезны, так как более эффективная обработка репортерных Т-клеток Jurkat и АПК, в конечном счете, позволит лечить больше страдающих раком пациентов. Во-первых, определили, что селекция бластицидином трансдуцированных ретровирусом TCR эффекторных клеток Jurkat TCR KO оказалась наиболее эффективной и наименее токсичной процедурой обогащения клетками. Более того, увеличение масштаба совместных культур клеток Jurkat-АПК с формата 96Л планшета до более масштабируемой постановки эксперимента в мешках GMP привело к сопоставимому уровню активации клеток Jurkat. Наконец, была проведена подготовительная работа, которая должна позволить заменить сортировку методом проточной цитометрии на более масштабируемую селекцию на основе гранул экспрессирующих неоантигенреактивные TCR клеток Jurkat в платформе обнаружения TCR.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. ПРИМЕР 19

Линии клеток

[0700] Линию клеток Jurkat человека (клон E6-1, TIB-152) приобретали у Американской коллекции типовых культур (ATCC) и линию иммортализованных с помощью EBV положительных по HLA-A2 B-клеток человека, названную JY, приобретали у Европейской коллекции клеточных культур животных (ECACC). Обе линии клеток Jurkat и JY культивировали в среде RPMI-1640: HEPES (Gibco), дополненный 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (ЭБС, Gibco), 100 ед/мл пенициллина (Gibco) и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco). Линии клеток эмбриональной почки человека 293T (HEK293T, CRL-3216) и Phoenix Ampho приобретали у ATCC и культивировали в среде DMEM (Gibco), дополненной 10% ЭБС, 100 ед/мл пенициллина (Gibco) и 100 мкг/мл стрептомицина. Все линии клеток поддерживали при 37°C и 5% CO_2.

Выделение Т-клеток и В-клеток из здоровых доноров-людей

[0701] Лейкоцитарные пленки из здоровых доноров-людей получали из банка крови Sanquin (Нидерланды) после получения информированного согласия. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из лейкоцитарных пленок, применяя фиколл Ficoll Paque Plus (Sigma-Aldrich).

[0702] Положительные по HLA-A2 B-клетки выделяли путем отрицательной селекции с применением набора MojoSort Human Pan B Cell Isolation Kit (BioLegend), а затем иммортализовали с помощью EBV, используя гаммагерпесвирус 4 человека (HHV-4, ATCC VR-1492). Иммортализованные с помощью EBV B-клетки (EBV LCL) культивировали в среде RPMI-1640: HEPES (Gibco), дополненный 20% ЭБС, 100 ед/мл пенициллина (Gibco) и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco).

[0703] Т-клетки выделяли, активировали с помощью гранул CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies Europe) и культивировали в среде RPMI-1640: HEPES (Gibco), дополненный 10% сыворотки человека (Sigma-Aldrich), 100 ед/мл пенициллина (Gibco), 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) и цитокинами (5 нг/мл IL-15 человека и 100 МЕ/мл IL-2 человека, Peprotech). Все первичные клетки поддерживали при 37°C и 5% CO_2.

Проточная цитометрия и сортировка

[0704] FACS буфер получали путем дополнения ФБР (Gibco) 2%-ной ЭБС. Для проведения анализа методом проточной цитометрии, клетки окрашивали в течение 20 мин при 4°C в темноте и однократно промывали буфером для FACS. LIVE/DEAD Fixable Near-IR (Life Technologies Europe, разведение 1:1000) или DAPI (Sigma-Aldrich, разведение 1:1000) использовали для окрашивания живых/мертвых клеток. Продуцирующие вирус клетки фиксировали в Cytofix (BD Biosciences) при 4°C в течение 30 мин и однократно промывали ФБР перед измерением. Измерения образцов проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD LSR Fortessa и анализировали, применяя программное обеспечение FlowJo v10.6.1.

[0705] Для сортировки пробирки для сбора образцов покрывали ЭБС. Окрашивали $20x10^6$ клеток на 0,5 мл раствора антитела в пробирке емкостью 15 мл. Окрашивание проводили в течение 20 мин при 4°C в темноте, а затем промывали клетки 10 мл буфера для FACS. Затем концентрацию клеток доводили до 15 - $20x10^6$ клеток/мл с помощью буфера для FACS и пропускали образцы через клеточное сито с диаметром пор 35 мкм. Добавляли DAPI (Sigma-Aldrich, разведение 1:1000) в качестве красителя для различения живых и мертвых клеток непосредственно перед сортировкой. Образцы сортировали на FACSAria Fusion.

[0706] Антитела для проточной цитометрии и сортировки разбавляли в буфере для FACS. Использовали следующие антитела и разведения: антитело против CD8 человека-APC(клон SK1, BD Biosciences, разведение 1:300) и антитело против CD8 человека-APC-R700 (клон RPA-T8, BD Biosciences, разведение 1:600), антитело против TCRβ мыши-PE (клон H57-597, BD Biosciences, разведение 1:150), антитело против CD69 человека-PE/APC/BV510 (клон FN50, BD Biosciences, разведения 1:100, 1:200 и 1:300, соответственно) и CD69-PE (клон CH/4, ThermoFisher Scientific, 1:100), антитело против CD20 человека-FITC (клон 2H7, BD Biosciences, разведение 1:25) и антитело против CD20 человека PE-Cy7 (клон L27, BD Biosciences, разведение 1:200), антитело против CD25 человека-BV711 (клон 2A3, BD Biosciences, разведение 1:200), антитело против CD62L человека-APC (клон DREG-56, BD Biosciences, разведение 1:25), антитело против CD3 человека-PerCPCy5.5 (клон SK7, BD Biosciences, разведение 1:25). *Примечание: если не*

указано иное, антитело против CD69 человека, клон FN50, применяли для считывания данных CD69.

Ретровирусные трансфекции и трансдукции

[0707] Для проведения ретровирусных трансфекций, ~1,8x10^6 Phoenix Ampho клеток высевали в культуральную чашку диаметром 10 см и трансфицировали через 24 ч 10 мкг плазмиды pMP71-TCR, применяя FuGENE-6 (Promega) в качестве трансфицирующего реагента. Трансдуцированные TCR состояли из константных областей мыши и вариабельных областей человека, чтобы предотвратить димеризацию трансдуцированных TCR с эндогенными TCR в линии клеток Jurkat. Следовательно, эффективность трансдукции различными TCR можно измерить путем окрашивания одним антителом против мышиной области TCRβ (mTCRβ). Вирусный супернатант собирали через 48 ч после трансфекции и пропускали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Для проведения ретровирусных трансдукций, не обработанные ТС 24Л планшеты покрывали 0,5 мл/лунку ретронектина (RetroNectin, RN, Takara) и инкубировали либо в течение ночи при 4°C, либо в течение 2 ч при КТ. Планшеты блокировали в течение 30 мин 0,5 мл/лунку блокирующего буфера (ФБР, дополненный 5% ЭБС) при КТ и однократно промывали ФБР. 2x10^5 клеток Jurkat в 0,5 мл среды высевали в покрытые RN 24Л планшеты и смешивали с 0,5 мл вирусного супернатанта. Планшеты центрифугировали при 880xg в течение 90 мин (ускорение 3, замедление 0). Эффективность трансдукции измеряли через 3 - 4 дня с помощью проточной цитометрии.

Лентивирусные трансфекции и трансдукции

[0708] Для проведения лентивирусных трансфекций, ~3x10^6 клеток HEK293T высевали в культуральную чашку диаметром 10 см и трансфицировали через 24 ч 10 мкг репортерной конструкции на основе pSMPUW-NFAT-IL-2, применяя пакующие конструкции третьего поколения (пакующие векторы pRSV-Rev и pCgpV и вектор оболочки pCMV-VSV-G, Cell Biolabs) и трансфицирующий реагент полиэтиленимин (PEI, 1 мг/мл, Polysciences) или липофектамин 3000 (ThermoFisher Scientific). Для некоторых лентивирусных трансфекций осуществляли котрансфекцию pmaxGFP (из набора SE Cell Line 4D-Nucleofector X Kit L, Lonza) в качестве меры эффективности трансфекции. Вирусный супернатант собирали через 48 и 72 ч после трансфекции и пропускали через

фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Первичные Т-клетки выделяли и активировали с помощью гранул CD3/CD28 Dynabeads в присутствии среды, дополненной IL-2 и IL-15 (см. 'Выделение Т-клеток и В-клеток из здоровых доноров-людей'), в течение 48 ч перед трансдукцией. Лентивирусные трансдукции первичных Т-клеток осуществляли путем трансдукции с помощью центрифугирования покрытых RN планшетов, как описано в разделе 'Ретровирусные трансфекции и трансдукции' ($2,5x10^5$ первичных Т-клеток на лунку в 24Л планшете). Для проведения лентивирусных трансдукций клеток Jurkat, $2x10^5$ клеток ресуспендировали в 1 мл вирусного супернатанта с полибреном (Sigma-Aldrich). Клетки высевали в 24Л планшет и измеряли эффективность трансдукции через 3 - 4 дня с помощью проточной цитометрии. Трансдуцированные первичные Т-клетки получали свежую среду с цитокинами каждые 3 - 4 дня.

Получение линии клеток Jurkat TCR KO $CD8^+$

[0709] Линию клеток Jurkat E6-1 трансдуцировали ретровирусом с pMP71-CD8α-P2A-CD8β для экспрессии CD8. Кроме того, эндогенную экспрессию TCR устраняли путем нокаута α- и β-цепей TCR, как описано в исследовании Scheper *et al*[46]. Клоны отдельных клеток с высокой экспрессией CD8 сортировали и размножали.

Электропорация клеток Jurkat

[0710] Для того чтобы добиться невирусной доставки плазмид pMKRQ-NFAT в клетки Jurkat (ФИГ. 24), следовали протоколу Amaxa 4D-Nucelofaector для клона E6.1 Jurkat из ATCC от Lonza (номер в каталоге V4XC-1024).

Анализ совместного культивирования

[0711] Мутантный пептид CDK4 (ALDPHSGHFV) и пептид CMVpp65 (NLVPMVATV) заказывали в Pepscan. Пептидами нагружали клетки JY с плотностью $1x10^6$ клеток/мл после 1 ч инкубации при 37°C и 5% CO_2. Затем клетки JY промывали дважды средой. EBV LCL трансдуцировали ретровирусным вектором, кодирующим 25-мерную цепочку полипептидов. Данные полипептиды содержат интересующие эпитопы (например, мутантный пептид CDK4 и пептид CMVpp65), и их называют последовательно расположенными минигенами (TMG) 2.1. Клетки JY без распознаваемого пептида или

нагруженные посторонним пептидом и нетрансдуцированные EBV LCL использовали в качестве отрицательных контролей.

[0712] Эффекторные клетки и клетки-мишени высевали при низкой плотности (0,25/0,5x10^6 клеток/мл) за 24 ч до совместного культивирования. Если не указано иное, совместные культуры вели с 200000 эффекторных клеток и клеток-мишеней (общий объем 200 мкл; соотношение Э:М составляло 1:1) в 96Л планшете со скругленным дном лунок в течение 20 ч; планшет центрифугировали при 1100 об/мин в течение 1 мин перед инкубацией в течение 20 ч. Антитело против CD20 человека включали в панель, чтобы отделить клетки-мишени.

[0713] Мешки MACS GMP Cell Differentiation Bag – 500, используемые на ФИГ. 19c, 19d, приобретали в Miltenyi Biotec.

Реагенты

[0714] Использовали следующие дополнительные реагенты: 50 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA, Sigma-Aldrich), 1 мкМ кальциевая соль иономицина (Sigma-Aldrich), пуромицина дигидрохлорид (Gibco), бластицидин S HCl (Gibco).

Кратность размножения

[0715] Значение кратности размножения на ФИГ. 18 использовали в качестве меры токсичности и рассчитывали путем деления суммарного количества клеток после селекции на суммарное количество клеток в начале селекции. Полученное значение корректировали для пересевания на 4 день.

Статистический анализ

[0716] Расчет значений EC50 и статистический анализ проводили с помощью GraphPad Prism 8. На ФИГ. 23 проводили двухфакторный дисперсионный анализ с последующими множественными сравнениями с использованием критерия Сидака, и P-значения $\leq$0,05 считали статистически значимыми (*P$\leq$0,05, **P$\leq$0,01).

ССЫЛОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFNγ, and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107-1111.

doi:10.1038/35074122

2. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988;334(6181):395-402. doi:10.1038/334395a0
3. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class i and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(12):823-836. doi:10.1038/nri3084
4. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*. 1994;76(2):263-274. doi:10.1016/0092-8674(94)90334-4
5. Crabtree GR, Clipstone NA. Signal Transmission Between the Plasma Membrane and Nucleus of T Lymphocytes. *Annu Rev Biochem*. 1994;63(1):1045-1083. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.005145
6. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15(1):707-747. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.707
7. Tran E, Robbins PF, Rosenberg SA. Final common pathway' of human cancer immunotherapy: Targeting random somatic mutations. *Nat Immunol*. 2017;18(3):255-262. doi:10.1038/ni.3682
8. Schumacher TN, Scheper W, Kvistborg P. Cancer Neoantigens. *Annu Rev Immunol*. 2019;37(1):173-200. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053402
9. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (80-)*. 1996;271(5256):1734-1736. doi:10.1126/science.271.5256.1734
10. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science (80-)*. 2015;348(6230):56-61. doi:10.1126/science.aaa8172
11. Castle JC, Uduman M, Pabla S, Stein RB, Buell JS. Mutation-derived neoantigens for cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2019;10(AUG). doi:10.3389/fimmu.2019.01856
12. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-723. doi:10.1056/NEJMoa1003466
13. Van Rooij N, Van Buuren MM, Philips D, et al. Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(32). doi:10.1200/JCO.2012.47.7521
14. Rizvi NA, Mazières J, Planchard D, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1

immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): A phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(3):257-265. doi:10.1016/S1470-2045(15)70054-9

15. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(17):1627-1639. doi:10.1056/NEJMoa1507643
16. Yee C, Thompson JA, Byrd D, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(25):16168-16173. doi:10.1073/pnas.242600099
17. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2011;17(13):4550-4557. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0116
18. Stevanović S, Draper LM, Langhan MM, et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *J Clin Oncol.* 2015;33(14):1543-1550. doi:10.1200/JCO.2014.58.9093
19. Stevanovic S, Helman SR, Wunderlich JR, et al. A Phase II Study of Tumor-infiltrating Lymphocyte Therapy for Human Papillomavirus–associated Epithelial Cancers. *Clin Cancer Res.* 2019;25(5):1486-1493. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2722
20. Papaioannou NE, Beniata O V., Vitsos P, Tsitsilonis O, Samara P. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Ann Transl Med.* 2016;4(14). doi:10.21037/atm.2016.04.01
21. Zhang J, Wang L. The emerging world of TCR-T cell trials against cancer: A systematic review. *Technol Cancer Res Treat.* 2019;18. doi:10.1177/1533033819831068
22. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: Moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004;10(9):909-915. doi:10.1038/nm1100
23. Robbins PF, Kassim SH, Tran TLN, et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: Long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res.* 2015;21(5):1019-1027. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2708
24. Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC, et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can

mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther*. 2011;19(3):620-626. doi:10.1038/mt.2010.272

25. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother*. 2013;36(2):133-151. doi:10.1097/CJI.0b013e3182829903
26. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (80-)*. 2015;348(6230):69-74. doi:10.1126/science.aaa4971
27. Tran E, Turcotte S, Gros A, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science (80-)*. 2014;344(6184):641-645. doi:10.1126/science.1251102
28. Tran E, Robbins PF, Lu Y-C, et al. T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(23):2255-2262. doi:10.1056/NEJMoa1609279
29. Rodenko B, Toebes M, Hadrup SR, et al. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1120-1132. doi:10.1038/nprot.2006.121
30. Cohen CJ, Gartner JJ, Horovitz-Fried M, et al. Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. *J Clin Invest*. 2015;125(10):3981-3991. doi:10.1172/JCI82416
31. Yadav M, Jhunjhunwala S, Phung QT, et al. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature*. 2014;515(7528):572-576. doi:10.1038/nature14001
32. López-Cabrera M, Santis AG, Fernández-Ruiz E, et al. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-Type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med*. 1993;178(2):537-548. doi:10.1084/jem.178.2.537
33. Krishnamani V, Stamnes MA, Piper RC. MALTA: A calculator for estimating the coverage with shRNA, CRISPR, and cDNA libraries. *SoftwareX*. 2019;9:154-160. doi:10.1016/j.softx.2019.01.006
34. Wölfel T, Hauer M, Schneider J, et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science (80-)*. 1995;269(5228):1281-1284. doi:10.1126/science.7652577

35. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol.* 1996;70(11):7569-7579. doi:10.1128/jvi.70.11.7569-7579.1996

36. Galkina E, Tanousis K, Preece G, et al. L-Selectin Shedding Does Not Regulate Constitutive T Cell Trafficking but Controls the Migration Pathways of Antigen-activated T Lymphocytes. *J Exp Med.* 2003;198(9):1323-1335. doi:10.1084/jem.20030485

37. Hooijberg E, Bakker AQ, Ruizendaal JJ, Spits H. NFAT-controlled expression of GFP permits visualization and isolation of antigen-stimulated primary human T cells. *Blood.* 2000;96(2):459-466. doi:10.1182/blood.v96.2.459.014k50_459_466

38. Jutz S, Leitner J, Schmetterer K, et al. Assessment of costimulation and coinhibition in a triple parameter T cell reporter line: Simultaneous measurement of NF-κB, NFAT and AP-1. *J Immunol Methods.* 2016;430:10-20. doi:10.1016/j.jim.2016.01.007

39. Morimoto S, Fujiki F, Kondo K, et al. Establishment of a novel platform cell line for efficient and precise evaluation of T cell receptor functional avidity. *Oncotarget.* 2018;9(75):34132-34141. doi:10.18632/oncotarget.26139

40. Rydzek J, Nerreter T, Peng H, et al. Chimeric Antigen Receptor Library Screening Using a Novel NF-κB/NFAT Reporter Cell Platform. *Mol Ther.* 2019;27(2):287-299. doi:10.1016/j.ymthe.2018.11.015

41. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, et al. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., & Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. Journal of Virology, 72(12), 9873–80. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.ni. *J Virol.* 1998;72(12):9873-9880. Accessed May 21, 2020. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811723%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC110499

42. Spindler MJ, Nelson AL, Wagner EK, et al. Massively parallel interrogation and mining of natively paired human TCRαβ repertoires. *Nat Biotechnol.* Published online 2020. doi:10.1038/s41587-020-0438-y

43. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: An in vitro model to monitor cellular immune function. *J*

Immunol Methods. 2004;293(1-2):127-142. doi:10.1016/j.jim.2004.07.006

44. Chao CC, Jensen R, Dailey MO. Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells. *J Immunol*. 1997;159(4):1686-1694. Accessed May 15, 2020. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9257829

45. Yang S, Liu F, Wang QJ, Rosenberg SA, Morgan RA. The Shedding of CD62L (L-Selectin) Regulates the Acquisition of Lytic Activity in Human Tumor Reactive T Lymphocytes. Teague RM, ed. *PLoS One*. 2011;6(7):e22560. doi:10.1371/journal.pone.0022560

46. Scheper W, Kelderman S, Fanchi LF, et al. Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers. *Nat Med*. 2019;25(1):89-94. doi:10.1038/s41591-018-0266-5

ПРИМЕР 20

[0717] В данном примере описано получение антигенспецифических TCR из библиотек TCR с использованием различных соотношений эффектора к мишени (Э:М).

[0718] Пять охарактеризованных TCR с известной антигенной реактивностью, а также 95 неохарактеризованных TCR (для библиотек 100 x 100; ФИГ. 35A) выбирали для создания библиотеки TCR (проводили в Twist Bioscience; Сан-Франциско, США). Вкратце, цепи TCRα и TCRβ из указанных TCR синтезировали в виде фрагментов путем синтеза ДНК. Для создания библиотеки все выбранные фрагменты TCRα и TCRβ комбинаторно соединяли в непрерывные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие кассеты TCRβ-P2A-TCRα (SEQ ID NO: 1). Ретровирусную конструкцию, содержащую как бета-, так и альфа-цепи TCR, а также маркер селекции пуромицином, можно использовать в качестве каркаса для создания библиотеки. Ретровирусная трансдукция с применением данной конструкции в конечном счете приводила к экспрессии единого транскрипта, что приводило к трансляции бета- и альфа-цепей TCR, а также маркера устойчивости к пуромицину, благодаря расщеплению пептида в сайтах 2A. Можно присоединить один TCRβ- и TCRα-фрагмент на кассету в формате TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину (SEQ ID NO: 1). Области TCR-бета и TCR-альфа каждого из 100 TCR синтезировали и встраивали в указанный вектор в подходе комбинаторного клонирования, осуществленного в Twist Bioscience.

[0719] Библиотеками 100 x 100 трансфицировали продуцирующие вирус клетки Phoenix-Ampho (ATCC CRL-3213), используя трансфицирующий реагент Fugene и протоколы, известные квалифицированному специалисту. Полученные в результате этого ретровирусные вирионы применяли для трансдукции линии репортерных Т-клеток Jurkat. В репортерной Т-клетке Jurkat отсутствует эндогенная экспрессия TCR (получение такого генетического нокаута было описано, например, в Mezzadra et al, Nature, 2017), и она модифицирована для экспрессии CD8α и CD8β человека после трансдукции трансгеном CD8α-P2A-CD8β (SEQ ID NO: 2) с применением способов, известных квалифицированному специалисту. Репортерные Т-клетки Jurkat трансдуцировали библиотекой TCR, что приводило к 25% модифицированных TCR Т-клеток из всех живых Т-клеток (на основании окрашивания через 4 дня после трансдукции – после селекции пуромицином и в день анализа чистота составляла > 80%). Использование мышиных последовательностей константного домена TCR в библиотеке TCR (SEQ ID NO: 1) позволяло обнаружение модифицированных TCR Т-клеток Jurkat с помощью проточной цитометрии с применением антитела, специфического к мышиному константному домену TCRβ. Проводили положительную селекцию Т-клеток Jurkat, модифицированных для экспрессии трансгена TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину, до высокой чистоты путем добавления пуромицина в среды для культивирования клеток. Селекция антибиотиком генетически модифицированных клеток известна специалисту со средней квалификацией в данной области техники.

[0720] Затем трансдуцированные TCR Т-клетки Jurkat стимулировали с помощью АПК, которые были сконструированы, чтобы презентировать антигены. Клетки EBV-LCL, экспрессирующие TMG, добавляли на уровне 10% в EBV-LCL, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии специфических антигенов. За три дня до совместного культивирования репортерные Т-клетки Jurkat высевали при низкой плотности (0,1 x 10^6 клеток на мл). АПК смешивали с репортерными Т-клетками Jurkat в соотношениях 1:1, 1:2 и 1:3 при концентрации 2,5x10^6 клеток на мл. Осуществляли один повтор для каждого соотношения Э:М (наличие экспрессии TMG), а также был включен один повтор отрицательного контроля (отсутствие экспрессии TMG). 200 мкл (0,5x10^6 клеток на лунку) распределяли по ~360, 540 или 720 лункам обработанных ТС 96-луночных

планшетов с U-образным дном лунок, соответственно. Планшеты центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 минуты и инкубировали в течение 20 - 22 часов при 37°C.

[0721] Затем совместные культуры собирали, клетки метили микрогранулами против CD20 от Miltenyi и переносили в колонки LS, которые помещали на магнит. Путем селекции на магнитных гранулах, CD20+ клетки сохраняли в колонке, тогда как CD20- клетки проходили через колонку и были собраны в отрицательную фракцию. Данные CD20- клетки затем окрашивали мечеными флуорохромом антителами против CD20 и CD69. Затем клетки фиксировали с применением фиксирующего буфера, содержащего 4% формальдегид. Применяя устройство для сортировки клеток методом проточной цитометрии ARIAFusion от BD Biosciences, сортировали следующие популяции для каждого условия стимуляции (ФИГ. 35B):

1. Лимфоцит, отдельные клетки, $CD20^-$, $CD69^{hi}$ ($CD69^{hi}$ включали 10 - 15% отдельных, $CD20^-$ клеток с наиболее высоким сигналом на основании сигнала флуоресценции CD69)
2. Лимфоцит, отдельные клетки, $CD20^-$, $CD69^{lo}$ ($CD69^{lo}$ включали 10 - 15% отдельных, $CD20^-$ клеток на основании низкого сигнала флуоресценции CD69)

[0722] Геномную ДНК выделяли из сортированных трансдуцированных TCR T-клеток Jurkat и использовали в качестве матрицы для множества раундов ПЦР с ограниченным количеством циклов, чтобы амплифицировать часть кассеты TCRβ-P2A-TCRα, применяя способы ПЦР, известные квалифицированному специалисту. Размер полученного в результате этого продукта ПЦР составлял приблизительно 1,5 т.п.н. (ФИГ. 35C), и его можно было секвенировать с применением секвенирующего устройства MinIon Oxford Nanopore или GridIon, применяя методики, известные специалисту в данной области техники. TCR идентифицировали, применяя методики выравнивания, известные квалифицированному специалисту, и дифференциально экспрессированные комбинации TCR идентифицировали, применяя пакет DESeq2 R. Rlog-преобразованные количества прочтений рассчитывали, применяя пакет DESeq2 R, и Rlog-значения для нижних образцов вычитали из Rlog-значений верхних образцов, и представили для совместных культур, которые вели в присутствии (ось x) и отсутствие (ось y) экспрессии TMG B-клетками (ФИГ. 35D). 5 охарактеризованных TCR изображены в виде более крупных серых точек.

Идентифицированные TCR, а также ключевые статистические показатели представлены для пяти охарактеризованных TCR (ФИГ. 35E).

[0723] В целом, в данном примере показали, что увеличение соотношения клеток-мишеней к эффекторным клеткам улучшает чувствительность платформы для скрининга библиотеки TCR.

ПРИМЕР 21

[0724] В данном примере описано получение антигенспецифических TCR из библиотеки TCR, полученной путем синтеза генов, с применением стратегии сортировки клеток на основе гранул.

[0725] Пять охарактеризованных TCR с известной антигенной реактивностью, а также 95 неохарактеризованных TCR (для библиотек 100 x 100; ФИГ. 36A) выбирали для создания библиотеки TCR (проводили в Twist Bioscience; Сан-Франциско, США). Вкратце, цепи TCRα и TCRβ из указанных TCR синтезировали в виде фрагментов путем синтеза ДНК. Для создания библиотеки все выбранные фрагменты TCRα и TCRβ комбинаторно соединяли в непрерывные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие кассеты TCRβ-P2A-TCRα (SEQ ID NO: 1). Ретровирусную конструкцию, содержащую как бета-, так и альфа-цепи TCR, а также маркер селекции пуромицином, можно использовать в качестве каркаса для создания библиотеки. Ретровирусная трансдукция с применением данной конструкции в конечном счете приводила к экспрессии единого транскрипта, что приводило к трансляции бета- и альфа-цепей TCR, а также маркера устойчивости к пуромицину, благодаря расщеплению пептида в сайтах 2A. Можно присоединить один TCRβ- и TCRα-фрагмент на кассету в формате TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину (SEQ ID NO: 1). Области TCR-бета и TCR-альфа каждого из 100 TCR синтезировали и встраивали в указанный вектор в подходе комбинаторного клонирования, осуществленного в Twist Bioscience.

[0726] Библиотекой 100 x 100 трансфицировали продуцирующие вирус клетки Phoenix-Ampho (ATCC CRL-3213), используя трансфицирующий реагент Fugene и протоколы, известные квалифицированному специалисту. Полученные в результате этого ретровирусные вирионы применяли для трансдукции линии репортерных Т-клеток Jurkat. В репортерной Т-клетке Jurkat отсутствует эндогенная экспрессия TCR (получение такого

генетического нокаута было описано, например, в Mezzadra et al, Nature, 2017), и она модифицирована для экспрессии CD8α и CD8β человека после трансдукции трансгеном CD8α-P2A-CD8β (SEQ ID NO: 2) с применением способов, известных квалифицированному специалисту. Репортерные Т-клетки Jurkat трансдуцировали библиотекой TCR, что приводило к 25% модифицированных TCR Т-клеток из всех живых Т-клеток (на основании окрашивания через 4 дня после трансдукции – после селекции пуромицином и в день анализа чистота составляла > 80%). Использование мышиных последовательностей константного домена TCR в библиотеке TCR (SEQ ID NO: 1) позволяло обнаружение модифицированных TCR Т-клеток Jurkat с помощью проточной цитометрии с применением антитела, специфического к мышиному константному домену TCRβ. Проводили положительную селекцию Т-клеток Jurkat, модифицированных для экспрессии трансгена TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину, до высокой чистоты путем добавления пуромицина в среды для культивирования клеток. Селекция антибиотиком генетически модифицированных клеток известна специалисту со средней квалификацией в данной области техники.

[0727] Затем трансдуцированные TCR Т-клетки Jurkat стимулировали с помощью АПК, которые были или не были подвергнуты генетической инженерии для презентации происходящих из опухоли антигенов (1 повтор для каждого). За три дня до совместного культивирования репортерные Т-клетки Jurkat высевали при низкой плотности (0,1 x 10^6 клеток на мл). АПК смешивали с репортерными Т-клетками Jurkat в соотношении 1:1 при концентрации 2,5x10^6 клеток на мл. 200 мкл (0,5x10^6 клеток на лунку) распределяли по ~360 лункам обработанных ТС 96-луночных планшетов с U-образным дном лунок. Планшеты центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 минуты и инкубировали в течение 20 - 22 часов при 37°C.

[0728] Затем совместные культуры собирали и удаляли мертвые клетки с применением набора для удаления мертвых клеток. Живые клетки отделяли на основе стратегии многоэтапного выделения (ФИГ. 36B), метили микрогранулами против CD20 и переносили на AutoMACS (Miltenyi, Бергиш-Гладбах, Германия). Путем селекции на магнитных гранулах, CD20+ клетки сохраняли в колонке, тогда как CD20- клетки проходили через колонку и были собраны в отрицательную фракцию. Данные CD20- клетки затем метили микрогранулами против CD62L, чтобы отделить неактивированные клетки

Jurkat от активированных клеток Jurkat с применением AutoMACS. После такого разделения, как отрицательную (CD62L- клетки), так и положительную фракцию (CD62L+ клетки) метили антителом против CD69, конъюгированным с биотином, и CD69- и CD69+ фракции разделяли, применяя микрогранулы против биотина. Для дополнительного анализа собирали следующие популяции (ФИГ. 36B):

1. $CD20^{-}$, CD62L+, CD69- («нижняя» фракция → неактивированные Т-клетки Jurkat)
2. $CD20^{-}$, CD62L-, CD69+ («верхняя» фракция → активированные Т-клетки Jurkat)

[0729] Геномную ДНК выделяли из сортированных на основе гранул трансдуцированных TCR Т-клеток Jurkat и использовали в качестве матрицы для множества раундов ПЦР с ограниченным количеством циклов, чтобы амплифицировать часть кассеты TCRβ-P2A-TCRα, применяя способы ПЦР, известные квалифицированному специалисту. Размер полученного в результате этого продукта ПЦР составлял приблизительно 1,5 т.п.н. (ФИГ. 36C), и указанный продукта можно было секвенировать, применяя секвенирующие устройства MinIon Oxford Nanopore или GridIon, используя методики, известные специалисту в данной области техники. TCR идентифицировали, применяя методики выравнивания, известные квалифицированному специалисту, и дифференциально экспрессированные комбинации TCR идентифицировали, применяя пакет DESeq2 R. Rlog-преобразованные количества прочтений для каждого TCR рассчитывали, применяя пакет DESeq2 R, и Rlog-значения для нижних вычитали из Rlog-значений для верхних образцов и представляли для совместных культур, которые вели в присутствии (ось x) и отсутствие (ось y) экспрессии TMG B-клетками (ФИГ. 36D). Представлена идентичность альфа- и бета-цепей TCR, а также ключевые статистические показатели для верхних 7 наиболее дифференциально представленных TCR в верхних образцах (ФИГ. 36E).

[0730] В целом, в данном примере показали, что сортировка на основе гранул позволяет успешно отделить активированные клетки от неактивированных клеток, и что данную методику можно применять в качестве способа идентификации антигенспецифических TCR из библиотеки TCR с применением подхода генетического скрининга в качестве альтернативы разделению клеток на основе FACS.

ПРИМЕР 22.

[0731] В данном примере описано, что комбинаторное кодирование TMG можно разрешить, применяя анализ попарного обогащения TCR. В данном примере продемонстрирована возможность смешать пулы экспрессирующих TMG АПК, применяя комбинаторное кодирование TMG, и разрешение TMG, которые экспрессируют антиген, который распознается TCR из библиотеки TCR.

[0732] Комбинаторное кодирование TMG позволяет осуществить эффективный скрининг больших количеств TMG без соответствующего масштабирования количеств скрининговых тестов, при этом сохраняя потенциальную возможность идентификации TMG, который распознается лидирующим TCR по реузльтатам скрининга библиотеки TCR. Комбинаторное кодирование TMG основано на принципе получения пулов АПК, экспрессирующих TMG, и на том, что каждый TMG представлен ровно в одной комбинации пулов. Поскольку комбинация пулов уникальна для каждого TMG, это позволяет идентификацию TMG, который распознается TCR, при скрининге библиотеки TCR. TMG, кодирующий антиген, который распознается данным лидирующим TCR по реузльтатам скрининга библиотеки TCR, можно идентифицировать, используя анализ попарного обогащения TCR, который служит для увеличения силы сигнала путем специфического анализа пар пулов вместо единичных пулов отдельно.

[0733] Один пример комбинаторного дизайна TMG представлен на ФИГ. 37A). 36 TMG экспрессируются в 12 пулах (C1-6 и R1-6), причем в каждом пуле экспрессируется 6 TMG. Пулы АПК, экспрессирующих TMG, можно создать путем поликлональной инженерии АПК (например, продукции поликлонального вируса и трансдукции АПК или продукции моноклонального вируса, смешивания вирусов в пулы и поликлональной трансдукции АПК), или путем смешивания сконструированных линий клеток АПК, каждая из которых экспрессирует один TMG. В качестве примера, если анализ попарного обогащения TCR показал, что оба пула АПК C1 и R1 могут активировать данный TCR, то этот TCR распознает антиген, экспрессированный с TMG1. Это является следствием того, что TMG1 – это единственный TMG, представленный в обоих пулах. Тогда как на ФИГ. 37A) комбинаторное кодирование TMG основано на присутствии TMG ровно в двух пулах, можно создать аналогичные дизайны комбинаторного кодирования TMG, в котором каждый TMG присутствует ровно в 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более пулах. В случае, когда

каждый TMG присутствует ровно в 3 пулах, идентификация 3 пулов, которые распознаются данным TCR, позволит установить TMG, который распознается. TMG, который распознается, представляет собой TMG, который есть во всех 3 пулах.

[0734] На ФИГ. 10G) показаны результаты трех повторов скрининга, которые включают 3 контрольных скрининга, в которых репортерные Т-клетки, экспрессирующие библиотеку TCR, совместно культивировали с АПК, которые не были подвергнуты генетической инжнерии для экспрессии TMG, и 3 скринингов на основе совместных культур с пулом линий клеток АПК, каждая из которых экспрессирует один TMG. Комбинаторное кодирование TMG, описанное выше, где каждый TMG представлен ровно в 2 пулах, включает достаточную чувствительность идентификации TCR в подходе скрининга на основе двух повторов. Для статистического анализа дифференциально представленных комбинаций TCR-альфа x бета-цепей по результатам, приведенным на ФИГ. 10G), применяли пакет программ DESeq2 R. На ФИГ. 37B) и 37C) показано, что авторы настоящего изобретения исследовали, были ли ранжирование или значимость лидирующих TCR, идентифицированных при скрининге для пациента с КРР (ФИГ. 10G), были сходны на основании 2 из 3 повторов. На ФИГ. 37B) показано, что при выборе 7 лидирующих TCR для pt2, будут выбраны те же TCR на основании комбинированного анализа любой комбинации 2 из 3 повторов. Аналогичным образом, для любого из лидирующих TCR, идентифицированных на ФИГ. 10G), те же (группа из) TCR будут выбраны на основании использования 2 из 3 повторов для статистического анализа (ФИГ. 37C; колонка ‘Ранги’). Кроме того, скорректированные p-значения сходны для статистического анализа на основании 2 или 3 повторов для любого из лидирующих TCR, идентифицированных при скрининге библиотеки TCR пациента 4 с КРР (ФИГ. 37C). Это показало, что 2 повторов достаточно для идентификации TCR с чувствительностью, сходной с таковой для скрининга с 3 повторами. Это позволяет идентификацию распознанных TMG с применением комбинаторного дизайна TMG, в котором каждый TMG представлен ровно два раза в пулах TMG.

[0735] Для того чтобы проверить чувствительность анализа попарного обогащения TCR с целью добиться распознавания TMG исходя из дизайна комбинаторного кодирования TMG, для анализа выбрали шесть образцов из pt4 (каждый из которых состоял из верхнего и нижнего образца) (ФИГ. 37D). Все возможные 15 попарных комбинаций из

указанных 6 образцов анализировали, применяя DESeq2, для выявления дифференциальной представленности TCR в верхнем образце по сравнению с нижним образцом. Для анализа использовали модель взаимодействия, в которой обогащение TCR в верхних образцах относительно такового в нижних образцах пары пулов противопоставляли обогащению TCR в верхних образцах по сравнению с таковым в нижних образцах из всех других пулов. Все скорректированные p-значения упорядочивали по рангу от наименьшего к наибольшему p-значению и представили на ФИГ. 37E). Два скорректированных p-значения выбивались из ряда остальных. Они представляли собой TCR-альфа9.бета14 в анализе попарного обогащения TCR образцов 4 и 5, и TCR-альфа43.бета16 в анализе попарного обогащения TCR образцов 3 и 5. Эти результаты показывают, что TMG4, который представлен в образцах 4 и 5, и TMG3, который представлен в образцах 3 и 5, кодируют антиген, который распознается соответствующими указанными TCR.

[0736] В целом, в данном примере показали, что пулы АПК, каждый из которых экспрессирует множество TMG, можно применять для проведения скрининга библиотеки TCR против большого количества минигенов, и что такой подход комбинаторного кодирования TMG позволяет идентификацию как антигенреактивных TCR, так и TMG, который экспрессирует распознаваемый антиген.

ПРИМЕР 23

[0737] В данном примере описано, что характеристики TCR можно получить из результатов генетического скрининга. Данный пример демонстрирует, что подходы скрининга библиотеки TCR достаточно чувствительны, чтобы получить характеристики TCR. Для этой цели, результаты функционального генетического скрининга для платформы идентификации TCR сравнивали с независимыми проверочными экспериментами в отношении индуцированной активации и фоновой активации TCR.

[0738] Оценивали реактивность шестнадцати TCR КРР из pt2, идентифицированных на ФИГ. 10G), в отношении распознаваемых TMG (TMG2). Наблюдали хорошую взаимосвязь между активацией, наблюдаемой в подходе генетического скрининга, и активацией, наблюдаемой в проверочных экспериментах (ФИГ. 38); средняя панель). Кроме того, наблюдали хорошую взаимосвязь между фоновой

активацией, наблюдаемой в подходе генетического скрининга, и фоновой активацией, наблюдаемой в проверочном эксперименте (ФИГ. 38); правая панель).

[0739] Полученные результаты показывают, что характеристики TCR, которые можно определить в независимых экспериментах после идентификации TCR с применением подхода скрининга библиотеки TCR, можно определить на стадии скрининга по результатам функционального генетического скрининга. Например, относительную чувствительность TCR, а также активацию TCR в отсутствие антигена можно определить по результатам скрининга библиотеки TCR, пример чего приведен на ФИГ. 38). Относительная чувствительность TCR может быть важна для определения оптимального TCR для конструирования Т-клеточного продукта для лечения страдающего раком пациента. Активация TCR в отсутствие антигена может представлять собой критерий отрицательной селекции, так как сконструированные Т-клетки, экспрессирующие такие TCR, могут распознавать антигены, презентированные на нераковых клетках.

[0740] На этапе скрининга библиотеки TCR можно добавить дополнительный скрининг, чтобы уменьшить количество анализов характеристик TCR, которые необходимо осуществить после этапа скрининга. Они включают, но не ограничены перечисленными: i) скрининг с АПК, экспрессирующими TMG дикого типа, в качестве контроля, чтобы определить специфичность TCR к мутациям в фазе скрининга библиотеки TCR; ii) скрининг с АПК, сконструированными таким образом, чтобы в них отсутствовали необходимые компоненты для представления I класса или II класса (B2M или CIITA/CD74), и сконструированные для экспрессии TMG в качестве контролей, чтобы определить рестриктирование TCR по I/II классу; iii) скрининг с АПК, экспрессирующими TMG с промоторов с различной силой, чтобы определить чувствительность TCR.

[0741] Резюмируя, в данном примере показали, что характеристики TCR можно определить по результатам скрининга библиотеки TCR, что дает преимущество, состоящее в уменьшении количества экспериментов, которые необходимо осуществить для определения характеристик TCR после этапа скрининга библиотеки TCR, и, следовательно, может уменьшить суммарное количество времени, необходимого от момента скрининга до и включая определение характеристик TCR.

ПРИМЕР 24.

Получение антигенреактивных TCR из библиотек TCRαβ посредством выделения субпопуляции репортерных Т-клеток («подход верхних и нижних образцов»)

[0742] В данном примере описано получение антигенреактивных TCR из библиотек TCRαβ посредством выделения одной или более субпопуляций на основании ответа на антиген. Сокращенно, этот подход включает следующие этапы: i) генную инженерию репортерных Т-клеток, чтобы позволить экспрессию TCR из библиотек TCRαβ; ii) ведение совместной культуры указанных клеток с антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один антиген; iii) разделение клеток на основании маркеров активации Т-клеток на a) 'верхнюю' популяцию, экспрессирующую один или множество маркеров активации Т-клеток; и b) 'нижнюю' популяцию без экспрессии (или с низкой экспрессией) одного или множества маркеров активации Т-клеток; iv) идентификацию TCR из верхних и нижних образцов, применяя ПЦР с геномной ДНК и последующее глубокое секвенирование; и v) идентификацию по меньшей мере одного антигенреактивного TCR, которым обогащен верхний образец по сравнению с нижним образцом. Экспрессия маркера активации Т-клеток может представлять собой относительно высокую экспрессию маркера, разграничивающего активированные Т-клетки (CD69), или относительно низкие уровни экспрессии маркера, разграничивающего неактивированные Т-клетки (CD62L).

[0743] Принцип, лежащий в основе подхода с верхними/нижними образцами, состоит в том, что антигенреактивные TCR станут положительными по маркерам активации после стимуляции антигеном, и, следовательно, такими TCR будет обогащена верхняя популяция относительно нижней популяции. Подход с верхними/нижними образцами проиллюстрирован на различных сопроводительных фигурах, как описано ниже.

[0744] В альтернативных вариантах реализации нижний образец может представлять собой любую референсную популяцию клеток или референсную библиотеку плазмид TCR. Нижний образец может быть отсортирован из той же популяции клеток, что и верхний образец, но содержит низкий уровень экспрессии маркеров активации. Нижний образец можно получить из совместных культур репортерных Т-клеток, экспрессирующих соответствующую библиотеку TCR, и В-клеток, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии экзогенных антигенов. Нижний образец может представлять

собой библиотеку плазмид TCR, которые применяли, чтобы создать репортерные Т-клетки, из которых сортировали верхний образец. В некоторых вариантах реализации представленность TCR в верхних и нижних образцах можно сравнить с представленностью TCR в любом другом дополнительном образце в процессе дифференциального анализа представленности TCR. В некоторых вариантах реализации такие дополнительные образцы могут представлять собой библиотеку плазмид TCR. В других вариантах реализации такие дополнительные образцы могут быть получены из совместных культур репортерных Т-клеток, экспрессирующих соответствующую библиотеку TCR, и В-клеток, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии экзогенных антигенов.

[0745] Значения rlog на ФИГ. 39) обозначают меру представленности TCR. На диаграмме показано обогащение пятью охарактеризованными TCR, которые стимулированы распознаваемыми антигенами (наиболее светлая серая штриховка), верхних образцов по сравнению с любым из других образцов. В нижних образцах, полученных из совместных культур с В-клетками, экспрессирующими TMG, выявлены более низкие значения rlog, чем в верхних или нижних образцах из совместных культур с В-клетками, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии экзогенных антигенов. На основании данных результатов, специалист в данной области поймет, что идентификация антигенреактивных TCR с применением подхода верхних и нижних образцов будет с большей чувствительностью, если i) нижние образцы получены из той же популяции клеток, что и верхний образец, но в них наблюдается низкая экспрессия маркера активации (нижний + TMG); чем если ii) нижние образцы получены из совместных культур с В-клетками, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии экзогенных антигенов. Причина этого состоит в том, что различие между верхними + TMG и нижними + TMG образцами больше, чем различие между верхними + TMG и верхними/нижние – TMG образцами, позволяя детектирование реактивности TCR с большей чувствительностью с применением первого из упомянутых сравнений. Нижний образец (т.е., референсная представленность TCR) может быть получен из соответствующей плазмидной библиотеки TCR (черные точки на ФИГ. 39), которая коррелирует с представленностью TCR в верхних или нижних образцах из совместных культур с В-клетками, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии экзогенных антигенов.

[0746] Дополнительные аспекты данного Примера представлены на ФИГ. 39, на которой показан дополнительный анализ генетического скрининга комбинаторной библиотеки 100 x 100, представленной на ФИГ. 14 F, G). В данном примере показан подход с верхними/нижними образцами, в котором клетки в нижнем образце в идеале отсортированы из той же популяции, что и клетки в верхнем образце, но отрицательны по маркеру активации. На ФИГ. 39) результаты с ФИГ. 14 F, G) были Rlog-преобразованы с применением пакета DESeq2 R и представлены для каждого из пяти охарактеризованных TCR. Каждая точка представляет собой независимый повтор, и точки окрашены в соответствии с типом образца. Верхние образцы представляют собой верхние 10% клеток с наиболее высокой экспрессией CD69, тогда как нижние образцы представляют собой клетки, которые были отсортированы из той же популяции клеток, но у которых выявили низкую экспрессию CD69. На ФИГ. 16E) подход с верхними/нижними образцами применяли в отношении пула hCD8+ клеток Jurkat, который был создан из 24 линий Т-клеток, каждая из которых экспрессировала различные TCR с известной идентичностью, но с неизвестной специфичностью. Указанные линии клеток смешивали в соотношении 1:1 и hCD8+ клетки Jurkat, экспрессирующие любой из CDK4-17, CDK4-8, CMV#1, CMV#2 или GCN1L1 TCR, также смешивали с различными частотами в диапазоне 1:10000 – 1:1000000. После совместного культивирования с В-клетками, экспрессирующими распознаваемые данными 5 TCR антигены, клетки окрашивали на CD69 (маркер активации Т-клеток). Верхние 10% Т-клеток, экспрессирующих наиболее высокий уровень CD69 сортировали с помощью FACS в верхний образец, и приблизительно равное количество Т-клеток, экспрессирующих низкие уровни CD69, сортировали с помощью FACS в нижний образец. Содержание TCR в обоих образцах анализировали с применением ПЦР на геномной ДНК, с последующим секвенированием нового поколения с применением платформы Illumina. Рассчитывали относительную распространенность TCR в верхних образцах относительно нижних образцов, и наблюдали обогащение всеми пятью TCR с известной специфичностью, применяя данный подход.

[0747] На ФИГ. 13A)-E) показана библиотека TCR, которую создавали путем смешивания плазмид, экспрессирующих шесть антигенспецифических TCR с частотами встречаемости 1:10000 - 1:100000, с пулом плазмид с известной идентичностью, но с неизвестной специфичностью. Данный пул плазмид использовали для получения

ретровируса и инфицирования клеток Jurkat hCD8+ TCR KO. Вели совместную культуру этого поликлонального пула репортерных Т-клеток с В-клетками, экспрессирующими антигены, распознаваемые антигенспецифическими TCR. Верхние 10% Т-клеток, экспрессирующих наиболее высокие уровни CD69, сортировали с помощью FACS в верхний образец, и приблизительно равное количество Т-клеток, экспрессирующих низкие уровни CD69, сортировали с помощью FACS в нижний образец (ФИГ. 13C). Содержание TCR в обоих образцах анализировали с помощью ПЦР с геномной ДНК (ФИГ. 13D), а затем секвенирования нового поколения с применением платформы Illumina. Рассчитывали относительную распространенность TCR в верхних образцах относительно нижних образцов, и наблюдали обогащение всеми пятью TCR с известной специфичностью, применяя данный подход (ФИГ. 13E).

[0748] На ФИГ. 10A)-J) показано создание комбинаторной библиотеки TCR из наиболее распространенных цепей TCRα и TCRβ, полученных с помощью секвенирования всех TCR образца колоректального рака (КРР). Данную библиотеку применяли для ретровирусной трансдукции клеток Jurkat hCD8+ TCR KO (ФИГ. 10D), которые совместно культивировали с EBV-B-клетками, экспрессирующими опухолеспецифические неоантигены. Верхние 10% Т-клеток, экспрессирующих наиболее высокие уровни CD69, сортировали с помощью FACS в верхние образцы, и приблизительно равное количество Т-клеток, экспрессирующих низкие уровни CD69, сортировали с помощью FACS в нижние образцы (ФИГ. 10E). Содержание TCR во всех образцах анализировали с применением ПЦР с геномной ДНК (ФИГ. 10F), с последующим секвенированием нового поколения с применением технологии Oxford Nanopore. Рассчитывали относительную распространенность TCR в верхних образцах относительно нижних образцов. Применяя указанный подход к трем дополнительным образцам КРР, авторы настоящего идентифицировали всего 11 кандидатных неоантигенреактивных TCR (ФИГ. 10G). Четыре из них дополнительно проверяли в независимых экспериментах по совместному культивированию (ФИГ. 10H-K).

[0749] На ФИГ. 36A)-E), верхние и нижние образцы разделяли, используя сортировку на основе гранул с применением AutoMACS (Miltenyi, Бергиш-Гладбах, Германия). Пять охарактеризованных TCR и 95 неохарактеризованных TCR из образцов рака яичников (РЯ) или колоректального рака (КРР) использовали для создания

комбинаторных библиотек TCR дизайна 100 x 100, которые экспрессировали в репортерных Т-клетках. После совместного культивирования с В-клетками, экспрессирующими антигены, распознаваемые пятью охарактеризованными TCR, В-клетки удаляли, применяя микрогранулы, покрытые антителами против CD20 (CD20-микрогранулы). Затем получали верхний и нижний образцы, используя последовательную сортировку на основе гранул с помощью маркеров CD62L и CD69. CD62L представляет собой маркер, экспрессированный на неактивированных Т-клетках, и CD69 представляет собой маркер, экспрессированный на активированных Т-клетках. Клетки, которые не связались с CD62L-микрогранулами и которые связались с CD69-микрогранулами отделяли в верхний образец, и клетки, которые связались с CD62L-микрогранулами и которые не связались с CD69-микрогранулами, отделяли в нижний образец. Содержание TCR в обоих образцах анализировали с помощью ПЦР с геномной ДНК (ФИГ. 36C), а затем секвенирования нового поколения с применением технологии Oxford Nanopore и скринингового анализа (ФИГ. 36D, E). Указанные пять охарактеризованных TCR находились среди 7 наиболее значительно обогащенных TCR в верхних образцах относительно нижних образцов. Это показало, что сортировку на основе гранул можно применять в качестве альтернативной стратегии для разделения верхних и нижних образцов в подходе скрининга библиотеки TCR.

[0750] В данном примере показали, что подход с верхними/нижними образцами можно в общем применять по отношению к репортерным Т-клеткам, экспрессирующим множество TCR, чтобы обеспечить возможность функционального генетического скрининга антигенреактивных TCR. Подход с верхними/нижними образцами можно применять независимо от способа, которым были созданы поликлональные репортерные Т-клетки, экспрессирующие множество TCR. Это подкрепляется идентификацией антигенреактивных TCR из экспрессирующих TCR репортерных Т-клеток, которые получали различными способами: i) путем смешивания линий репортерных Т-клеток, каждая из которых экспрессирует один определенный TCR; ii) путем смешивания плазмид, кодирующих определенные TCR, продукции поликлонального вируса и трансдукции репортерных Т-клеток; и iii) путем применения библиотеки TCR для продукции поликлонального вируса и трансдукции репортерных Т-клеток.

[0751] Кроме того, в данном примере показали, что подход с верхними/нижними образцами можно применять для различных методик разделения клеток и идентификации

TCR: i) окрашивания различных маркеров активации Т-клеток (CD69 отдельно или комбинации CD62L/CD69); ii) разделения с помощью различных методик сортировки клеток (сортировка FACS и сортировка на основе гранул); и iii) анализа с помощью различных методик секвенирования нового поколения (технологий Illumina и Oxford Nanopore).

[0752] В некоторых вариантах реализации подход, описанный выше в примере (подход с верхними/нижними образцами), можно применять для любого способа создания библиотеки TCR, включая, но не ограничиваясь перечисленными: i) различные способы дизайна библиотеки, описанные на ФИГ. 15; ii) дизайн библиотеки на основании методик секвенирования TCR, которые позволяют идентифицировать последовательности обеих цепей TCRa и TCRb, которые экспрессируются в одной клетке (секвенирование спаренных TCR); iii) дизайн библиотеки на основании соединения последовательностей TCRa и TCRb внутри клетки и последующего клонирования. Подход с верхними/нижними образцами может основываться на разделении клеток по любым маркерам активации Т-клеток, или комбинации маркеров активации Т-клеток, включая, но не ограничиваясь CD69, CD62L, CD137, CD25, IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF. Подход с верхними/нижними образцами можно применять по отношению к любому маркеру пролиферации, включая, но не ограничиваясь окрашиванием CellTrace. Подход с верхними/нижними образцами можно применять по отношению к разделению клеток на основании любого репортера активации Т-клеток, включая, но не ограничиваясь репортерами CD69(промотор)-EGFRt и CD69(промотор)-LNGFR. Подход с верхними/нижними образцами можно применять по отношению к любым методикам разделения клеток, включая, но не ограничиваясь сортировкой на основе FACS, сортировкой клеток на основе микрофлюидного подхода и сортировкой клеток на основе гранул. Подход с верхними/нижними образцами можно проанализировать, применяя любую методику секвенирования нового поколения, включая, но не ограничиваясь секвенированием с применением технологии Illumina, Oxford Nanopore или Pacific Biosciences.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) из разнообразных популяций Т-клеток, указанный способ включает:

определение последовательностей нуклеотидов или аминокислот TCRα и β в образце из организма субъекта;

выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара;

создание репертуара TCR путем комбинаторного получения пар выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ, тем самым создавая библиотеку пар TCRαβ; и

идентификацию по меньшей мере одной пары TCRαβ с желательными свойствами из созданного репертуара TCR.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что осуществляют выбор одной или более подгрупп последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара на основании по меньшей мере одного критерия:

частоты встречаемости в популяции Т-клеток,

относительного обогащения по сравнению со второй популяцией Т-клеток,

относительного различия числа копий ДНК и РНК данной цепи TCR,

биологических свойств цепи TCR, причем указанные свойства выбраны из по меньшей мере одного из следующих свойств: (предсказанной) специфичности к антигену, (предсказанной) HLA-рестрикции, аффинности к антигену, зависимости от корецептора, исходной Т-клеточной линии дифференцировки (например, CD4 или CD8 Т-клетка) или мотивов последовательности TCR,

пространственных паттернов экспрессии генов, причем пространственные паттерны экспрессии генов получают из по меньшей мере одного из: области происхождения в ткани или паттернов коэкспрессии других генов,

совместной встречаемости или встречаемости со сходной частотой во множестве образцов, например, встречаемости во множестве очагов опухоли,

распределения по множеству групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR,

комбинации множества критериев, приведенных в различных вариантах реализации.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что выбор на основании частоты встречаемости в популяции Т-клеток основан на данных о частоте встречаемости последовательностей TCR, которые используют для создания отдельного порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ или комбинированного порядка ранжирования цепей TCRα и TCRβ.

4. Способ по любому из пп. 1 - 3, дополнительно включающий определение порога частоты встречаемости, который определяют на основании желательной глубины получения репертуара TCR и используют для выбора совокупностей цепей TCRα и TCRβ на основании частоты встречаемости.

5. Способ по любому из пп. 1 - 4, отличающийся тем, что определение последовательностей TCRα- и β осуществляют с помощью по меньшей мере одного из способов:

мультиплексной ПЦР;

получения последовательности TCR путем направленного обогащения;

получения последовательности TCR с помощью 5'-RACE и ПЦР;

получения последовательности TCR путем пространственного секвенирования;

получения последовательности TCR путем секвенирования РНК;

и применения уникального молекулярного идентификатора (UMI)

6. Способ по любому из пп. 1 - 5, отличающийся тем, что полученную последовательность цепи TCR определяют как последовательность нуклеотидов CDR3 вместе с достаточной информацией о 5'- и 3'-последовательности нуклеотидов для выбора семейства по меньшей мере одного TCR V- и одного TCR J-сегмента на основании выравнивания последовательностей нуклеотидов, чтобы собрать полноразмерную последовательность цепи TCR.

7. Способ по любому из пп. 1 - 6, отличающийся тем, что создание репертуара TCR путем комбинаторного получения пар выбранных последовательностей цепей TCRα и TCRβ, тем самым создавая библиотеку пар TCRαβ, осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов:

последовательности цепей TCR применяют для синтеза отдельных библиотек фрагментов ДНК или РНК цепей TCRα и TCRβ, которые впоследствии соединяют в один фрагмент ДНК или РНК, в котором соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь,

комбинации цепей TCRα и TCRβ получают путем непосредственного синтеза фрагментов ДНК или РНК, в которых соединены ровно одна TCRα- и одна β-цепь,

комбинации цепей TCRα и TCRβ создают внутри клетки путем модификации пула клеток отдельными совокупностями генов TCRα и β таким образом, что клетки будут экспрессировать по меньшей мере одну TCRα- и одну β-цепь, и/или

комбинации цепей TCRα и TCRβ соединяют в одноцепочечную конструкцию TCR, в которой слиты фрагменты вариабельных областей обеих цепей TCRα и TCRβ, и в которой одноцепочечная конструкция TCR может быть слита с (i) трансмембранным доменом отдельно или (ii) дополнительно содержит внутриклеточные сигнальные домены, включая, но не ограничиваясь сигнальными доменами CD3ε или CD3ζ, отдельно или в комбинации с сигнальным доменом CD28.

8. Способ по любому из пп. 1 - 7, отличающийся тем, что идентификацию по меньшей мере одной пары TCRαβ с желательными свойствами из созданного репертуара TCR осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов:

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки выделяют на основании по меньшей мере одного маркера активации для выделения TCR;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, метят флуоресцентным красителем, подходящим для отслеживания пролиферации клеток, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и выделяют

антигенреактивные репортерные клетки на основании пролиферации для выделения TCR;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, разделяют на по меньшей мере два образца; образцы стимулируют антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген или нет; после стимуляции обе популяции репортерных клеток инкубируют в течение некоторого периода времени и впоследствии обе популяции репортерных клеток анализируют путем выделения TCR; сравнение пар TCRαβ, полученных из обоих образцов, используют, чтобы определить гены TCR с большей распространенностью в образце, приведенном в контакт с по меньшей мере одним антигеном;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки выделяют для выделения TCR на основании по меньшей мере одного репортерного гена, такого как NFAT-GFP или NFAT-YFP, который свидетельствует о стимуляции TCR;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген, и антигенреактивные репортерные клетки выделяют для выделения TCR на основании селекции антигенспецифических репортерных клеток на основании селективной выживаемости, включая, но не ограничиваясь приобретенной устойчивостью к антибиотику, в результате сигнализации TCR, например, путем применения трансгена NFAT-пуромицин;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, приводят в контакт с одним или множеством комплексов ГКГС, которые несут интересующий антиген; репортерные клетки, связавшиеся с комплексом ГКГС, выделяют для выделения TCR;

пул репортерных клеток, модифицированных библиотекой полученных пар TCRαβ, стимулируют антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими по меньшей мере один интересующий антиген; затем интересующие пары TCRαβ

идентифицируют, применяя основанные на отдельных клетках капельную ПЦР или микрофлюидные подходы, чтобы комбинировать выделение TCR с детектированием уровней транскрипта по меньшей мере одного маркера активации; таким образом детектируют отдельные репортерные клетки в пуле Т-клеток, в которых транскрипты TCRαβ коэкспрессируются с повышенными уровнями маркера активации.

9. Способ по любому из пп. 1 - 8, отличающийся тем, что образец из организма субъекта содержит нежизнеспособный исходный материал.

10. Способ по любому из пп. 1 - 9, отличающийся тем, что получают определенную часть идентифицированного репертуара TCR.

11. Способ по любому из пп. 1 - 10, отличающийся тем, что получают последовательности антигенспецифического TCR.

12. Способ по любому из пп. 1 - 11, отличающийся тем, что получают последовательности TCR, рестриктированного по I классу и/или II классу.

13. Способ по любому из пп. 1 - 12, отличающийся тем, что получают по меньшей мере одну из:

специфических к неоантигену последовательностей TCR,
специфических к вирусу последовательностей TCR,
специфических к общим антигенам опухоли последовательностей TCR,
специфических к собственным антигенам последовательностей TCR.

14. Способ по п. 12, дополнительно включающий этап введения Т-клеток, экспрессирующих специфические к неоантигену последовательности TCR, в качестве терапии рака.

15. Способ по любому из пп. 1 - 13, отличающийся тем, что указанный способ предназначен для диагностики.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что диагностика представляет собой получение репертуаров TCR из патологических очагов инфекции или аутоиммунитета.

17. Способ по любому из пп. 1 - 15, отличающийся тем, что указанный способ предназначен для получения репертуаров BCR/антител.

18. Способ по любому из пп. 1 - 16, дополнительно включающий выделение из организма субъекта нуклеиновых кислот, которые содержат последовательности нуклеотидов TCR-α и -β.

19. Способ по п. 8, отличающийся тем, что маркер активации выбирают из группы, состоящей из: CD25, CD69, CD62L, CD137, IFN-γ, IL-2, TNF-α, GM-CSF, OX40.

20. Способ по любому из пп. 1 - 18, отличающийся тем, что выделение ДНК и РНК осуществляют из популяции Т-клеток, которая представляет собой смесь различных типов клеток или часть образца ткани (такой как кровь или опухолевая ткань).

21. Способ по любому из пп. 1 - 19, отличающийся тем, что образец из организма субъекта содержит клетки, выделенные из биологической жидкости.

22. Способ по п. 20, отличающийся тем, что клетки представляют собой опухолеспецифические Т-клетки или инфильтрирующие опухоль лимфоциты.

23. Способ по пп. 20 - 21, отличающийся тем, что биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из крови, мочи, сыворотки, серозной жидкости, плазмы, лимфы, спинномозговой жидкости, слюны, мокроты, секрета слизистой, вагинальной жидкости, асцитной жидкости, плевральной жидкости, перикардиальной жидкости, перитонеальной жидкости и жидкости брюшной полости.

24. Способ по п. 1, дополнительно включающий применение последовательностей цепей TCRαβ для лечения субъекта, страдающего от рака, иммунологического расстройства, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания.

25. Способ по любому из пп. 1 - 7, отличающийся тем, что идентификацию по меньшей мере одной пары TCRαβ с желательными свойствами из созданного репертуара TCR осуществляют с помощью по меньшей мере одного из следующих способов:

идентификации или селекции на основании по меньшей мере одного маркера активации;

идентификации или селекции на основании пролиферации в ответ на антиген;

идентификации или селекции на основании идентификации генов TCR с большей распространенностью в стимулированных антигеном клетках по сравнению с нестимулированными клетками;

идентификации или селекции на основании активации репортерного гена путем стимуляции TCR;

идентификации или селекции на основании селективной выживаемости, включая, но не ограничиваясь приобретенной устойчивостью к антибиотику в результате сигнализации TCR;

идентификации или селекции на основании связывания с одним или более комплексами ГКГС;

идентификации или селекции с применением основанных на отдельных клетках капельной ПЦР или микрофлюидных способов;

или любой их комбинации.

26. Способ по п. 8, отличающийся тем, что выделение TCR осуществляют путем выделения ДНК или РНК из общей популяции антигенреактивных Т-клеток, чтобы получить специфический продукт ПЦР TCRαβ, который анализируют путем секвенирования ДНК или секвенирования РНК, чтобы определить последовательности генов TCRαβ антигенреактивных Т-клеток, или с помощью основанных на отдельных клетках капельной ПЦР или микрофлюидных подходов, чтобы проанализировать последовательности генов TCRαβ, экспрессированные в анализируемых отдельных Т-клетках.

27. Способ по п. 8, отличающийся тем, что репортерные клетки представляют собой Т-клетки.

28. Способ по п. 24, отличающийся тем, что идентификация или селекция с применением основанных на отдельных клетках капельной ПЦР или микрофлюидных

способов дополнительно включает определение коэкспрессии ассоциированных с активацией генов.

29. Способ создания множества библиотек Т-клеток, указанный способ включает: получение репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) в соответствии со способом по п. 1; выбор последовательностей цепей TCRα и TCRβ из общего репертуара во множество групп, чтобы отдельно получить определенные части репертуара TCR, при этом создается множество библиотек Т-клеток, которые имеют меньшую сложность или которые позволяют получить определенные части репертуара TCR.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что выбор последовательностей цепей TCRα и TCRβ осуществляют на основании диапазона частот.

31. Способ идентификации последовательности нуклеотидов из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

предоставление комбинаторной библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит комбинацию двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, причем первая вариантная подпоследовательность нуклеотидов из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет первый конец непрерывного участка и вторая вариантная подпоследовательность нуклеотидов из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу;

введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот;

селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, зависящего от комбинации двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток;

выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции;

определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и

идентификацию по меньшей мере одной комбинации из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании последовательностей нуклеотидов.

32. Способ по п. 1, отличающийся тем, что один или более полипептидов включают:

цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ;

химерный антигенный рецептор (CAR);

рецептор-переключатель; или

одну или более цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

33. Способ по п. 31 или **Error! Reference source not found.**, отличающийся тем, что первая вариантная подпоследовательность нуклеотидов кодирует вариантную последовательность аминокислот TCRα и вторая вариантная подпоследовательность нуклеотидов кодирует вариантную последовательность аминокислот TCRβ.

34. Способ по любому из пп. 31 - 33, отличающийся тем, что две или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов кодируют одну или более из: V-области TCR, определяющей комплементарность области 3 (CDR3) TCR, J-сегмента TCR и константной области TCR.

35. Способ по п. 31 или **Error! Reference source not found.**, отличающийся тем, что каждая из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов кодирует антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен или один или более внутриклеточных сигнальных доменов CAR.

36. Способ по любому из пп. 31 - 35, отличающийся тем, что длина указанных непрерывных участков составляет от 600 п.о. до 15000 п.о.

37. Способ по любому из пп. 31 - 36 отличающийся тем, что предоставление включает создание библиотеки.

38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что создание библиотеки включает:

идентификацию двух или более групп вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, кодирующих две или более групп вариантных последовательностей аминокислот одного или более полипептидов, причем по меньшей мере одно функциональное свойство зависит от комбинации вариантных последовательностей аминокислот из каждой из двух или более групп вариантных последовательностей аминокислот; и

сборку непрерывного участка путем комбинирования вариантной подпоследовательности нуклеотидов из каждой из двух или более групп вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, чтобы тем самым получить представителя множества вариантных нуклеиновых кислот.

39. Способ по любому из пп. 31 - 38, отличающийся тем, что редакционное расстояние между непрерывными участками из множества вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке максимизировано.

40. Способ по любому из пп. 31 - 39, отличающийся тем, что библиотека содержит по меньшей мере 100 различных комбинаций из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов.

41. Способ по любому из пп. 31 - 40, отличающийся тем, что введение включает введение указанной библиотеки посредством вирусной трансдукции, доставки генов на основе транспозонов или опосредованного нуклеазой сайт-специфического встраивания.

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что введение включает вирусную трансдукцию популяции клеток при множественности заражения (MOI), составляющей 5 или менее.

43. Способ по любому из пп. 31 - 42, включающий регулирование размера популяции клеток на основании количества различных комбинаций из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов в библиотеке.

44. Способ по любому из пп. 31 - 43, отличающийся тем, что популяция клеток содержит иммортализованные Т-клетки или первичные Т-клетки.

45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что иммортализованные Т-клетки или первичные Т-клетки представляют собой Т-клетки человека.

46. Способ по любому из пп. 31 - 45, дополнительно включающий применение маркера для селекции или скрининга клеток в популяции клеток, экспрессирующих по меньшей мере одну из множества вариантных нуклеиновых кислот.

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что маркер представляет собой маркер устойчивости к цитотоксину и/или маркер поверхности клетки.

48. Способ по любому из пп. 31 - 47, отличающийся тем, что клетки из популяции клеток генетически модифицированы.

49. Способ по любому из пп. 31 - 47, отличающийся тем, что клетки из популяции не содержат эндогенный полипептид, придающий клеткам по меньшей мере одно функциональное свойство.

50. Способ по любому из пп. 1 - 49, отличающийся тем, что клетки генетически модифицированы, чтобы устранить или уменьшить экспрессию одного или более из CD4, CD8 и CD28.

51. Способ по п. 48 или 49, отличающийся тем, что в клетках восстанавливают экспрессию CD4 и/или CD8 и используют их для скрининга на рестриктированные по I классу и/или II классу последовательности TCR.

52. Способ по п. 50 или 51, отличающийся тем, что клетки представляют собой Т-клетки.

53. Способ по любому из пп. 31 - 52, отличающийся тем, что селекция включает селекцию субпопуляции на основании экспрессии детектируемого маркера, причем указанная экспрессия зависит от по меньшей мере одного функционального свойства одного или более полипептидов.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что детектируемый маркер включает маркер поверхности клетки, маркерный цитокин, маркер пролиферации клеток, транскрипционный репортер, репортер передачи сигнала и/или репортер цитотоксичности.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что

маркер поверхности клетки включает один или более из: CD25, CD69, CD62L, CD137, OX40;

маркерный цитокин включает один или более из: IFN-γ, IL-2, TNF-α, IL-8, GM-CSF;

транскрипционный репортер включает один или более из: NF-κB, NFAT, AP-1;

репортер передачи сигнала включает один или более из: ZAP70, ERK1/2; и

репортер цитотоксичности включает один или более из: CD107A, CD107B.

56. Способ по любому из пп. 31 - 55, отличающийся тем, что селекция включает приведение популяции клеток в контакт с одним или более из:

второй популяции клеток;

лиганда одного или более полипептидов;

агониста или антагониста одного или более полипептидов; и

малой молекулы,

причем изменение в субпопуляции, вызванное указанным приведением в контакт, зависит от указанного по меньшей мере одного функционального свойства одного или более полипептидов.

57. Способ по п. 56, отличающийся тем, что селекция дополнительно включает:

детектирование присутствия или отсутствия изменения, и/или величины изменения; и

селекцию субпопуляции на основании указанного детектирования.

58. Способ по п. 56 или 57, отличающийся тем, что вторая популяция клеток содержит антигенпрезентирующие клетки.

59. Способ по п. 58, отличающийся тем, что антигенпрезентирующие клетки включают В-клетки и/или дендритные клетки.

60. Способ по любому из пп. 56 - 59, отличающийся тем, что вторая популяция клеток содержит первичные клетки или иммортализованные клетки.

61. Способ по любому из пп. 56 - 60, отличающийся тем, что варианты последовательностей нуклеотидов из библиотеки получены из клеток, экспрессирующих вариантный полипептид, содержащий аминокислоту, кодируемую вариантными подпоследовательностями нуклеотидов, причем клетки получены из организма субъекта, и причем вторая популяция клеток происходит из организма указанного субъекта.

62. Способ по любому из пп. 31 - 61, отличающийся тем, что селекция включает селекцию первой субпопуляции из популяции клеток на основании меры по меньшей мере одного функционального свойства выше или ниже порога.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что порог определяют на основании меры функционального свойства в невыбранной субпопуляции из популяции клеток.

64. Способ по п. 62, отличающийся тем, что селекция дополнительно включает селекцию второй субпопуляции из популяции клеток на основании второй меры по меньшей мере одного функционального свойства выше или ниже второго порога, причем первая и вторая субпопуляции являются неперекрывающимися.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что идентификация по меньшей мере одной комбинации включает сравнение распространенности по меньшей мере одной комбинации между первой и второй субпопуляциями.

66. Способ по любому из пп. 31 - 64, отличающийся тем, что идентификация по меньшей мере одной комбинации включает измерение обогащения субпопуляции по меньшей мере одной комбинацией относительно контрольной популяции клеток.

67. Способ по п. 66, отличающийся тем, что популяция клеток включает контрольную популяцию клеток

68. Способ по п. 67, отличающийся тем, что субпопуляция и контрольная популяция клеток являются неперекрывающимися, причем неперекрывающиеся означает, что клетки в обеих популяциях имеют различные статусы активации, но могут нести одинаковую вариантную нуклеиновую кислоту.

69. Способ по п. 66, отличающийся тем, что селекцию контрольной популяции клеток осуществляют на основании второго функционального свойства, которое отлично от указанного по меньшей мере одного функционального свойства.

70. Способ по любому из пп. 31 - 69, отличающийся тем, что указанная субпопуляция содержит множество клеток.

71. Способ по любому из пп. 31 - 70, отличающийся тем, что выделение не включает выделение отдельных клонов из субпопуляции на основании по меньшей мере одного функционального свойства.

72. Способ по любому из пп. 31 - 71, отличающийся тем, что указанная субпопуляция содержит по меньшей мере 1000 клеток.

73. Способ по любому из пп. 31 - 72, отличающийся тем, что определение включает секвенирование отдельных представителей путем получения прочтений секвенирования по меньшей мере 600 п.о. непрерывного участка.

74. Способ по п. 73, отличающийся тем, что длина прочтений секвенирования составляет от 600 п.о. до 15000 п.о.

75. Способ по любому из пп. 31 - 74, отличающийся тем, что определение включает амплификацию по меньшей мере непрерывного участка отдельных представителей.

76. Способ по п. 75, отличающийся тем, что амплификация включает применение праймера для амплификации, который гибридизуется с неизменной подпоследовательностью нуклеотидов, причем каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит неизменную подпоследовательность нуклеотидов, и при

этом неизменная подпоследовательность нуклеотидов кодирует неизменную последовательность аминокислот одного или более полипептидов.

77. Способ по п. 76, отличающийся тем, что один или более полипептидов содержат TCRα- и TCRβ-цепи, и при этом неизменная последовательность аминокислот содержит константную область TCRα.

78. Способ по п. 76, отличающийся тем, что один или более полипептидов содержат TCRα- и TCRβ-цепи, и при этом неизменная последовательность аминокислот содержит константную область TCRβ.

79. Способ по любому из пп. 31 - 78, отличающийся тем, что выделение включает применение опосредованного CRISPR/Cas9 направленного фрагментирования геномной ДНК из субпопуляции.

80. Способ по любому из пп. 31 - 78, отличающийся тем, что определение включает получение среднего покрытия, составляющего по меньшей мере 10, для каждой из последовательностей нуклеотидов непрерывного участка, до или в отсутствие какой-либо амплификации отдельных представителей.

81. Способ по любому из пп. 31 - 80, отличающийся тем, что определение включает получение среднего покрытия, составляющего по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500 или по меньшей мере 1000 для каждой из последовательностей нуклеотидов непрерывного участка.

82. Способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит:

комбинацию

первой вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей вариантную последовательность аминокислот TCRα и определяющей первый конец непрерывного участка, и

второй вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей вариантную последовательность аминокислот TCRβ и определяющей второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу;

введение указанной библиотеки в популяцию иммортализованных Т-клеток, сконструированных для экспрессии TCRα- и TCRβ-цепей, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот;

селекцию субпопуляции из популяции иммортализованных Т-клеток на основании экспрессии маркера активации Т-клеток выше порогового уровня в ответ на приведение в контакт иммортализованных Т-клеток с иммортализованными В-клетками, экспрессирующими антиген, причем указанная субпопуляция содержит множество Т-клеток;

выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции;

определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и

идентификацию по меньшей мере одной комбинации первой и второй вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании обогащения подгруппы по меньшей мере одной комбинацией последовательностей нуклеотидов относительно контроля.

83. Способ по п. 82, дополнительно включающий:

селекцию второй субпопуляции из популяции иммортализованных Т-клеток на основании экспрессии маркера активации Т-клеток ниже второго порогового уровня в ответ на приведение в контакт иммортализованных Т-клеток с иммортализованными В-клетками, причем вторая субпопуляция содержит второе множество Т-клеток, и при этом указанная субпопуляция и вторая субпопуляция являются неперекрывающимися;

выделение второй подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из второй субпопуляции; и

определение второй последовательности нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей второй подгруппы,

причем по меньшей мере одну комбинацию идентифицируют на основании обогащения подгруппы указанной по меньшей мере одной комбинацией относительно по меньшей мере одной комбинации во вторых последовательностях нуклеотидов второй подгруппы.

84. Способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей шарнирный домен, трансмембранный домен и/или внутриклеточный сигнальный домен химерного антигенного рецептора (CAR), из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит комбинацию двух или более из:

первой вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей шарнирный домен CAR;

второй вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей трансмембранный домен CAR; и

третьей вариантной подпоследовательности нуклеотидов, кодирующей внутриклеточный сигнальный домен CAR,

причем одна из первой, второй или третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет первый конец непрерывного участка, и при этом другая одна из первой, второй или третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу;

введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии CAR, кодируемого представителем множества вариантных нуклеиновых кислот, причем популяция клеток включает популяцию иммортализованных Т-клеток или первичных Т-клеток человека;

селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании пролиферации клеток выше порогового уровня в ответ на приведение клеток в контакт с антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими антиген, специфичный к связывающему антиген домену CAR, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток;

выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции;

определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и

идентификацию по меньшей мере одной комбинации первой, второй и третьей вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании обогащения подгруппы по меньшей мере одной комбинацией последовательностей нуклеотидов относительно контроля.

85. Способ по п. 84, отличающийся тем, что присутствует более чем один внутриклеточный сигнальный домен CAR.

86. Способ по п. 85, отличающийся тем, что присутствует по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена CAR.

87. Способ по п. 84, отличающийся тем, что по меньшей мере два из перечисленных далее доменов представляют собой указанные по меньшей мере два внутриклеточных сигнальных домена CAR: CD3ε, CD3ζ ITAM1, CD3ζ ITAM12, CD3ζ ITAM123, CD3ζ с любым ITAM из CD3δ, CD3ε и CD3γ, CD8α, CD28, ICOS, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD27 и CD2.

88. Способ по п. 84, включающий:

селекцию второй субпопуляции из популяции клеток на основании пролиферации клеток ниже второго порогового уровня в ответ на приведение клеток в контакт с антигенпрезентирующими клетками, причем вторая субпопуляция содержит второе множество клеток, и при этом указанная субпопуляция и вторая субпопуляция являются неперекрывающимися;

выделение второй подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из второй субпопуляции;

определение второй последовательности нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей второй подгруппы, и

причем по меньшей мере одну комбинацию идентифицируют на основании обогащения подгруппы указанной по меньшей мере одной комбинацией относительно по меньшей мере одной комбинации во вторых последовательностях нуклеотидов второй подгруппы.

89. Способ идентификации последовательности нуклеотидов из комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

предоставление комбинаторной библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о.;

введение указанной библиотеки в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот;

селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, зависящего от непрерывного участка из по меньшей мере 600 п.о., причем указанная субпопуляция содержит множество клеток;

выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции;

определение последовательностей нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы; и

идентификацию непрерывного участка из по меньшей мере 600 п.о. на основании последовательностей нуклеотидов.

90. Способ по п. 89, отличающийся тем, что вариабельность в непрерывном участке из по меньшей мере 600 п.о. распределена по всей длине 600 пар оснований.

91. Способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих пары цепей антигенспецифического Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ из библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

введение библиотеки в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, кодируемые представителем множества вариантных нуклеиновых кислот,

селекцию субпопуляций из популяции клеток на основании экспрессии маркера выше порогового уровня в ответ на антиген, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток,

выделение подгруппы из множества вариантных нуклеиновых кислот из субпопуляции,

определение последовательностей нуклеотидов вариантных нуклеиновых кислот, и

идентификацию по меньшей мере одной вариантной последовательности нуклеотидов на основании обогащения подгруппы указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля.

92. Способ по п. 91 или 90, дополнительно включающий предоставление библиотеки, содержащей множество вариантных нуклеиновых кислот, кодирующих цепи TCR-альфа и TCR-бета.

93. Способ идентификации последовательностей нуклеотидов, кодирующих цепи Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ из образца, включающий:

секвенирование цепей TCRα и TCRβ в образце,

выбор и комбинаторное образование пары последовательностей цепей TCRα и TCRβ для создания библиотеки пар TCRαβ,

введение указанной библиотеки пар TCRαβ в пул репортерных клеток,

стимулирование репортерных клеток, которые модифицированы библиотекой пар TCRαβ, антигенпрезентирующими клетками, презентирующими по меньшей мере один интересующий антиген,

определение пар TCRαβ, специфических к по меньшей мере одному интересующему антигену, и

введение пар TCRαβ в клетки и селекцию клеток, содержащих пары TCRαβ.

94. Способ по п. 14, дополнительно включающий этап введения Т-клеток, экспрессирующих последовательности антигенспецифического TCR, для диагностики или лечения инфекции или аутоиммунитета.

95. Способ по п. 14, отличающийся тем, что Т-клетки могут быть аутологическими или аллогенными.

96. Способ по п. 8, отличающийся тем, что маркер активации представляет собой CD69, и тем, что выделяют две популяции клеток: одну популяцию клеток с высокой экспрессией CD69 и другую популяцию клеток с низкой экспрессией CD69.

97. Нуклеотидная библиотека, содержащая репертуар Т-клеточных рецепторов, полученных в соответствии с любым из пп. 1 - 30 и 95, 96.

98. Нуклеотидная конструкция, содержащая последовательность нуклеотидов, идентифицированную в соответствии с любым из пп. 1 - 96.

99. Клетка, содержащая нуклеотидную конструкцию согласно п. 98.

100. Способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей пару цепей антигенспецифического Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из библиотеки нуклеиновых кислот, указанный способ включает:

введение библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, чтобы получить библиотеку клеток;

селекцию первой популяции клеток из библиотеки на основании экспрессии маркера выше первого порогового уровня в ответ на антиген; и

выделение первой популяции вариантных нуклеиновых кислот из первой популяции из библиотеки.

101. Способ по п. 100, дополнительно включающий:

определение по меньшей мере одной последовательности нуклеотидов или идентичности нуклеиновых кислот из первой популяции вариантных нуклеиновых кислот; и

идентификацию по меньшей мере одной вариантной последовательности нуклеотидов на основании обогащения подгруппы указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля.

102. Способ по п. 100 или 101, отличающийся тем, что пороговый уровень основан на по меньшей мере одном из:

d) получения процента от общего пула клеток на основании экспрессии маркера; или

e) получения минимального количества клеток из общего пула клеток; или

f) получения клеток, удерживаемых магнитом на основании связывания магнитного зонда с по меньшей мере одним маркером, экспрессированным в ответ на антиген.

103. Способ по п. 66 - 69, 82, 84, 91 или 101, отличающийся тем, что контроль представляет собой вторую популяцию клеток, которая ниже второго порога.

104. Способ по п. 66 - 69, 82, 84, 91 или 101, отличающийся тем, что контроль представляет собой одну или более из:

референсной популяции клеток,

комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот, которую ввели в популяцию клеток,

популяции клеток, отсортированных из той же популяции клеток, что и первая популяция, на основании экспрессии маркера ниже второго порога,

по меньшей мере одной популяции клеток, полученной из совместных культур репортерных Т-клеток, экспрессирующих соответствующую библиотеку TCR, с антигенпрезентирующими клетками, такими как В-клетки, которые не презентируют никакие экзогенные антигены.

105. Способ по пп. 104, отличающийся тем, что контроль (или нижний образец) отсортировывают из той же популяции клеток, что и верхний образец, но у него наблюдается низкая экспрессия маркера активации, или отличающийся тем, что нижний образец получают из совместных культур репортерных Т-клеток, экспрессирующих

соответствующую библиотеку TCR, и B-клеток, которые не подвергали генетической инженерии для экспрессии экзогенных антигенов.

106. Способ по любому из пп. 100 - 105, дополнительно включающий добавление антигена в популяцию клеток.

107. Способ по любому из пп. 100 - 106, отличающийся тем, что выделение первой популяции и/или контроля осуществляют с помощью по меньшей мере одного из способов: a) обогащения с помощью магнитных гранул, b) сортировки с помощью проточной цитометрии или c) обоих.

108. Способ идентификации последовательности нуклеотидов, кодирующей цепь Т-клеточного рецептора α (TCRα) и TCRβ, из библиотеки нуклеиновых кислот, указанный способ включает:

введение библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, способных экспрессировать цепи TCRα и TCRβ, чтобы получить библиотеку клеток; и

определение по меньшей мере одной последовательности нуклеотидов или идентичности нуклеиновых кислот из первой популяции вариантных нуклеиновых кислот на основании обогащения подгруппы последовательностью нуклеотидов относительно контроля.

109. Способ по п. 108, отличающийся тем, что указанную по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту выделяют из первой популяции клеток.

110. Способ по п. 109, отличающийся тем, что первую популяцию клеток подвергают селекции на основании экспрессии маркера выше первого порогового уровня в ответ на антиген.

111. Способ идентификации последовательности нуклеотидов из библиотеки нуклеиновых кислот, включающий:

введение указанной библиотеки нуклеиновых кислот в популяцию клеток, чтобы получить библиотеку клеток;

приведение в контакт библиотеки клеток с первой популяцией клеток;

селекцию субпопуляции из библиотеки клеток на основании экспрессии по меньшей мере одного маркера путем обогащения с помощью магнитных гранул; и

идентификацию по меньшей мере одной последовательности нуклеотидов на основании статистически значимого обогащения или обеднения субпопуляции указанными последовательностями нуклеотидов относительно контроля.

112. Способ по п. 111, отличающийся тем, что по меньшей мере некоторые из субпопуляции клеток сконструированы для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем библиотеки нуклеиновых кислот.

113. Способ по п. 111, отличающийся тем, что экспрессия маркера связана с введенной нуклеиновой кислотой из библиотеки, причем такая связь обозначает, что введенная нуклеиновая кислота изменяет экспрессию маркера.

114. Способ по п. 111, отличающийся тем, что селекцию осуществляют на основании экспрессии маркера выше порогового уровня.

115. Способ по п. 111, отличающийся тем, что селекцию осуществляют на основании экспрессии по меньшей мере двух маркеров выше порогового уровня.

116. Способ по любому из пп. 8, 82, 91, 93 или 100, отличающийся тем, что идентификация или стимуляция, или предоставление антигена включает одно или более из:

a) селекции множества антигенов;

b) создания пулов антигенов, в которых каждый антиген присутствует ровно в двух пулах антигенов;

c) оценки реактивности репортерных клеток, экспрессирующих по меньшей мере один Т-клеточный рецептор, против каждого из пулов антигенов; и

d) определения того, реактивен ли по меньшей мере один Т-клеточный рецептор по отношению к любому из прошедших селекцию антигенов, путем оценки реактивности против ровно двух пулов антигенов.

117. Способ по п. 116, отличающийся тем, что реактивность против ровно двух пулов антигенов детектируют путем анализа попарного обогащения.

118. Способ по п. 111, отличающийся тем, что библиотека представляет собой библиотеку TCR.

119. Способ по п. 111, отличающийся тем, что используют маркер активации.

120. Способ по п. 111, отличающийся тем, что используют сравнение верхних и нижних образцов, чтобы оценить реактивность.

121. Способ по любому из предыдущих пунктов, включающий оценку реактивности или дополнительно включающий оценку реактивности, при которой используют сравнение верхних и нижних образцов, чтобы оценить реактивность.

122. Способ по любому из предыдущих пунктов, включающий библиотеку, отличающийся тем, что последовательность нуклеотидов из множества вариантных нуклеиновых кислот в библиотеке оптимизирована на основании по меньшей мере одного из следующего:

введения предпочтительно используемых клеткой-хозяином кодонов,

оптимизации структурной стабильности мРНК,

исключения повторяющихся последовательностей,

исключения длинных участков гомополимеров, и

исключения большого различия в локальном содержании GC в данной вариантной последовательности нуклеиновой кислоты.

123. Способ по п. 91, отличающийся тем, что антиген презентируется посредством антигенпрезентирующей клетки.

124. Способ по п. 91, отличающийся тем, что библиотека представляет собой комбинаторную библиотеку.

125. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что источником антигена является клетка.

126. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что процесс подразумевает высокую степень разнообразия и/или сложности антигенов.

127. Способ в соответствии с любым из описанных выше способов, включающий библиотеку, отличающийся тем, что библиотека представляет собой комбинаторную библиотеку.

128. Описанный выше способ, отличающийся тем, что комбинаторная библиотека представляет собой библиотеку TCR.

129. Совокупность клеток, указанная совокупность содержит:

группу из по меньшей мере двух Т-клеток, причем каждая сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета происходит из организма субъекта, причем Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR, и причем указанная группа сконструирована для активации одного или более маркеров активации Т-клеток; и

группу из по меньшей мере двух В-клеток, причем каждая из по меньшей мере двух В-клеток сконструирована для экспрессии по меньшей мере одного экзогенного неоантигена (или антигена), так что способны продуцироваться по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена), и причем по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена) одинаковы с присутствующими у субъекта.

130. Композиция по п. 129, отличающаяся тем, что группа из по меньшей мере двух В-клеток содержит:

по меньшей мере первую В-клетку, которая продуцирует экзогенный неоантиген (или антиген); и

по меньшей мере вторую В-клетку, которая продуцирует второй экзогенный неоантиген (или антиген).

131. Библиотека экспрессирующих TCR клеток, указанная библиотека экспрессирующих TCR клеток содержит: группу из по меньшей мере трех Т-клеток,

в которой по меньшей мере две Т-клетки сконструированы для экспрессии по меньшей мере двух пар TCR-альфа и TCR-бета (по меньшей мере двух пар TCR),

в которой указанные по меньшей мере две пары TCR происходят из организма субъекта,

в которой указанные по меньшей мере три Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR,

в которой указанные по меньшей мере три Т-клетки сконструированы для активации одного или более маркеров активации Т-клеток при связывании с антигеном (или неоантигеном), презентированным В-клеткой,

причем количество геномных копий каждой пары TCR, которое отражается количеством клеток с TCR, такое, что можно узнать количество всех TCR в образце, и

при этом по меньшей мере один из TCR не распределен равномерно по всей композиции, составляющей библиотеку.

132. Библиотека экспрессирующих TCR клеток по п. 131, отличающаяся тем, что распределение по меньшей мере одной Т-клетки изменяется при связывании с антигеном, презентированным В-клеткой.

133. Библиотека экспрессирующих TCR клеток по п. 131, отличающаяся тем, что по меньшей мере две пары TCR приблизительно равномерно присутствуют в библиотеке экспрессирующих TCR клеток.

134. Способ лечения субъекта, указанный способ включает:

идентификацию субъекта, имеющего опухоль;

предоставление группы из по меньшей мере двух Т-клеток, каждая из которых сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной отличной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета происходит из организма указанного субъекта,

предоставление группы из по меньшей мере двух В-клеток, причем указанная группа В-клеток сконструирована для экспрессии по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов, и причем по меньшей мере два экзогенных неоантигена одинаковы с неоантигенами, обнаруженными у субъекта;

объединение группы из по меньшей мере двух Т-клеток с группой из по меньшей мере двух В-клеток и селекцию комбинации из по меньшей мере двух пар

TCR на основании активации по меньшей мере двух Т-клеток посредством по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов; и

введение комбинации из по меньшей мере двух пар TCR субъекту, тем самым осуществляя лечение опухоли.

135. Способ по п. 134, отличающийся тем, что лечение уменьшает размер опухоли.

136. Способ лечения субъекта, указанный способ включает:

идентификацию субъекта, имеющего опухоль;

предоставление группы из по меньшей мере двух Т-клеток, каждая из которых сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной отличной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета происходит из организма указанного субъекта,

предоставление группы из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток, причем группа антигенпрезентирующих клеток происходит из организма субъекта, сконструирована для экспрессии по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов, и при этом по меньшей мере два экзогенных неоантигена одинаковы с неоантигенами, обнаруженными у субъекта;

объединение группы из по меньшей мере двух Т-клеток с группой из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток и селекцию комбинации из по меньшей мере двух пар TCR на основании активации по меньшей мере двух Т-клеток посредством по меньшей мере двух экзогенных неоантигенов; и

введение комбинации из по меньшей мере двух пар TCR субъекту, тем самым осуществляя лечение опухоли.

137. Фармацевтическая композиция, содержащая:

первую пару TCR, которая связывается с первым антигеном (или неоантигеном) в опухоли субъекта; и

вторую пару TCR, которая связывается со вторым антигеном (или неоантигеном) в опухоли субъекта.

138. Фармацевтическая композиция по п. 137, отличающаяся тем, что первая пара TCR рестриктирована по ГКГС I класса, и тем, что вторая пара TCR рестриктирована по ГКГС II класса.

139. Фармацевтическая композиция, содержащая:

первую пару TCR, которая связывается с первым антигеном и рестриктирована по ГКГС I класса; и

вторую пару TCR, которая связывается со вторым антигеном и рестриктирована по ГКГС II класса.

140. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 137 - 139, дополнительно содержащая третью пару TCR.

141. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 137 - 140, отличающаяся тем, что первая пара TCR связывается с неоантигеном из опухоли, тем, что вторая пара TCR связывается с неоантигеном из указанной опухоли, и тем, что как первая, так и вторая пары TCR присутствуют в организме хозяина опухоли.

142. Совокупность клеток, указанная совокупность содержит:

группу из по меньшей мере двух Т-клеток, причем каждая сконструирована для экспрессии по меньшей мере одной пары TCR-альфа и TCR-бета, причем указанная пара происходит из организма субъекта, в котором Т-клетки не экспрессируют эндогенный TCR, и причем указанная группа сконструирована для активации одного или более маркеров активации Т-клеток; и

группу из по меньшей мере двух антигенпрезентирующих клеток (АПК), в которой каждая из по меньшей мере двух АПК сконструирована для экспрессии по меньшей мере одного экзогенного неоантигена (или антигена), так что способны продуцироваться по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена), и при этом по меньшей мере два экзогенных неоантигена (или антигена) одинаковы с присутствующими у субъекта.

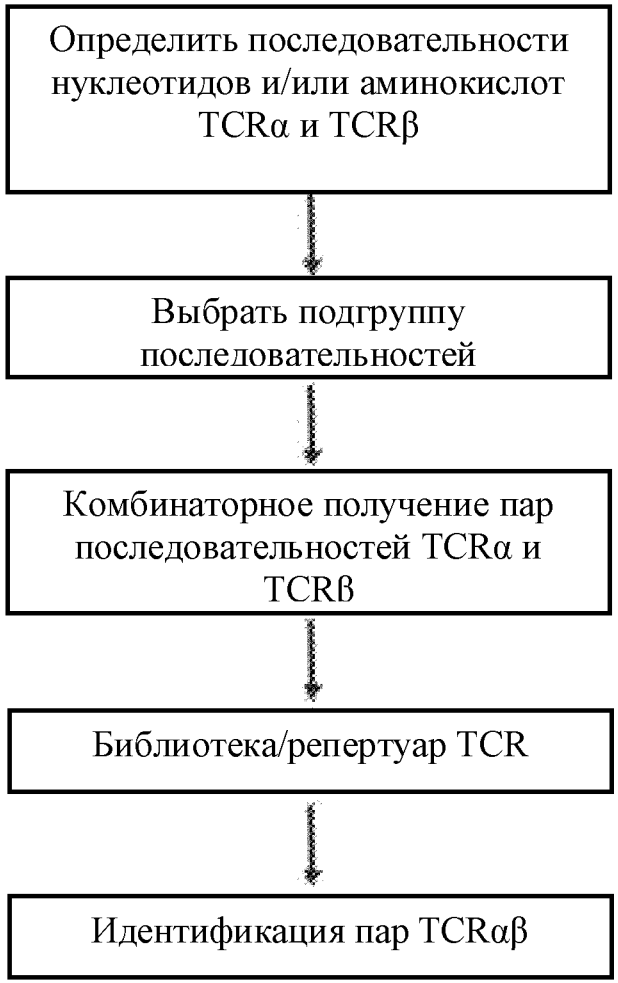
143. Способ в соответствии с любым из описанных выше способов, отличающийся тем, что пары TCR и/или Т-клетки, экспрессирующие пары TCR, выбирают путем селекции или идентифицируют по связыванию с антигеном (таким как неоантиген), причем антиген экспрессируется В-клеткой или антигенпрезентирующей клеткой.

144. Способ в соответствии с любым из описанных выше способов, отличающийся тем, что антиген или неоантиген происходит из опухоли из организма субъекта, и отличающийся тем, что каждая из цепей TCR-альфа и TCR-бета из пар TCR также происходит из организма субъекта.

145. Способ в соответствии с любым из описанных выше способов, отличающийся тем, что присутствует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион пар TCR (или клеток, содержащих данные пары), и присутствует по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 или 1 миллион антигенов.

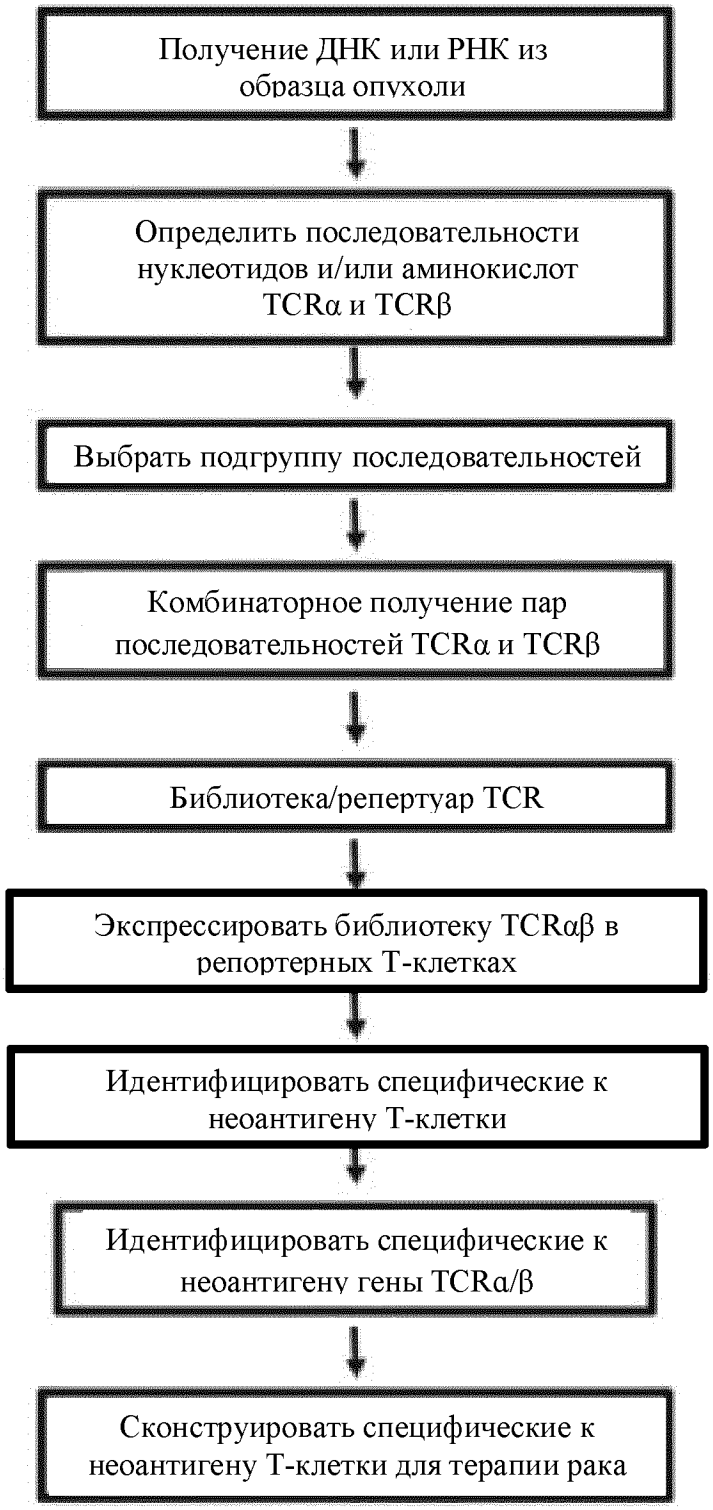
ФИГУРА 1

Иллюстрация способа получения репертуара TCR для создания библиотеки



ФИГУРА 2

Иллюстрация способа получения репертуара TCR и идентификации последовательностей антигенспецифических TCRα и TCRβ для применения для терапии рака.



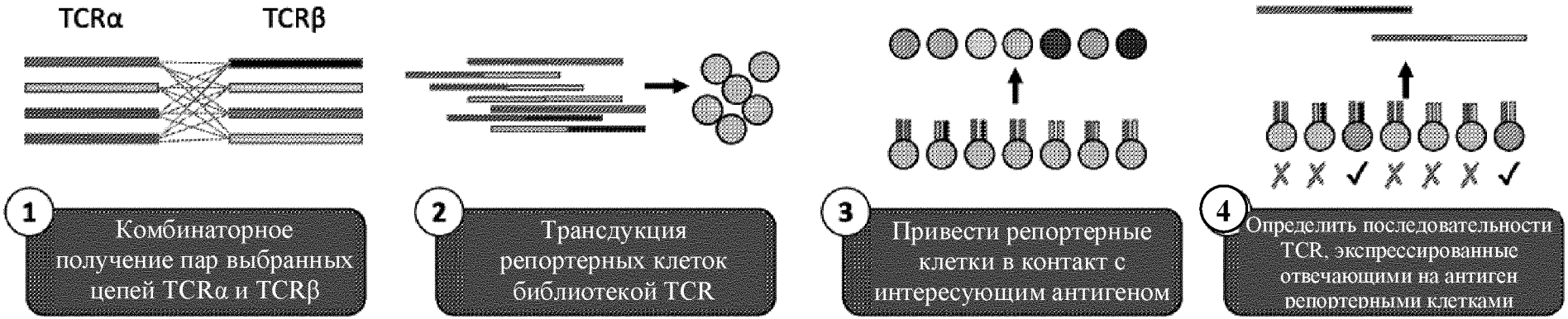
ФИГУРА 3

Типичный дизайн кассеты экспрессии TCR

Область V TCRβ	CDR3 TCRβ	J-сегмент TCRβ	C-домен TCRβ	P2A	Область V TCRα	CDR3 TCRα	J-сегмент TCRα	C-домен TCRα
321-357 п.о.	15-90 п.о.	27 п.о.	519 п.о.	66 п.о.	303-351 п.о.	15-90 п.о.	30 п.о.	414 п.о.
Несколько человеческих вариантов	Уникальны для каждого TCR	Несколько человеческих вариантов	Идентичны для каждого TCR	Идентичны для каждой кассеты TCR	Несколько человеческих вариантов	Уникальны для каждого TCR	Несколько человеческих вариантов	Идентичны для каждого TCR

ФИГУРА 4

Скрининг комбинаторных библиотек TCR



Стратегии приведения репортерных клеток в контакт с антигеном:

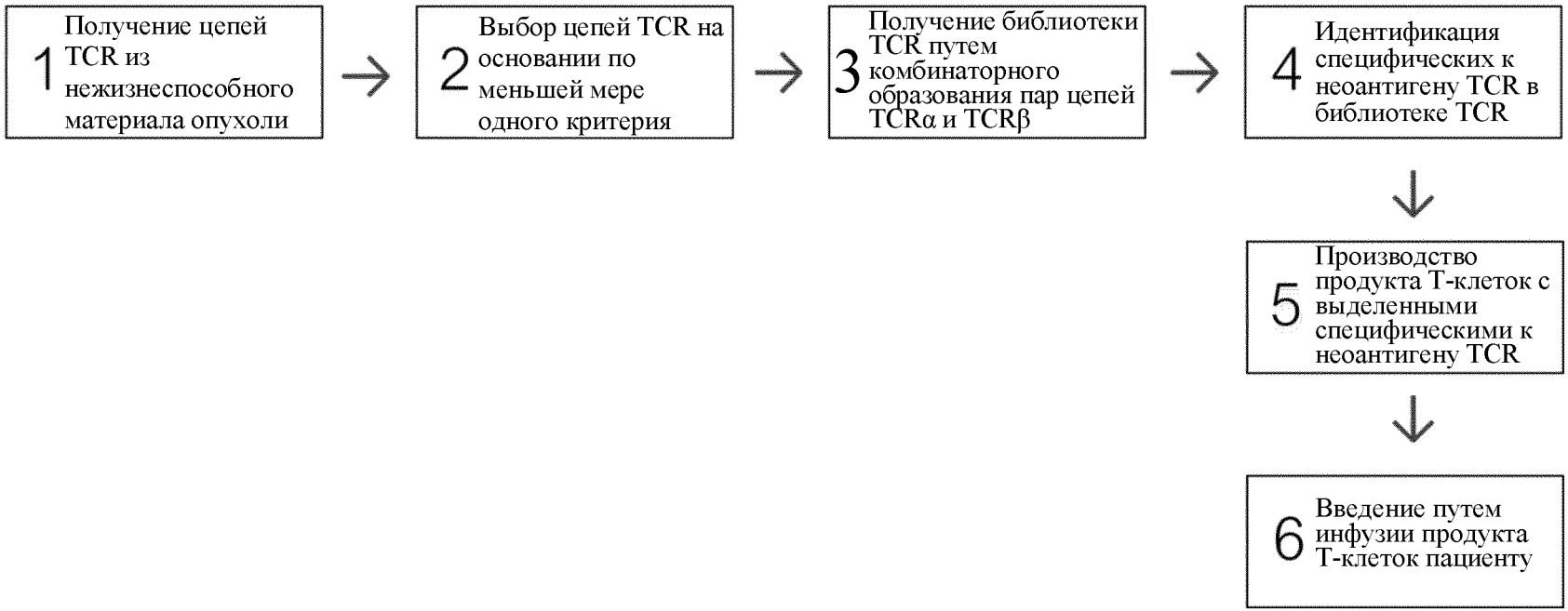
1. **Загрузка или экспрессия антигенпрезентирующим и клетками (АПК)**
2. **Использование комплексов пептид-ГКГС**

Стратегии селекции отвечающих на антиген репортерных клеток:

1. **Селекция на основании маркера активации**
2. **Селекция на основании пролиферации**
3. **Селекция на основании экспрессии репортерного гена**
4. **Селекция на основании селективной выживаемости**
5. **Селекция на основании уровней экспрессии маркеров активации**
6. **Селекция на основании связывания с комплексами пептид-ГКГС**

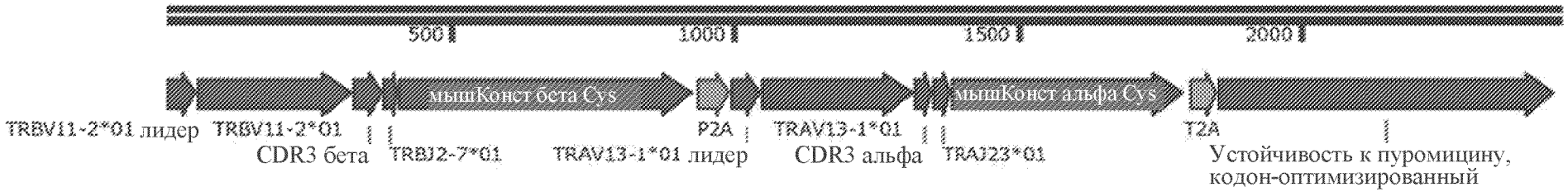
ФИГУРА 5

Пример применения процесса для лечения страдающего раком пациента



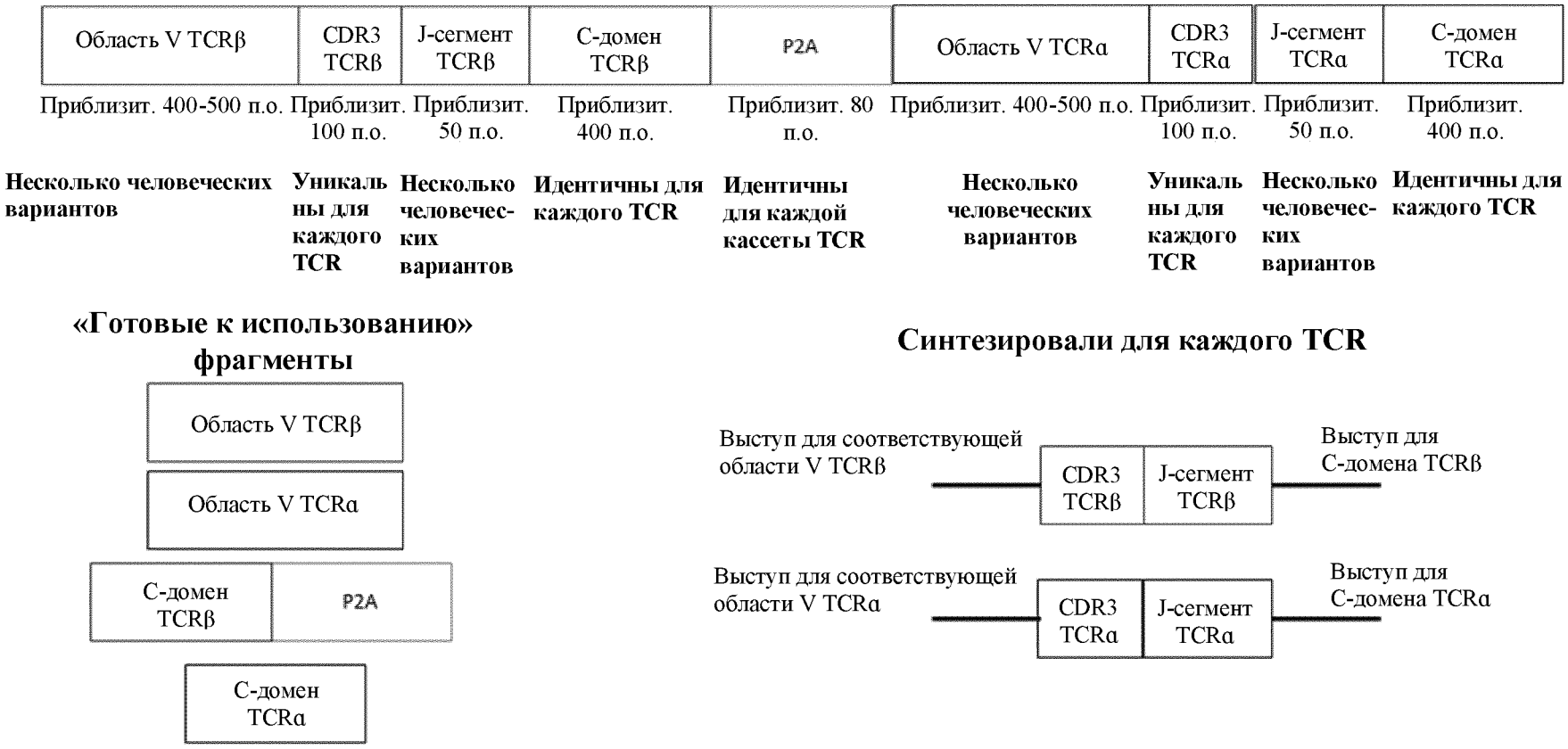
ФИГУРА 6

Схематический пример гена TCR, экспрессированного в виде кассеты экспрессии TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину

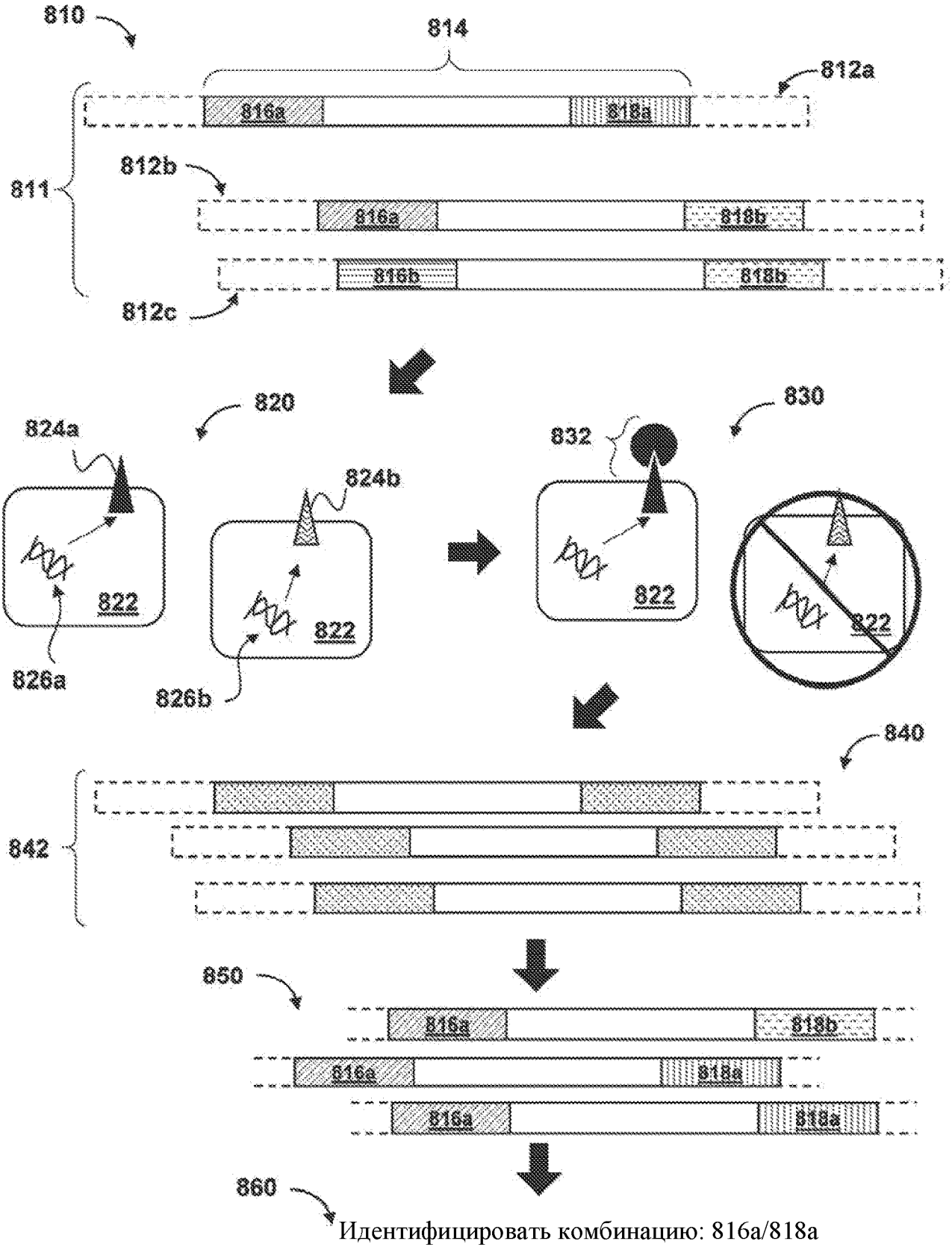


ФИГУРА 7

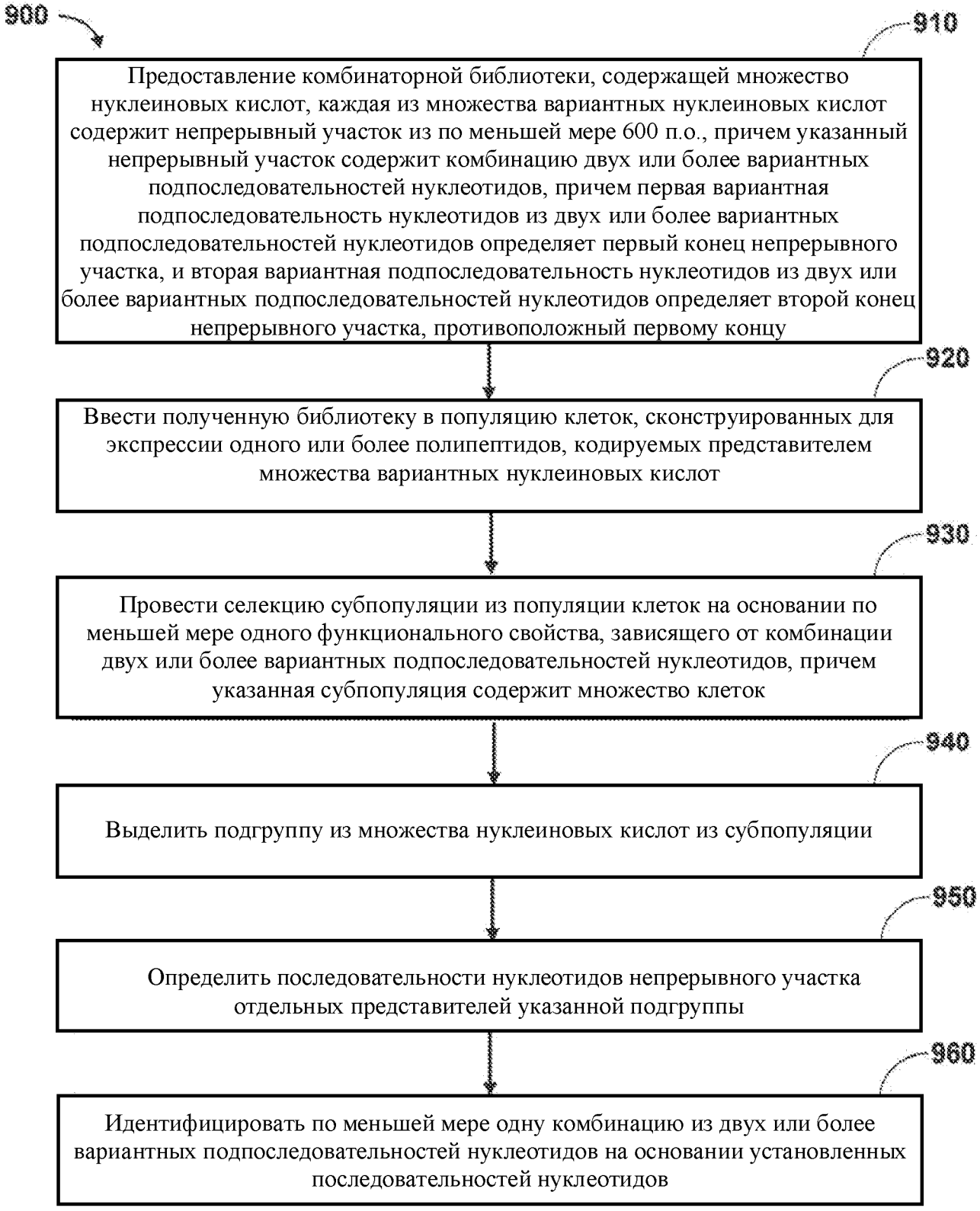
Типичная стратегия дизайна кассет экспрессии TCR



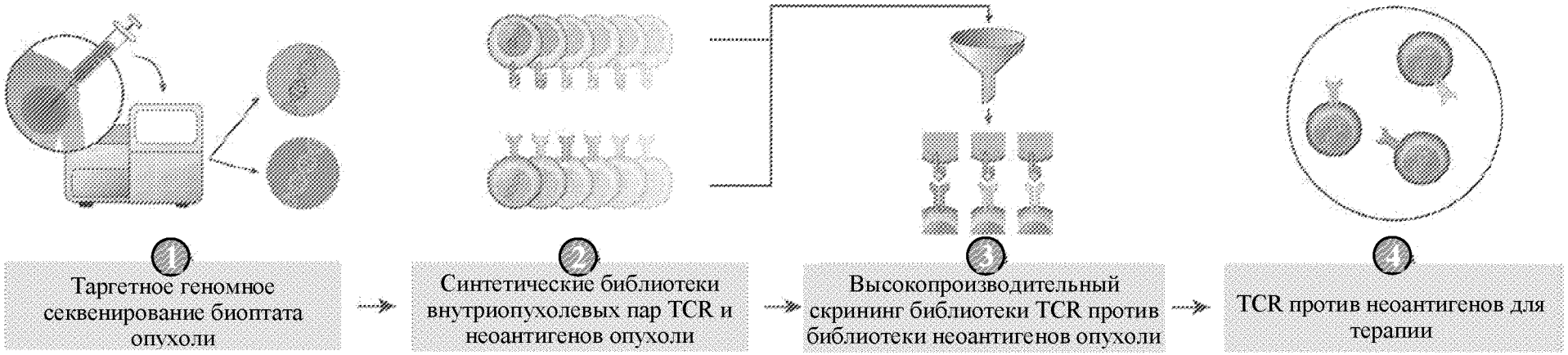
ФИГУРА 8


810
814
812a
816a
818a
811
812b
816a
818b
816b
818b
812c
820
824a
824b
822
822
826a
826b
830
832
822
822
840
842
850
816a
818b
816a
818a
816a
818a
860
Идентифицировать комбинацию: 816a/818a

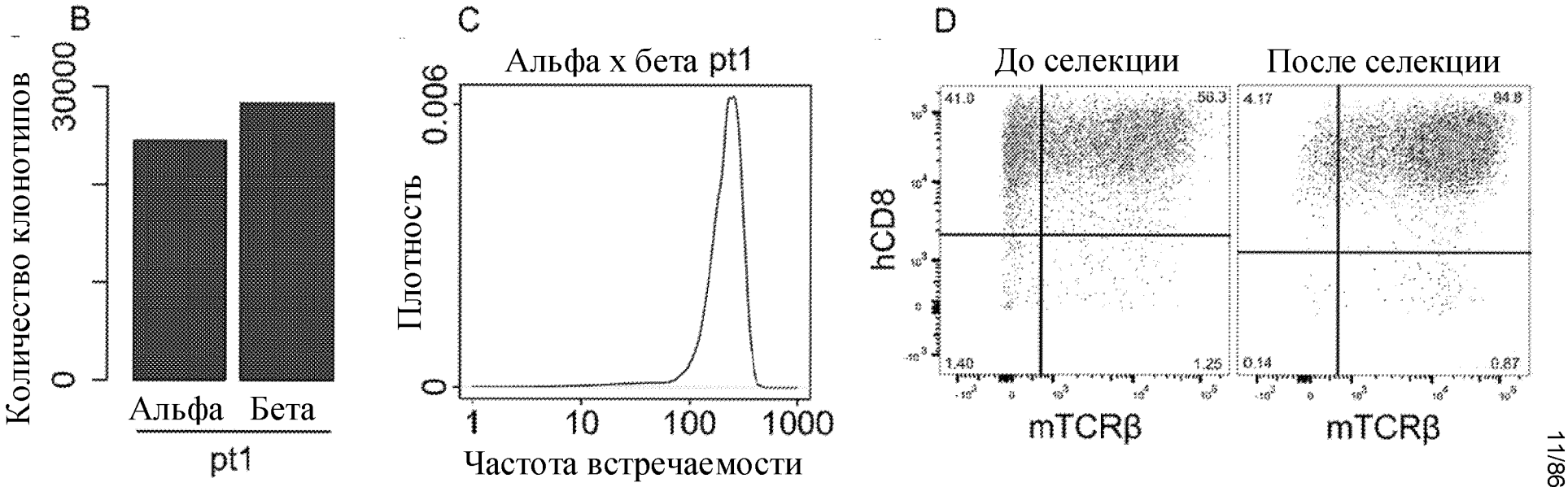
ФИГУРА 9


900
910
Предоставление комбинаторной библиотеки, содержащей множество нуклеиновых кислот, каждая из множества вариантных нуклеиновых кислот содержит непрерывный участок из по меньшей мере 600 п.о., причем указанный непрерывный участок содержит комбинацию двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, причем первая вариантная подпоследовательность нуклеотидов из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет первый конец непрерывного участка, и вторая вариантная подпоследовательность нуклеотидов из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов определяет второй конец непрерывного участка, противоположный первому концу
920
Ввести полученную библиотеку в популяцию клеток, сконструированных для экспрессии одного или более полипептидов, кодируемых представителем множества вариантных нуклеиновых кислот
930
Провести селекцию субпопуляции из популяции клеток на основании по меньшей мере одного функционального свойства, зависящего от комбинации двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов, причем указанная субпопуляция содержит множество клеток
940
Выделить подгруппу из множества нуклеиновых кислот из субпопуляции
950
Определить последовательности нуклеотидов непрерывного участка отдельных представителей указанной подгруппы
960
Идентифицировать по меньшей мере одну комбинацию из двух или более вариантных подпоследовательностей нуклеотидов на основании установленных последовательностей нуклеотидов

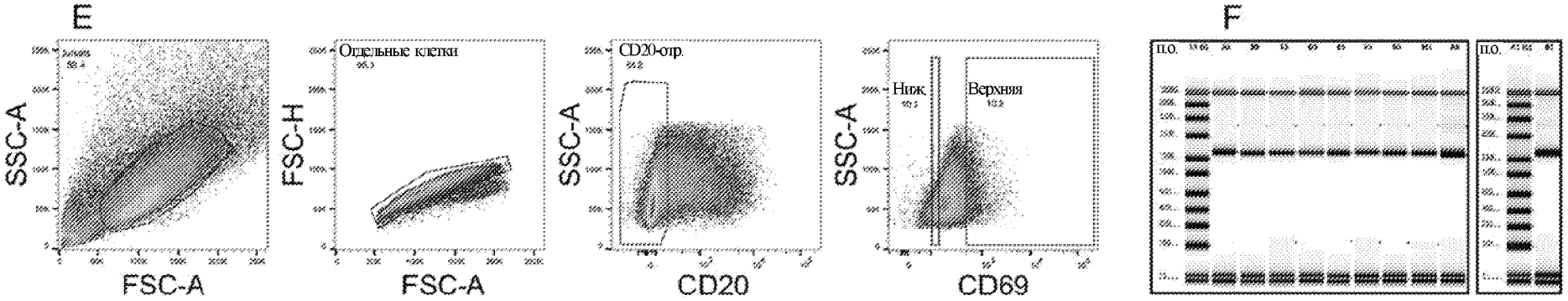
ФИГУРА 10А


1
Таргетное геномное секвенирование биоптата опухоли
2
Синтетические библиотеки внутриопухолевых пар TCR и неоантигенов опухоли
3
Высокопроизводительный скрининг библиотеки TCR против библиотеки неоантигенов опухоли
4
TCR против неоантигенов для терапии

ФИГУРА 10


B
Количество клонотипов
30000
0
Альфа
Бета
pt1
C
Альфа x бета pt1
Плотность
0.006
0
1
10
100
1000
Частота встречаемости
D
До селекции
После селекции
hCD8
41.0
58.3
1.40
1.25
4.17
94.8
0.14
0.87
mTCRβ
mTCRβ

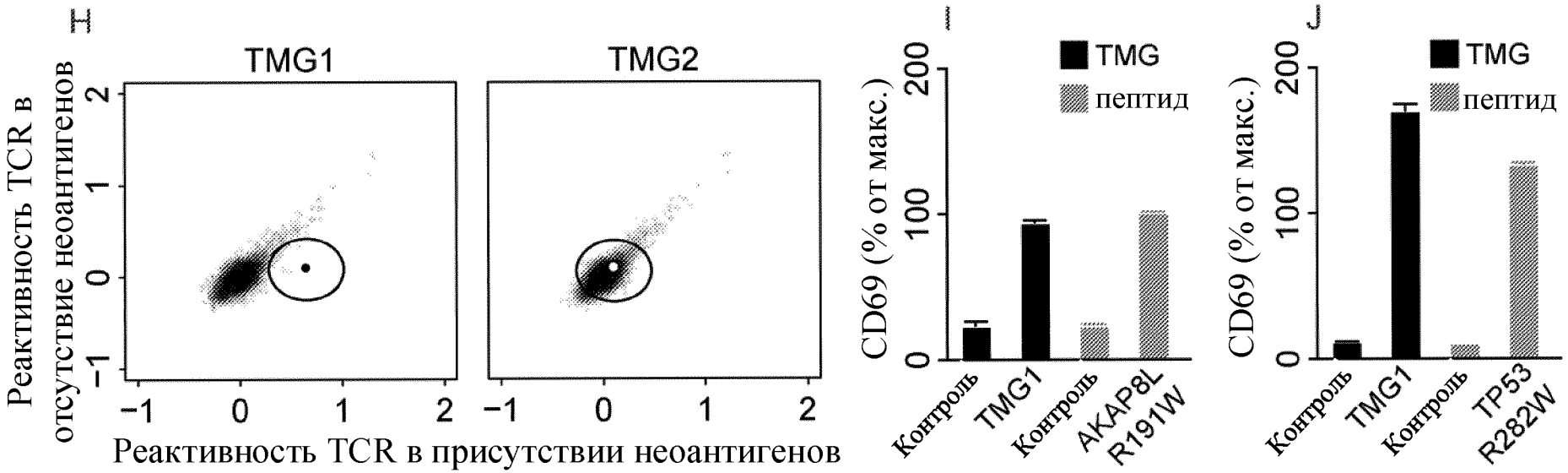
ФИГУРА 10


E
SSC-A
FSC-A
FSC-H
Отдельные клетки
FSC-A
SSC-A
CD20-отр.
CD20
SSC-A
Ниж.
Верхняя
CD69
F
п.о.
п.о.

ФИГУРА 10G

pt1
pt2
pt3
pt4
Реактивность TCR в отсутствие неоантигенов
8
0
−4
−4
0
8
TCR reactivity in presence of neo-antigens
Реактивность TCR в присутствии неоантигенов

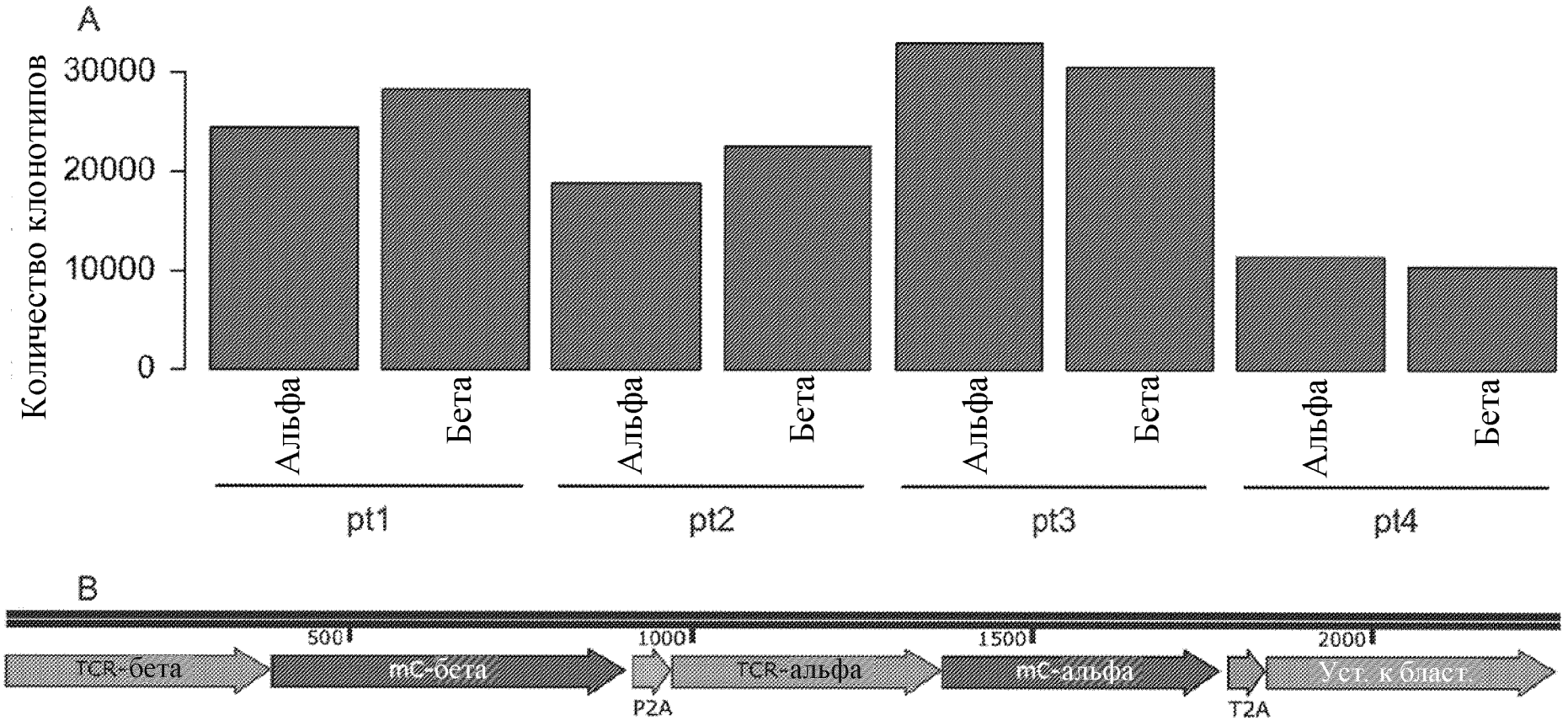
ФИГУРА 10


H
TMG1
TMG2
Реактивность TCR в отсутствие неоантигенов
Реактивность TCR в присутствии неоантигенов
−1
0
1
2
I
CD69 (% от макс.)
0
100
200
TMG
пептид
Контроль
TMG1
Контроль
AKAP8L R191W
J
CD69 (% от макс.)
0
100
200
TMG
пептид
Контроль
TMG1
Контроль
TP53 R282W

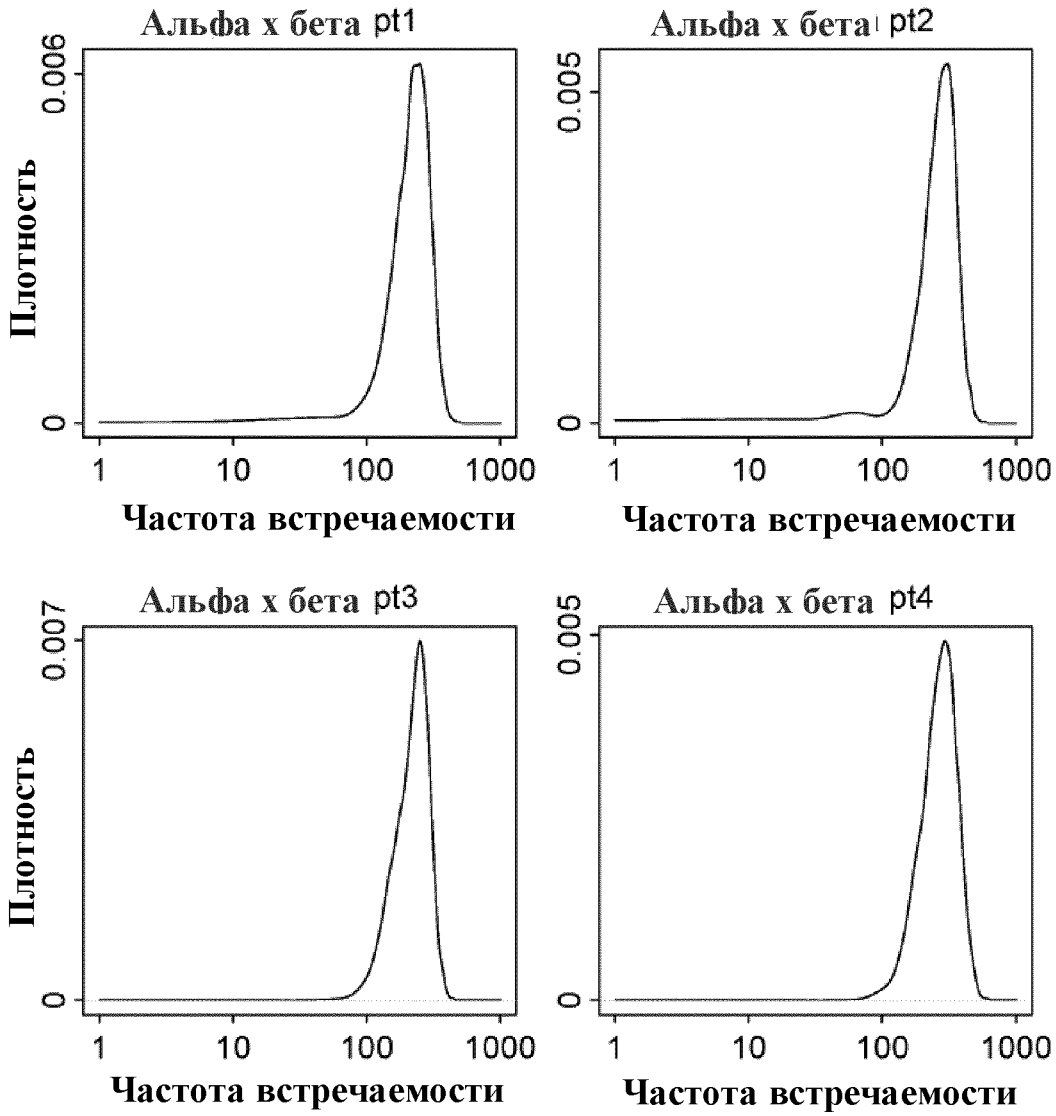
ФИГУРА 10

K
CD69+ (% от макс.)
100
0
Контроль
MG91
TMG3
L
CD69+ (% от макс.)
100
0
Контроль
MG132
TMG4

ФИГУРА 11


A
Количество клонотипов
30000
20000
10000
0
Альфа
Бета
Альфа
Бета
Альфа
Бета
Альфа
Бета
pt1
pt2
pt3
pt4
B
500
1000
1500
2000
TCR-бета
mC-бета
P2A
TCR-альфа
mC-альфа
T2A
Уст. к бласт.

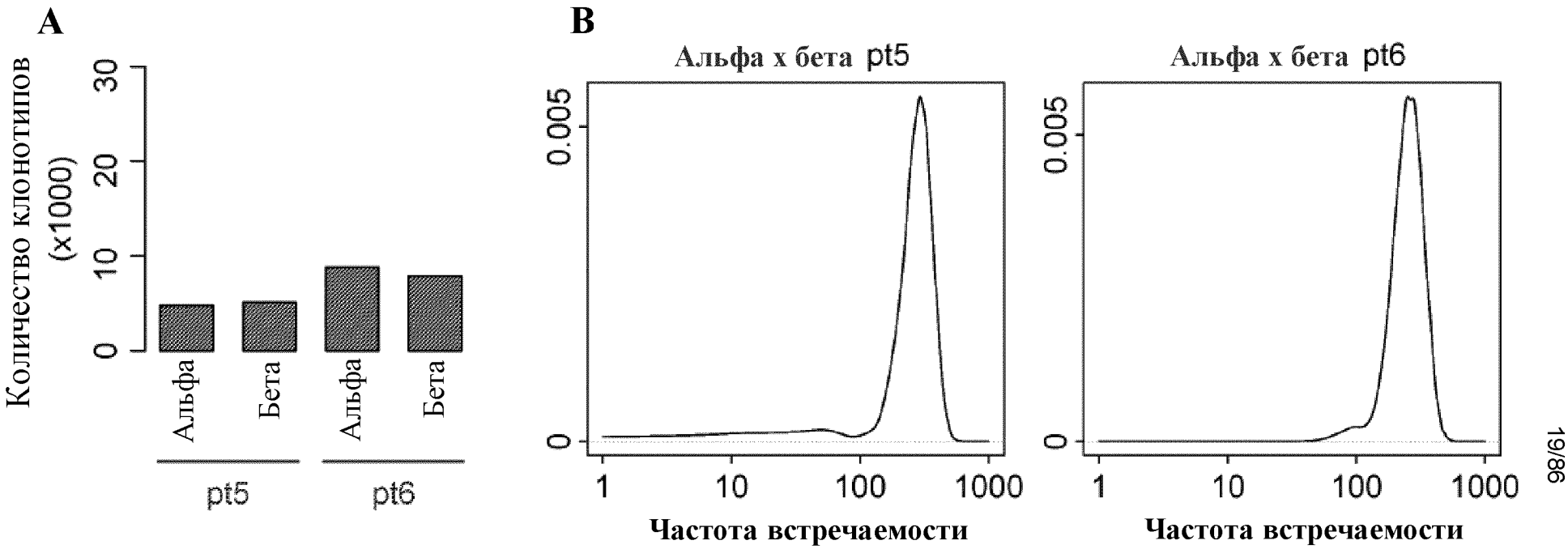
ФИГУРА 11С


Альфа х бета pt1
Альфа х бета pt2
Альфа х бета pt3
Альфа х бета pt4
Плотность
Частота встречаемости
0
0.005
0.006
0.007
1
10
100
1000

ФИГУРА 11D

Образец	Количество прочтений (диапазон)	Среднее покрытие	% TCR в диапазоне медиана+/- ^{2}log-единица
pt1	14-498	254	97.2%
pt2	5-592	291	97.7%
pt3	49-495	240	97.8%
pt4	60-742	297	97.6%

ФИГУРА 12



C

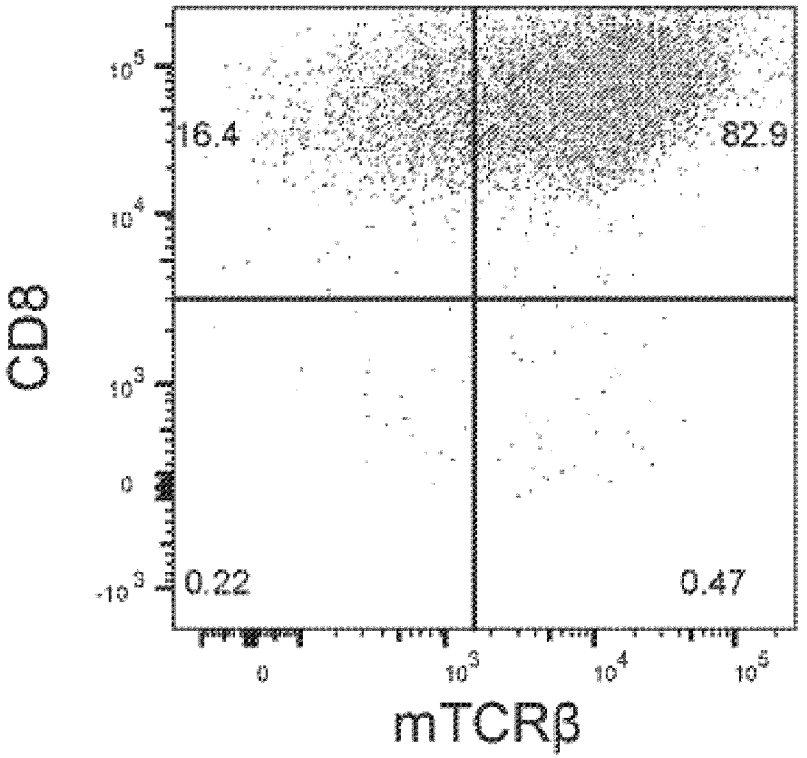
Образец	Количество прочтений (диапазон)	Среднее покрытие	% TCR в диапазоне медиана+/- ^{2}log-единица
pt5	3-611	299	97.6%
pt6	48-569	276	98.2%

ФИГУРА 13

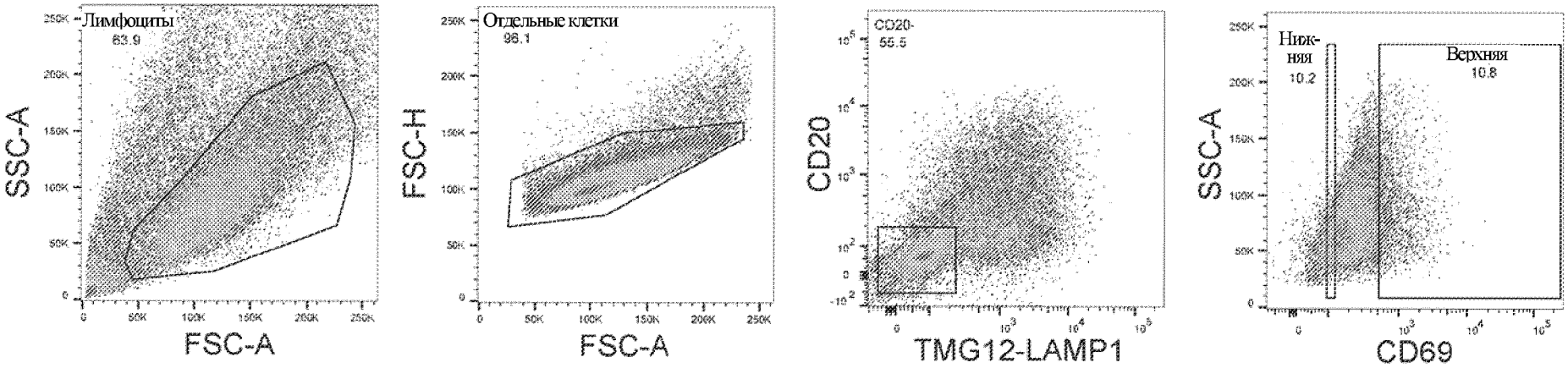
A

Плазмиды TCR	Разведение
CMV1	10.000
CMV2	100.000
CDK4-8	10.000
CDK4-17	100.000
GCN1L1	100.000
NY ESO 1G4	100.000

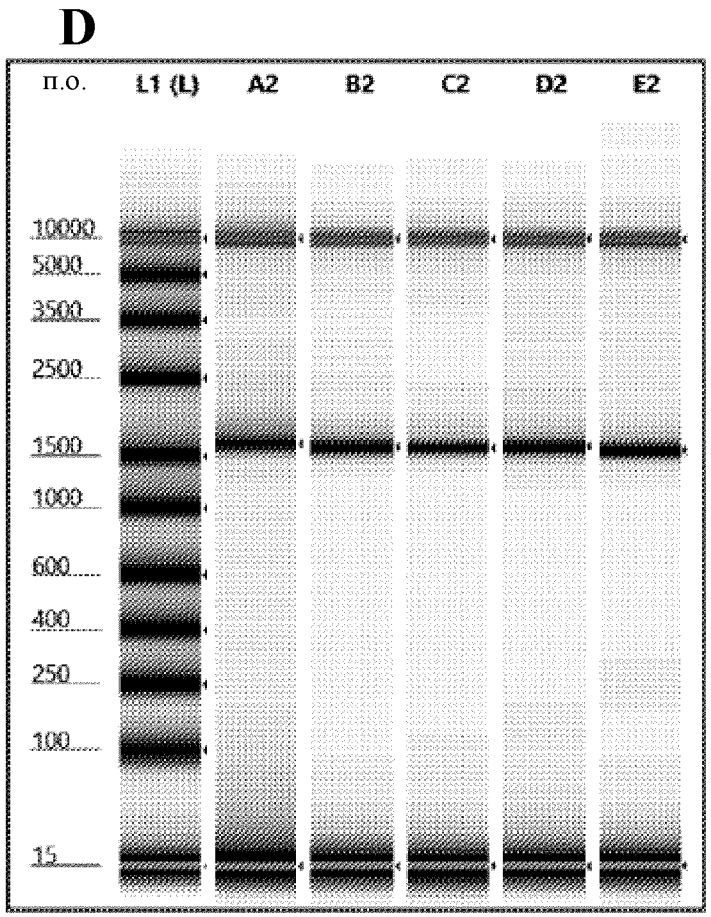
B

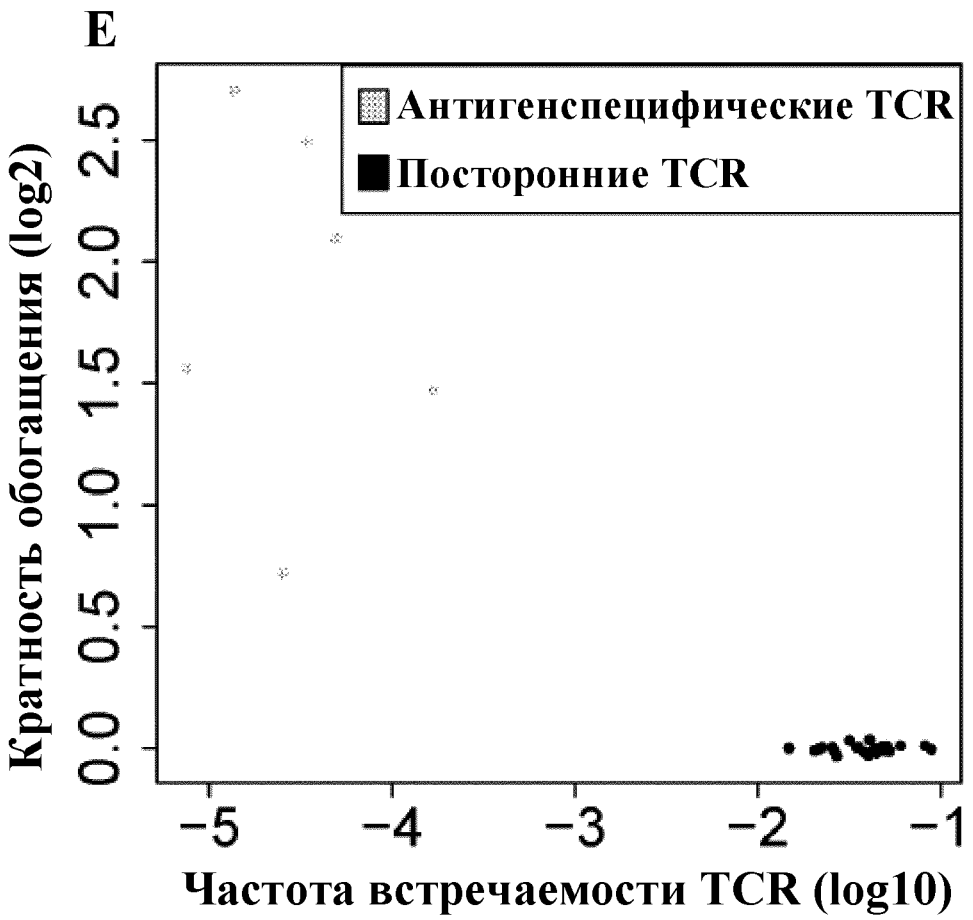


ФИГУРА 13C


Лимфоциты
83.9
SSC-A
FSC-A
Отдельные клетки
96.1
FSC-H
FSC-A
CD20-
55.5
CD20
TMG12-LAMP1
Ниж-
няя
10.2
Верхняя
10.8
SSC-A
CD69

ФИГУРА 13


D
п.о.
L1 (L)
A2
B2
C2
D2
E2
10000
5000
3500
2500
1500
1000
600
400
250
100
15

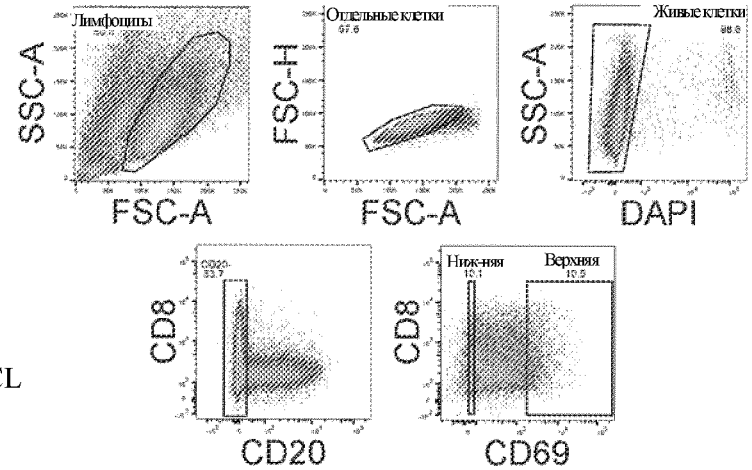

E
Антигенспецифические TCR
Посторонние TCR
Кратность обогащения (log2)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
−5
−4
−3
−2
−1
Частота встречаемости TCR (log10)

ФИГУРА 14

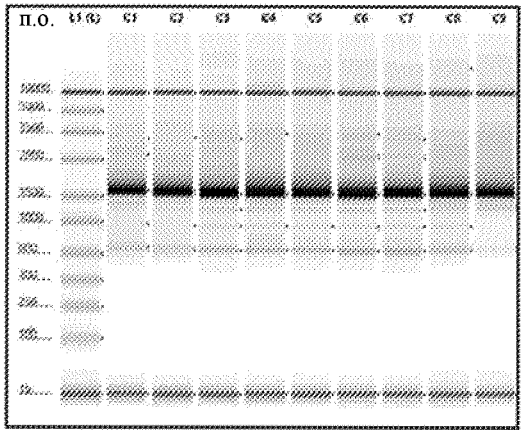
A

CDK4_8 | CDK4_17 | CMV_1 | CMV_2 | GCN1L1
(5 антигенреактивных TCR)
+
РЯ/КРР
(45/95 посторонних TCR)
1 поликлональная библиотека TCR,
экспрессированная в репортерных Т-клетках
x
Различные типы
антигенпрезентирующих клеток
Смесь нагруженных JY
Смесь экспрессирующих миниген (МГ) EBV-LCL
Экспрессирующие TMG EBV-LCL
EBV-LCL

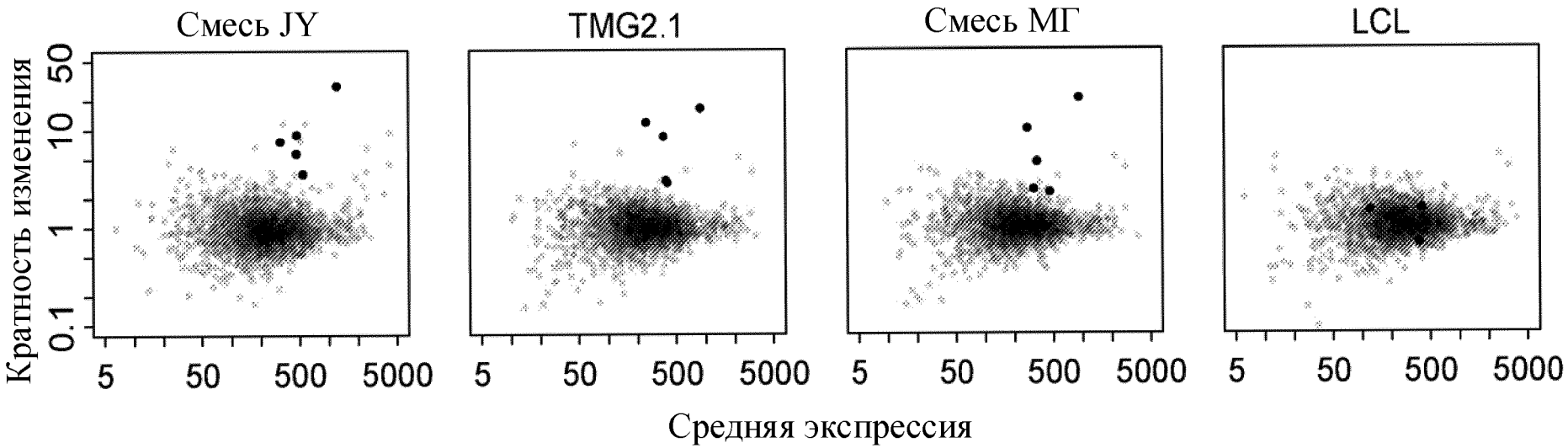
B



C



ФИГУРА 14D

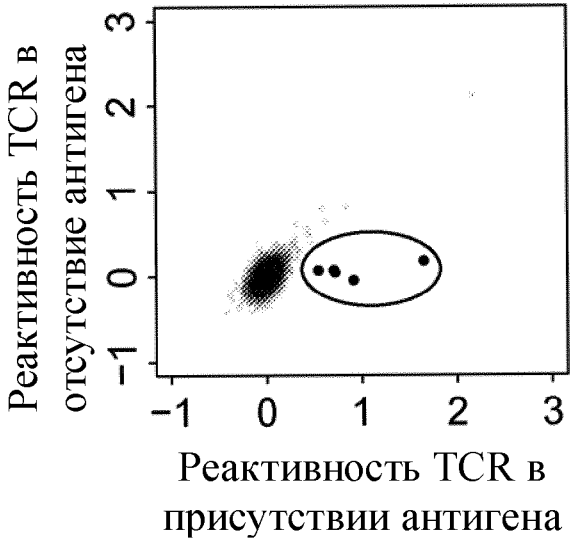

Смесь JY
TMG2.1
Смесь МГ
LCL
Кратность изменения
0.1
1
10
50
5
50
500
5000
Средняя экспрессия

ФИГУРА 14

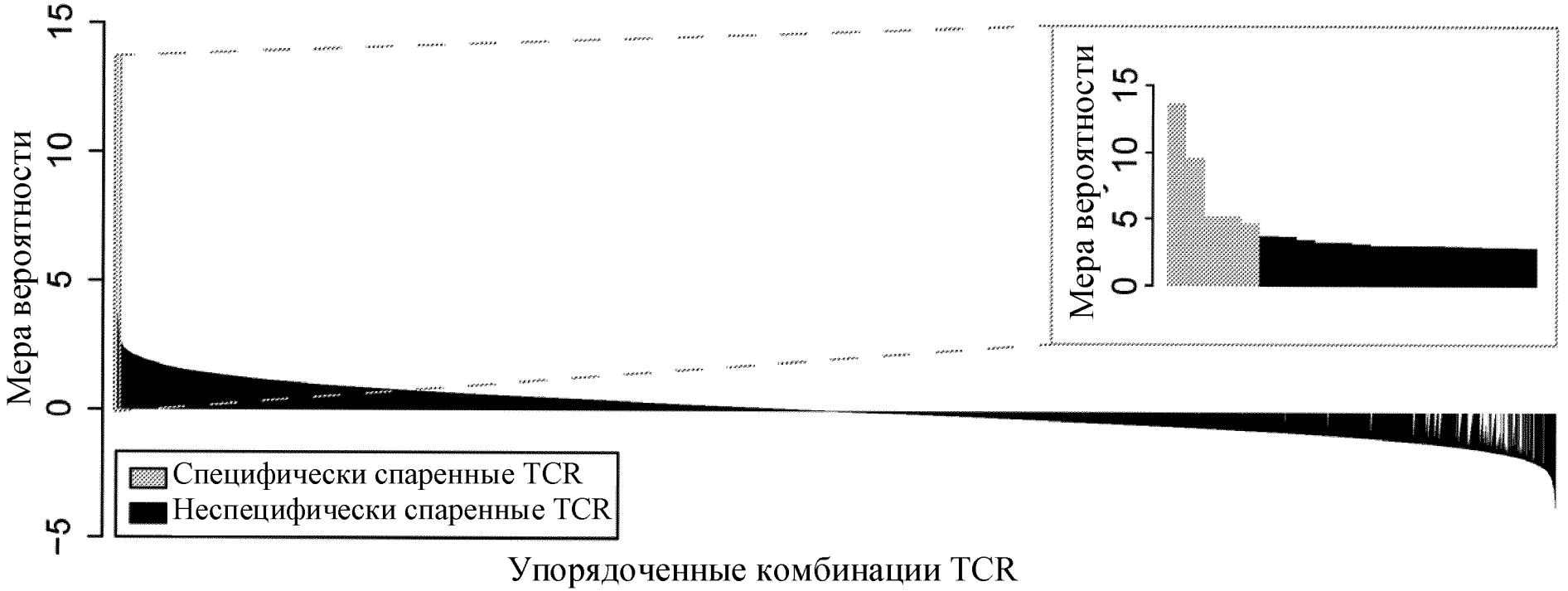
E

Ранг	Альфа	Бета	Базовое среднее	КИ Log2	Скорр. p-знач.
1	CDK4_17	CDK4_17	872	3.81	4.3E-42
2	CDK4_8	CDK4_8	244	2.75	1.2E-10
3	GCN1L1	GCN1L1	346	2.57	6.8E-10
4	CMV_2	CMV_2	449	2.11	7.0E-09
5	CMV_1	CMV_1	362	1.89	3.4E-01
6	CMV_1	GCN1L1	154	1.19	4.1E-01
7	OVC48.1	OVC21.2	97	1.55	8.1E-01
8	OVC21.2	CDK4_8	135	1.22	9.0E-01
9	CDK4_8	OVC21.2	52	1.63	9.6E-01
10	CMV_2	OVC48.1	99	1.34	1.0E+00

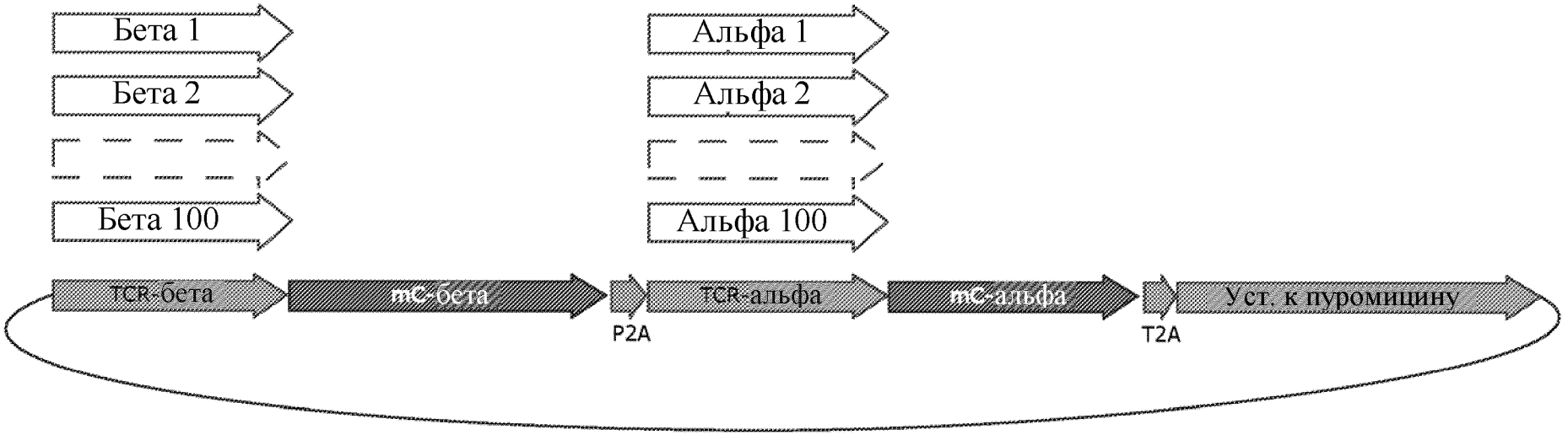
F



ФИГУРА 14G


Мера вероятности
15
10
5
0
−5
Специфически спаренные TCR
Неспецифически спаренные TCR
Упорядоченные комбинации TCR
Мера вероятности
0
5
10
15

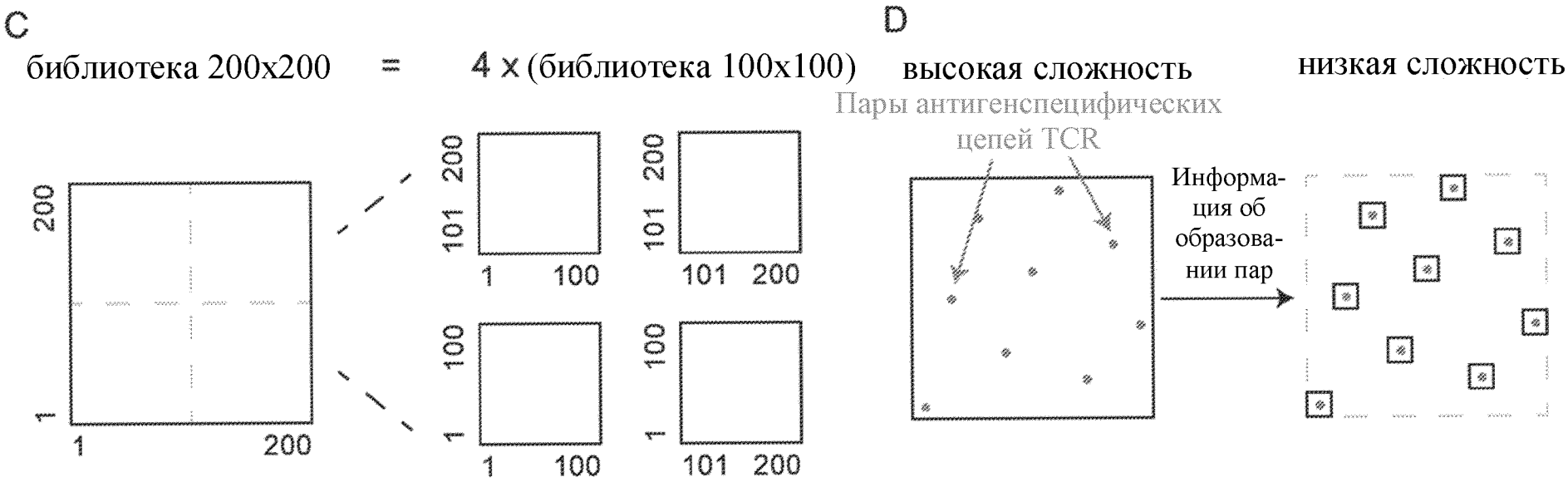
ФИГУРА 15A


Бета 1
Бета 2
Бета 100
Альфа 1
Альфа 2
Альфа 100
TCR-бета
mC-бета
P2A
TCR-альфа
mC-альфа
T2A
Уст. к пуромицину

ФИГУРА 15B

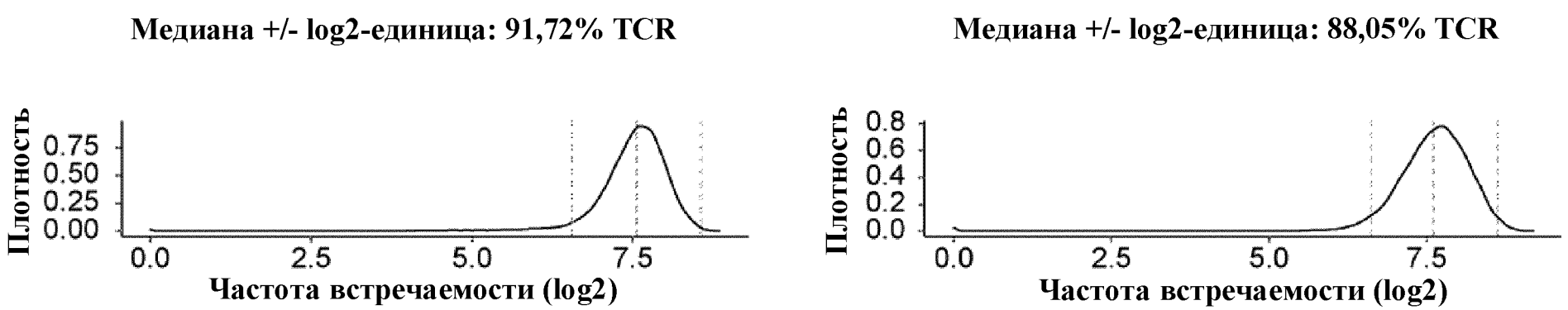

Альфа
Бета
Альфа x бета
Плотность
0.00025
0.0002
0.015
0
1000
10000
1
10
100
Частота встречаемости

ФИГУРА 15


C
библиотека 200x200
=
4 x (библиотека 100x100)
200
1
1
200
101
200
1
100
101
200
101
200
100
1
1
100
100
1
101
200
D
высокая сложность
низкая сложность
Пары антигенспецифических цепей TCR
Информа-ция об образова-нии пар

ФИГУРА 15

E


Медиана +/- log2-единица: 91,72% TCR
Плотность
0.75
0.50
0.25
0.00
0.0
2.5
5.0
7.5
Частота встречаемости (log2)
Медиана +/- log2-единица: 88,05% TCR
Плотность
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0
2.5
5.0
7.5
Частота встречаемости (log2)

ФИГУРА 15

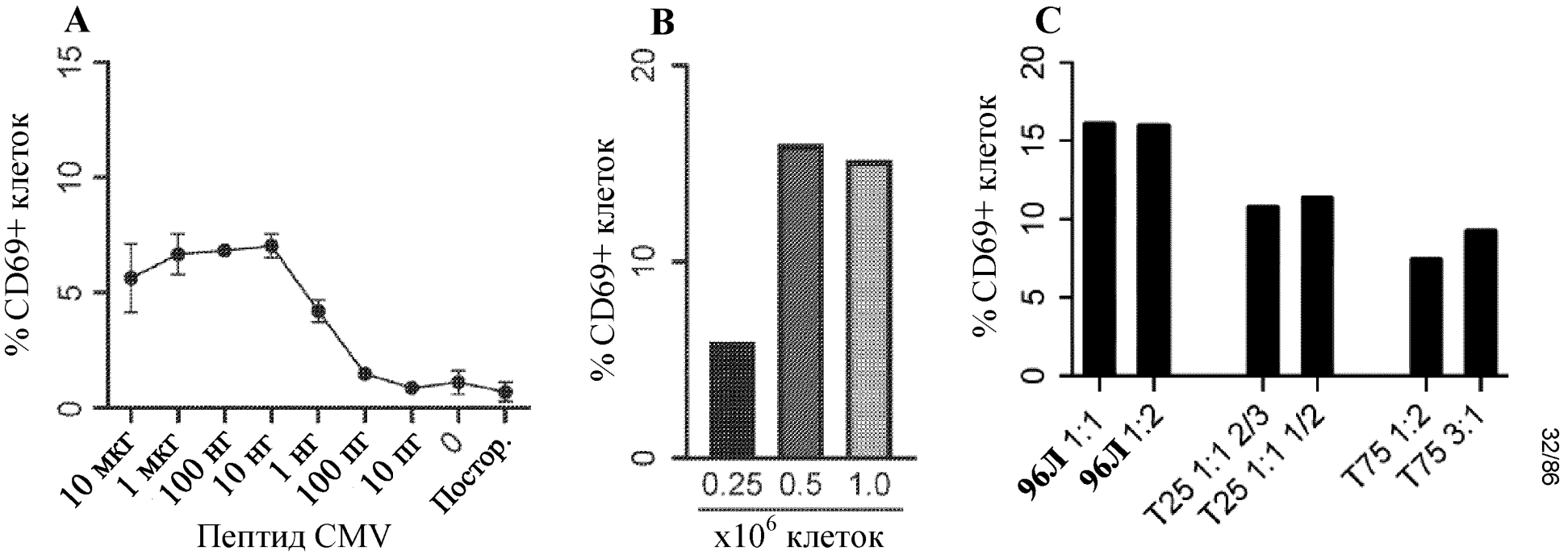
F



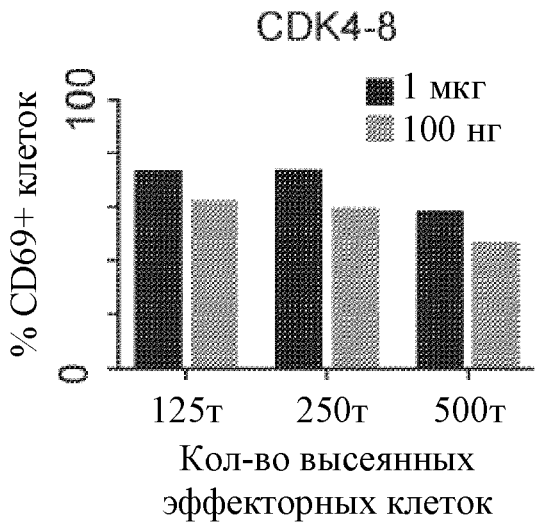
G

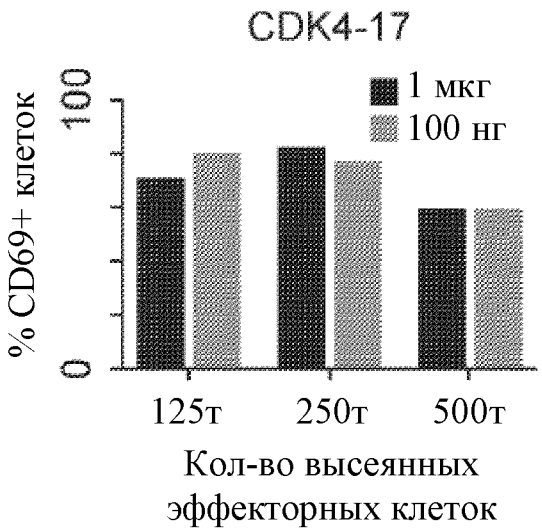
Альфа	Бета	200 x 200				100 x 100		
		Баз. сред	КИ log2	Бонферони	ранг	Баз. сред	КИ log2	Бонферони
NYESO_1g4	NYESO_1g4	895.756	3.559	2.83E-87	1			
GCN1L1	GCN1L1	169.73	3.512	2.19E-17	4			
CDK4_17	CDK4_17	123.15	3.255	2.96E-12	7			
CMV_2	CMV_2	408.906	1.505	1.71E-08	10			
CMV_1	CMV_1	276.288	1.667	1.68E-07	12			
TCR24	TCR43	155.563	1.845	3.88E-04	22	721.624	2.929	2.60E-123
CDK4_8	CDK4_8	160.185	1.309	1.00E+00	41			
TCR61	TCR97	27.535	0.561	1.00E+00	9693	3452.72	2.306	3.41E-243
TCR83	TCR29	8.754	-0.738	1.00E+00	14727	515.73	2.598	2.35E-63
TCR86	TCR35	1.494	-1.485	1.00E+00	19661	455.633	2.368	1.05E-50
TCR76	TCR20	49.302	0.208	1.00E+00	22192	357.861	3.768	3.27E-93
TCR63	TCR17	53.18	-0.145	1.00E+00	26478	410.276	2.599	6.56E-64
TCR24	TCR62	51.637	0.027	1.00E+00	37425	574.068	3.978	4.80E-148

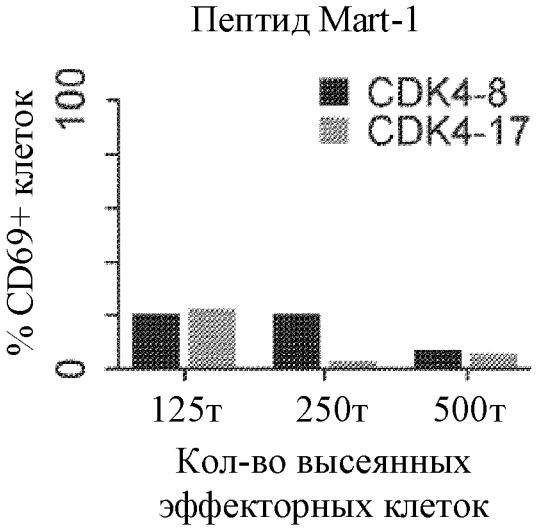
ФИГУРА 16


A
% CD69+ клеток
0
5
10
15
10 мкг
1 мкг
100 нг
10 нг
1 нг
100 пг
10 пг
0
Постор.
Пептид CMV
B
% CD69+ клеток
0
10
20
0.25
0.5
1.0
x10^6 клеток
C
% CD69+ клеток
0
5
10
15
20
96Л 1:1
96Л 1:2
T25 1:1 2/3
T25 1:1 1/2
T75 1:2
T75 3:1

ФИГУРА 16D


CDK4-8
1 мкг
100 нг
% CD69+ клеток
100
0
125т
250т
500т
Кол-во высеянных эффекторных клеток

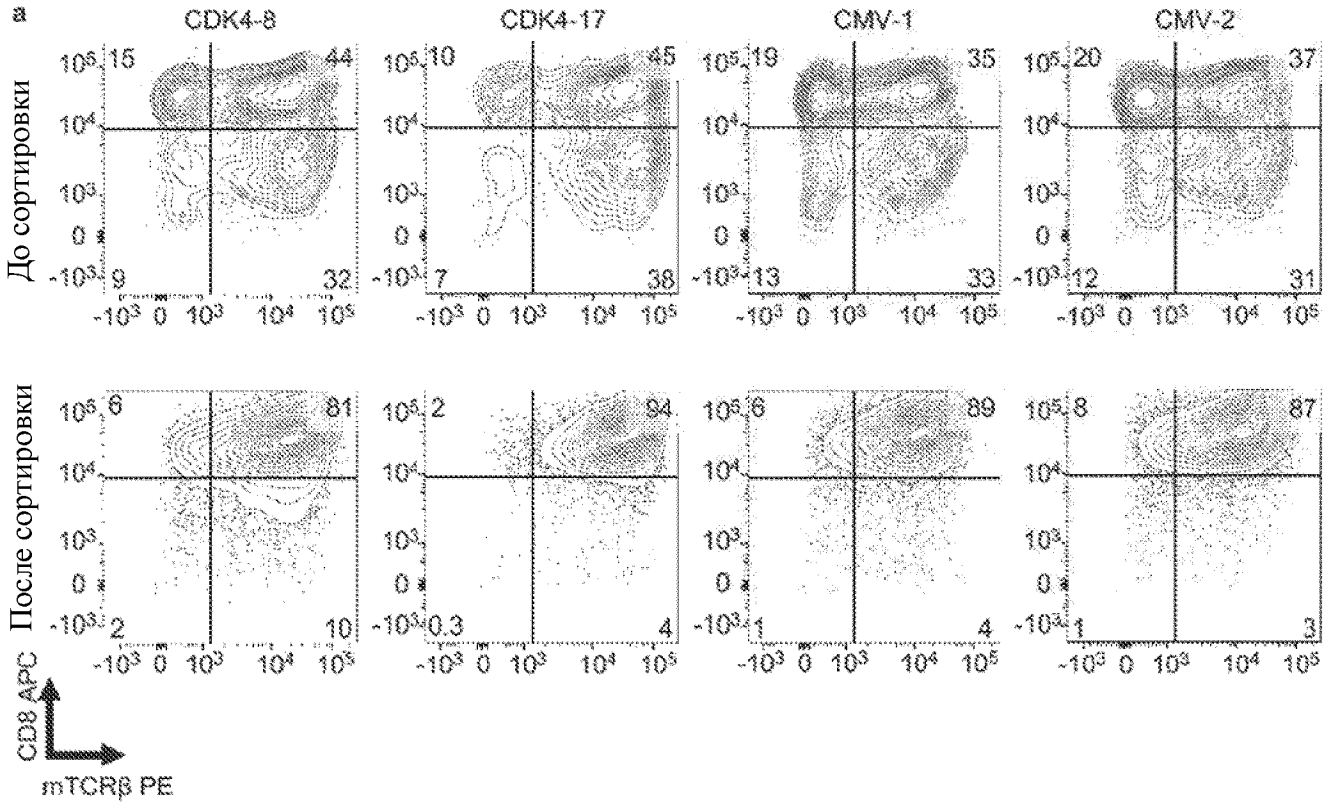

CDK4-17
1 мкг
100 нг
% CD69+ клеток
100
0
125т
250т
500т
Кол-во высеянных эффекторных клеток


Пептид Mart-1
CDK4-8
CDK4-17
% CD69+ клеток
100
0
125т
250т
500т
Кол-во высеянных эффекторных клеток

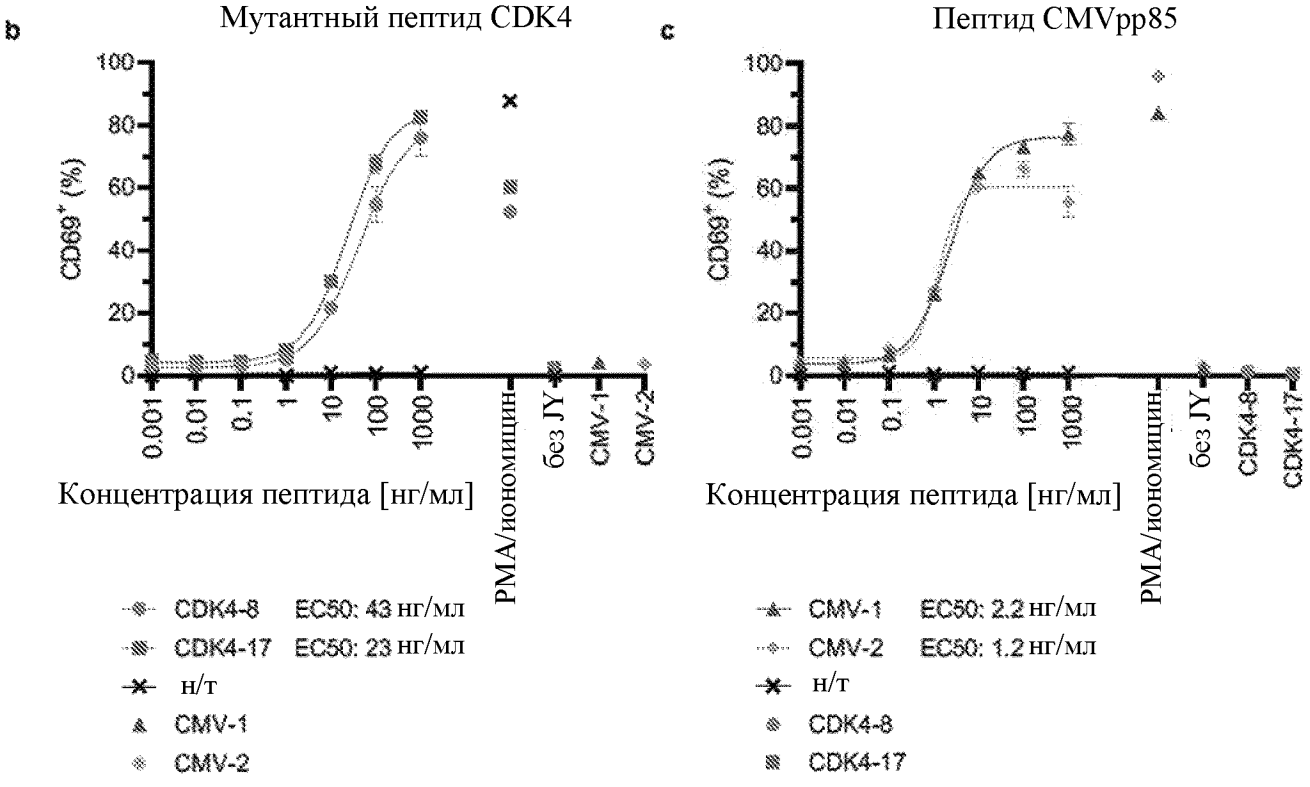
ФИГУРА 16E

Кратность обогащения
0
5
10
15
20
25
30
Посторонние TCR
CDK4-8 (~1:1e6)
CDK4-17 (~1:1e6)
GCN1L1 (~1:1e5)
CMV1 (~1e5)
CMV2 (~1e4)

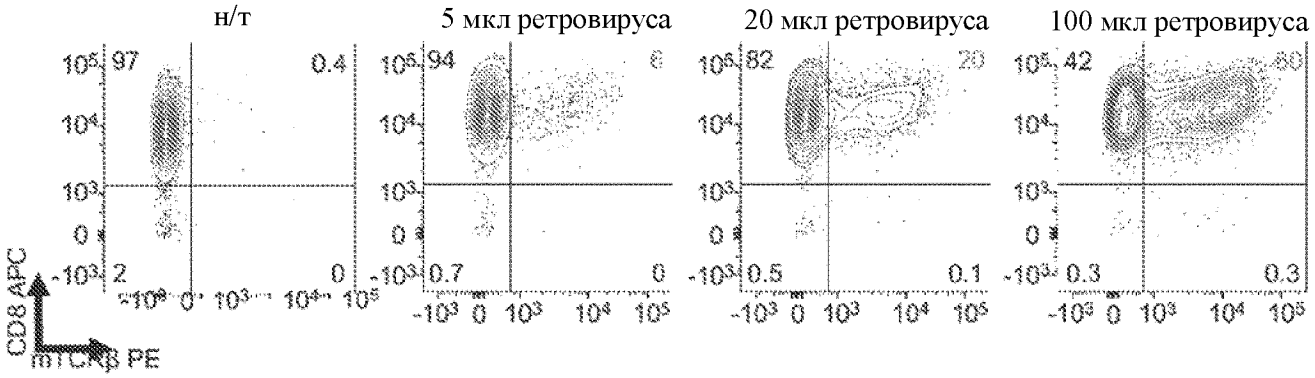
ФИГУРА 17


a
CDK4-8
CDK4-17
CMV-1
CMV-2
До сортировки
После сортировки
15
44
9
32
10
45
7
38
19
35
13
33
20
37
12
31
6
81
2
10
2
94
0.3
4
6
89
1
4
8
87
1
3
CD8 APC
mTCRβ PE

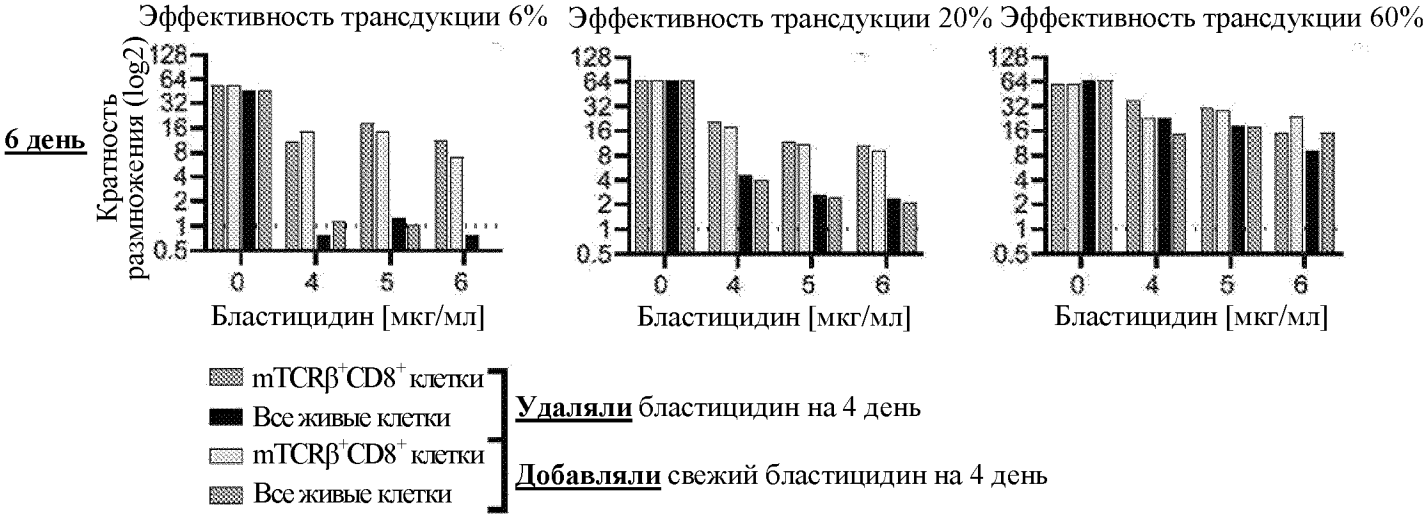
ФИГУРА 17


b
Мутантный пептид CDK4
CD69+ (%)
Концентрация пептида [нг/мл]
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
PMA/иономицин
без JY
CMV-1
CMV-2
CDK4-8 EC50: 43 нг/мл
CDK4-17 EC50: 23 нг/мл
н/т
CMV-1
CMV-2
c
Пептид CMVpp85
CD69+ (%)
Концентрация пептида [нг/мл]
PMA/иономицин
без JY
CDK4-8
CDK4-17
CMV-1 EC50: 2.2 нг/мл
CMV-2 EC50: 1.2 нг/мл
н/т
CDK4-8
CDK4-17

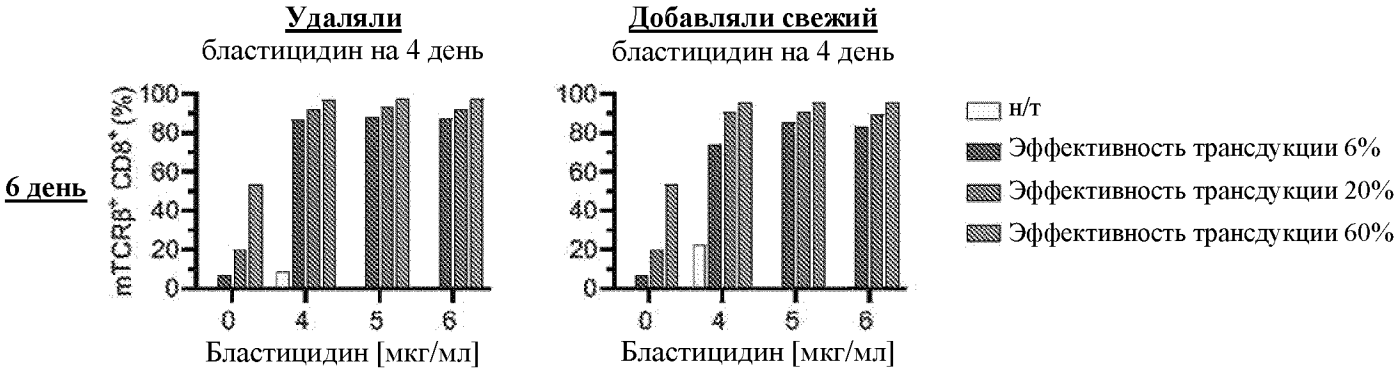
ФИГУРА 18А


н/т
5 мкл ретровируса
20 мкл ретровируса
100 мкл ретровируса
97
0.4
2
0
94
6
0.7
0
82
20
0.5
0.1
42
60
0.3
0.3
CD8 APC
mTCRβ PE

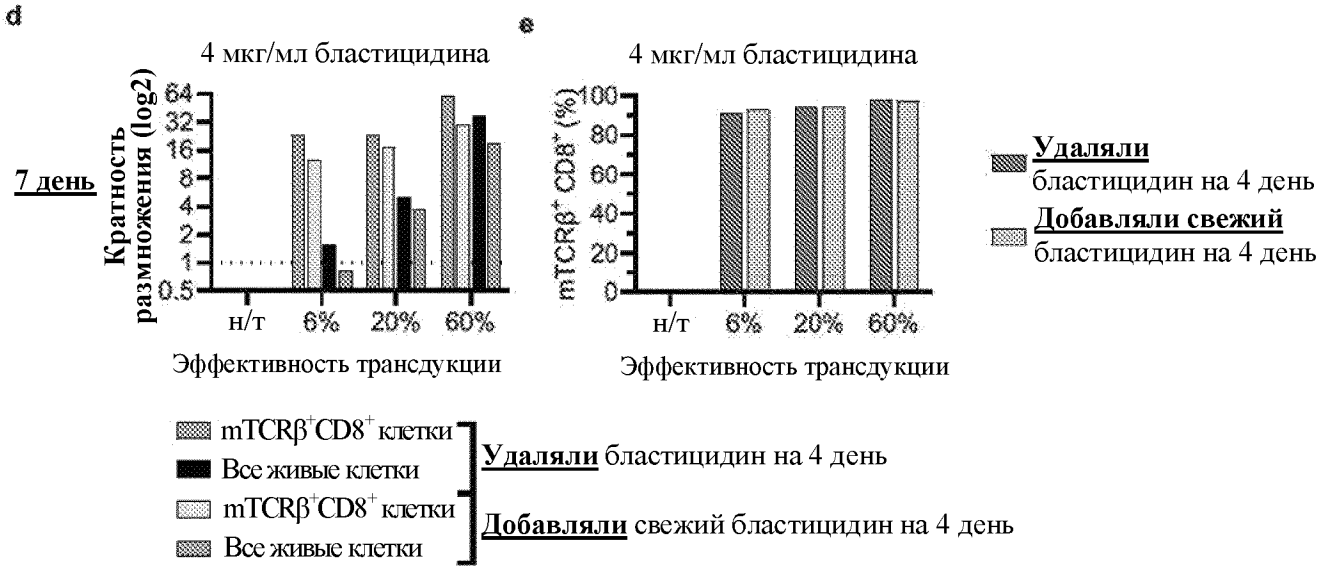
ФИГУРА 18B


Эффективность трансдукции 6%
Эффективность трансдукции 20%
Эффективность трансдукции 60%
6 день
Кратность размножения (log2)
128
64
32
16
8
4
2
1
0.5
0
4
5
6
Бластицидин [мкг/мл]
mTCRβ+CD8+ клетки
Все живые клетки
mTCRβ+CD8+ клетки
Все живые клетки
Удаляли бластицидин на 4 день
Добавляли свежий бластицидин на 4 день

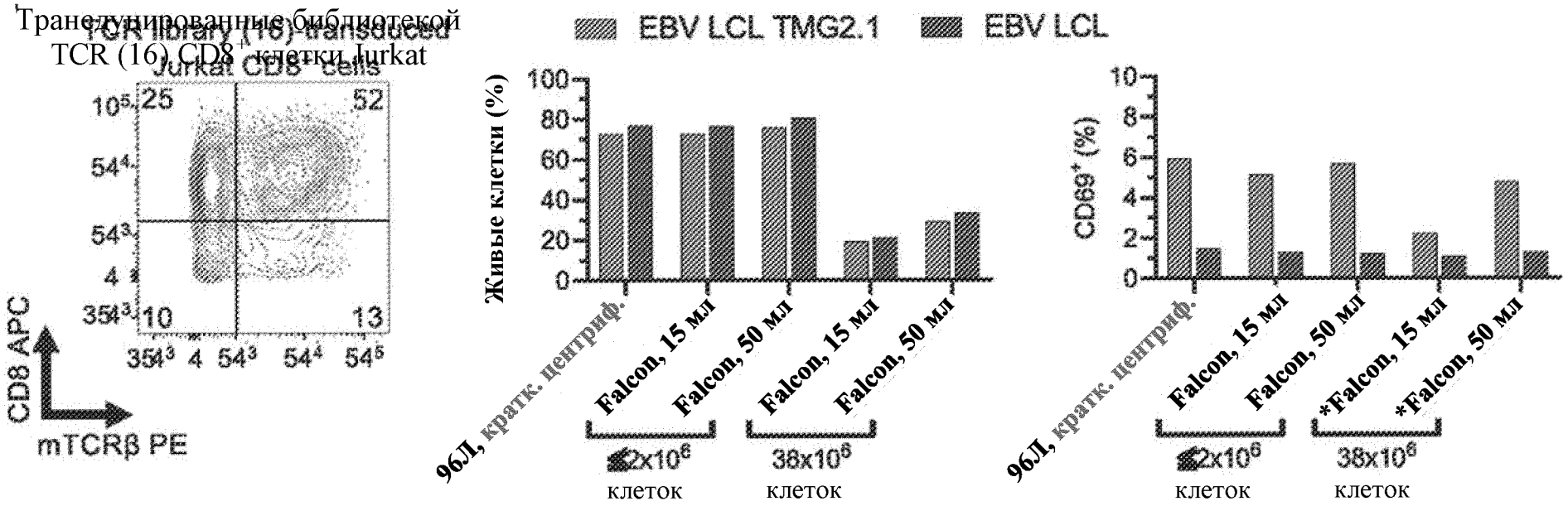
ФИГУРА 18C


Удаляли
бластицидин на 4 день
Добавляли свежий
бластицидин на 4 день
6 день
mTCRβ+ CD8+ (%)
100
80
60
40
20
0
0
4
5
6
Бластицидин [мкг/мл]
Бластицидин [мкг/мл]
н/т
Эффективность трансдукции 6%
Эффективность трансдукции 20%
Эффективность трансдукции 60%

ФИГУРА 18

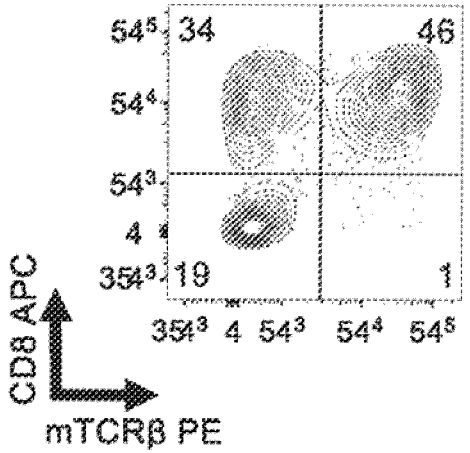

d
4 мкг/мл бластицидина
7 день
Кратность размножения (log2)
64
32
16
8
4
2
1
0.5
н/т
6%
20%
60%
Эффективность трансдукции
e
4 мкг/мл бластицидина
mTCRβ+ CD8+ (%)
100
80
60
40
20
0
н/т
6%
20%
60%
Эффективность трансдукции
Удаляли бластицидин на 4 день
Добавляли свежий бластицидин на 4 день
mTCRβ+CD8+ клетки
Все живые клетки
mTCRβ+CD8+ клетки
Все живые клетки
Удаляли бластицидин на 4 день
Добавляли свежий бластицидин на 4 день

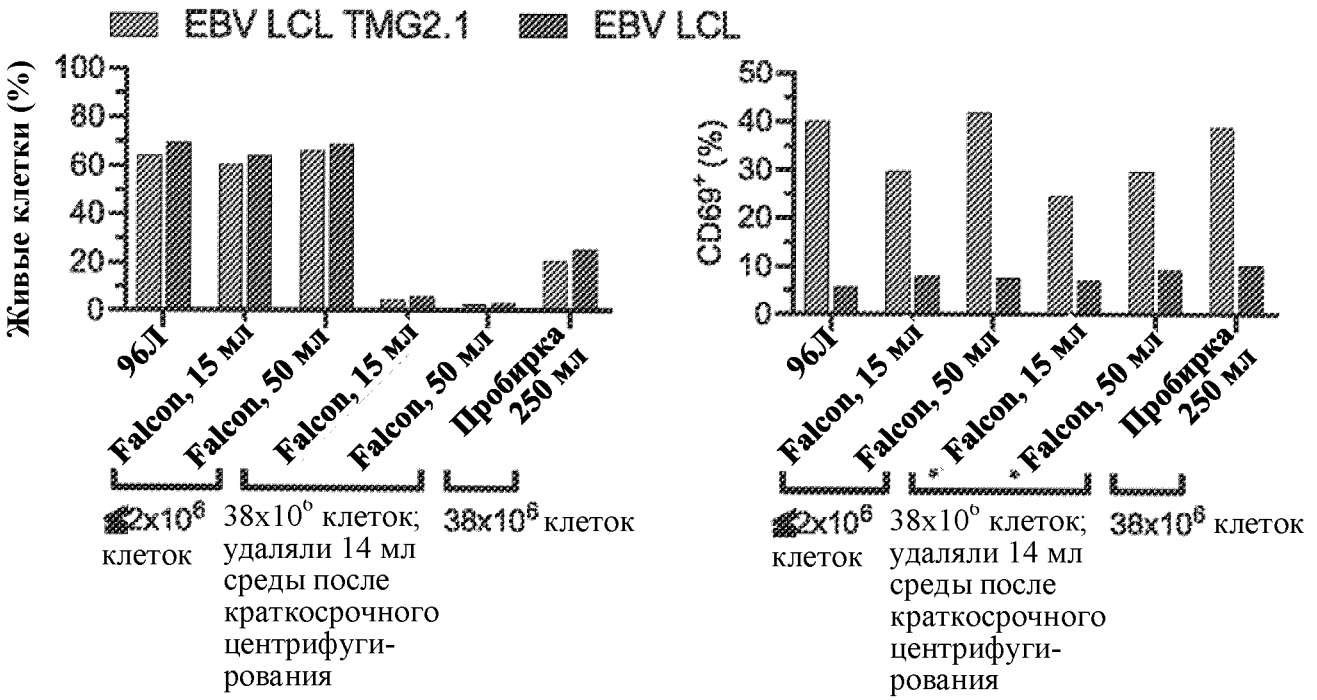
ФИГУРА 19А


Трансдуцированные библиотекой TCR (16) CD8+ клетки Jurkat
TCR library (16) transduced Jurkat CD8+ cells
25
52
10
13
CD8 APC
mTCRβ PE
EBV LCL TMG2.1
EBV LCL
Живые клетки (%)
CD69+ (%)
96Л, кратк. центриф.
Falcon, 15 мл
Falcon, 50 мл
*Falcon, 15 мл
*Falcon, 50 мл
2x10^6 клеток
38x10^6 клеток

ФИГУРА 19В

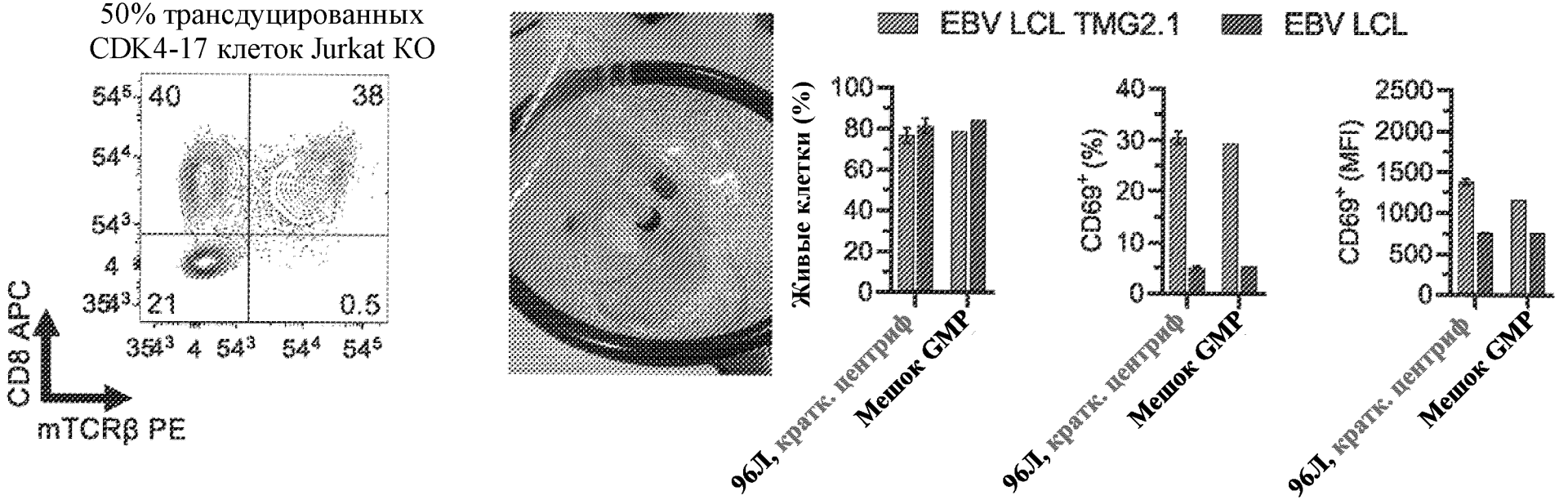
60% трансдуцированных CDK4-17 клеток Jurkat KO



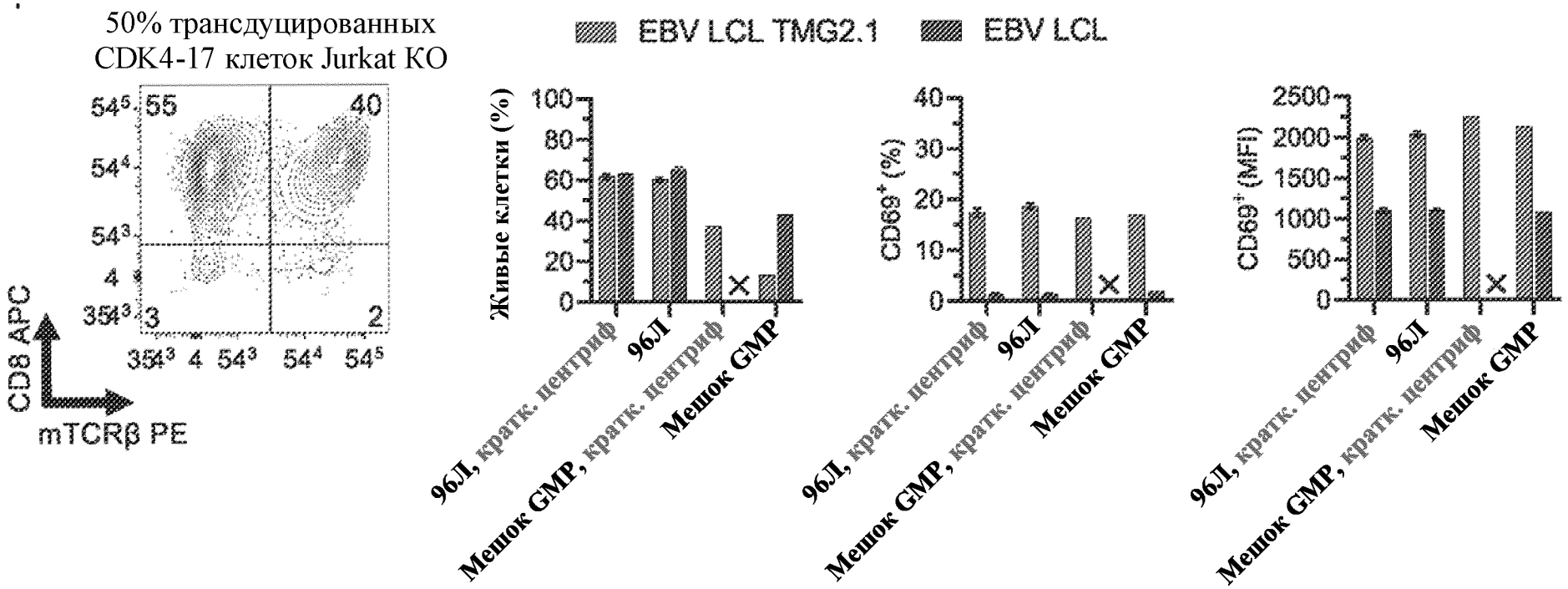


Краткосрочное центрифугирование: все условия, кроме пробирок емкостью 250 мл

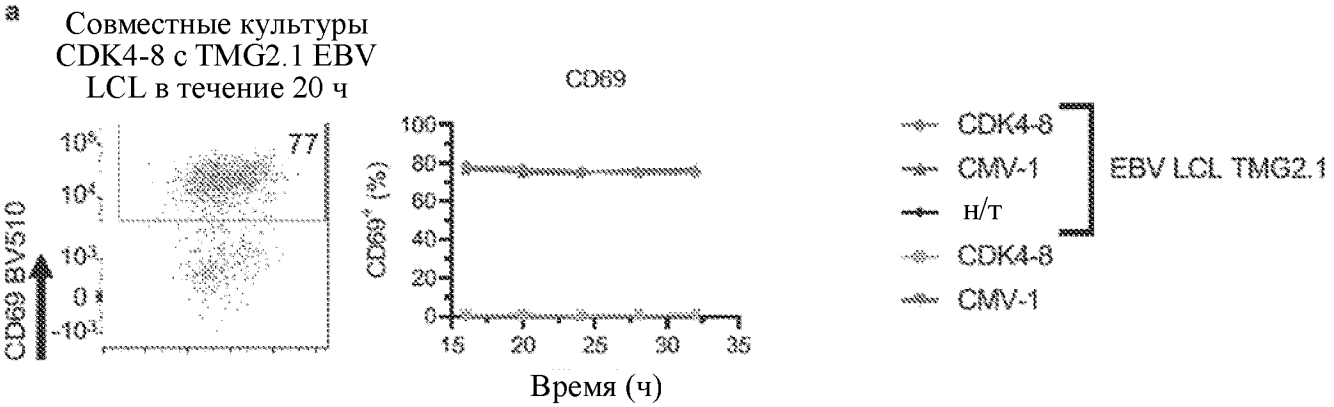
ФИГУРА 19С


50% трансдуцированных
CDK4-17 клеток Jurkat KO
40
38
21
0.5
CD8 APC
mTCRβ PE
EBV LCL TMG2.1
EBV LCL
Живые клетки (%)
CD69+ (%)
CD69+ (MFI)
96Л, кратк. центриф
Мешок GMP

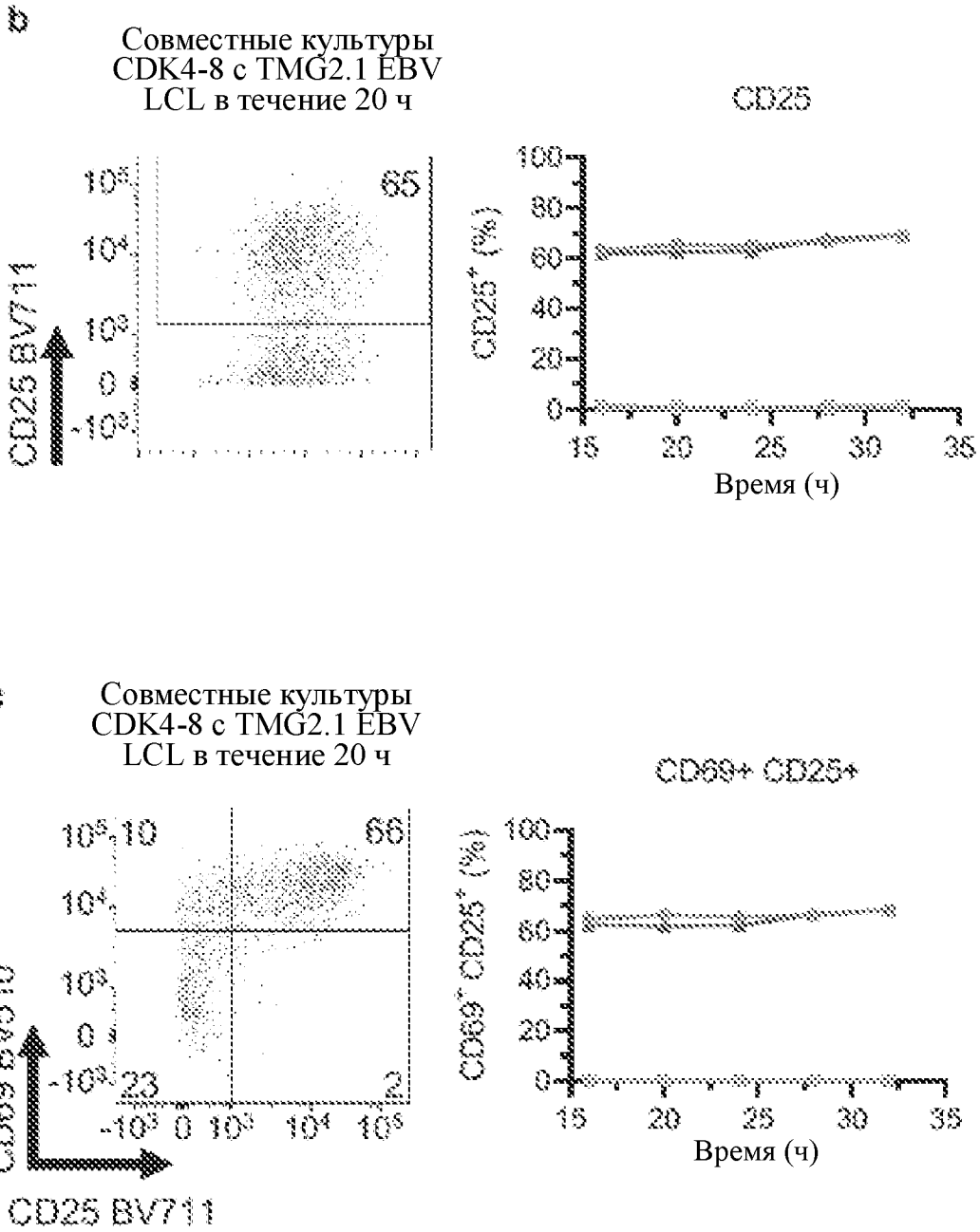
ФИГУРА 19D


50% трансдуцированных
CDK4-17 клеток Jurkat KO
55
40
3
2
CD8 APC
mTCRβ PE
EBV LCL TMG2.1
EBV LCL
Живые клетки (%)
CD69+ (%)
CD69+ (MFI)
96Л, кратк. центриф
96Л
Мешок GMP, кратк. центриф
Мешок GMP

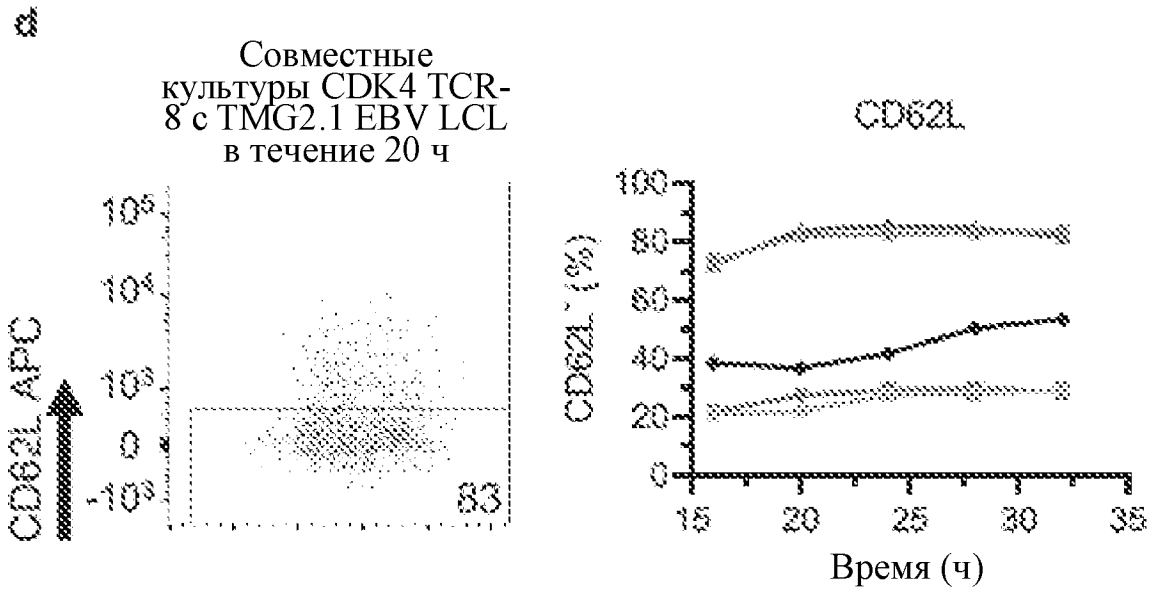
ФИГУРА 20А

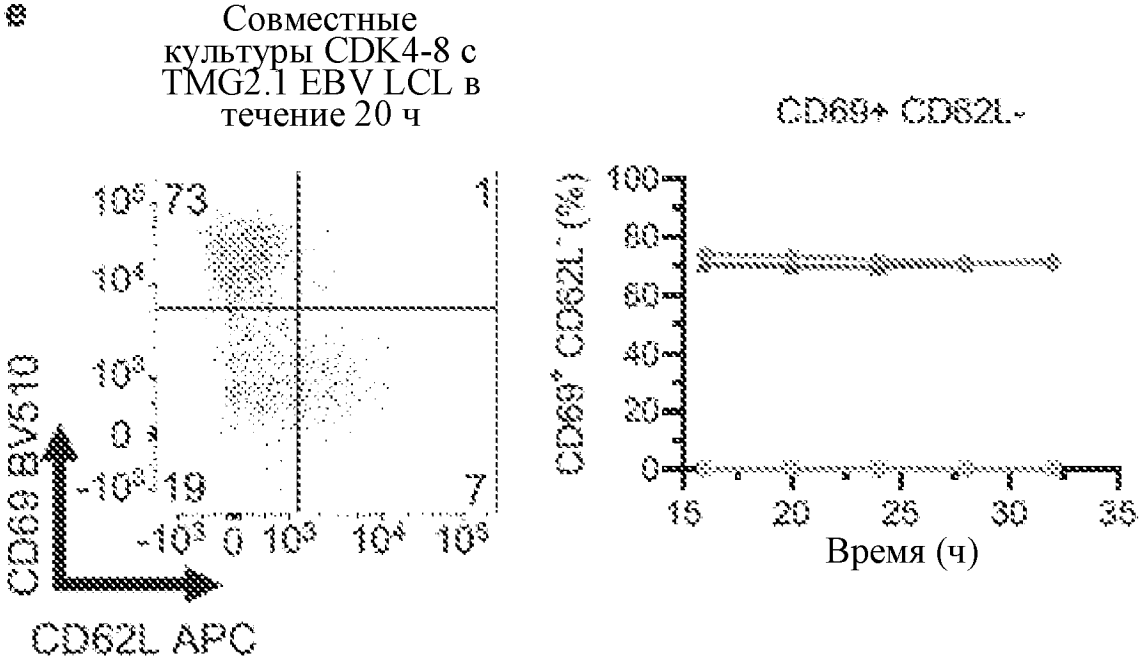

a
Совместные культуры CDK4-8 с TMG2.1 EBV LCL в течение 20 ч
77
CD69 BV510
CD69
CD69+ (%)
Время (ч)
CDK4-8
CMV-1
н/т
CDK4-8
CMV-1
EBV LCL TMG2.1

ФИГУРА 20

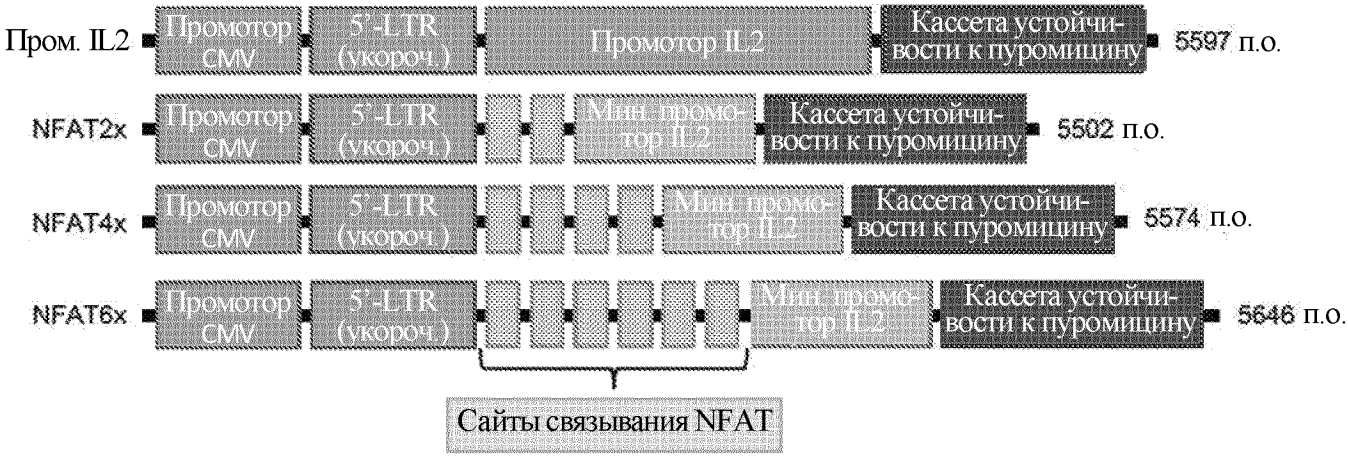

b
Совместные культуры
CDK4-8 с TMG2.1 EBV
LCL в течение 20 ч
CD25 BV711
65
CD25
CD25+ (%)
Время (ч)
c
Совместные культуры
CDK4-8 с TMG2.1 EBV
LCL в течение 20 ч
CD69 BV510
CD25 BV711
10
66
23
2
CD69+ CD25+
CD69+ CD25+ (%)
Время (ч)

ФИГУРА 20

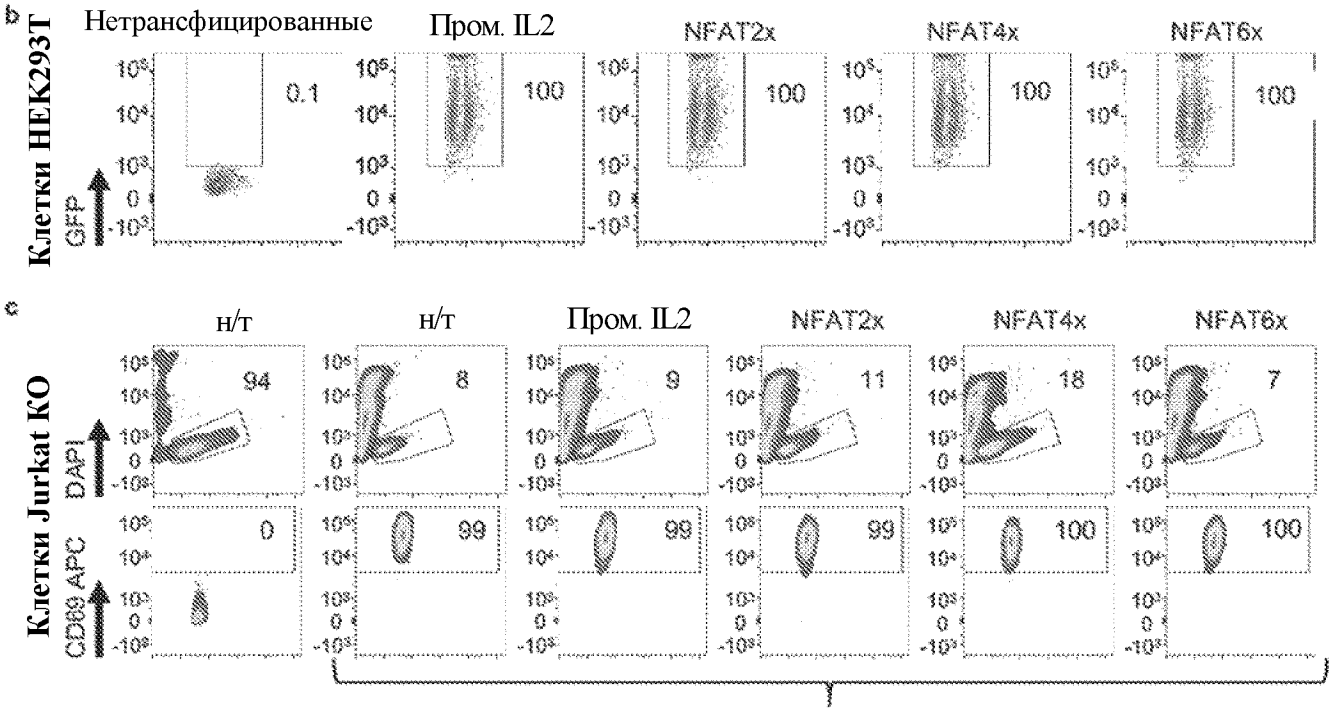

Совместные культуры CDK4 TCR-8 с TMG2.1 EBV LCL в течение 20 ч
CD62L_APC
83
CD62L
CD62L+ (%)
Время (ч)


Совместные культуры CDK4-8 с TMG2.1 EBV LCL в течение 20 ч
CD69 BV510
CD62L APC
73
19
7
CD69+ CD62L-
CD69+ CD62L- (%)
Время (ч)

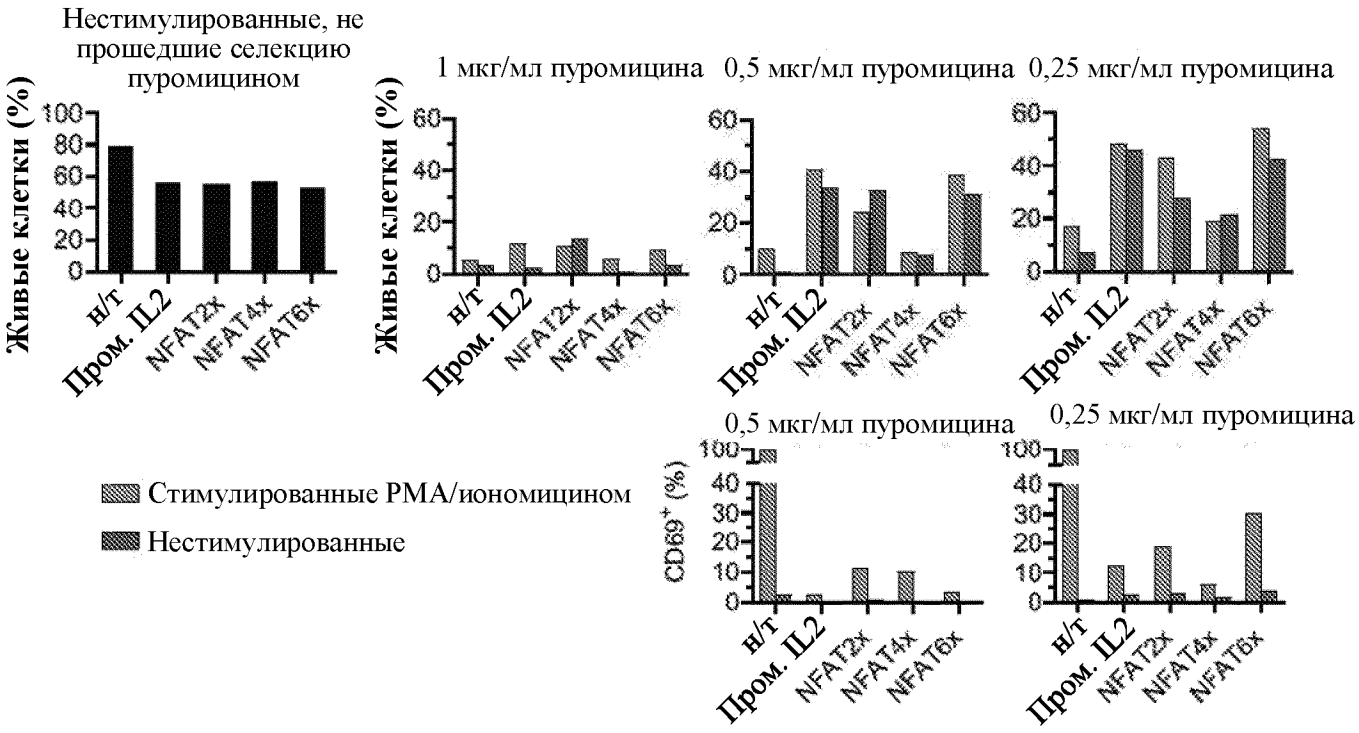
ФИГУРА 21А


Пром. IL2
Промотор CMV
5'-LTR (укороч.)
Промотор IL2
Кассета устойчивости к пуромицину
5597 п.о.
NFAT2x
Промотор CMV
5'-LTR (укороч.)
Мин. промотор IL2
Кассета устойчивости к пуромицину
5502 п.о.
NFAT4x
Промотор CMV
5'-LTR (укороч.)
Мин. промотор IL2
Кассета устойчивости к пуромицину
5574 п.о.
NFAT6x
Промотор CMV
5'-LTR (укороч.)
Мин. промотор IL2
Кассета устойчивости к пуромицину
5646 п.о.
Сайты связывания NFAT

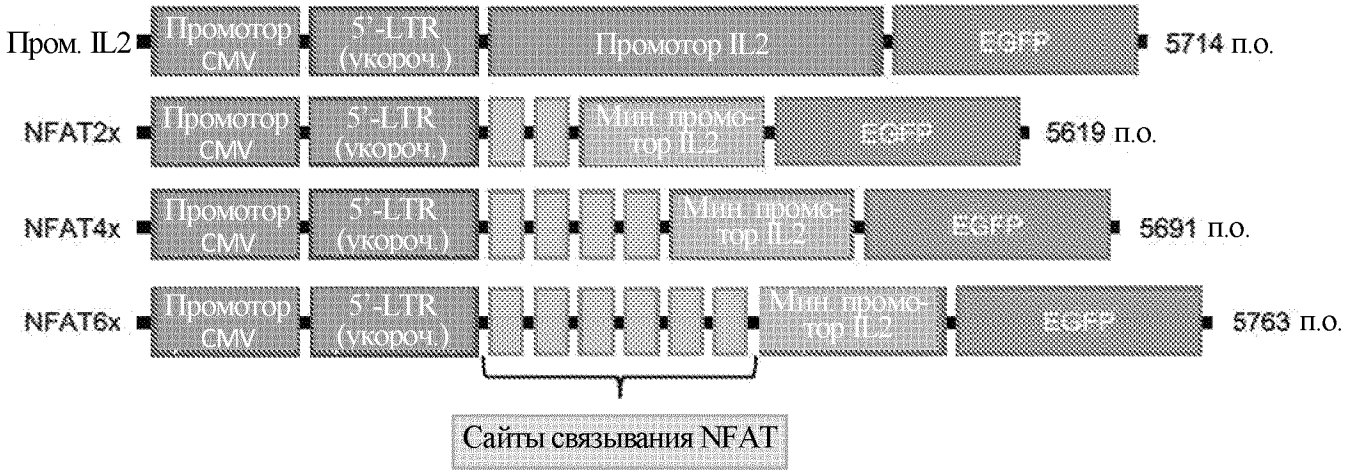
ФИГУРА 21


b
Клетки HEK293T
Нетрансфицированные
Пром. IL2
NFAT2x
NFAT4x
NFAT6x
GFP
0.1
100
c
Клетки Jurkat KO
н/т
н/т
Пром. IL2
NFAT2x
NFAT4x
NFAT6x
DAPI
CD69 APC
94
8
9
11
18
7
0
99
99
99
100
100
Стимуляции PMA/иономицином → 3 дня селекции 1 мкг/мл пуромицина

ФИГУРА 21D

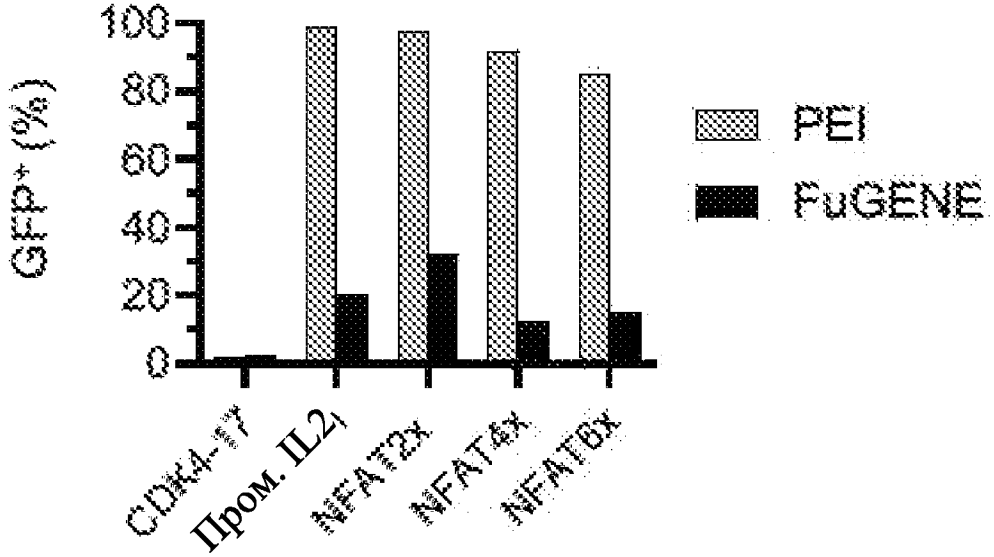

Нестимулированные, не прошедшие селекцию пуромицином
1 мкг/мл пуромицина
0,5 мкг/мл пуромицина
0,25 мкг/мл пуромицина
Живые клетки (%)
н/т
Пром. IL2
NFAT2x
NFAT4x
NFAT6x
Стимулированные PMA/иономицином
Нестимулированные
CD69+ (%)

ФИГУРА 22А

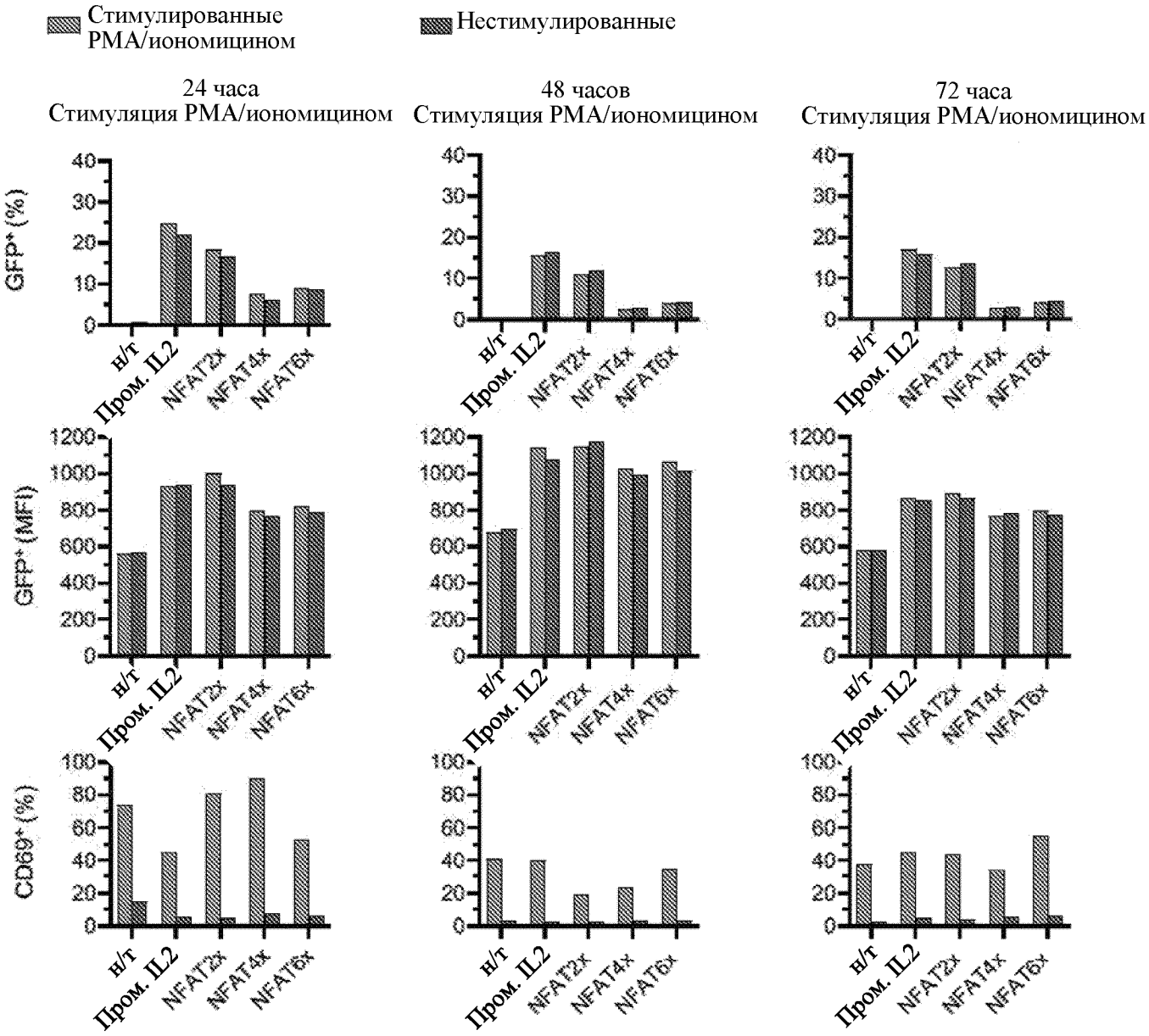

Пром. IL2
Промотор CMV
5'-LTR (укороч.)
Промотор IL2
EGFP
5714 п.о.
NFAT2x
Промотор CMV
5'-LTR (укороч.)
Мин. промотор IL2
EGFP
5619 п.о.
NFAT4x
Промотор CMV
5'-LTR (укороч.)
Мин. промотор IL2
EGFP
5691 п.о.
NFAT6x
Промотор CMV
5'-LTR (укороч.)
Мин. промотор IL2
EGFP
5763 п.о.
Сайты связывания NFAT

ФИГУРА 22B

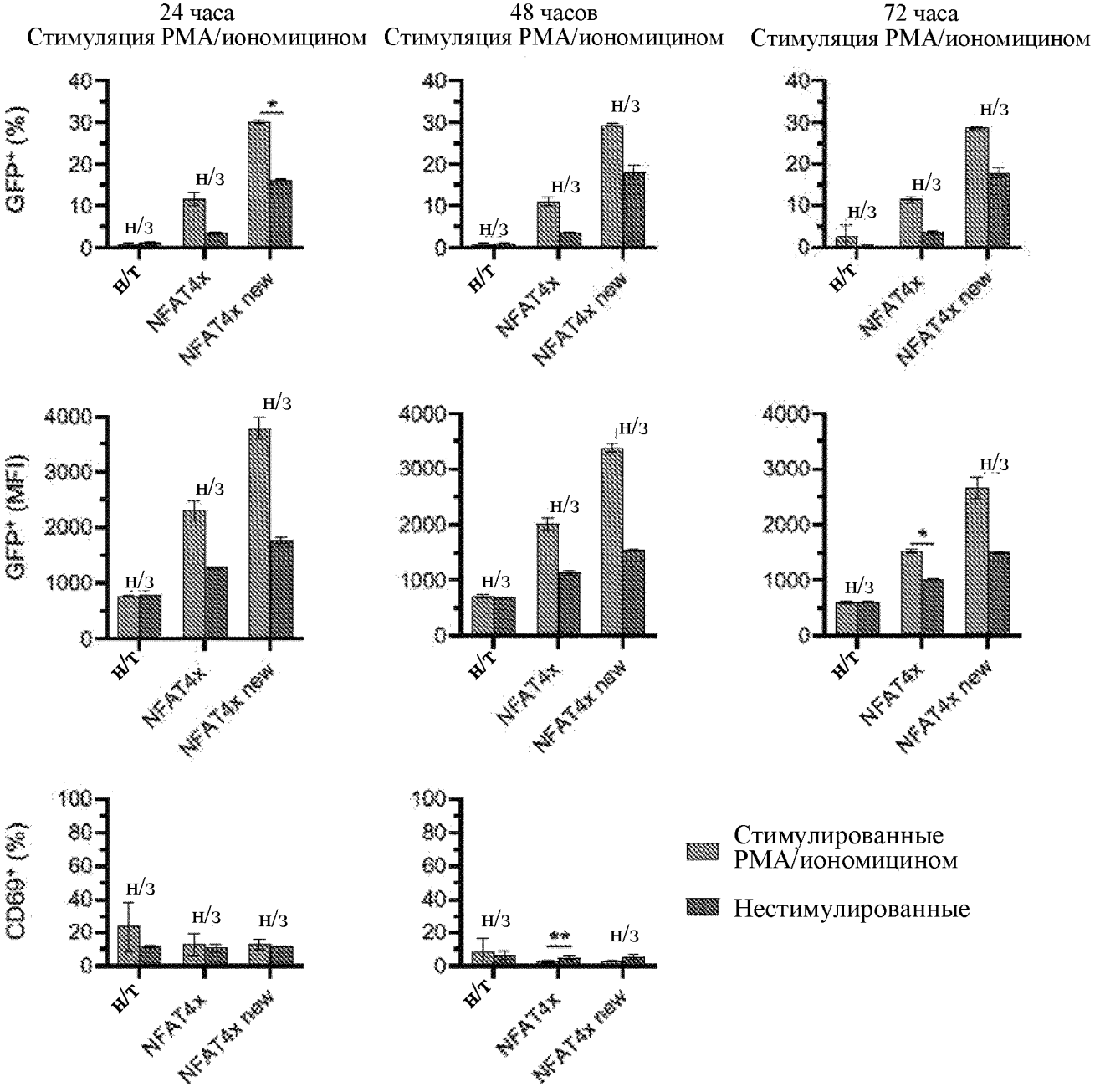
Клетки HEK293T



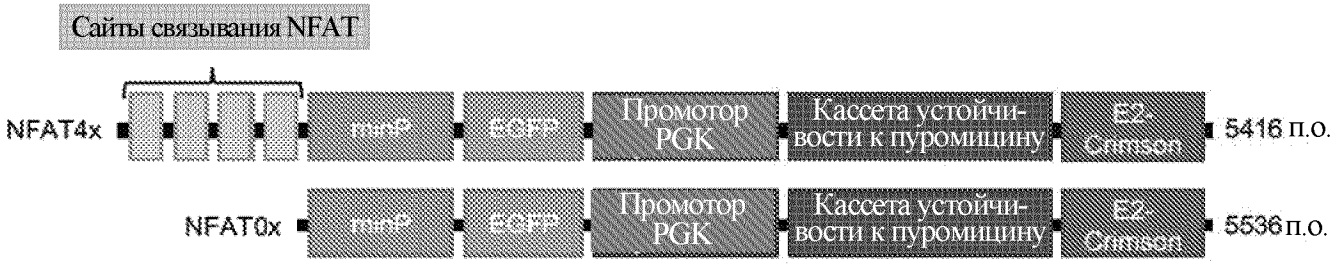
ФИГУРА 22С


Стимулированные PMA/иономицином
Нестимулированные
24 часа
Стимуляция PMA/иономицином
48 часов
Стимуляция PMA/иономицином
72 часа
Стимуляция PMA/иономицином
GFP+ (%)
GFP+ (MFI)
CD69+ (%)
н/т
Пром. IL2
NFAT2x
NFAT4x
NFAT6x

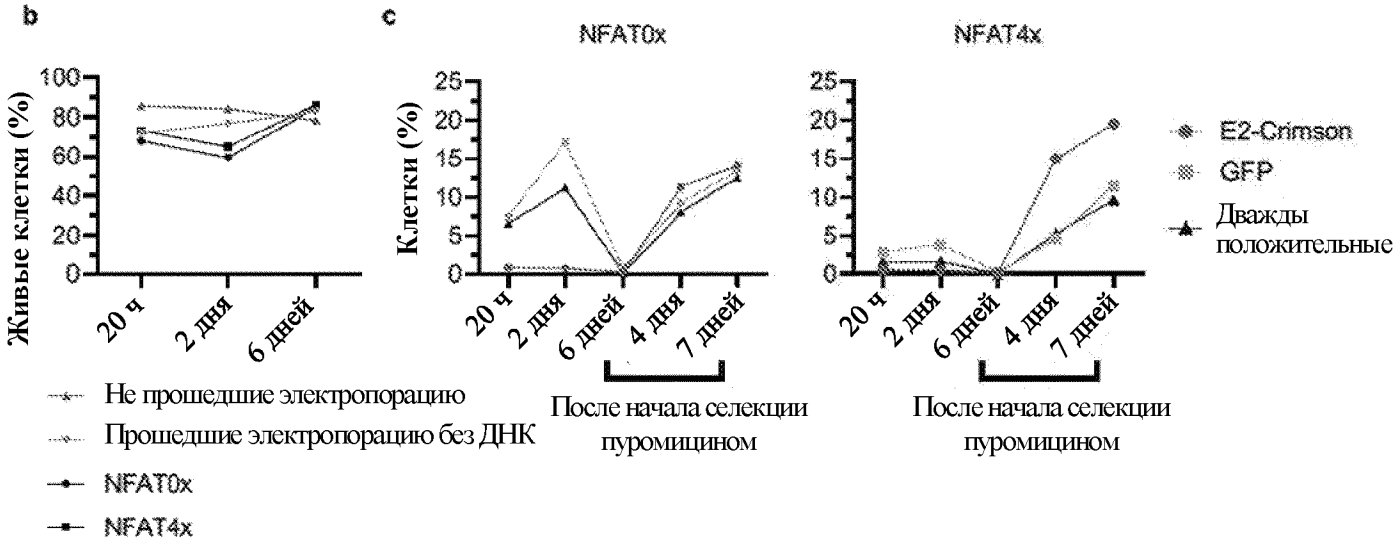
ФИГУРА 23


24 часа
Стимуляция PMA/иономицином
48 часов
Стимуляция PMA/иономицином
72 часа
Стимуляция PMA/иономицином
GFP+ (%)
GFP+ (MFI)
CD69+ (%)
н/з
н/т
NFAT4x
NFAT4x new
*
**
Стимулированные PMA/иономицином
Нестимулированные

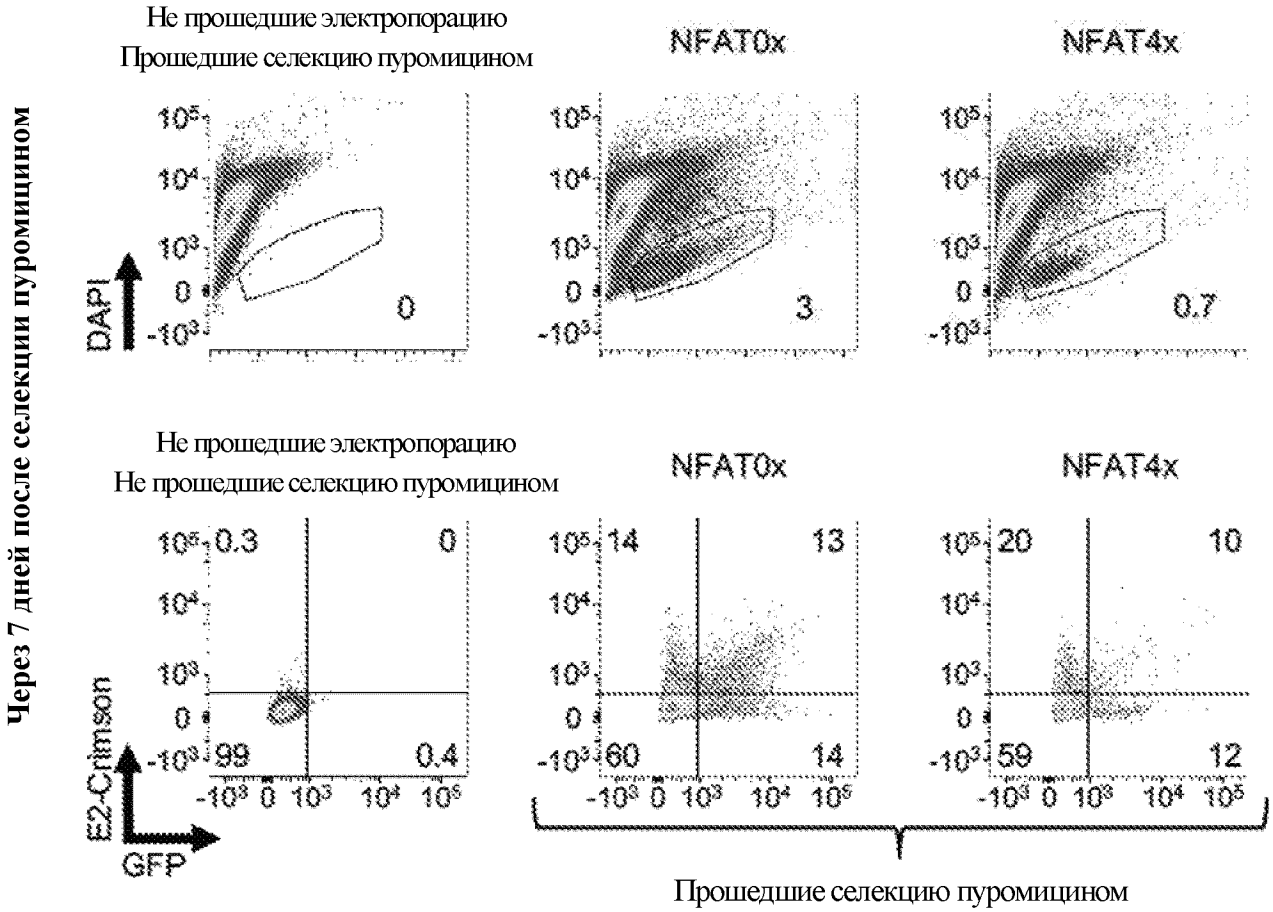
ФИГУРА 24А


Сайты связывания NFAT
NFAT4x
minP
EGFP
Промотор PGK
Кассета устойчивости к пуромицину
E2-Crimson
5416 п.о.
NFAT0x
minP
EGFP
Промотор PGK
Кассета устойчивости к пуромицину
E2-Crimson
5536 п.о.

ФИГУРА 24


b
Живые клетки (%)
100
80
60
40
20
0
20 ч
2 дня
6 дней
c
NFAT0x
NFAT4x
Клетки (%)
25
20
15
10
5
0
20 ч
2 дня
6 дней
4 дня
7 дней
После начала селекции пуромицином
E2-Crimson
GFP
Дважды положительные
Не прошедшие электропорацию
Прошедшие электропорацию без ДНК
NFAT0x
NFAT4x

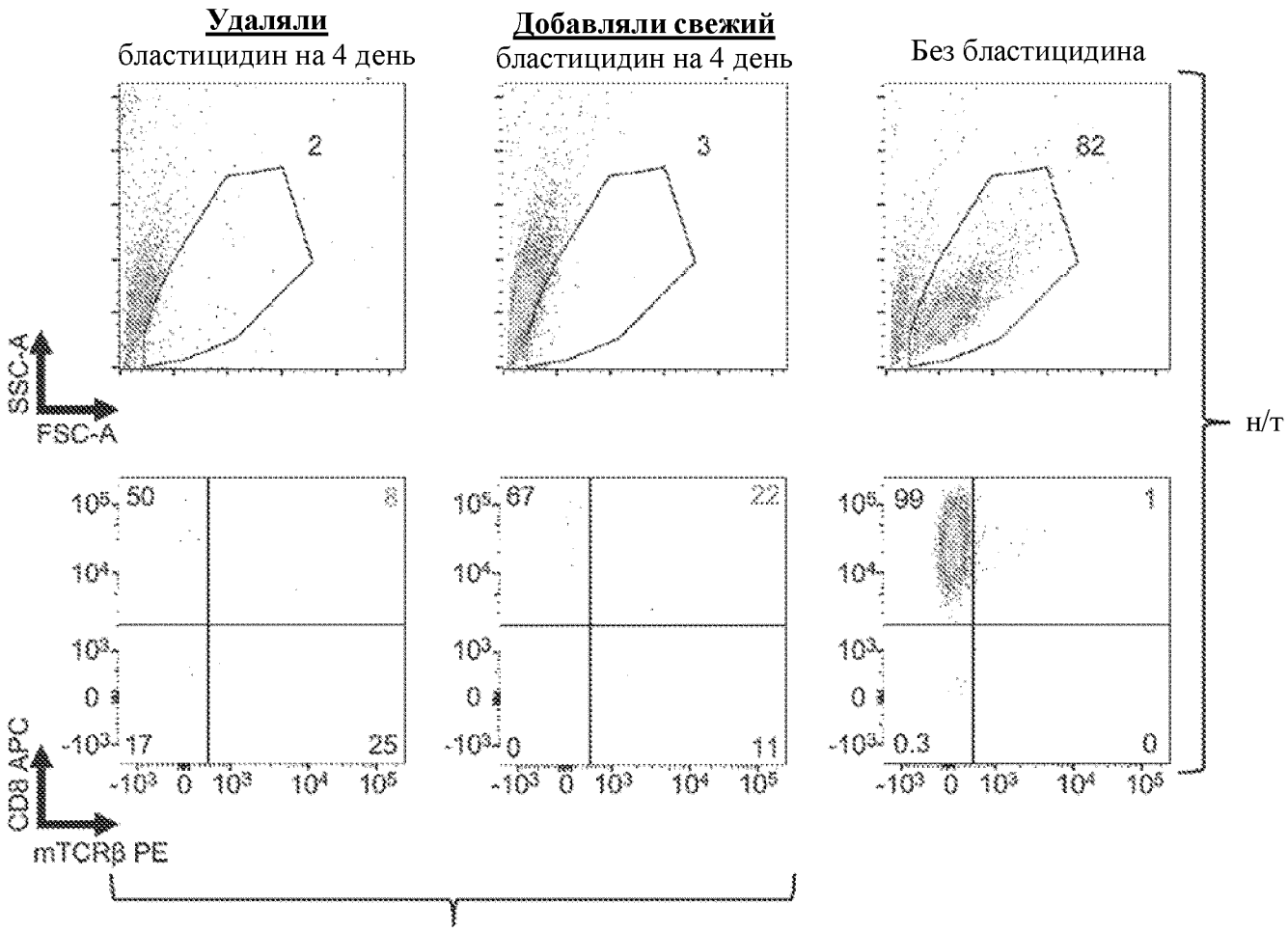
ФИГУРА 24D


Через 7 дней после селекции пуромицином
Не прошедшие электропорацию
Прошедшие селекцию пуромицином
NFAT0x
NFAT4x
DAPI
0
3
0.7
Не прошедшие электропорацию
Не прошедшие селекцию пуромицином
NFAT0x
NFAT4x
0.3
0
99
0.4
14
13
60
14
20
10
59
12
E2-Crimson
GFP
Прошедшие селекцию пуромицином

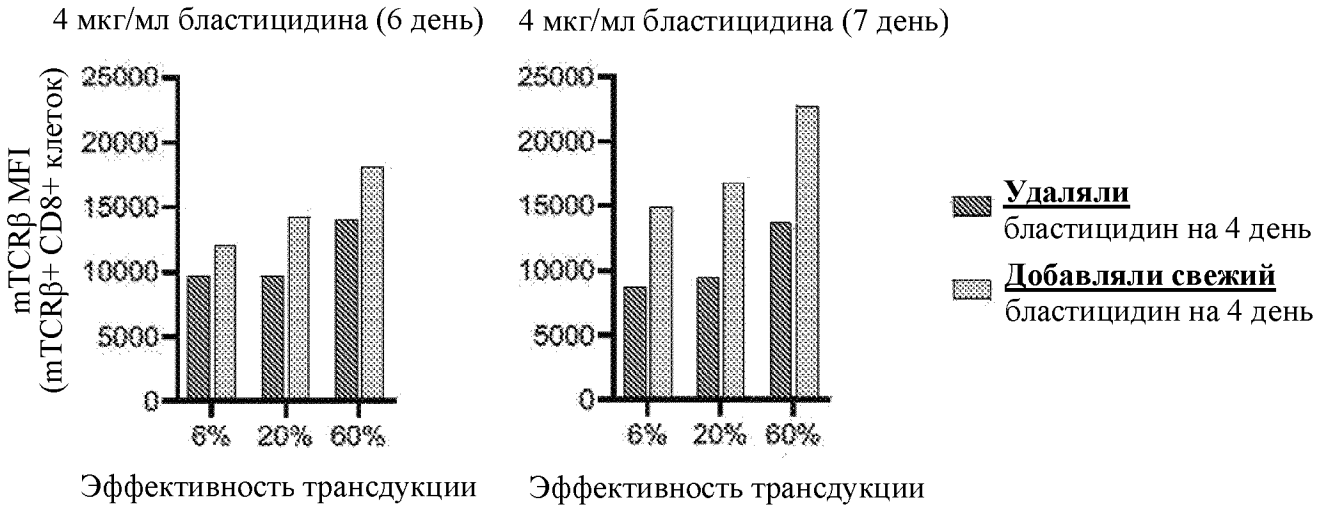
ФИГУРА 25А


Удаляли
бластицидин на 4 день
Добавляли свежий
бластицидин на 4 день
Кратность размножения (log2)
128
64
32
16
8
4
2
1
0.5
0 4 5 6
Бластицидин [мкг/мл]
н/т; все живые клетки

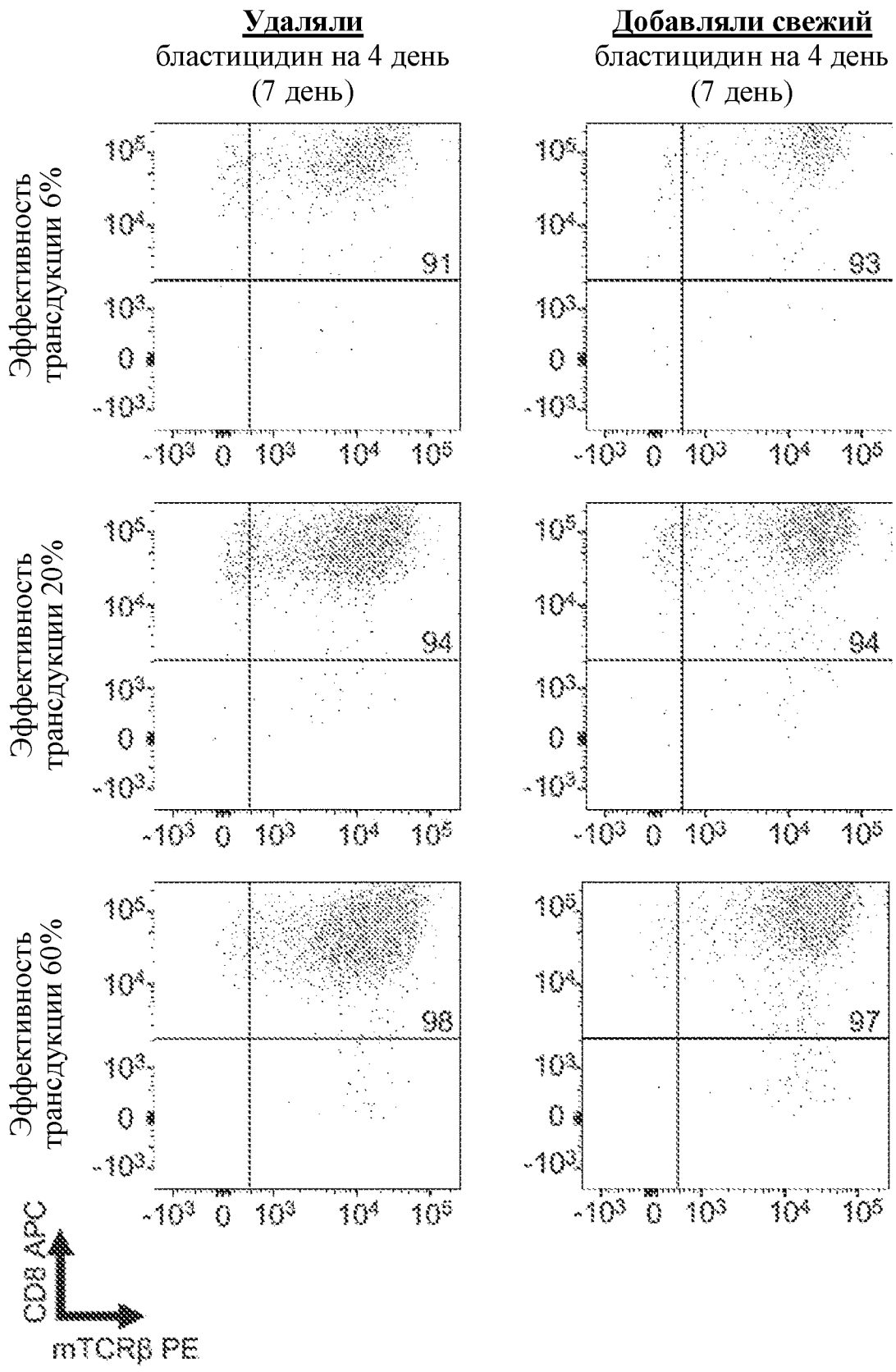
ФИГУРА 25B


Удаляли
бластицидин на 4 день
Добавляли свежий
бластицидин на 4 день
Без бластицидина
2
3
82
SSC-A
FSC-A
н/т
50
8
17
25
67
22
0
11
99
1
0.3
0
CD8 APC
mTCRβ PE
4 мкг/мл бластицидина

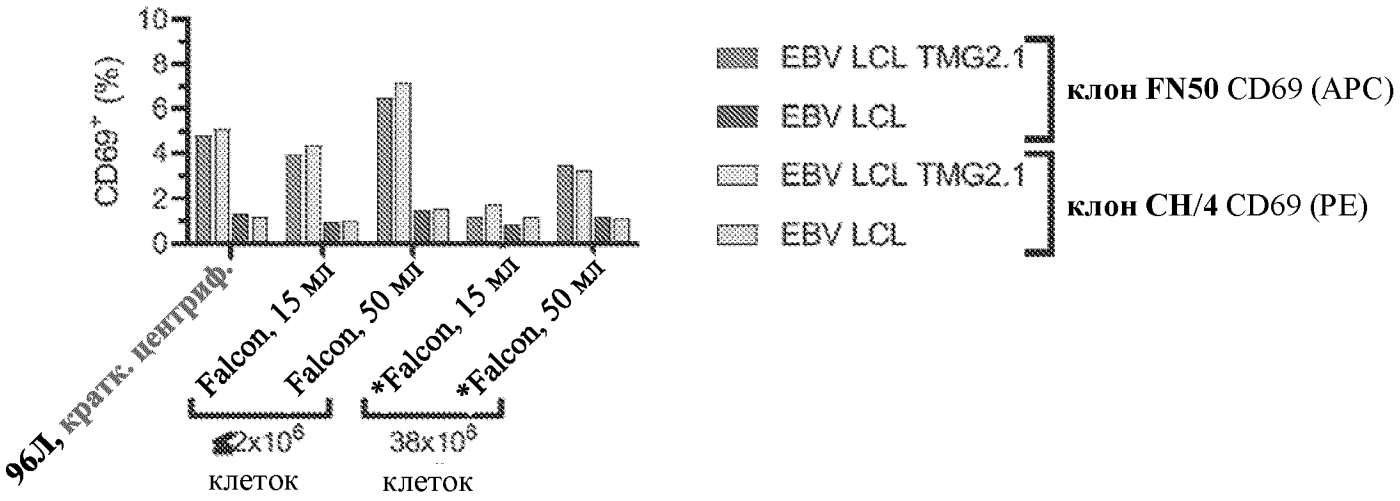
ФИГУРА 26А


4 мкг/мл бластицидина (6 день)
4 мкг/мл бластицидина (7 день)
mTCRβ MFI
(mTCRβ+ CD8+ клеток)
25000
20000
15000
10000
5000
0
6%
20%
60%
Эффективность трансдукции
Эффективность трансдукции
Удаляли
бластицидин на 4 день
Добавляли свежий
бластицидин на 4 день

ФИГУРА 26B

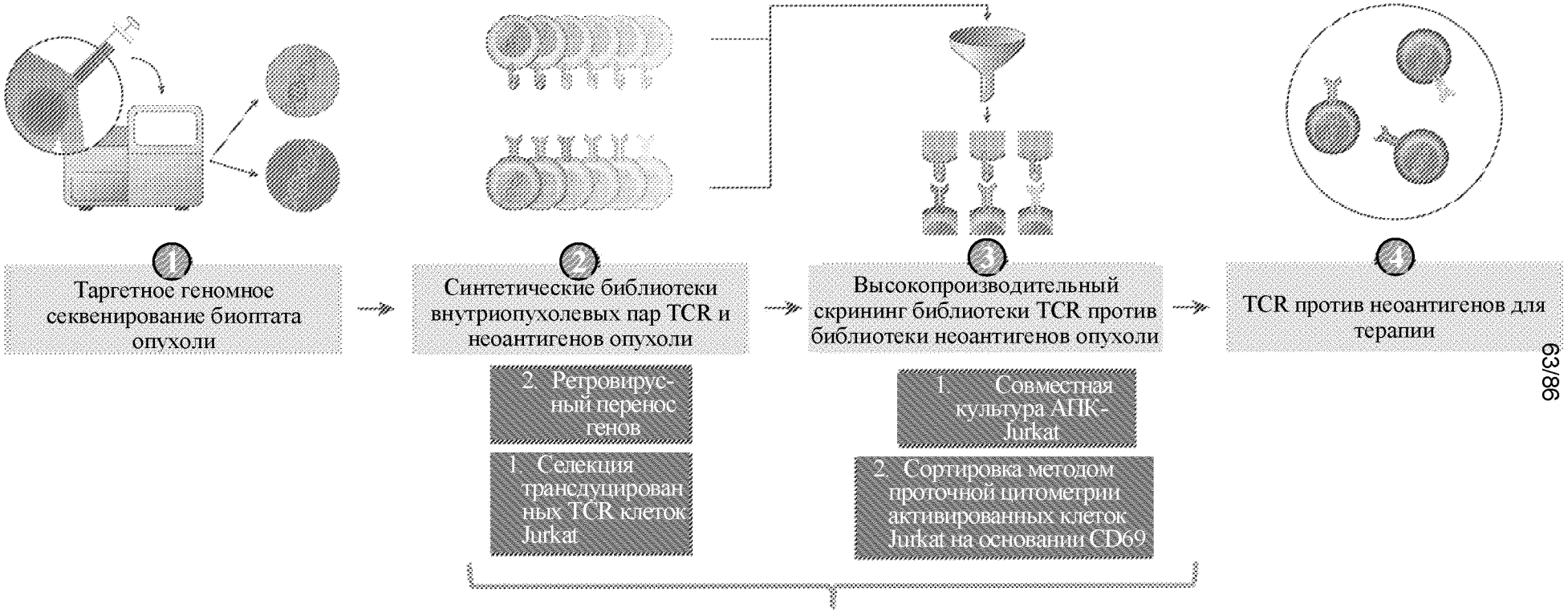

Удаляли
бластицидин на 4 день
(7 день)
Добавляли свежий
бластицидин на 4 день
(7 день)
Эффективность трансдукции 6%
Эффективность трансдукции 20%
Эффективность трансдукции 60%
91
93
94
94
98
97
CD8 APC
mTCRβ PE

ФИГУРА 27


CD69+ (%)
10
8
6
4
2
0
96Л, кратк. центриф.
Falcon, 15 мл
Falcon, 50 мл
*Falcon, 15 мл
*Falcon, 50 мл
2x10^6
клеток
38x10^6
клеток
EBV LCL TMG2.1
EBV LCL
EBV LCL TMG2.1
EBV LCL
клон FN50 CD69 (APC)
клон CH/4 CD69 (PE)

ФИГУРА 28

Платформа для выделения специфических к неоантигену TCR



Утрата клеток → каждый уникальный TCR должен быть представлен множество раз, чтобы сохранить **покрытие TCR**

Позволить скрининг **с высокой чувствительностью ≥10000 TCR**

ФИГУРА 29

Цель исследования

Увеличение масштабируемости платформы для выделения TCR, позволяя более эффективную обработку большого количества клеток, при этом все еще сохранив покрытие TCR

Полезны исследования по оптимизации с известными TCR

Рестриктированные по HLA-A*02:01

Экспрессирующие HLA-A*02:01 АПК

EBVLCL	Линия клеток JY	EBVLCL
Экспрессировать интересующий пептид путем:	Нагрузки пептидом	Трансдукции TMG2.1

1. клон 8 TCR CDK4
2. клон 17 TCR CDK4

Мутированный пептид CDK4

3. клон 1 TCR CMV
4. клон 2 TCR CMV

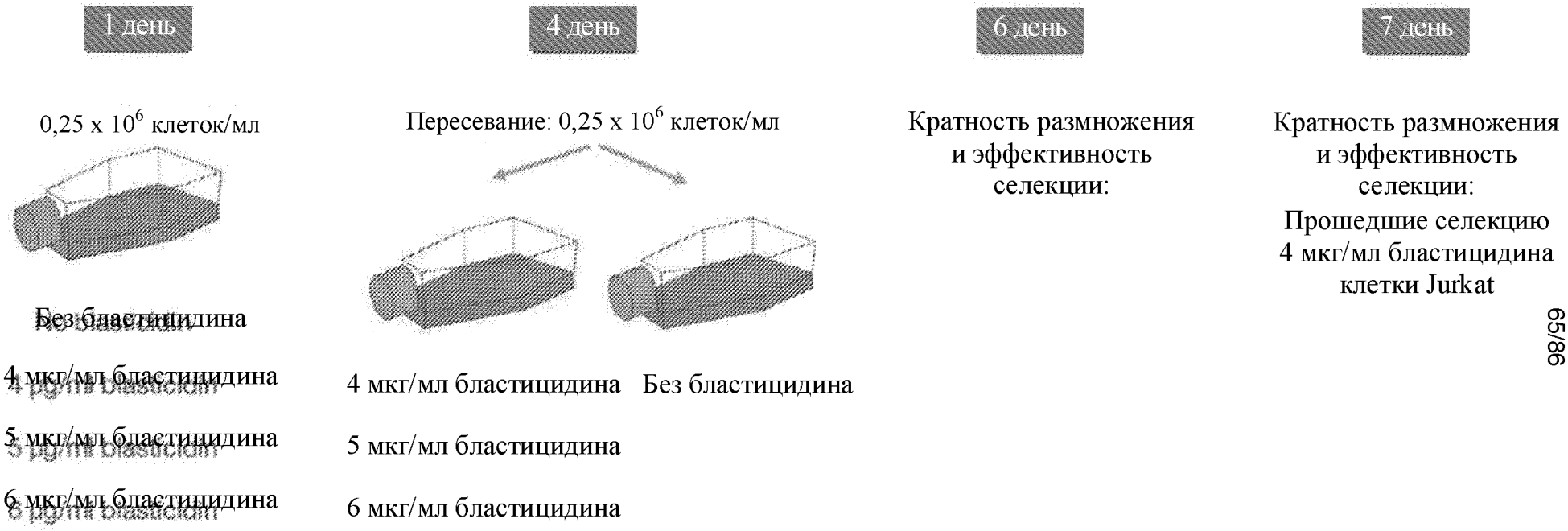
Пептид CMVpp65

Потенциально различные аффинности

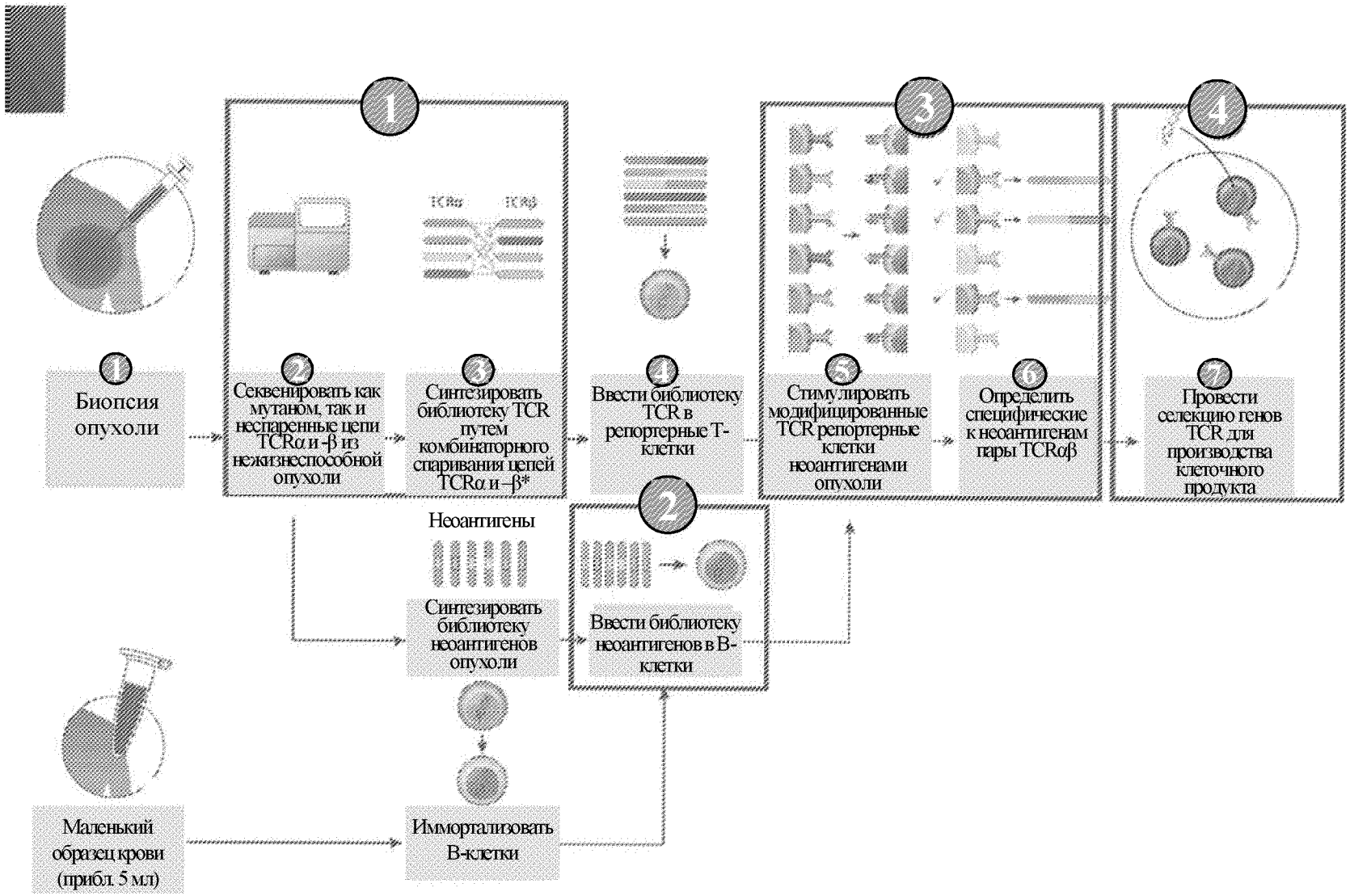
→ Оценить роль аффинности TCR к распознаваемому пептиду в процессе скрининга

ФИГУРА 30

Приводит ли селекция бластицидином к эффективному и минимально токсичному обогащению трансдуцированными TCR клетками Jurkat?



ФИГУРА 31



*Например, комбинаторное образование пар 100 цепей TCRα и –β позволяет получить размер библиотеки TCR, составляющий 10000 вариантов TCR

ФИГУРА 32

SEQ ID NO: 1: последовательность аминокислот гена TCR, экспрессированного в виде кассеты экспрессии TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к пуромицину

MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILG
QGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSLYPY
DGRSSYEQYFGPGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHV
ELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHG
LSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVL
VSGLVLMAMVKKKNSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMTSIRAVFIFLWLQLDLVNGE
NVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKGPQLIIDIRSNVGEKKDQRI
AVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAAYNQGGKLIFGQGTELSVKPDIQNPEPAVYQ
LKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTS
FTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLL
MTLRLWSSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFAD
YPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVWVADDGAAVAVWTTPESVEAGAV
FAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKEPAWFLATVGVSPDHQGKGLGSAVVL
PGVEAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYERLGFTVTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA

SEQ ID NO: 4: последовательность аминокислот гена TCR, экспрессированного в виде кассеты экспрессии TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к бластицидину

MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTCSQNMNHEYMSWYRQD
PGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKVSRKEKRNFPLILESPSPNQTSLYFCASRASGR
EQFFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWW
VNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDK
WPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSGLVL
MAMVKKKNSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQDQQV
KQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVF
LNKSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAAFLQSNDMRFGAGTRLTVKPDIQNPEPAVYQLK
DPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFT
CQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMT
LRLWSSGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMKTFNISQQDLELVEVATEKITMLYEDNKHHV
GAAIRTKTGEIISAVHIEAYIGRVTVCAEAIAIGSAVSNGQKDFDTIVAVRHPYSDEVDRSI
RVVSPCGMCRELISDYAPDCFVLIEMNGKLVKTTIEELIPLKYTRN

ФИГУРА 33

]SEQ ID NO: 2: последовательность аминокислот трансгена CD8α-P2A-CD8β.

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQ
PRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSAL
SNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYVGSG
ATNFSLLKQAGDVEENPGPMRPRLWLLLAAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVM
LSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASR
FILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLPR
PETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQFYK

ФИГУРА 34

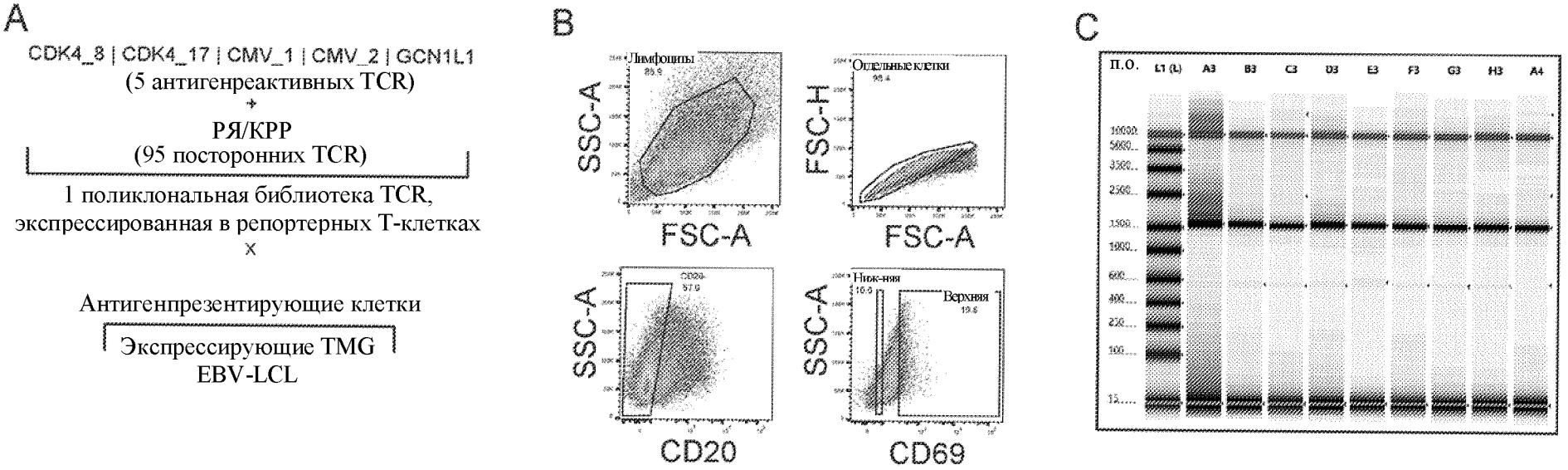
SEQ ID NO 3: пример последовательности нуклеотидов K562-HLA-A*02:01-IRES-FusionRed

ATGGCTGTTATGGCCCCTAGAACACTGGTGCTGCTGCTGTCTGGTGCCCTGGCTCTG
ACACAAACATGGGCCGGCAGCCACAGCATGCGGTACTTTTTCACCAGCGTGTCCAG
ACCTGGCAGAGGCGAGCCTAGATTCATTGCCGTGGGCTACGTGGACGACACCCAGT
TCGTCAGATTCGATTCCGATGCCGCCAGCCAGCGGATGGAACCTAGAGCACCTTGG
ATCGAGCAAGAGGGCCCCGAGTATTGGGACGGCGAGACAAGAAAAGTGAAGGCCC
ACAGCCAGACACACAGAGTGGATCTGGGAACCCTGCGGGGCTACTACAATCAGTCT
GAGGCCGGCTCTCACACCGTGCAGAGGATGTATGGCTGTGACGTGGGCAGCGATTG
GCGGTTCCTGAGAGGCTATCACCAGTACGCCTACGACGGCAAGGACTATATCGCCCT
GAAAGAGGACCTGCGGTCTTGGACAGCCGCCGATATGGCTGCCCAGACCACAAAGC
ACAAGTGGGAAGCCGCTCACGTGGCCGAACAGCTGAGAGCTTATCTGGAAGGCACC
TGTGTGGAATGGCTGCGGAGATACCTGGAAAACGGCAAAGAGACACTGCAGCGGAC
AGACGCCCCTAAGACACACATGACACACCACGCCGTGTCCGACCACGAAGCCACAC
TTAGATGTTGGGCCCTGAGCTTCTACCCCGCCGAGATCACACTGACATGGCAGAGAG
ATGGCGAGGATCAGACCCAGGATACCGAGCTGGTGGAAACAAGACCTGCCGGCGAC
GGCACCTTCCAGAAATGGGCTGCTGTGGTGGTGCCTAGCGGCCAAGAGCAGAGATA
CACCTGTCACGTGCAGCACGAGGGCCTGCCTAAGCCTCTTACACTGAGATGGGAGC
CCAGCAGCCAGCCTACAATCCCCATCGTGGGAATCATTGCCGGCCTGGTGCTGTTTG
GCGCCGTGATTACAGGTGCAGTGGTGGCCGCTGTTATGTGGCGGAGAAAGAGCAGC
GACAGAAAAGGCGGCAGCTACTCTCAGGCCGCCAGCTCTGATTCTGCCCAGGGCTC
TGATGTGTCTCTGACCGCCTGCAAAGTCTGAGCGGCCGCTACGTAAATTCCGCCCCC
CCCCCTCCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTG
CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCG
GAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAA
AGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTG
AAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCG
ACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCA
CAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCC
TCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGG
ATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAA
ACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATA
ATATGGCCACAACCATGGTGTCCGAGCTGATCAAAGAAAACATGCCCATGAAGCTG
TACATGGAAGGGACCGTGAACAACCACCACTTCAAGTGCACCAGCGAAGGCGAGGG
CAAGCCTTATGAGGGCACCCAGACCATGCGGATCAAGGTGGTGGAAGGTGGCCCTC
TGCCTTTCGCCTTTGATATCCTGGCCACCAGCTTTATGTACGGCAGCCGGACCTTCAT
CAAGCACCCTCCAGGCATCCCCGATTTCTTCAAGCAGAGCTTTCCCGAGGGCTTCAC
CTGGGAGAGAGTGACCACATACGAGGATGGCGGCGTGCTGACAGCCACACAGGATA
CAAGTCTGCAGGACGGCTGCCTGATCTACAACGTGAAAGTGCGGGGCGTGAACTTC
CCCGCCAATGGACCTGTGATGCAGAAGAAAACCCTCGGCTGGGAAGCCAGCACCGA
GACAATGTATCCTGCCGACGGTGGACTGGAAGGGGCCTGTGATATGGCCCTGAAGC

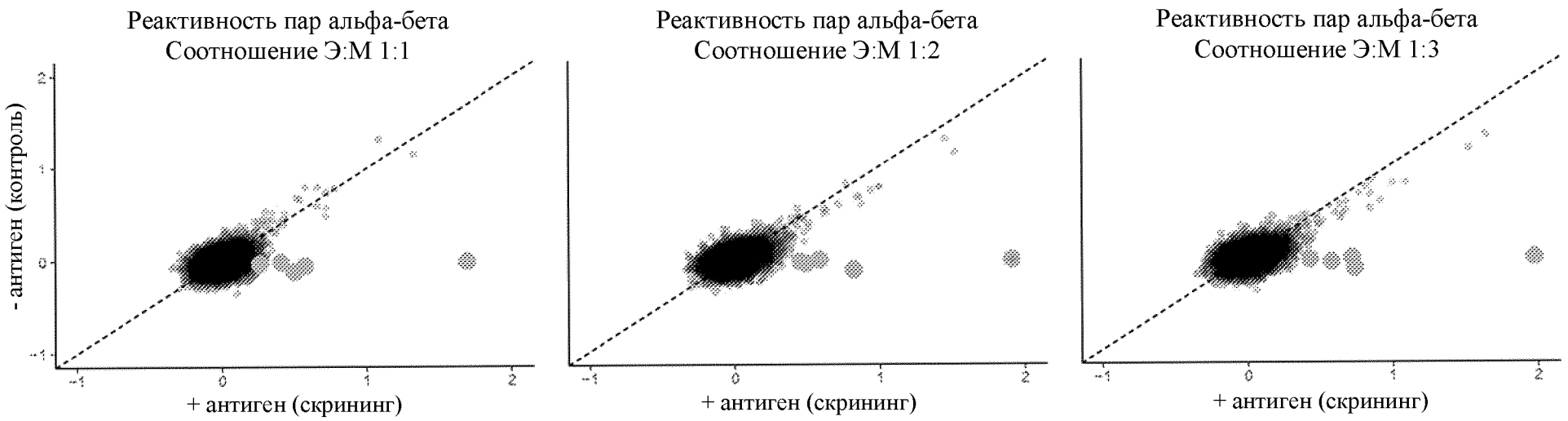
ФИГУРА 34 (продолжение)

TTGTTGGCGGCGGACACCTGATCTGCAACCTGGAAACCACCTACAGAAGCAAGAAG
CCCGCCACCAACCTGAAGATGCCCGGCGTGTACAACGTGGACCACCGGCTGGAAAG
GATCAAAGAGGCCGACGACGAGACATACGTGGAACAGCACGAAGTGGCCGTGGCC
AGATACTCTACAGGCGGAGCTGGCGACGGCGGCAAATGA

ФИГУРА 35


A
CDK4_8 | CDK4_17 | CMV_1 | CMV_2 | GCN1L1
(5 антигенреактивных TCR)
+
РЯ/КРР
(95 посторонних TCR)
1 поликлональная библиотека TCR,
экспрессированная в репортерных Т-клетках
x
Антигенпрезентирующие клетки
Экспрессирующие TMG
EBV-LCL
B
Лимфоциты
SSC-A
FSC-A
Отдельные клетки
FSC-H
FSC-A
CD20
SSC-A
CD20
Нижняя
Верхняя
SSC-A
CD69
C
П.О.
L1 (L)
A3
B3
C3
D3
E3
F3
G3
H3
A4
10000
5000
3500
2500
1500
1000
600
400
250
100
15

ФИГУРА 35D


Реактивность пар альфа-бета
Соотношение Э:М 1:1
- антиген (контроль)
+ антиген (скрининг)
Реактивность пар альфа-бета
Соотношение Э:М 1:2
+ антиген (скрининг)
Реактивность пар альфа-бета
Соотношение Э:М 1:3
+ антиген (скрининг)

ФИГУРА 35E

Э:М 1:1

Ранг	Пары альфа-бета	P-значение
1	CDK4_17_TCRальфа.CDK4_17_TCR бета	1.24e-40
2	CDK4_8_TCRальфа.CDK4_8_TCR бета	6.26e-08
3	CMV_2_TCRальфа.CMV_2_TCR бета	2.04e-03
25	CMV_1_TCRальфа.CMV_1_TCR бета	2.45e-02
159	GCN1L1_TCRальфа.GCN1L1_TCR бета	8.74e-02

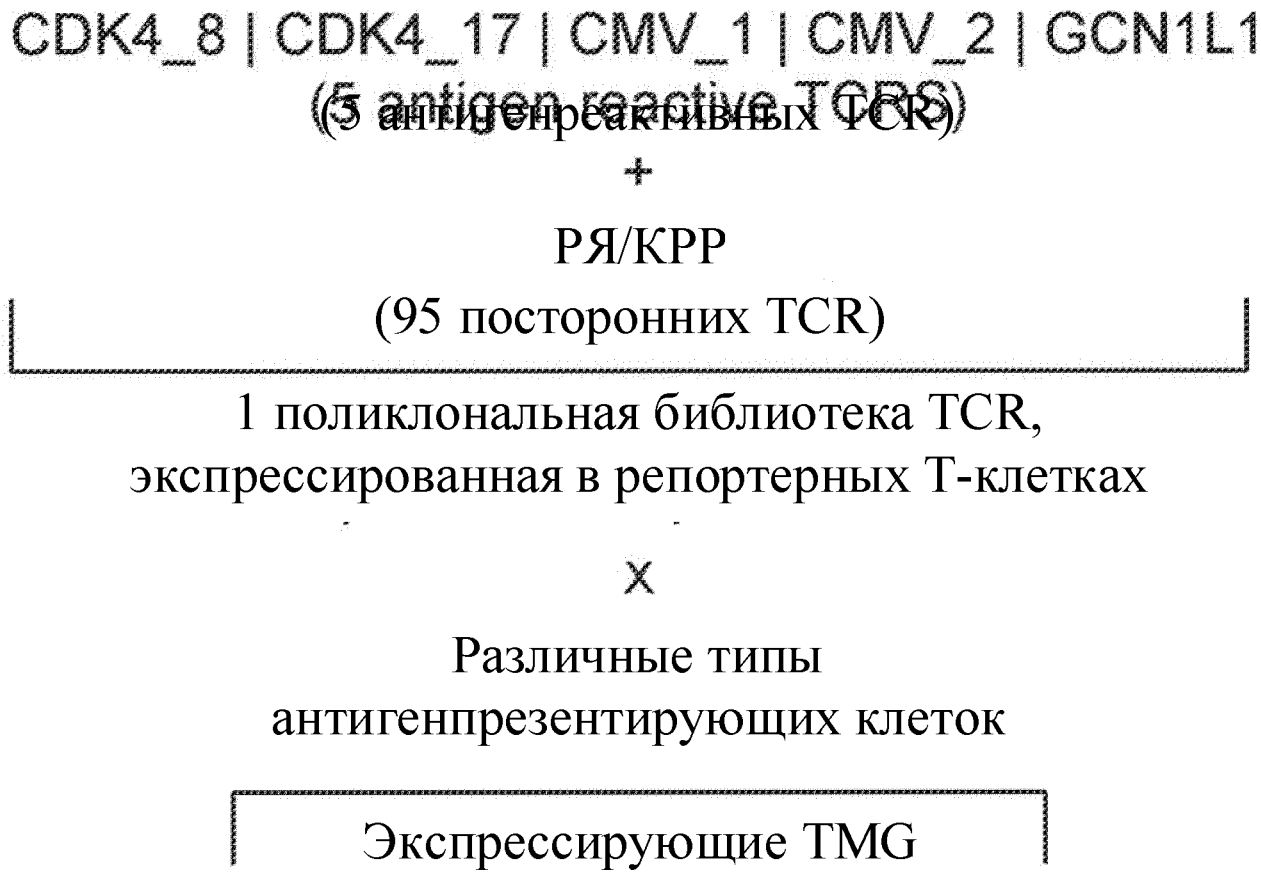
Э:М 1:2

Ранг	Пары альфа-бета	P-значение
1	CDK4_17_TCRальфа.CDK4_17_TCR бета	2.04e-10
2	CDK4_8_TCRальфа.CDK4_8_TCR бета	1.55e-06
3	CMV_2_TCRальфа.CMV_2_TCR бета	2.53e-05
5	CMV_1_TCRальфа.CMV_1_TCR бета	4.35e-04
108	GCN1L1_TCRальфа.GCN1L1_TCR бета	3.52e-02

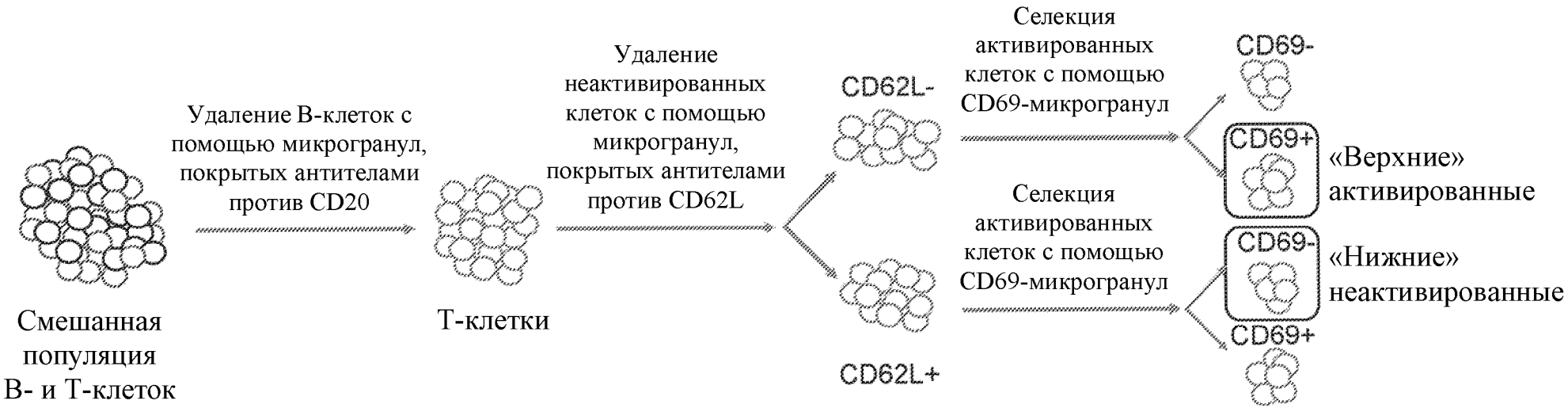
Э:М 1:3

Ранг	Пары альфа-бета	P-значение
1	CDK4_7_TCRальфа.CDK4_17_TCR бета	1.23e-12
2	CMV_2_TCRальфа.CMV_2_TCR бета	2.30e-07
3	CDK4_8_TCRальфа.CDK4_8_TCR бета	2.70e-06
9	CMV_1_TCRальфа.CMV_1_TCR бета	1.62e-03
71	GCN1L1_TCRальфа.GCN1L1_TCR бета	2.49e-02

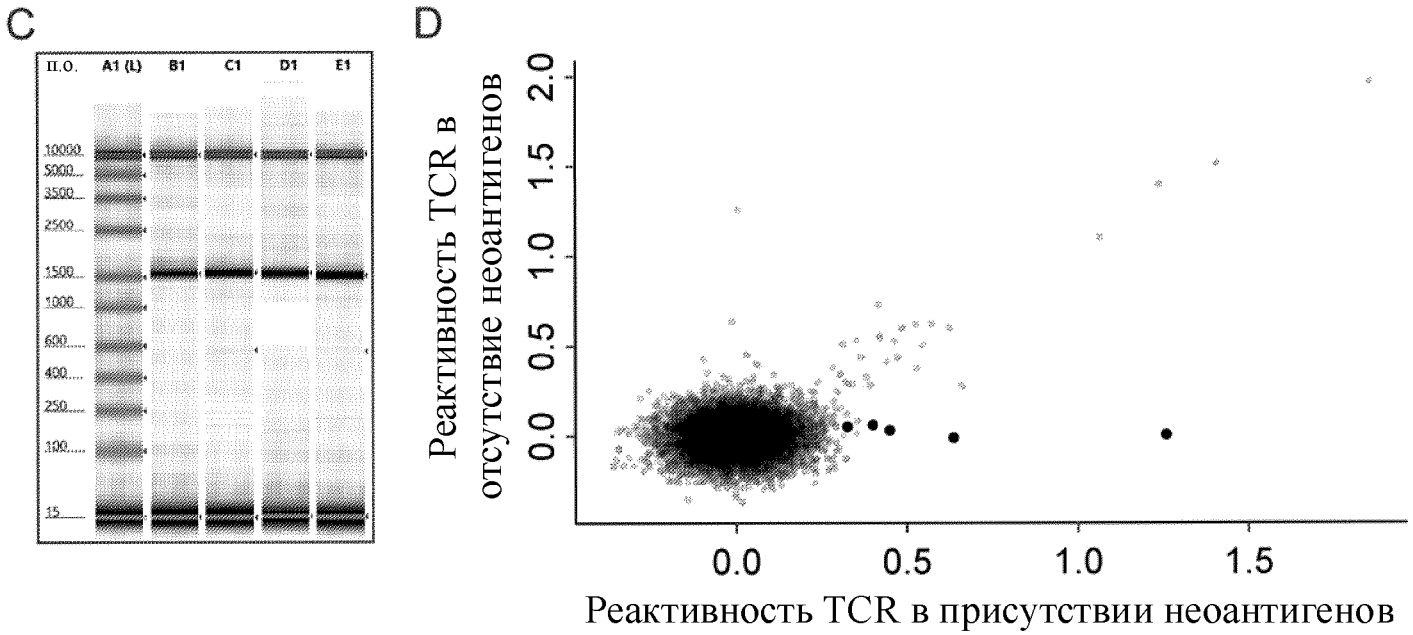
ФИГУРА 36А


CDK4_8 | CDK4_17 | CMV_1 | CMV_2 | GCN1L1
(5 antigen reactive TCRS)
(5 антигенреактивных TCR)
+
РЯ/КРР
(95 посторонних TCR)
1 поликлональная библиотека TCR,
экспрессированная в репортерных Т-клетках
X
Различные типы
антигенпрезентирующих клеток
Экспрессирующие TMG
EBV-LCL

ФИГУРА 36B


Смешанная популяция B- и T-клеток
Удаление B-клеток с помощью микрогранул, покрытых антителами против CD20
T-клетки
Удаление неактивированных клеток с помощью микрогранул, покрытых антителами против CD62L
CD62L-
CD62L+
Селекция активированных клеток с помощью CD69-микрогранул
Селекция активированных клеток с помощью CD69-микрогранул
CD69-
CD69+
CD69-
CD69+
«Верхние» активированные
«Нижние» неактивированные

ФИГУРА 36


C
п.о.
A1 (L)
B1
C1
D1
E1
10000
5000
3500
2500
1500
1000
600
400
250
100
15
D
Реактивность TCR в отсутствие неоантигенов
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0.0
0.5
1.0
1.5
Реактивность TCR в присутствии неоантигенов

ФИГУРА 36E

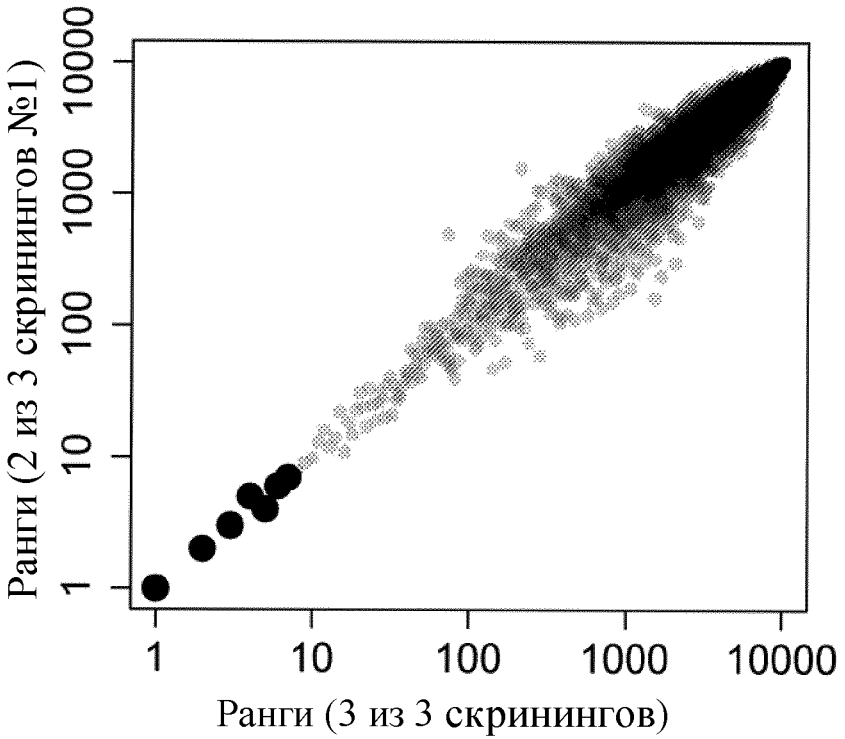
Ранг	Альфа	Бета	Базовое среднее	log2-КИ	Скорр. p-знач.
1	CDK4_17	CDK4_17	221	1.54	1.37E-18
2	GCN1L1	GCN1L1	99	1.15	4.09E-03
3	CMV_1	CMV_1	113	0.73	1.00E+00
4	OVC21.1	OVC48.1	268	0.55	1.00E+00
5	CRC11.1	OVC48.1	406	0.44	1.00E+00
6	CMV_2	CMV_2	186	0.49	1.00E+00
7	CDK4_8	CDK4_8	64	0.80	1.00E+00

ФИГУРА 37

A

	Пул C1	Пул C2	Пул C3	Пул C4	Пул C5	Пул C6
Пул R1	TMG1	TMG7	TMG13	TMG19	TMG25	TMG31
Пул R2	TMG2	TMG8	TMG14	TMG20	TMG26	TMG32
Пул R3	TMG3	TMG9	TMG15	TMG21	TMG27	TMG33
Пул R4	TMG4	TMG10	TMG16	TMG22	TMG28	TMG34
Пул R5	TMG5	TMG11	TMG17	TMG23	TMG29	TMG35
Пул R6	TMG6	TMG12	TMG18	TMG24	TMG30	TMG36

B



ФИГУРА 37C

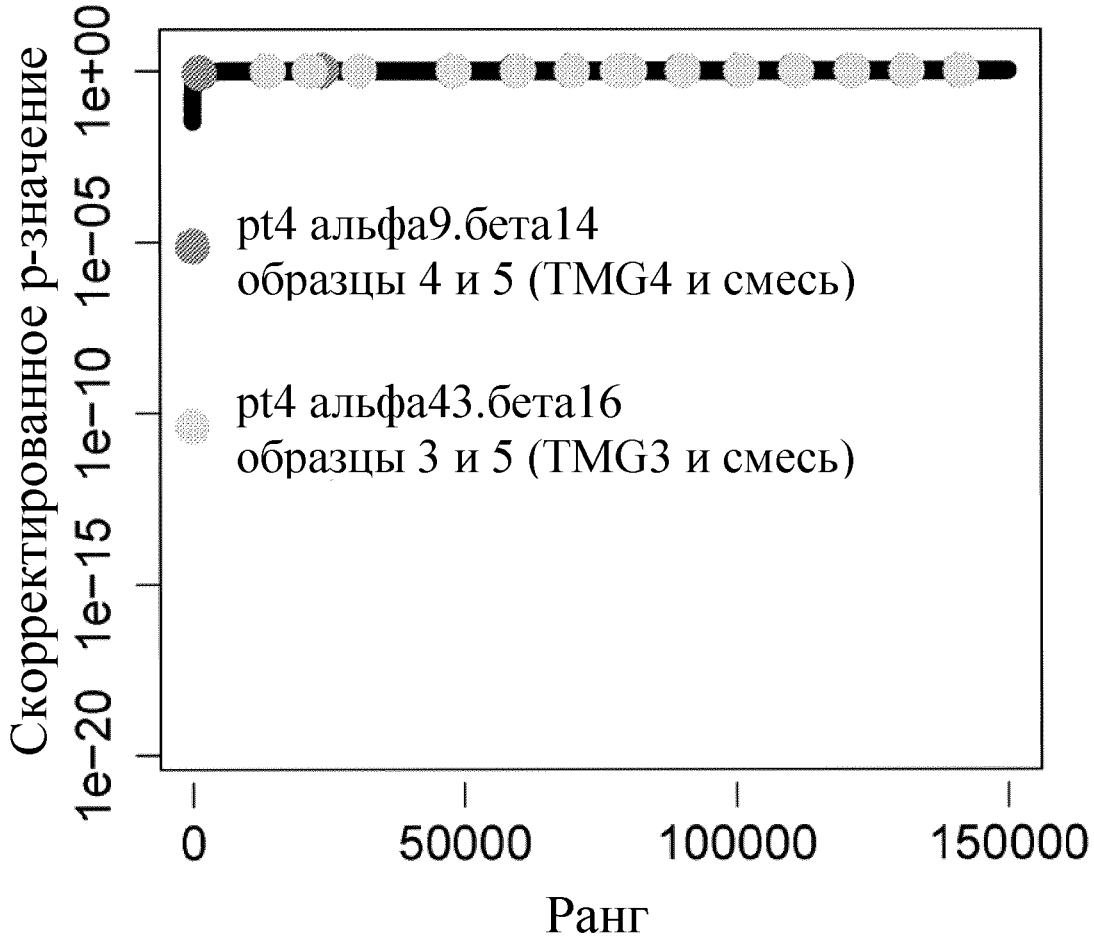
Образец	TCR	3 скрининга	2 скрининга №1	2 скрининга №2	2 скрининга №3	Ранги
pt1	TCR7альфа.TCR58бета	2.1E-11	9.0E-15	4.0E-08	2.8E-12	✓
pt2	TCR24альфа.TCR62бета	8.8E-106	3.4E-133	6.9E-120	7.3E-117	✓
pt2	TCR76альфа.TCR20бета	1.4E-87	5.6E-93	1.5E-91	7.4E-114	✓
pt2	TCR24альфа.TCR43бета	9.7E-72	9.3E-76	4.6E-56	2.3E-66	✓
pt2	TCR63альфа.TCR17бета	1.1E-51	2.7E-56	8.9E-49	1.2E-68	✓
pt2	TCR61альфа.TCR97бета	4.9E-51	2.5E-56	5.1E-60	2.9E-49	✓
pt2	TCR83альфа.TCR29бета	3.8E-40	1.2E-38	1.3E-35	5.5E-39	✓
pt2	TCR86альфа.TCR35бета	5.5E-39	8.3E-36	3.7E-41	4.0E-33	✓
pt3	TCR55альфа.TCR24бета	1.5E-21	5.2E-30	1.5E-29	4.3E-21	✓
pt4	TCR43альфа.TCR16бета	1.8E-15	1.7E-17	5.4E-16	8.5E-11	✓
pt4	TCR9альфа.TCR14бета	1.8E-07	3.3E-06	1.3E-10	7.5E-05	✓

ФИГУРА 37

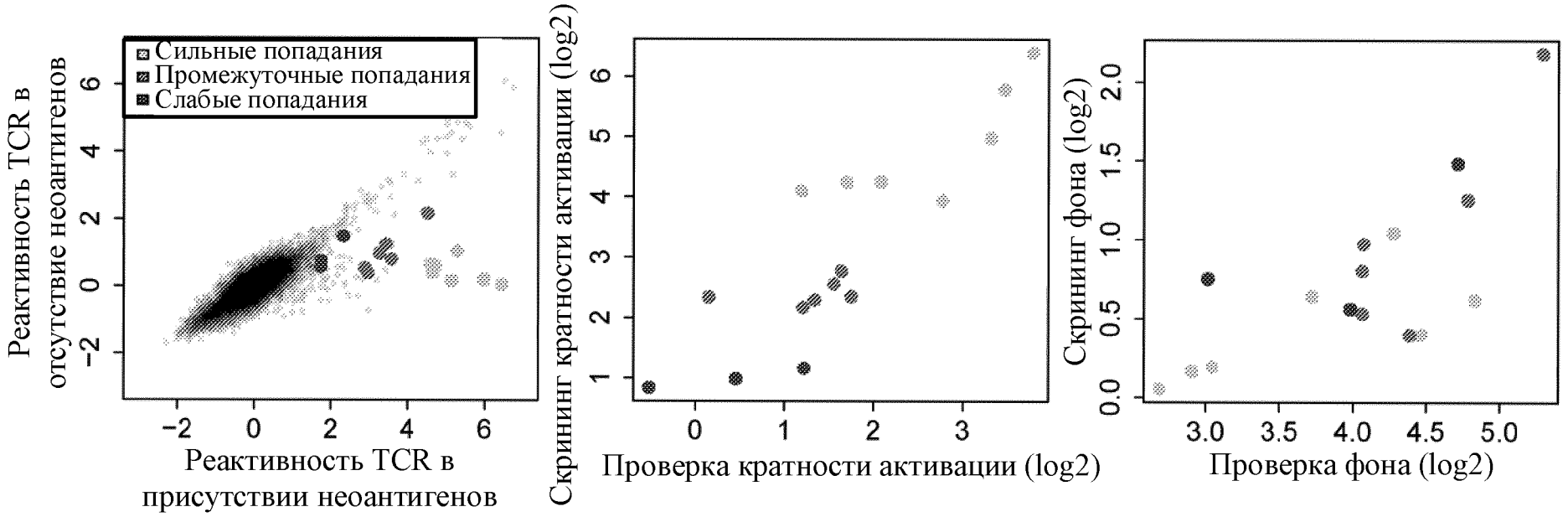
D

Образец	Антиген
1	TMG1
2	TMG2
3	TMG3
4	TMG4
5	Смесь (TMG1-4)
6	Без TMG

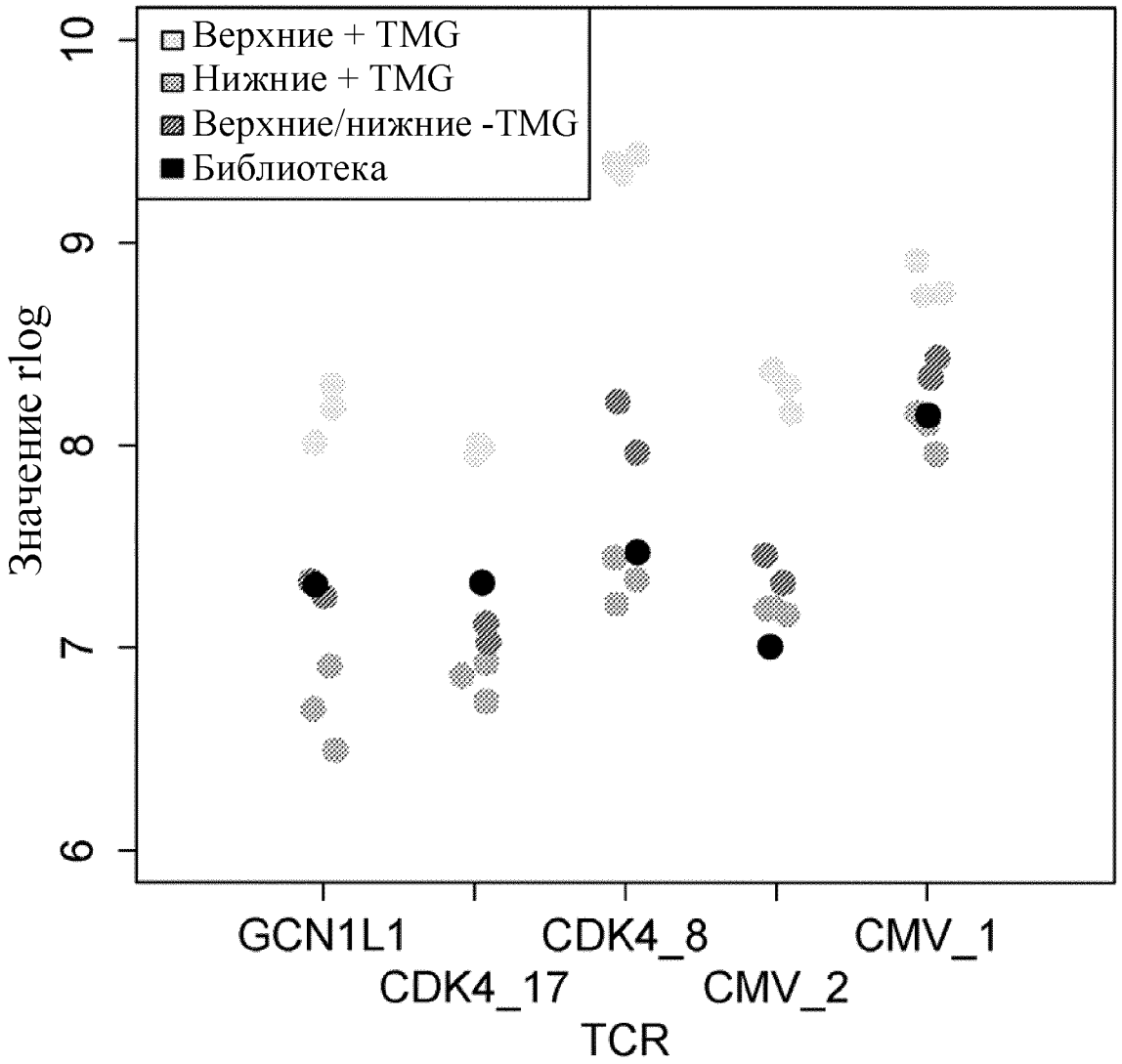
E



ФИГУРА 38А

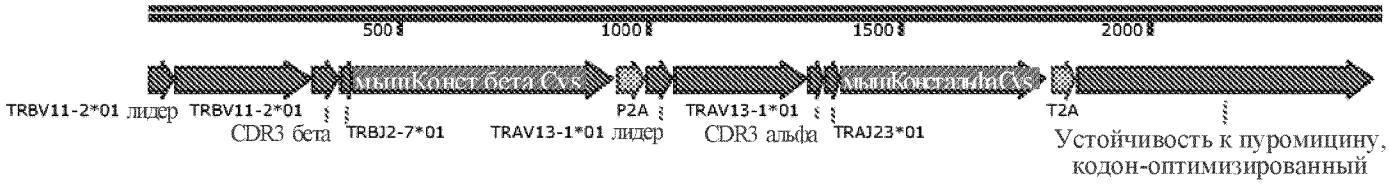

Сильные попадания
Промежуточные попадания
Слабые попадания
Реактивность TCR в отсутствие неоантигенов
Реактивность TCR в присутствии неоантигенов
Скрининг кратности активации (log2)
Проверка кратности активации (log2)
Скрининг фона (log2)
Проверка фона (log2)

ФИГУРА 39


Верхние + TMG
Нижние + TMG
Верхние/нижние -TMG
Библиотека
Значение rlog
10
9
8
7
6
GCN1L1
CDK4_17
CDK4_8
CMV_2
CMV_1
TCR

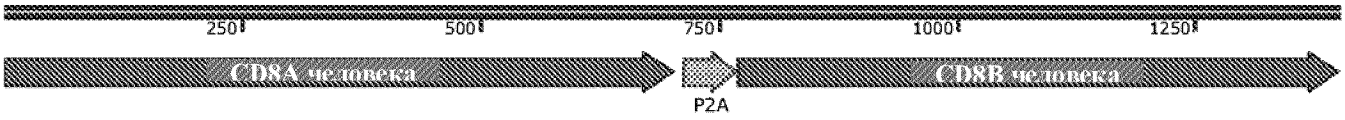
ФИГУРА 40

Диаграмма SEQ ID NO: 1 - гена TCR, экспрессированного в виде кассеты экспрессии TCRβ-P2ATCRα-T2A-устойчивость к пуромицину



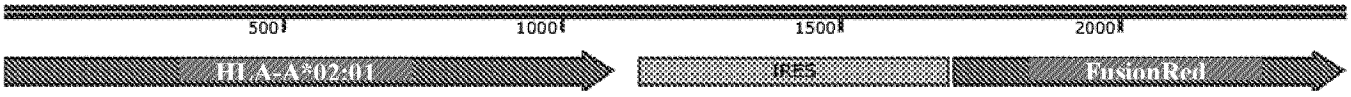
ФИГУРА 41

Диаграмма SEQ ID NO: 2 - трансген CD8α-P2A-CD8β



ФИГУРА 42

Диаграмма SEQ ID NO: 3 - K562-HLA-A*02:01-IRESFusionRed



ФИГУРА 43

Диаграмма SEQ ID NO: 4 - гена TCR, экспрессированного в виде кассеты экспрессии TCRβ-P2A-TCRα-T2A-устойчивость к бластицидину

