(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202290216 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.26

(22) Дата подачи заявки
2020.08.19

(51) Int. Cl. ***C07K 14/47*** (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(54) Т-КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ, СПЕЦИФИЧНАЯ К WT-1

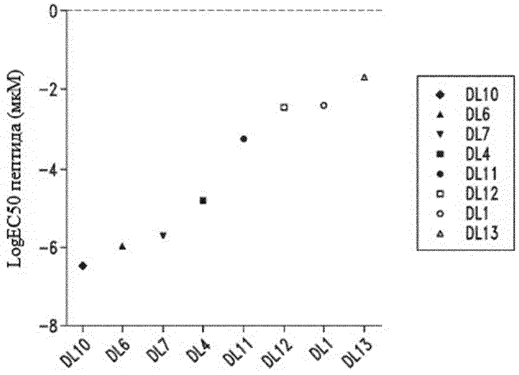
(31) **62/889,519**
(32) **2019.08.20**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/047071**
(87) **WO 2021/034976 2021.02.25**

(71) Заявитель:
ФРЕД ХАТЧИНСОН КЭНСЕР РИСЕРЧ СЕНТЕР (US)

(72) Изобретатель:
Шмитт Томас М., Шапюи Од Дж., Гринберг Филип Д. (US)

(74) Представитель:
Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В., Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)

(57) Изобретение относится к связывающим белкам, специфичным к эпитопам белка опухоли Вильмса 1 (WT-1) человека, а также клеткам-хозяевам, которые экспрессируют связывающие белки. Также предложены полинуклеотиды, кодирующие связывающий белок, и векторы, содержащие полинуклеотид. Связанные способы и применения раскрытых в настоящем документе композиций предложены для лечения заболеваний или нарушений, связанных с экспрессией WT-1, таких как различные виды рака.



202290216 A1

202290216 A1

Т-КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ, СПЕЦИФИЧНАЯ К WT-1

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и настоящим включен в описание посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий перечень последовательностей, имеет название 360056_473WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Текстовый файл имеет размер 109 КБ, был создан 17 августа 2020 г. и подается в электронном виде через EFS-Web.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Генная терапия Т-клеточными рецепторами (TCR) представляет собой новый подход к лечению, разработанный для преодоления ограничений, связанных с традиционной Т-клеточной адоптивной иммунотерапией, таких как большие временные и трудозатраты, необходимые для выделения, определения характеристик и размножения Т-клеток, специфичных к опухолевому антигену (Schmitt et al., Hum. Gene Ther. 20:1240, 2009). Еще одним препятствием является то, что большинство идентифицированных опухолевых антигенов, которые могут выступать мишенями для Т-клеточной иммунотерапии, представляют собой сверхэкспрессируемые собственные белки, поэтому высокоаффинные Т-клетки, специфичные к этим антигенам, обычно устраняются во время селекции в тимусе и мало представлены или вообще отсутствуют в периферическом репертуаре.

Были рассмотрены стратегии повышения аффинности TCR, предназначенных для применения в генной TCR-терапии (например, Udyavar et al., J. Immunol. 182:4439, 2009; Zhao et al., J. Immunol. 179:5845, 2007; Richman and Kranz, Biomol. Eng. 24:361, 2007).

Необходимым условием для таргетной Т-клеточной терапии, способной достичь максимального клинического эффекта при минимальной иммунологической токсичности, является идентификация ассоциированных с заболеванием антигенов с высокой экспрессией и презентацией, например, компартментом злокачественных клеток, но без значимой экспрессии в нормальных тканях. Например, было описано несколько антигенов, ассоциированных с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), и было показано, что белок опухоли Вильмса 1 (WT-1) экспрессируется в компартменте лейкозных стволовых клеток (ЛСК) у большинства пациентов с ОМЛ на значительно более высоких уровнях, чем в нормальных гемопоэтических стволовых клетках (ГСК). WT-1 использовался в качестве мишени в клинических исследованиях как с адоптивным переносом Т-клеток, так и с пептидной вакцинацией (см., например, патенты США № 7342092, 7608685, 7622119). Кроме того, сообщалось, что экспрессия WT-1 является

маркером минимальной остаточной болезни, поскольку повышенные уровни транскриптов у пациентов с ОМЛ в морфологической ремиссии являлись прогностическим фактором выраженного клинического рецидива (Inoue et al., Blood 84:3071, 1994; Ogawa et al., Blood 101:1698, 2003).

Поскольку WT-1 является внутриклеточным (обычно ядерным) белком, для иммунотерапий, нацеленных на WT-1, использовались клеточные подходы, направленные на индукцию WT-1-специфичных ответов $CD8^+$ Т-цитотоксических лимфоцитов (CTL), которые распознают пептиды, презентируемые на клеточной поверхности молекулами MHC (главный комплекс гистосовместимости) I класса. Для индукции ответа CTL внутриклеточные белки обычно расщепляются протеасомами или эндо/лизосомами, при этом образующиеся пептидные фрагменты связываются с молекулами MHC I класса или II класса. Эти комплексы пептид-MHC экспонируются на клеточной поверхности, где они связываются Т-клетками посредством взаимодействия пептид-MHC-TCR. Пептиды, происходящие из белка WT-1, теоретически могут быть использованы в вакцине для применения у людей, чтобы индуцировать человеческий лейкоцитарный антиген (HLA)-рестриктированные цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки, способные уничтожать опухолевые клетки. Однако, поскольку WT-1 является собственным белком, иммунизация может вызывать ответы только Т-клеток с низкоаффинными TCR. Кроме того, у пациентов с гемобластозами и солидными опухолями выявляются антитела к WT-1, что свидетельствует о том, что WT-1 может быть высокоиммуногенным антигеном (Gaiger et al., Clin. Cancer Res. 7 (Suppl. 3):761, 2001).

Совершенно очевидно, что существует потребность в альтернативных видах генной терапии для применения в качестве высокоспецифичной иммунотерапии, нацеленной на WT-1, направленной против различных видов рака, таких как лейкоз и опухоли. Раскрытые в настоящем документе варианты осуществления удовлетворяют эту потребность и обеспечивают другие связанные с этим преимущества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении в соответствии с некоторыми вариантами осуществления предложены связывающие белки, способные связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):человеческий лейкоцитарный антиген (HLA), где связывающие белки содержат (a) вариабельный домен α-цепи (Vα) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий аминокислотную последовательность CDR3 (CDR - область, определяющая комплементарность) (CDR3α) согласно любой из SEQ ID NO: 19, 22, 25 или 28 или ее вариант, и вариабельный домен β-цепи (Vβ) TCR, где Vβ необязательно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90%

(например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 5-8 или 13-16; (b) Vβ домен TCR, содержащий аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3β) согласно любой из SEQ ID NO: 31, 34, 37 или 40 или ее вариант, и Vα домен TCR, где Vα необязательно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-4 или 9-12; или (c) Vα домен TCR согласно (a) и Vβ домен TCR согласно (b).

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 4,0, 4,5, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5 или выше (например, иммунная клетка (такая как, например, Т-клетка, NK-Т-клетка (естественная киллерная Т-клетка) или NK-клетка (естественная киллерная клетка)), содержащая связывающий белок, имеет значение pEC_{50} при продукции IFNγ при связывании с SEQ ID NO: 94:HLA, равное 4,0, 4,5, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5 или выше).

В некоторых вариантах осуществления HLA включает HLA-A*0201.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок является человеческим, гуманизированным или химерным.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):человеческий лейкоцитарный антиген (HLA), где связывающий белок содержит Vβ домен TCR и Vα домен TCR, где: (i) Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 5-8 или 13-16; и/или (ii) Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 1-4 или 9-12.

В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий белок представляет собой TCR, CAR (химерный антигенный рецептор) или scTCR (одноцепочечный TCR).

Также в настоящем документе предложены модифицированные иммунные клетки, содержащие гетерологичный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, как раскрыто в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления иммунная

клетка включает Т-клетку, NK-клетку, NK-T-клетку или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, кодирующая связывающий белок, как раскрыто в настоящем документе, активирована в присутствии пептида с SEQ ID NO: 94 (например, входящего в состав комплекса пептид:HLA). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка, кодирующая связывающий белок, как раскрыто в настоящем документе, способна уничтожать клетку-мишень, экспрессирующую комплекс SEQ ID NO: 94:HLA.

Также предложены выделенные полинуклеотиды, кодирующие связывающий белок согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий белок содержит: (i) аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37 или 40; (ii) аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35 или 38; (iii) аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 или 39; (iv) аминокислотную последовательность, содержащую, состоящую из или обладающую по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-4 или 9-12; (v) аминокислотную последовательность, содержащую, состоящую из или обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 5-8 или 13-16; (vi) аминокислотную последовательность, содержащую, состоящую из или обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 46-53; (vii) аминокислотную последовательность, содержащую, состоящую из или обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 54-61; или (viii) любую комбинацию (i)-(vii).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит или состоит из полинуклеотида, обладающего по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 62-81. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является кодон-оптимизированным для экспрессии в клетке-хозяине, такой как иммунная клетка (например, человеческая Т-клетка).

Также предложены векторы, содержащие полинуклеотид, как описано в настоящем документе, а также композиции, содержащие раскрытые в настоящем документе модифицированную клетку, связывающий белок, полинуклеотид и/или вектор.

Также предложены способы лечения субъекта, имеющего заболевание или расстройство, связанное с экспрессией или активностью WT-1, где способы включают введение указанному субъекту эффективного количества модифицированной иммунной клетки, связывающего белка, полинуклеотида или вектора, как раскрыто в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой гемобластоз или солидный рак. Например, гемобластоз, подлежащий лечению, может представлять собой острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ, включая рефрактерный и рецидивирующий ОМЛ, и включая острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз (например, с эозинофилией или без нее), острый моноцитарный лейкоз, острый эритроидный лейкоз и острый мегакариобластный лейкоз), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), хронический миелоцитарный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз (ХЭЛ), миелодиспластический синдром (МДС), неходжкинскую лимфому (НХЛ) или множественную миелому (ММ, включая рефрактерную и рецидивирующую ММ). Примерами солидного рака, подлежащего лечению, может быть рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, карцинома костей и мягких тканей, опухоль головного мозга, рак молочной железы, карцинома молочной железы, рак шейки матки, рак ободочной кишки, колоректальная аденокарцинома, колоректальный рак, десмоидная опухоль, эмбриональный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, аденокарцинома желудка, мультиформная глиобластома, глиобластома, меланома, диффузная мезотелиома брюшины, злокачественная мезотелиома плевры, глиома, астроцитома, гинекологическая опухоль, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак печени, гепатоцеллюлярная карцинома, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, злокачественная меланома, остеосаркома, рак яичника (например, эпителиальный рак яичника, карцинома яичника), рак маточной трубы, карцинома эндометрия, рак поджелудочной железы, протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, первичная астроцитарная опухоль, первичный рак щитовидной железы, рак предстательной железы, рак почки, почечно-клеточная карцинома, рабдомиосаркома, рак кожи, саркома мягких тканей, остеогенная саркома, герминогенная опухоль яичка, уротелиальный рак, саркома матки, карциносаркома матки или рак матки.

Эти и другие аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения станут более понятными при обращении к следующему далее подробному описанию изобретения и прилагаемым графическим материалам. Содержание всех патентов США, публикаций

заявок на патенты США, заявок на патенты США, иностранных патентов, иностранных патентных заявок и непатентных публикаций, упомянутых в настоящем описании и/или перечисленных в информационном листке заявки, полностью включено в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждый из перечисленного был включен в отдельности. Аспекты и варианты осуществления изобретения при необходимости могут быть модифицированы для использования концепций различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов осуществления.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показана идентификация WT-1-специфичных Т-клеточных линий. Вкратце, WT-1-специфичные поликлональные Т-клеточные линии (CD8+), полученные от 4 здоровых доноров, культивировали с аутологичными дендритными клетками, в которые вводили пептид, окрашивали CD8-независимым (CD8i) тетрамером пептид WT-1/HLA-A и отбирали клетки с высоким окрашиванием тетрамером. Было идентифицировано двадцать четыре (24) WT-1-специфичных клонотипа. Анализ репертуара TCR проводили путем секвенирования. Показаны кратность обогащения каждого клонотипа в отсортированных популяциях по сравнению с несортированными (ось y) и поверхностная экспрессия CD3 (ось x) для каждого клонотипа.

На фиг. 2A-2C показано, что иллюстративные WT-1-специфичные связывающие белки экспрессируются в трансдуцированных клетках-хозяевах. Десять (10) WT-1-специфичных TCR из 24 клонотипов, показанных на фиг. 1, использовали для трансдукции лишенных TCRα/TCRβ Т-клеток Jurkat J76. Связывание тетрамера WT-1:HLA-A и экспрессию CD3 в трансдуцированных клетках (показаны светло-серым цветом) сравнивали с клетками, трансдуцированными эталонным WT-1-специфичным TCR (показаны темно-серым цветом), имеющим α-цепь согласно SEQ ID NO: 82 и β-цепь согласно SEQ ID NO: 83 и описанным Schmitt et al. (Nat. Biotechnol. 35:1188, 2017).

На фиг. 3A и 3B показано, что связывающие белки согласно настоящему изобретению являются функциональными в трансдуцированных клетках-хозяевах. (A) Клетки Jurkat, экспрессирующие репортер Nur77-dtTomato (сигнализирующий об антигенспецифической передаче сигналов в человеческих Т-клетках; см. Ahsouri and Weiss, J Immunol 198(2):657-668 (2017)), трансдуцировали WT-1-специфичным TCR и инкубировали в течение 24 ч с APC (антигенпрезентирующими клетками), нагруженными пептидом WT-1 в указанных концентрациях. (B) Значения EC_{50} Nur77 активационного пептида для указанных TCR.

На фиг. 4A-4C показано определение дополнительных функциональных характеристик иллюстративных связывающих белков согласно настоящему изобретению.

(A) Связывание тетрамера пептид/MHC CD8+ Т-клетками, которые были трансдуцированы для экспрессии WT-1-специфичного TCR, как указано. (B) Продукция IFNγ (определенная с помощью проточной цитометрии) размноженными антигенспецифическими CD8+ Т-клетками при совместном культивировании в течение 4 часов с клетками-мишенями T2, в которые вводили подобранные концентрации пептида. Показан процент IFN-γ+ Т-клеток. (C) EC_{50} пептида IFNγ для каждого TCR определяли путем аппроксимации процента IFNγ-продуцирующих клеток кривыми доза-ответ с помощью линейной регрессии.

На фиг. 5A и 5B показан лизис опухолевых клеток Т-клетками, экспрессирующими иллюстративный связывающий белок согласно настоящему изобретению (TCR DL6 или DL10), по сравнению с лизисом Т-клетками, экспрессирующими эталонный TCR (α-цепь согласно SEQ ID NO: 82; β-цепь согласно SEQ ID NO: 83). (A) Лизис клеток линии опухолевых клеток MDA-MB-468, трансдуцированных HLA-A2. (B) Лизис клеток опухолевой линии Panc-1, которая от природы является HLA-A2+. В обоих из (A) и (B) показаны результаты 4-часовых анализов, в которых клетки-мишени нагружали ^{51}Cr и рассчитывали опосредованное TCR-трансдуцированными Т-клетками уничтожение путем измерения высвобождения Cr в ответ на уменьшение доз эффекторных Т-клеток относительно опухолевых клеток-мишеней (E:T; ось x).

На фиг. 6 показана продукция IFN-γ иллюстративным TCR DL10 согласно настоящему изобретению по сравнению с эталонным TCR (α-цепь согласно SEQ ID NO: 82; β-цепь согласно SEQ ID NO: 83) в присутствии клеток-мишеней T2, в которые вводили пептид.

На фиг. 7 показано снижение роста опухолевых клеток Panc-1 в присутствии Т-клеток, экспрессирующих иллюстративный TCR DL10 согласно настоящему изобретению, по сравнению с опухолевыми клетками как таковыми или в присутствии Т-клеток, экспрессирующих эталонный TCR (α-цепь согласно SEQ ID NO: 82; β-цепь согласно SEQ ID NO: 83). Пролиферацию/выживание клеток отслеживали в течение 7 дней с помощью анализа IncuCyte. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к связывающему белку (например, TCR, CAR, scTCR), обладающему специфичностью в отношении пептидного антигена WT-1, связанного с главным комплексом гистосовместимости (MHC) (например, человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA)), полинуклеотидам, кодирующим связывающий белок, векторам, модифицированным иммунным клеткам, кодирующим

и/или экспрессирующим связывающие белки, и соответствующим композициям. Раскрытые в настоящем документе WT-1-специфичные композиции пригодны, например, в адоптивной иммунотерапии для лечения рака. В качестве пояснения, большинство опухолевых мишеней для иммунотерапии на основе Т-клеток являются собственными антигенами, поскольку опухоли возникают из ранее нормальной ткани. Например, такие опухолеассоциированные антигены (TAA) могут экспрессироваться на высоких уровнях в раковой клетке, но могут не экспрессироваться или могут экспрессироваться на минимальном уровне в других клетках. Во время развития Т-клеток в тимусе Т-клетки, которые слабо связываются с собственными антигенами, выживают в тимусе и могут претерпевать дальнейшее развитие для повышения специфичности против чужеродных агентов, в то время как Т-клетки, которые сильно связываются с собственными антигенами, устраняются иммунной системой, поскольку такие клетки вызвали бы нежелательный аутоиммунный ответ. Следовательно, Т-клетки сортируются по их относительной способности связываться с антигенами, чтобы подготовить иммунную систему к ответу против чужеродного агента (т. е., распознаванию чужеродного антигена), и предотвращению при этом аутоиммунного ответа (т. е., распознаванию собственных антигенов). Этот механизм толерантности ограничивает встречающиеся в природе Т-клетки, способные распознавать опухолевые (собственные) антигены с высокой аффинностью, и, следовательно, устраняет Т-клетки, которые эффективно уничтожали бы опухолевые клетки. Следовательно, выделение Т-клеток, имеющих высокоаффинные TCR, специфичные к опухолевым антигенам, осложнено, поскольку такие клетки по существу устраняются иммунной системой.

Преимущество настоящего изобретения заключается в обеспечении связывающего белка, специфичного к пептиду WT-1, где связывающий белок способен связываться с комплексом WT-1 (SEQ ID NO: 94):HLA (например, HLA-A*0201). В некоторых вариантах осуществления связывающий белок способен связываться с WT-1 независимо или в отсутствие CD8, способен более эффективно связываться с белком CD3 по сравнению с эндогенным TCR, способен подать сигнал клетке-хозяину, экспрессирующей связывающий белок, чтобы она продуцировала цитокин, или способен осуществлять любую комбинацию перечисленного. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 4,0, 4,5, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5 или выше; и/или где связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA с более высоким значением pEC_{50} при продукции IFNγ по сравнению с TCR, содержащим аминокислотную

последовательность α-цепи согласно SEQ ID NO: 82 и аминокислотную последовательность β-цепи согласно SEQ ID NO: 83.

Композиции и способы, описанные в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления будут иметь терапевтическое применение для лечения заболеваний и состояний, связанных с экспрессией WT-1 (например, при поддающейся обнаружению экспрессии WT-1 на уровне, который статистически значимо больше по величине, чем уровень экспрессии WT-1, который может быть обнаружен в нормальной или здоровой клетке). Такие заболевания включают различные заболевания и расстройства, такие как гемобластозы и солидные опухоли. Неограничивающие примеры этих и связанных с ними применений описаны в настоящем документе и включают стимуляцию in vitro, ex vivo и in vivo специфичных к антигену WT-1 Т-клеточных ответов, например, с использованием рекомбинантных иммунных клеток, таких как Т-клетки, кодирующих и/или экспрессирующих гетерологичный связывающий белок, специфичный к пептиду WT-1 (например, RMFPNAPYL, SEQ ID NO: 94).

Перед более подробным описанием настоящего изобретения для лучшего понимания может быть полезным привести определения некоторых терминов, используемых в настоящем документе Дополнительные определения приведены в тексте настоящего документа.

В настоящем описании любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон отношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, при необходимости, его доли (например, одну десятую и одну сотую целого числа), если не указано иное. Кроме того, подразумевается, что любой указанный в настоящем документе численный диапазон, относящийся к любой физической характеристике, такой как полимерные субъединицы, размер или толщина, включает любое целое число в указанном диапазоне, если не указано иное. В контексте настоящего документа термин «приблизительно» означает ± 20 % от указанного диапазона, значения или структуры, если не указано иное. Следует исходить из того, что используемые в настоящем документе термины в единственном числе относятся к «одному или более» из перечисленных компонентов. Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как означающее одну, обе или любую комбинацию таких альтернатив. В контексте настоящего документа термины «включать», «иметь» и «содержать» используются как синонимы, и эти термины и их варианты следует толковать как неограничивающие.

Кроме того, следует исходить из того, что отдельные соединения или группы соединений, полученные из различных комбинаций описанных в настоящем документе

структур и заместителей, раскрыты настоящей заявкой в такой же степени, как если бы каждое соединение или группа соединений были описаны по отдельности. Таким образом, выбор конкретных структур или конкретных заместителей входит в объем настоящего изобретения.

Термин «состоящий по существу из» не эквивалентен «содержащему» и относится к указанным материалам или стадиям либо к тем, которые не оказывают значимого влияния на основные характеристики заявленного изобретения. Например, белковый домен, область или модуль (например, связывающий домен, шарнирная область, линкерный модуль) или белок (который может иметь один или более доменов, областей или модулей) «состоит по существу из» определенной аминокислотной последовательности, когда аминокислотная последовательность домена, области, модуля или белка включает удлинения, делеции, мутации или их комбинацию (например, аминокислоты на амино- или карбокси-конце или между доменами), которые в комбинации составляют не более 20 % (например, не более 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % или 1 %) длины домена, области, модуля или белка и не оказывают существенного влияния (т. е. не снижают активность более чем на 50 %, например, не более чем на 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % или 1 %) на активность домена(ов), области(ей), модуля(ей) или белка (например, аффинность связывания мишени связывающего белка).

В контексте настоящего документа термин «хозяин» относится к клетке (например, Т-клетке) или микроорганизму, подлежащему генетической модификации с помощью гетерологичной или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты для получения требуемого полипептида (например, анти-WT-1 TCR с повышенной аффинностью). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может необязательно уже иметь или быть модифицирована для включения других генетических модификаций, которые придают желаемые свойства, связанные или не связанные с биосинтезом гетерологичного или экзогенного белка (например, включение детектируемого маркера; удаленный, измененный или укороченный эндогенный TCR; повышенная экспрессия костимулирующего фактора). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой человеческую гемопоэтическую клетку-предшественника, трансдуцированную гетерологичной или экзогенной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей цепь TCRα, специфичную к антигенному пептиду WT-1.

В контексте настоящего документа термин «клетка иммунной системы» означает любую клетку иммунной системы, происходящую из гемопоэтической стволовой клетки в костном мозге, которая дает начало двум основным линиям: миелоидной клетке-

предшественнику (которая дает начало миелоидным клеткам, таким как моноциты, макрофаги, дендритные клетки, мегакариоциты и гранулоциты) и лимфоидной клетке-предшественнику (которая дает начало лимфоидным клеткам, таким как Т-клетки, В-клетки и естественные киллерные клетки (NK-клетки)). Примеры клеток иммунной системы включают $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^-$ $CD8^-$ двойную негативную Т-клетку, γδ-Т-клетку, естественную киллерную клетку и дендритную клетку. Макрофаги и дендритные клетки могут называться «антигенпрезентирующими клетками» или «APC», которые представляют собой специализированные клетки, способные активировать Т-клетки, когда рецептор главного комплекса гистосовместимости (MHC) на поверхности APC взаимодействует с TCR на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка иммунной системы представляет собой клетку иммунной системы человека.

В контексте настоящего документа термин «гемопоэтическая клетка-предшественник» относится к клетке, которая может происходить из гемопоэтических стволовых клеток или фетальной ткани и способна к дальнейшей дифференцировке в зрелые типы клеток (например, клетки иммунной системы). Примеры гемопоэтических клеток-предшественников включают клетки с фенотипом $CD24^{Lo}$ Lin^- $CD117^+$ или находящиеся в тимусе (называемые тимоцитами-предшественниками).

«Главный комплекс гистосовместимости» (MHC) относится к гликопротеинам, которые доставляют пептидные антигены на клеточную поверхность. Молекулы MHC I класса представляют собой гетеродимеры, имеющие трансмембранную α-цепь (с тремя α-доменами) и нековалентно связанный β2-микроглобулин. Молекулы MHC II класса состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β, оба из которых пронизывают мембрану. Каждая цепь имеет два домена. Молекулы MHC I класса доставляют пептиды, продуцируемые в цитозоле, на клеточную поверхность, где комплекс пептид:MHC распознается $CD8^+$ Т-клетками. Молекулы MHC II класса доставляют пептиды, продуцируемые в везикулярной системе, на клеточную поверхность, где они распознаются $CD4^+$ Т-клетками. Человеческий MHC называют человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA).

«Т-клетка» представляет собой клетку иммунной системы, которая созревает в тимусе и продуцирует Т-клеточные рецепторы (TCR). Т-клетки могут быть наивными (не подвергавшимися воздействию антигена; повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA и пониженная экспрессия CD45RO по сравнению с T_{CM}), Т-клетками памяти (T_M) (коммитированными и долгоживущими) и эффекторными клетками (коммитированными, цитотоксическими). T_M можно дополнительно разделить на

субпопуляции центральных Т-клеток памяти (T_{CM}, повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO и CD95 и пониженная экспрессия CD54RA по сравнению с наивными Т-клетками), стволовых Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток памяти (T_{EM}, пониженная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD45RA и повышенная экспрессия CD127 по сравнению с наивными Т-клетками или TC_M). Эффекторные Т-клетки (T_E) относятся к коммитированным CD8+ цитотоксическим Т-лимфоцитам, которые имеют пониженную экспрессию CD62L, CCR7, CD28 и являются положительными в отношении гранзима и перфорина по сравнению с T_{CM}.

«Т-клеточный рецептор» (TCR) относится к члену суперсемейства иммуноглобулинов (имеющему вариабельный связывающий домен, константный домен, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост; см., например, Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997), способному специфически связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором MHC. TCR может быть представлен на клеточной поверхности или в растворимой форме и обычно состоит из гетеродимера, имеющего α- и β-цепи (также известные как TCRα и TCRβ, соответственно) или γ- и δ-цепи (также известные как TCRγ и TCRδ, соответственно). Как и другие иммуноглобулины (например, антитела), внеклеточная часть цепей TCR (например, α-цепи, β-цепи) содержит два иммуноглобулиновых домена, вариабельный домен (например, вариабельный домен α-цепи или Vα, вариабельный домен β-цепи или Vβ; обычно аминокислоты с 1 по 116 на основе нумерации по Кабату (Kabat, et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) на N-конце и один константный домен (например, константный домен α-цепи или C_α, обычно аминокислоты со 117 по 259 на основе нумерации по Кабату, константный домен β-цепи или C_β, обычно аминокислоты со 117 по 295 на основе нумерации по Кабату), прилегающий к клеточной мембране. Также, как и другие иммуноглобулины, вариабельные домены содержат области, определяющие комплементарность (CDR), разделенные каркасными областями (FR) (см., например, Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; см. также Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления TCR представлен на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов) и связан с комплексом CD3. Источник TCR, применяемый в настоящем документе, может происходить от различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса, кролик или другое млекопитающее.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену связывающего белка суперсемейства иммуноглобулинов (например, α-цепи или β-цепи

TCR (или γ-цепи и δ-цепи для γδ-TCR)), который участвует в связывании связывающего белка суперсемейства иммуноглобулинов (например, TCR) с антигеном. В случае TCR вариабельные домены α-цепи и β-цепи (Vα и Vβ, соответственно) обычно имеют схожие структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативных каркасных области (FR) и три CDR. Vα домен кодируется двумя отдельными сегментами ДНК: вариабельным генным сегментом и соединительным генным сегментом (V-J); Vβ домен кодируется тремя отдельными сегментами ДНК: вариабельным генным сегментом, обеспечивающим разнообразие генным сегментом и соединительным генным сегментом (V-D-J). Одного Vα или Vβ домена или его функционального фрагмента или части может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, TCR, связывающие определенный антиген, могут быть выделены с использованием Vα или Vβ домена из TCR, который связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных Vα или Vβ доменов соответственно.

Термины «область, определяющая комплементарность» и «CDR» являются синонимами «гипервариабельной области» или «HVR» и, как известно в данной области техники, относятся к последовательностям аминокислот в вариабельных областях иммуноглобулина (например, TCR), которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания и отделены друг от друга каркасными областями. Как правило, имеется три CDR в каждой вариабельной области α-цепи TCR (αCDR1, αCDR2, αCDR3) и три CDR в каждой вариабельной области β-цепи TCR (βCDR1, βCDR2, βCDR3). Полагают, что в TCR CDR3 является основной CDR, ответственной за распознавание процессированного антигена. Как правило, CDR1 и CDR2 в основном взаимодействуют с MHC.

CDR1 и CDR2 кодируются в пределах вариабельного генного сегмента последовательности, кодирующей вариабельную область TCR, тогда как CDR3 кодируется областью, охватывающей вариабельный и соединительный сегменты для Vα, или областью, охватывающей вариабельные, обеспечивающие разнообразие и соединительные сегменты для Vβ. Таким образом, если известна принадлежность вариабельного генного сегмента Vα или Vβ, можно установить последовательности их соответствующих CDR1 и CDR2. По сравнению с CDR1 и CDR2 CDR3 обычно значительно более разнообразен из-за добавления и потери нуклеотидов в процессе рекомбинации.

Последовательности вариабельных доменов TCR могут быть выровнены по системе нумерации (например, IMGT, Кабат, Чотиа, «расширенной» Чотиа, контактной и Aho), что позволяет аннотировать положения эквивалентных остатков и сравнивать

различные молекулы с использованием, например, программного обеспечения ANARCI (2016, Bioinformatics 15:298-300). Схема нумерации обеспечивает стандартизированное разграничение каркасных областей и CDR в вариабельных доменах TCR. Соответственно, следует исходить из того, что CDR из Vα или Vβ области или домена TCR может иметь определенную последовательность в соответствии с определенной системой нумерации и может иметь более короткую, более длинную или смещенную (например, частично перекрывающуюся) последовательность в соответствии с другой системой нумерации. В некоторых раскрытых в настоящем документе вариантах осуществления CDR определены с использованием системы нумерации IMGT; например, с помощью IMGT V-Quest (imgt.org/IMGTindex/V-QUEST.php).

«CD3» известен в данной области техники как мультибелковый комплекс из шести цепей (см. Abbas and Lichtman, 2003; Janeway et al., p172 и 178, 1999). У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3γ, цепь CD3δ, две цепи CD3ε и гомодимер цепей CD3ζ. Цепи CD3γ, CD3δ и CD3ε являются в высокой степени родственными белкам клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащих единственный иммуноглобулиновый домен. Трансмембранные области цепей CD3γ, CD3δ и CD3ε отрицательно заряжены, что, как полагают, позволяет таким цепям связываться с положительно заряженными областями цепей Т-клеточных рецепторов. Внутриклеточные хвосты каждой из цепей CD3γ, CD3δ и CD3ε содержат один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM, тогда как каждая цепь CD3ζ имеет три таких мотива. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что ITAM важны для сигнальной способности комплекса TCR. CD3, в контексте настоящего документа, может происходить от различных видов животных, включая человека, мышь, крысу или других млекопитающих.

В контексте настоящего документа термин «комплекс TCR» относится к комплексу, образованному посредством ассоциации CD3 с TCR. Например, комплекс TCR может состоять из цепи CD3γ, цепи CD3δ, двух цепей CD3ε, гомодимера цепей CD3ζ, цепи TCRα и цепи TCRβ. В качестве альтернативы, комплекс TCR может состоять из цепи CD3γ, цепи CD3δ, двух цепей CD3ε, гомодимера цепей CD3ζ, цепи TCRγ и цепи TCRδ.

«Компонент комплекса TCR» в контексте настоящего документа относится к цепи TCR (например, TCRα, TCRβ, TCRγ или TCRδ), цепи CD3 (например, CD3γ, CD3δ, CD3ε или CD3ζ) или комплексу, образованному двумя или более цепями TCR или цепями CD3 (например, комплексу TCRα и TCRβ, комплексу TCRγ и TCRδ, комплексу CD3ε и CD3δ, комплексу CD3γ и CD3ε или субкомплексу TCR из TCRα, TCRβ, CD3γ, CD3δ и двух цепей CD3ε).

В контексте настоящего документа термин «корецептор CD8» или «CD8» означает гликопротеин клеточной поверхности CD8, который может экспрессироваться Т-клетками в виде гомодимера, содержащего две цепи CD8α, или в виде гетеродимера, содержащего α-цепь и β-цепь. Полагают, что корецептор CD8 способствует функционированию цитотоксических Т-клеток ($CD8^+$) и осуществляет свою функцию посредством передачи сигналов через свой путь фосфорилирования цитоплазматического тирозина (Gao and Jakobsen, Immunol. Today 21:630-636, 2000; Cole and Gao, Cell. Mol. Immunol. 1:81-88, 2004). В частности, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что корецептор CD8 связывается с комплексом MHC-I и белка, экспрессируемым на поверхности антигенэкспрессирующей клетки, и что это связывание в контексте связывания TCR:антиген-MHC инициирует или способствует Т-клеточному сигнальному пути, который вызывает иммунный ответ (например, транскрипцию и экспрессию цитокинов, секрецию кальция, цитолитическую активность и т. п.) против антигенэкспрессирующей клетки. У людей известно восемь (8) различных изоформ бета-цепи CD8 («M1»-«M8»; см. идентификаторы UniProtKB P10966-1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 и 9); из них изоформы 1, 2, 4 и 5, как полагают, ассоциируют с клеточной мембраной в природе, тогда как изоформы 3, 6, 7 и 8, как полагают, ассоциируют с внеклеточными областями или подлежат секреции. Также у людей известны три изоформы альфа-цепи CD8 (см. идентификаторы UniProtKB P01732-1, 2 и 3).

«CD4» относится к корецепторному гликопротеину иммуноглобулина, который помогает TCR взаимодействовать с антигенпрезентирующими клетками (см. Campbell & Reece, Biology 909 (Benjamin Cummings, Sixth Ed., 2002); UniProtKB P01730). CD4 находится на поверхности иммунных клеток, таких как Т-хелперные клетки, моноциты, макрофаги и дендритные клетки, и обычно включает четыре иммуноглобулиновых домена (D1 (содержащий Ig-подобный домен V-типа), D2, D3 и D4 (соответственно содержащие Ig-подобные домены C2-типа 1, 2 и 3)), которые экспрессируются на клеточной поверхности. Во время презентации антигена CD4 рекрутируется вместе с комплексом TCR для связывания с различными областями молекулы MHCII (CD4 связывает MHCII β2, а комплекс TCR связывает MHCII α1/β1). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что непосредственная близость к комплексу TCR позволяет молекулам CD4-ассоциированных киназ фосфорилировать иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM), присутствующие на цитоплазматических доменах CD3. Считается, что эта активность усиливает сигнал, генерируемый активированным TCR, для продуцирования различных типов Т-хелперных клеток.

«Связывающий домен» (также называемый «связывающей областью» или

«связывающим фрагментом») в контексте настоящего документа относится к пептиду, олигопептиду, полипептиду или белку, который обладает способностью специфически и нековалентно ассоциироваться, объединяться или связываться с мишенью (например, WT-1 или комплексом пептид WT-1:MHC). Связывающий домен включает любой встречающийся в природе, синтетический, полусинтетический или полученный рекомбинантно партнер по связыванию для биологической молекулы, молекулярного комплекса (т. е. комплекса, содержащего две или более биологических молекул) или другой мишени, представляющей интерес. Примеры связывающих доменов включают вариабельные области одноцепочечных иммуноглобулинов (например, scTCR, scFv), эктодомены рецепторов, лиганды (например, цитокины, хемокины) или синтетические полипептиды, выбранные по наличию специфической способности связываться с биологической молекулой, молекулярным комплексом или другой мишенью, представляющей интерес.

В контексте настоящего документа термин «специфически связывает» или «является специфичным к» относится к ассоциации или объединению связывающего белка (например, рецептора TCR) или связывающего домена (или содержащего его слитого белка) с молекулой-мишенью с аффинностью или K_a (т. е. равновесной константой ассоциации для конкретного связывающего взаимодействия, выражаемая в единицах 1/M), равной или большей 10^5 M^{-1} (что равно отношению скорости ассоциации [k_{on}] к скорости диссоциации [k_{off}] для этой реакции ассоциации), в отсутствие при этом существенной ассоциации или объединения с любыми другими молекулами или компонентами в образце. Связывающие белки или связывающие домены (или содержащие их слитые белки) могут быть классифицированы как «высокоаффинные» связывающие белки или связывающие домены (или содержащие их слитые белки) или «низкоаффинные» связывающие белки или связывающие домены (или содержащие их слитые белки). «Высокоаффинные» связывающие белки или связывающие домены относятся к связывающим белкам или связывающим доменам с K_a по меньшей мере 10^7 M^{-1}, по меньшей мере 10^8 M^{-1}, по меньшей мере 10^9 M^{-1}, по меньшей мере 10^{10} M^{-1}, по меньшей мере 10^{11} M^{-1}, по меньшей мере 10^{12} M^{-1} или по меньшей мере 10^{13} M^{-1}. «Низкоаффинные» связывающие белки или связывающие домены относятся к связывающим белкам или связывающим доменам с K_a вплоть до 10^7 M^{-1}, вплоть до 10^6 M^{-1} или вплоть до 10^5 M^{-1}. В качестве альтернативы, аффинность может быть определена как равновесная константа диссоциации (K_d) для конкретного связывающего взаимодействия, выражаемая в единицах M (например, от 10^{-5} M до 10^{-13} M).

В некоторых вариантах осуществления рецептор или связывающий домен может

иметь «повышенную аффинность», что относится к выбранному или сконструированному рецепторам или связывающему домену с более сильным связыванием с антигеном-мишенью, чем у связывающего домена дикого типа (или исходного связывающего домена). Например, повышенная аффинность может объясняться K_a (равновесной константой ассоциации) для антигена-мишени, которая выше, чем у связывающего домена дикого типа, K_d (константой диссоциации) для антигена-мишени, которая ниже, чем у связывающего домена дикого типа, скоростью диссоциации (k_{off}) для антигена-мишени, которая ниже, чем у связывающего домена дикого типа, или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления TCR с повышенной аффинностью могут быть кодон-оптимизированы для усиления экспрессии в конкретной клетке-хозяине, такой как Т-клетки (Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135, 2006).

Термин «функциональная авидность» относится к биологической мере или порогу активации ответа иммунной клетки (например, Т-клетки, NK-клетки, NK-Т-клетки) in vitro на данную концентрацию лиганда, при этом биологические меры могут включать продукцию цитокинов (например, продукцию IFNγ, продукцию IL-2 и т. д.), цитотоксическую активность, активацию и пролиферацию. Например, Т-клетки, которые биологически (иммунологически) отвечают in vitro на низкую дозу антигена, продуцируя цитокины, оказывая цитотоксическое действие, экспрессируя маркер активации или пролиферируя, считаются обладающими высокой функциональной авидностью, в то время как для Т-клеток с более низкой функциональной авидностью требуются более высокие количества антигена, чтобы был вызван иммунный ответ, подобный Т-клеткам с высокой авидностью. Понятно, что функциональная авидность отличается от аффинности и авидности. Аффинность относится к силе любой отдельно взятой связи между связывающим белком и его антигеном/лигандом. Некоторые связывающие белки мультивалентны и связываются с несколькими антигенами — в этом случае сила совокупной связи представляет собой авидность.

Существует множество корреляций между функциональной авидностью и эффективностью иммунного ответа. Некоторые исследования ex vivo показали, что различные функции Т-клеток (например, пролиферация, продукция цитокинов и т. д.) могут запускаться при различных пороговых значениях (см., например, Betts et al., J. Immunol. 172:6407, 2004; Langenkamp et al., Eur. J. Immunol. 32:2046, 2002). Факторы, которые могут влиять на функциональную авидность, включают (a) аффинность TCR к pMHC-комплексу, то есть, силу взаимодействия между TCR и pMHC (Cawthon et al., J. Immunol. 167:2577, 2001), (b) уровни экспрессии TCR и корецепторов CD4 или CD8 и (c) распределение и состав сигнальных молекул (Viola and Lanzavecchia, Science 273:104,

1996), а также уровни экспрессии молекул, ослабляющих функцию Т-клеток и передачу сигналов TCR.

Концентрация антигена, необходимая для индукции полумаксимального ответа между исходным уровнем и максимальным ответом после определенного времени воздействия, называется «полумаксимальной эффективной концентрацией» или «EC_{50}». Значение EC_{50} обычно выражают в виде молярного количества (моль/литр), но часто преобразуют его в логарифмическое значение следующим образом: – $\log_{10}(EC_{50})$ (см., например, фиг. 4(C)). Например, если EC_{50} равно 1 мкМ (10^{-6} М), значение $\log_{10}(EC_{50})$ равно минус 6. Еще одним используемым значением является pEC_{50}, которое определено как отрицательный логарифм EC_{50} ($-\log_{10}(EC_{50})$). В приведенном выше примере EC_{50}, равная 1 мкМ, имеет значение pEC50, равное 6. В некоторых вариантах осуществления функциональная авидность связывающего белка согласно настоящему изобретению будет мерой его способности стимулировать продукцию IFNγ иммунными клетками (например, Т-клетками, NK-Т-клетками, NK-клетками), которую можно измерить с помощью анализов, известных в данной области техники и/или описанных в настоящем документе. TCR или их связывающие домены с «высокой функциональной авидностью» относятся к TCR или их связывающим доменам, которым имеют EC_{50} по меньшей мере 10^{-4} М, по меньшей мере приблизительно 10^{-5} М или по меньшей мере приблизительно 10^{-6} М.

В некоторых вариантах осуществления pEC_{50} используется для описания количества пептидного антигена, необходимого для того, чтобы 50 % иммунных клеток экспрессировали маркер активации Nur77.

Известны различные анализы для идентификации связывающих доменов согласно настоящему изобретению, специфически связывающих определенную мишень, а также для определения величины аффинности связывающего домена или слитого белка, такие как вестерн-блот, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), аналитическое ультрацентрифугирование, спектроскопия и поверхностный плазмонный резонанс (Biacore®) (см., например, Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; Wilson, Science 295:2103, 2002; Wolff et al., Cancer Res. 53:2560, 1993; и патенты США № 5283173, 5468614 или эквивалент), и окрашивание тетрамера пептид:MHC.

Термин «WT-1-специфичный связывающий белок суперсемейства иммуноглобулинов» или «WT-1-специфичный связывающий белок» относится в некоторых вариантах осуществления к белку или полипептиду согласно настоящему изобретению, который специфически связывается с WT-1 или его пептидом, необязательно в комплексе с молекулой HLA. Термин «WT-1-связывающий домен» или «WT-1-связывающий фрагмент» относится к домену или части WT-1-специфичного

связывающего белка, ответственного за специфическое связывание WT-1. WT-1-специфичный связывающий домен сам по себе (т. е. без какой-либо другой части WT-1-специфичного связывающего белка) может быть растворимым. Иллюстративные WT-1-специфичные связывающие домены включают домены из WT-1-специфичных TCR, например таких, как присутствующие в TCR или scTCR (например, одноцепочечные белки αβTCR, такие как Vα-L-Vβ, Vβ-L-Vα, Vα-Cα-L-Vα или Vα-L-Vβ-Cβ, где Vα и Vβ представляют собой вариабельные домены TCRα и β, соответственно, Cα и Cβ представляют собой константные домены TCRα и β, соответственно, а L представляет собой линкер), и scFv-фрагменты, как описано в настоящем документе, которые могут быть получены из TCR или антитела к WT-1.

«Антиген WT-1» или «пептидный антиген WT-1» относится к полученной естественным или синтетическим путем части белка WT-1 длиной от приблизительно 7 аминокислот до приблизительно 15 аминокислот, которая может образовывать комплекс с MHC (например, HLA), и такой комплекс может связываться с TCR, специфичным к комплексу пептид WT-1:MHC (например, HLA). Принципы процессинга антигена антигенпрезентирующими клетками (APC) (такими как дендритные клетки, макрофаги, лимфоциты или другие типы клеток) и презентации антигена APC Т-клеткам, включая рестриктированную главным комплексом гистосовместимости (MHC) презентацию между иммуносовместимыми (например, имеющими по меньшей мере одну общую аллельную форму гена MHC, которая имеет отношение к презентации антигена) APC и Т-клетками, хорошо известны (см., например, Murphy, Janeway's Immunobiology (8^{th} Ed.) 2011 Garland Science, NY; главы 6, 9 и 16). Например, процессированные антигенные пептиды, происходящие из цитозоля (например, опухолевый антиген, внутриклеточный патоген), обычно имеют длину от приблизительно 7 до приблизительно 11 аминокислот и будут ассоциироваться с молекулами MHC I класса, тогда как пептиды, процессированные в везикулярной системе (например, бактериальные, вирусные), будет иметь длину в пределах от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 25 аминокислот и ассоциироваться с молекулами MHC II класса. Поскольку WT-1 является эндогенным хозяйским белком, антигенные пептиды WT-1 будут презентироваться в контексте MHC I класса. В частных вариантах осуществления пептид WT-1 представляет собой RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), о котором известно, что он ассоциируется с человеческим HLA I класса (и, более конкретно, связывается с аллелем HLA-A*201).

«Линкер» относится к аминокислотной последовательности, которая соединяет два белка, полипептида, пептида, домена, области или мотива и может обеспечивать спейсерную функцию, совместимую с взаимодействием двух субсвязывающих доменов,

так что полученный полипептид сохраняет специфическую аффинность связывания (например, scTCR) с молекулой-мишенью или сохраняет сигнальную активность (например, комплекс TCR). В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из от приблизительно двух до приблизительно 35 аминокислот, например, или от приблизительно четырех до приблизительно 20 аминокислот, или от приблизительно восьми до приблизительно 15 аминокислот, или от приблизительно 15 до приблизительно 25 аминокислот.

В контексте настоящего документа «слитый белок» относится к белку, который в одной цепи имеет по меньшей мере два отдельных домена или мотива, причем указанные домены или мотивы в естественных условиях не встречаются вместе в белке. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок, может быть сконструирован с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция), сконструирован методами генной инженерии, и т. п., или такие слитые белки могут быть синтезированы. Слитый белок может дополнительно содержать другие компоненты, такие как метка, линкер или маркер трансдукции. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, экспрессируемый или продуцируемый клеткой-хозяином (например, иммунной клеткой, например, Т-клеткой), располагается на клеточной поверхности, где слитый белок прикреплен к клеточной мембране (например, через трансмембранный компонент или домен) и содержит внеклеточный компонент (например, способный связываться с молекулой MHC) и внутриклеточный компонент (например, содержащий сигнальный домен, эффекторный домен, костимулирующий домен или их части, или их комбинации).

Термины «соединительные аминокислоты» или «соединительные аминокислотные остатки» относятся к одному или более (например, приблизительно от 2 до 10) аминокислотным остаткам между двумя смежными мотивами, областями или доменами полипептида, например, между связывающим доменом и смежным константным доменом или между цепью TCR и смежным саморасщепляющимся пептидом. Соединительные аминокислоты могут быть результатом моделирования конструкции слитого белка (например, аминокислотные остатки, присутствующие вследствие использования сайта рестрикционного фермента при конструировании молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок).

«Измененный домен» или «измененный белок» относится к мотиву, области, домену, пептиду, полипептиду или белку с последовательностью, идентичной мотиву, области, домену, пептиду, полипептиду или белку дикого типа (например, цепи TCRα, цепи TCRβ, константному домену TCRα, константному домену TCRβ дикого типа) по меньшей мере на 85 % (например, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %,

94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 99,5 %).

В контексте настоящего документы термины «нуклеиновая кислота», или «молекула нуклеиновой кислоты», или «полинуклеотид» относятся к любому из дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), рибонуклеиновой кислоты (РНК), олигонуклеотидов, фрагментов, полученных, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или трансляции in vitro, и фрагментов, полученных с помощью любого из лигирования, расщепления, воздействия эндонуклеазы или воздействия экзонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды согласно настоящему изобретению получены с помощью ПЦР. Полинуклеотиды могут состоять из мономеров, которые представляют собой встречающиеся в природе нуклеотиды (такие как дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды), аналоги встречающихся в природе нуклеотидов (например, α-энантиомерные формы встречающихся в природе нуклеотидов) или их комбинации. Модифицированные нуклеотиды могут содержать модификации в сахарных фрагментах или их замену, или фрагменты пиримидиновых или пуриновых оснований. Мономеры нуклеиновой кислоты могут быть связаны фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают тиофосфат, дитиофосфат, фосфорселеноат, фосфородиселеноат, фосфоранилотиоат, фосфоранилидат, фосфорамидат и т. п. Полинуклеотиды могут быть как одноцепочечными, так и двухцепочечными.

Термин «выделенный» означает, что материал удален из своей исходной среды (например, из природной среды, если он встречается в природе). Например, встречающаяся в природе нуклеиновая кислота или полипептид, присутствующие в организме живого животного, не являются выделенными, но та же самая нуклеиновая кислота или полипептид, отделенные от некоторых или всех сопутствующих материалов в природной системе, являются выделенными. Такая нуклеиновая кислота может быть частью вектора, и/или такая нуклеиновая кислота или полипептид могут быть частью композиции (например, клеточного лизата), и при этом по-прежнему являться выделенными, поскольку такой вектор или композиция не является частью природной среды для нуклеиновой кислоты или полипептида. Термин «ген» означает сегмент ДНК, участвующий в продуцировании полипептидной цепи; он включает области, предшествующие кодирующей области и следующие за ней, «лидерную и трейлерную», а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами).

Любая клетка-хозяин, связывающий белок, полинуклеотид или вектор согласно настоящему изобретению могут быть «выделены».

В контексте настоящего документа термины «рекомбинантный», «сконструированный» или «модифицированный» относятся к клетке, микроорганизму, молекуле нуклеиновой кислоты или вектору, которые были модифицированы путем введения экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты, или относятся к клетке или микроорганизму, которые были изменены таким образом, чтобы экспрессия эндогенной молекулы нуклеиновой кислоты или гена была контролируемой, дерегулированной или конститутивной, где такие изменения или модификации могут быть введены с помощью генной инженерии. Генетические изменения могут включать, например, модификации, вводящие молекулы нуклеиновой кислоты (которые могут включать элемент контроля экспрессии, такой как промотор), кодирующие один или более белков или ферментов, или другие добавления, делеции, замены молекул нуклеиновой кислоты, или другие функциональные нарушения генетического материала клетки или его дополнения. Примеры модификаций включают модификации в кодирующих областях или их функциональных фрагментах гетерологичных или гомологичных полипептидов относительно эталонной или исходной молекулы.

В контексте настоящего документа «мутация» относится к изменению последовательности молекулы нуклеиновой кислоты или молекулы полипептида по сравнению с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты или полипептида или молекулой нуклеиновой кислоты или полипептида дикого типа, соответственно. Мутация может приводить к нескольким различным типам изменений в последовательности, включая замену, вставку или делецию нуклеотида(ов) или аминокислоты (аминокислот). В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой замену одного или трех кодонов или аминокислот, делецию от одного до приблизительно 5 кодонов или аминокислот, или их комбинацию.

«Консервативная замена» известна в данной области техники как замена одной аминокислоты на другую аминокислоту, обладающую схожими свойствами. Примеры консервативных замен хорошо известны в данной области техники (см., например, WO 97/09433 на стр. 10; Lehninger, Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc. NY, NY, pp.71-77, 1975; Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY и Cell Press, Cambridge, MA, p. 8, 1990). Различные критерии, известные специалистам в данной области техники, указывают, является ли аминокислота, замещенная в определенном положении в пептиде или полипептиде, консервативной (или схожей). Например, схожая аминокислота или консервативная аминокислотная замена представляет собой такую замену, при которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. Схожие аминокислоты могут быть включены в следующие категории:

аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин); аминокислоты с кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота); аминокислоты с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, гистидин); аминокислоты с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан); аминокислоты с бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и аминокислоты с ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан). Пролин, который считается более сложным для классификации, обладает общими свойствами с аминокислотами, имеющими алифатические боковые цепи (например, лейцином, валином, изолейцином и аланином). При определенных условиях замена глутамина на глутаминовую кислоту или аспарагина на аспарагиновую кислоту может считаться схожей заменой в том смысле, что глутамин и аспарагин представляют собой амидные производные глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, соответственно. Как понимается в данной области техники, «сходство» между двумя полипептидами определяют путем сравнения аминокислотной последовательности и содержащихся в ней консервативных аминокислотных замен полипептида с последовательностью второго полипептида (например, с помощью GENEWORKS, Align, алгоритма BLAST или других алгоритмов, описанных в настоящем документе и применяемых в данной области техники).

В некоторых вариантах осуществления белки (например, связывающие белки) согласно настоящему изобретению содержат вариантную последовательность по сравнению с эталонной последовательностью (например, вариантная CDR TCR по сравнению с эталонной CDR TCR, раскрытой в настоящем документе). Вариантные белки, пептиды, полипептиды и аминокислотные последовательности согласно настоящему изобретению могут, в некоторых вариантах осуществления, содержать одну или более консервативных замен относительно эталонной аминокислотной последовательности. Также рассматриваются варианты полинуклеотидов и полипептидов согласно настоящему изобретению. Варианты молекул нуклеиновой кислоты или полипептидов идентичны по меньшей мере на 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % и предпочтительно по меньшей мере на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 99,9 % определенному или эталонному полинуклеотиду или полипептиду (соответственно), как описано в настоящем документе, или, в случае полинуклеотида, гибридизуются с эталонным полинуклеотидом в жестких условиях гибридизации 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при температуре приблизительно от 65 до 68 °С или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата

натрия и 50% формамида при температуре приблизительно 42 °C. Варианты молекулы нуклеиновой кислоты сохраняют способность кодировать связывающий белок или его связывающий домен, имеющий описанную в настоящем документе функциональность, такую как специфическое связывание с молекулой-мишенью. Дополнительную информацию и объяснение жесткости условий реакций гибридизации см. в Ausubel, F. M. (1995), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. Кроме того, специалист в данной области техники может следовать инструкциям, приведенным в руководстве Boehringer Mannheim GmbH (1993) The DIG System Users Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany, и в Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., and Schleifer, KH (1991) International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260, о том, как идентифицировать последовательности ДНК посредством гибридизации.

Варианты также могут относиться к фрагментам (например, части, полученной в результате усечения, расщепления и т. п.) определенной или эталонной последовательности, и фрагменты могут иметь любую длину, меньшую, чем длина определенной или эталонной последовательности. В контексте настоящего документа термин «функциональная часть» или «функциональный фрагмент» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который содержит только домен, часть или фрагмент исходного или эталонного соединения, и полипептид или кодируемый полипептид сохраняет по меньшей мере 50 % активности, связанной с доменом, частью или фрагментом исходного или эталонного соединения, предпочтительно по меньшей мере 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 % или 100 % уровня активности исходного полипептида, или обеспечивает биологическое преимущество (например, эффекторную функцию). «Функциональная часть» или «функциональный фрагмент» полипептида или кодируемого полипептида согласно настоящему изобретению имеет «аналогичное связывание» или «аналогичную активность», когда функциональная часть или фрагмент проявляет не более чем 50% снижение эффективности в выбранном анализе по сравнению с исходным или эталонным полипептидом (предпочтительно в отношении аффинности снижение составляет не более чем 20 % или 10 %, или не более чем логарифмическую разницу по сравнению с исходным или эталонным соединением), таком как анализ для измерения аффинности связывания или измерения эффекторной функции (например, высвобождения цитокинов). В некоторых вариантах осуществления функциональная часть относится к «сигнальной части» эффекторной молекулы, эффекторного домена, костимулирующей молекулы или костимулирующего домена.

В некоторых вариантах осуществления вариантный связывающий белок или его часть (например, связывающий фрагмент) или фрагмент может содержать одну или более аминокислотных замен относительно исходного или эталонного связывающего белка или домена, где одна или более аминокислотных замен обеспечивают удаление, изменение или ослабление потенциального нежелательного признака или характеристики, если они имеются в исходном или эталонном связывающем домене или белке; например, потенциально иммуногенной аминокислотной последовательности или аминокислотной последовательности, которая может обеспечивать нежелательный сайт гликозилирования, нежелательный сайт дезамидирования, нежелательный сайт окисления, нежелательный сайт изомеризации или снижение термодинамической стабильности, или которая может привести к ошибочному спариванию или нарушению фолдинга связывающего белка (например, непарные остатки цистеина в непосредственной близости). Известны аминокислотные последовательности, паттерны и мотивы, которые могут обеспечивать нежелательный признак или характеристику (см., например, Seeliger et al., MAbs 7(3): 505–515 (2015)).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена включает замену для удаления соматической мутации, такую как, например, реверсная мутация в аминокислоту зародышевой линии. Например, в некоторых вариантах осуществления вариант эталонной аминокислотной последовательности CDR, или последовательности вариабельного домена TCR, или последовательности константной области TCR, содержит замену для удаления или ослабления возможного нежелательного признака или характеристики. Понятно, что такие варианты выбирают таким образом, чтобы не нарушить или существенно не нарушить целевую функцию (например, специфичность связывания и/или аффинность к комплексу антиген WT-1:HLA).

Термин «конструкция» относится к любому полинуклеотиду, который содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту. Конструкция может присутствовать в векторе (например, бактериальном векторе, вирусном векторе) или может быть интегрирована в геном. «Вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая способна переносить другую молекулу нуклеиновой кислоты. Векторы могут представлять собой, например, плазмиды, космиды, вирусы, РНК-вектор или линейную или кольцевую молекулу ДНК или РНК, которая может включать хромосомные, нехромосомные, полусинтетические или синтетические нуклеиновые кислоты. Иллюстративные векторы представляют собой векторы, способные к автономной репликации (эписомальный вектор) или экспрессии нуклеиновых кислот, с которыми они связаны (векторы экспрессии).

Вирусные векторы включают ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирус, вирусы с отрицательной цепью РНК, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, кори и Сендай), вирусы с положительной цепью РНК, такие как пикорнавирус и альфавирус, и вирусы с двухцепочечной ДНК, включая аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и поксвирус (например, коровьей оспы, птичьей оспы и оспы канареек). Другие вирусы включают, например, вирус Норуолк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают лейкоз-саркому птиц, вирусы С-типа, В-типа, D-типа млекопитающих, группу HTLV-BLV, лентивирус, спумавирус (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

«Лентивирусный вектор» в контексте настоящего документа означает лентивирусные векторы на основе ВИЧ для доставки генов, которые могут быть интегративными или неинтегративными, обладают относительно большой упаковочной способностью и могут трансдуцировать ряд различных типов клеток. Лентивирусные векторы обычно образуются после временной трансфекции трех (упаковочной, оболочечной и плазмиды переноса) или более плазмид в клетки-продуценты. Подобно ВИЧ, лентивирусные векторы проникают в клетку-мишень за счет взаимодействия гликопротеинов на поверхности вируса с рецепторами на поверхности клетки. После проникновения вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, которая опосредуется комплексом обратной транскриптазы вируса. Продукт обратной транскрипции представляет собой двухцепочечную линейную вирусную ДНК, которая является субстратом для интеграции вируса в ДНК инфицированных клеток.

Термин «функционально связанный» относится к ассоциации двух или более молекул нуклеиновой кислоты на одном фрагменте нуклеиновой кислоты, так что на функцию одной влияет другая. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, когда он способен влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т. е. кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора). «Несвязанный» означает, что ассоциированные генетические элементы не находятся в тесной связи друг с другом и функция одного не влияет на другой.

В контексте настоящего документа термин «вектор экспрессии» относится к конструкции ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, которая функционально

связана с подходящей контрольной последовательностью, способной осуществлять экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине. Такие контрольные последовательности включают промотор для осуществления транскрипции, необязательную последовательность оператора для контроля такой транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие сайты связывания рибосом на мРНК, и последовательности, которые контролируют завершение транскрипции и трансляции. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу, вирус или просто потенциальную геномную вставку. После введения в подходящего хозяина вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина или, в некоторых случаях, может интегрироваться в сам геном. В настоящем описании термины «плазмида», «плазмида экспрессии», «вирус» и «вектор» часто используются взаимозаменяемо.

Термин «экспрессия» в контексте настоящего документа относится к процессу, посредством которого продуцируется полипептид на основе последовательности нуклеиновой кислоты гена. Этот процесс включает как транскрипцию, так и трансляцию.

Термин «введенный» в контексте помещения последовательности нуклеиновой кислоты в клетку означает «трансфекцию», «трансформацию» или «трансдукцию» и охватывает включение последовательности нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, где молекула нуклеиновой кислоты может быть встроена в геном клетки (например, хромосомную, плазмидную, пластидную или митохондриальную ДНК), преобразована в автономный репликон или временно экспрессирована (например, трансфицированная мРНК).

В контексте настоящего документа «гетерологичная» или «экзогенная» молекула нуклеиновой кислоты, конструкция или последовательность относится к молекуле нуклеиновой кислоты или части молекулы нуклеиновой кислоты, которая не является нативной для клетки-хозяина, но может быть гомологичной молекуле нуклеиновой кислоты или части молекулы нуклеиновой кислоты из клетки-хозяина. Источником гетерологичной или экзогенной молекулы, конструкции или последовательности нуклеиновой кислоты может быть другой род или вид. В некоторых вариантах осуществления гетерологичную или экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты (т. е. не являющуюся эндогенной или нативной) добавляют к клетке-хозяину или геному хозяина, например, путем конъюгации, трансформации, трансфекции, электропорации и т. п., при этом добавленная молекула может интегрироваться в геном хозяина или существовать в виде внехромосомного генетического материала (например, в виде плазмиды или другой формы самореплицирующегося вектора) и может присутствовать во множестве копий.

Кроме того, «гетерологичный» относится к ненативному ферменту, белку или другой активности, кодируемой экзогенной молекулой нуклеиновой кислоты, введенной в клетку-хозяина, даже если клетка-хозяин кодирует гомологичный белок или активность. Более того, клетка, содержащая «модифицированный» или «гетерологичный» полинуклеотид или связывающий белок, включает потомство этой клетки, независимо от того, было ли само потомство трансдуцировано, трансфицировано или подвергнуто каким-либо иным манипуляциям или изменениям.

В контексте настоящего документа, более одной гетерологичной или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты может быть введено в клетку-хозяина в виде отдельных молекул нуклеиновой кислоты, в виде множества индивидуально контролируемых генов, в виде молекулы полицистронной нуклеиновой кислоты, в виде единственной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, или любой их комбинации. Например, как раскрыто в настоящем документе, клетка-хозяин может быть модифицирована для экспрессии двух или более гетерологичных или экзогенных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих желаемый TCR, специфичный к антигенному пептиду WT-1 (например, TCRα и TCRβ). Когда в клетку-хозяина вводят две или более экзогенных молекул нуклеиновой кислоты, подразумевается, что две или более экзогенных молекул нуклеиновой кислоты могут быть введены в виде одной молекулы нуклеиновой кислоты (например, в одном векторе), в отдельных векторах, интегрированных в хромосому хозяина в одном сайте или нескольких сайтах. Количество указанных гетерологичных молекул нуклеиновой кислоты или активностей белка относится к количеству кодирующих молекул нуклеиновой кислоты или количеству активностей белка, а не к количеству отдельных молекул нуклеиновой кислоты, введенных в клетку-хозяина. Экзогенные молекулы нуклеиновой кислоты (например, кодирующие связывающий белок или корецептор CD8 согласно настоящему изобретению) также могут быть введены в геном клетки-хозяина методами редактирования генов, например, с использованием системы CRISPR-Cas, мегануклеазы и т. п.

В контексте настоящего документа термин «эндогенный» или «нативный» относится к гену, белку или активности, которые в норме присутствуют в клетке-хозяине. Кроме того, ген, белок или активность, которые были мутированы, сверхэкспрессированы, перемешаны, дуплицированы или иным образом изменены по сравнению с исходным геном, белком или активностью, по-прежнему считаются эндогенными или нативными для этой конкретной клетки-хозяина. Например, эндогенная контрольная последовательность из первого гена (например, последовательности промотора, аттенюатора трансляции) может быть использована для изменения или регуляции

экспрессии второго нативного гена или молекулы нуклеиновой кислоты, при этом экспрессия или регуляция второго нативного гена или молекулы нуклеиновой кислоты отличается от нормальной экспрессии или регуляции в родительской клетке.

Термин «гомологичный» или «гомолог» относится к молекуле или активности, присутствующей в или полученной из клетки-, вида- или штамма-хозяина. Например, гетерологичная или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты может быть гомологична нативному гену клетки-хозяина и может необязательно иметь измененный уровень экспрессии, другую последовательность, измененную активность или любую их комбинацию.

«Идентичность последовательностей» в контексте настоящего документа относится к проценту аминокислотных остатков в одной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в другой эталонной полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Значения процента идентичности последовательностей могут быть получены с помощью программного обеспечения NCBI BLAST2.0, как определено Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, с установленными значениями параметров по умолчанию.

Как понимается в данной области техники, «сходство» между двумя полипептидами определяют путем сравнения аминокислотной последовательности и содержащихся в ней консервативных аминокислотных замен полипептида с последовательностью второго полипептида (например, с помощью GENEWORKS™, Align, ClustalTM, алгоритма BLAST и т. п.).

В контексте настоящего документа «гиперпролиферативное расстройство» относится к чрезмерному росту или пролиферации по сравнению с нормальной или не имеющей заболевания клеткой. Примеры гиперпролиферативных расстройств включают опухоли, раковые заболевания, неопластическую ткань, карциному, предраковые клетки, а также неопухолевые или доброкачественные гиперпролиферативные расстройства (например, аденому, фиброму, липому, лейомиому, гемангиому, рестеноз, а также аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, остеоартрит, псориаз, воспалительное заболевание кишечника или т. п.). Некоторые заболевания, связанные с патологическим или чрезмерным ростом, который происходит медленнее, чем в контексте гиперпролиферативного заболевания, могут называться «пролиферативными

заболеваниями» и включают отдельные опухоли, раковые заболевания, неопластическую ткань, карциному, саркому, злокачественные клетки, предраковые клетки, а также неопухолевые или доброкачественные расстройства.

Связывающие белки, специфичные к антигенным пептидам WT-1

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к связывающему белку, содержащему (a) вариабельный домен α-цепи (Vα) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3α) согласно любой из SEQ ID NO: 19, 22, 25 или 28 или ее вариант, и Vβ домен TCR; (b) Vβ домен TCR, содержащий аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3β) согласно любой из SEQ ID NO: 31, 34, 37 или 40 или ее вариант, и Vα домен TCR; или (c) Vα домен TCR согласно (a) и Vβ домен TCR согласно (b), где связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):человеческий лейкоцитарный антиген (HLA), где, необязательно, HLA включает HLA-A*0201.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 4,0, 4,5, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5 или выше.

В некоторых вариантах осуществления Vβ домен в (a), (b) или (c) содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 5-8 или 13-16, и/или Vα домен в (a), (b) или (c) содержит или состоит из любой аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-4 или 9-12.

В некоторых вариантах осуществления CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31, и CDR3α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 34, и CDR3α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, и CDR3α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40, и CDR3α

содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит Vα домен, содержащий CDR1α, CDR2α и CDR3α, и Vβ домен, содержащий CDR1β, CDR2β и CDR3β.

В некоторых вариантах осуществления Vβ домен содержит аминокислотную последовательность CDR1β согласно любой из SEQ ID NO: 29, 32, 35 или 38 или ее вариант, и/или аминокислотную последовательность CDR2β согласно любой из SEQ ID NO: 30, 33, 36 или 39 или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления Vα домен содержит аминокислотную последовательность CDR1α согласно любой из SEQ ID NO: 17, 20, 23 или 26, или ее вариант, и/или аминокислотную последовательность CDR2α согласно любой из SEQ ID NO: 18, 21, 24 или 27 или ее вариант.

В частных вариантах осуществления Vα и Vβ домены TCR содержат, соответственно, CDR1α, CDR2α, CDR3α и CDR1β, CDR2β, CDR3β и аминокислотные последовательности: (i) SEQ ID NO: 26-28 и 38-40, соответственно; (ii) SEQ ID NO: 23, 27, 28 и 38-40, соответственно; (iii) SEQ ID NO: 17-19 и 29-31, соответственно; (iv) SEQ ID NO: 20-22 и 32-34, соответственно; или (v) SEQ ID NO: 23-25 и 35-37, соответственно.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления связывающий белок связывается с комплексом пептид WT-1:HLA-A*201. В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления связывающий белок способен связываться с комплексом пептид WT-1:HLA на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок, как описано в настоящем документе, включает вариантные полипептидные молекулы, имеющие одну или более аминокислотных замен, вставок или делеций в аминокислотной последовательности относительно последовательностей SEQ ID NO: 1-61, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой или включает консервативную замену. Консервативные замены аминокислот хорошо известны и могут встречаться в природе или могут быть введены, когда связывающий белок получают рекомбинантным путем. Аминокислотные замены, делеции и добавления могут быть введены в белок с использованием методов мутагенеза, известных в данной области техники (см., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001). Олигонуклеотид-направленные методы сайт-специфического (или сегмент-специфического) мутагенеза могут быть использованы для получения измененного полинуклеотида, определенные кодоны в котором изменены в соответствии с требуемой заменой, делецией или вставкой.

В качестве альтернативы, для получения иммуногенных вариантов полипептидов могут быть использованы методики случайного или насыщающего мутагенеза, такие как аланин-сканирующий мутагенез, мутагенез с помощью подверженной ошибкам полимеразной цепной реакции и олигонуклеотид-направленный мутагенез (см., например, Sambrook et al., цитируемый выше).

В некоторых вариантах осуществления молекулы (или варианты) конкретного связывающего белка, специфичного к WT-1, могут включать белок, обладающий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью аминокислотной последовательности любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 1-61).

В некоторых вариантах осуществления предложен связывающий белок, который содержит Vβ домен, обладающий по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-4 или 9-12, и/или Vα домен, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 5-8 или 13-16, где связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA. В дополнительных вариантах осуществления любая одна или более из аминокислотных последовательностей β или α CDR, как предложено в настоящем документе, могут присутствовать в Vβ домене и/или Vα домене, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит Vβ домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью любой из SEQ ID NO: 5-8 или 13-16, и/или Vα домен, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью любой из SEQ ID NO: 1-4 или 9-12, при условии, что (a) по меньшей мере три или четыре CDR не имеют мутаций, (b) CDR, которые имеют мутации, имеют только до двух аминокислотных замен, делецию до пяти аминокислот подряд или их комбинацию, и (c) связывающий белок сохраняет свою способность связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA, необязательно со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 4,0, 4,5, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5 или выше.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит вариабельный домен TCR, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую аллелем V, D и/или J человеческого TCR. В качестве пояснения, во время

развития лимфоцитов экзоны Vα собираются из различных вариабельных и соединительных генных сегментов (V-J), и экзоны Vβ собираются из различных вариабельных, обеспечивающих разнообразие и соединительных генных сегментов (V-D-J). Хромосомный локус TCRα имеет от 70 до 80 вариабельных генных сегментов и 61 соединительный генный сегмент. Хромосомный локус TCRβ имеет 52 вариабельных генных сегмента и два отдельных кластера, каждый из которых содержит один обеспечивающий разнообразие генный сегмент вместе с шестью или семью соединительными генными сегментами. Функциональные экзоны генов Vα и Vβ образуются путем рекомбинации вариабельного генного сегмента с соединительным генным сегментом для Vα, и вариабельного генного сегмента с обеспечивающим разнообразие генным сегментом и соединительным генным сегментом для Vβ. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности, соответствующие генным сегментам TCR различных аллелей, известны в данной области техники, и с ними можно ознакомиться на веб-сайте ImMunoGeneTics; например, по ссылке imgt.org/IMGTrepertoire/LocusGenes/listIG_TR/TR/human/Hu_TRgroup.html.

Понятно, что, хотя полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, может содержать ту же нуклеотидную последовательность, соответствующую генному сегменту TCR, как раскрыто в настоящем документе, в контексте настоящего изобретения может быть использована любая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность генного сегмента.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит Vβ домен, содержащий (i) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBJ02-03; и/или (ii) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV06-05, аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV07-09, или аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV20-01. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит Vα домен, содержащий (i) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAJ43; и/или (ii) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV20-02; аминокислотную последовательность, кодируемую генным сегментом TRAV38DV08; или аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV38-01. В связанных вариантах осуществления Vβ домен содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBJ02-03, и Vα домен содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAJ43; Vβ домен содержит аминокислотную последовательность, соответствующую

генному сегменту TRBV06-05, и Vα домен содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV20-02; Vβ домен содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV07-09, и Vα домен содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV38DV08; или Vβ домен содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV20-01, и Vα домен содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV38-01.

В вышеупомянутых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, соответствующая генному сегменту TRA или TRB, имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 аминокислот, включая длину, равную любому количеству аминокислот между этими иллюстративными длинами (например, 11, 12, 13, 14 аминокислот и т. п.).

В некоторых вариантах осуществления предложен связывающий белок, способный связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA, где связывающий белок содержит Vα домен TCR и Vβ домен TCR. В некоторых вариантах осуществления Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или 9, и Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или 13. В некоторых вариантах осуществления Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 или 10, и Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6 или 14. В некоторых вариантах осуществления Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3 или 11, и Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7 или 15. В некоторых вариантах осуществления Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4 или 12, и Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8 или 16.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления связывающий белок может содержать константный домен α-цепи (Cα) или его фрагмент, и/или константный домен β-цепи (Cβ) или его фрагмент или часть. В некоторых вариантах осуществления Cα содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99% или 100%) идентичностью последовательности любой из SEQ ID NO: 41-44. В некоторых вариантах осуществления Cβ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 45.

В дополнительных вариантах осуществления Cβ TCR содержит аминокислоту цистеин вместо нативного серина в аминокислотном положении 57 (например, GV(S→C)TD), и Cα TCR содержит аминокислоту цистеин вместо нативного треонина в аминокислотном положении 48 (например, DK(T→C)VL; см., например, Cohen et al., Cancer Res. 67(8):3898-3903 (2007)).

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR), химерный антигенный рецептор или антигенсвязывающий фрагмент TCR, любой из которых может быть химерным, гуманизированным или человеческим. В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит одноцепочечный TCR (scTCR) или химерный антигенный рецептор (CAR).

«Химерный антигенный рецептор» (CAR) относится к слитому белку, сконструированному так, чтобы он содержал две или более встречающихся в природе аминокислотных последовательностей, связанных вместе таким образом, который не встречается в природе или не встречается в природе в клетке-хозяине, причем такой слитый белок может действовать в качестве рецептора, когда он присутствует на клеточной поверхности. CAR могут содержать внеклеточную часть, содержащую антигенсвязывающий домен (т. е. полученный или происходящий от иммуноглобулина или иммуноглобулиноподобной молекулы, например, TCR-связывающий домен, происходящий или полученный от TCR, специфичного к раковому антигену, scFv, происходящий или полученный от антитела, или антигенсвязывающий домен, происходящий или полученный от иммунорецептора-киллера из NK-клетки), связанный с трансмембранным доменом и одним или более внутриклеточными сигнальными доменами (необязательно содержащими костимулирующий домен(ы)) (см., например, Sadelain et al., Cancer Discov., 3(4):388 (2013); см. также Harris and Kranz, Trends Pharmacol. Sci., 37(3):220 (2016), Stone et al., Cancer Immunol. Immunother., 63(11):1163 (2014), и Walseng et al., Scientific Reports 7:10713 (2017), где перечисленные конструкции CAR и способы их получения включены в настоящий документ посредством ссылки). CAR согласно настоящему изобретению, которые специфически связываются с антигеном WT-1 (например, в контексте комплекса пептид:HLA), содержат Vα домен и Vβ домен TCR или их функциональный фрагмент или часть.

В некоторых вариантах осуществления WT-1-специфичный связывающий белок представляет собой TCR. В связанных вариантах осуществления связывающий белок (a) содержит α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50 или 46, и β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 58 или 54; (b) содержит α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 51 или 47, и β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 59 или 55; (c) содержит α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 52 или 48, и β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 60 или 56; или (d) содержит α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53 или 49, и β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 61 или 57.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит слитый белок, содержащий (i) внеклеточный компонент, содержащий связывающий домен, который содержит вариабельный домен α-цепи (Vα) Т-клеточного рецептора (TCR) и вариабельный домен β-цепи (Vβ) Т-клеточного рецептора (TCR), где Vα домен содержит аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3α) согласно любой из SEQ ID NO: 19, 22, 25 или 28 или ее вариант, и Vβ домен TCR содержит аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3β) согласно любой из SEQ ID NO: 31, 34, 37 или 40 или ее вариант; (ii) внутриклеточный компонент и (iii) трансмембранный компонент, расположенный между внеклеточным компонентом и внутриклеточным компонентом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок представляет собой CAR.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит слитый белок, содержащий (i) внеклеточный компонент, содержащий связывающий домен, который специфически связывается с комплексом пептид RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA, где связывающий домен содержит вариабельный домен α-цепи (Vα) Т-клеточного рецептора (TCR) и вариабельный домен β-цепи (Vβ) Т-клеточного рецептора

(TCR), где Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью любой из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11 или 12 или ее варианта, и Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью любой из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15 или 16 или ее варианта, необязательно при условии, что: (a) по меньшей мере три или четыре CDR не имеют мутаций, (b) CDR, которые имеют мутации, имеют только до двух аминокислотных замен, делецию до пяти аминокислот подряд или их комбинацию; и (c) слитый белок сохраняет свою способность связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA; (ii) внутриклеточный компонент и (iii) трансмембранный компонент, расположенный между внеклеточным компонентом и внутриклеточным компонентом.

Следует исходить из того, что любой из раскрытых в настоящем документе связывающих доменов, включая иллюстративные последовательности CDR и вариабельные домены и их варианты, может быть включен в слитый белок согласно настоящему изобретению.

В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, кодируемый полипептид согласно настоящему изобретению может содержать «сигнальный пептид» (также известный как лидерная последовательность, лидерный пептид или транзитный пептид). Сигнальные пептиды нацеливают новые синтезированные полипептиды на их соответствующую локализацию внутри или вне клетки. Аминокислотные последовательности иллюстративных белков или полипептидов согласно настоящему изобретению, которые содержат сигнальный пептид, представлены, например, в SEQ ID NO: 1-8, 46-49 и 54-57. Сигнальный пептид может быть удален из полипептида во время или после завершения локализации или секреции. Полипептиды, которые имеют сигнальный пептид, называются в настоящем документе «белком-предшественником», а полипептиды, у которых удален сигнальный пептид, называются в настоящем документе «зрелыми» белками или полипептидами. В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления связывающий белок или слитый белок содержит или является зрелым белком, или представляет собой или содержит белок-предшественник. Аминокислотные последовательности иллюстративных зрелых белков или полипептидов согласно настоящему изобретению представлены в SEQ ID NO: 9-16, 50-53 и 58-61.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок согласно настоящему изобретению содержит одну или более соединительных аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит линкер. В

некоторых вариантах осуществления линкер состоит из от приблизительно двух до приблизительно 35 аминокислот, например, или от приблизительно четырех до приблизительно 20 аминокислот, или от приблизительно восьми до приблизительно 15 аминокислот, или от приблизительно 15 до приблизительно 25 аминокислот. Иллюстративные линкеры включают глицин-сериновые линкеры (например, SEQ ID NO: 95 и 96).

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая WT-специфичный связывающий белок согласно любому из вышеупомянутых вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления WT-1-специфичный связывающий белок представлен в растворимой форме (см., например, Walseng et al., PLoS One doi:10.1371/journal.pone.0119559 (2015)) и может быть необязательно конъюгирован с цитотоксическим агентом и/или детектируемым агентом. Способы, пригодные для выделения и очистки рекомбинантно полученного растворимого TCR, в качестве примера, могут включать получение супернатантов из подходящих систем клетка-хозяин/вектор, которые секретируют рекомбинантный растворимый TCR в культуральные среды, а затем концентрирование сред с применением коммерчески доступного фильтра. После концентрирования концентрат может быть нанесен на единственную подходящую очищающую матрицу или на ряд подходящих матриц, таких как аффинная матрица или ионообменная смола. Одна или более стадий обращенно-фазовой ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) могут применяться для дополнительной очистки рекомбинантного полипептида. Такие способы очистки также можно применять при выделении иммуногена из его естественной среды. Способы крупномасштабного производства одного или более выделенных/рекомбинантных растворимых TCR, описанных в настоящем документе, включают периодическую клеточную культуру, которую отслеживают и контролируют для поддержания соответствующих условий культивирования. Очистку растворимого TCR можно проводить в соответствии со способами, описанными в настоящем документе и известными в данной области техники, и которые соответствуют законам и руководствам национальных и зарубежных регулирующих органов.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие WT-1-специфичный связывающий белок, используют для трансфекции/трансдукции клетки-хозяина (например, Т-клеток) для применения в терапии адоптивного переноса. В уровне техники описаны достижения в секвенировании TCR (например, Robins et al., 2009 Blood 114:4099; Robins et al., 2010 Sci. Translat. Med.

2:47ra64, PMID: 20811043; Robins et al. 2011 (Sept. 10) J. Imm. Meth. Epub ahead of print, PMID: 21945395; Warren et al., 2011 Genome Res. 21:790), и их можно применять при практической реализации вариантов осуществления согласно настоящему изобретению. Точно так же были описаны способы трансфекции/трансдукции Т-клеток желаемыми нуклеиновыми кислотами (например, US 2004/0087025), а также методы адоптивного переноса с применением Т-клеток с желаемой антигенной специфичностью (например, Schmitt et al., Hum. Gen. 20:1240, 2009; Dossett et al., Mol. Ther. 17:742, 2009; Till et al., Blood 112:2261, 2008; Wang et al., Hum. Gene Ther. 18:712, 2007; Kuball et al., Blood 109:2331, 2007; US 2011/0243972; US2011/0189141; Leen et al., Ann. Rev. Immunol. 25:243, 2007), таким образом предполагается адаптация указанных методов к раскрытым в настоящем документе вариантам осуществления, на основе сведений, приведенных в настоящем документе, включая относящиеся к TCR с повышенной аффинностью, специфичным к пептидному антигену WT-1 RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94) в комплексе с HLA.

В некоторых вариантах осуществления WT-1-специфичные связывающие белки или домены, как описано в настоящем документе, могут экспрессироваться Т-клеткой-хозяином и могут быть функционально охарактеризованы в соответствии с любой из большого числа принятых в данной области техники методик анализа активности Т-клеток, включая определение связывания, активации или индукции Т-клеток, а также определение Т-клеточных ответов, которые являются антигенспецифическими. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок способен стимулировать антигенспецифический Т-клеточный ответ против человеческого WT-1 рестриктированным HLA I класса образом. В дополнительных вариантах осуществления ответ, рестриктированный HLA I класса, является независимым от транспортера, связанного с процессингом антигена (TAP). В некоторых вариантах осуществления антигенспецифический Т-клеточный ответ включает по меньшей мере один из ответа $CD4^+$ Т-хелперных лимфоцитов (Th) и ответа $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). В связанных вариантах осуществления ответ CTL направлен против сверхэкспрессирующей WT-1 клетки. Дополнительные примеры методик анализа активности Т-клеток включают определение пролиферации Т-клеток, высвобождения цитокинов Т-клетками, антигенспецифической стимуляции Т-клеток, MHC-рестриктированной стимуляции Т-клеток, активности CTL (например, путем обнаружения высвобождения ^{51}Cr из предварительно загруженных клеток-мишеней), изменений экспрессии фенотипического маркера Т-клеток и другие показатели функций Т-клеток. Процедуры проведения указанных и подобных им анализов можно найти, например, в

Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998). См. также Current Protocols in Immunology; Weir, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986); Mishell and Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979); Green and Reed, Science 281:1309 (1998) и цитируемые в них источники).

«Окрашивание тетрамера MHC-пептид» относится к анализу, используемому для обнаружения антигенспецифических Т-клеток, которые содержат тетрамер молекул MHC, каждая из которых содержит идентичный пептид, имеющий аминокислотную последовательность, родственную (например, идентичную или схожую с) по меньшей мере одному антигену (например, WT-1), при этом комплекс способен связывать Т-клеточные рецепторы, специфичные к родственному антигену. Каждая из молекул MHC может быть помечена молекулой биотина. Биотинилированные MHC/пептиды тетрамеризуются добавлением стрептавидина, который может быть помечен флуоресцентной меткой. Тетрамер может быть обнаружен с помощью проточной цитометрии по флуоресцентной метке. В некоторых вариантах осуществления анализ тетрамера MHC-пептид применяют для обнаружения или отбора TCR с повышенной аффинностью согласно настоящему изобретению.

Уровни цитокинов можно определять в соответствии со способами, описанными в настоящем документе и применяемыми на практике в данной области техники, включая, например, ELISA, ELISPOT, внутриклеточное окрашивание цитокинов, проточную цитометрию и их комбинации (например, внутриклеточное окрашивание цитокинов и проточную цитометрию). Пролиферацию иммунных клеток и клональную экспансию в результате антигенспецифической активации или стимуляции иммунного ответа можно определить путем выделения лимфоцитов, таких как циркулирующие лимфоциты в образцах клеток периферической крови или клеток из лимфатических узлов, стимуляции клеток антигеном и измерения продукции цитокинов, пролиферации клеток и/или жизнеспособности клеток, например, путем включения меченного тритием тимидина или нерадиоактивных анализов, таких как MTT-тест и т.п. Влияние иммуногена, описанного в настоящем документе, на баланс между иммунным ответом Th1 и иммунным ответом Th2 может быть исследовано, например, путем определения уровней цитокинов Th1, таких как IFN-γ, IL-12, IL-2 и TNF-β, и цитокинов типа 2, таких как IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 и IL-13.

Полинуклеотиды и векторы

Также предложены полинуклеотиды (например, выделенные полинуклеотиды), кодирующие связывающий белок или его фрагмент или часть согласно настоящему изобретению. Выделенные или рекомбинантные полинуклеотиды, кодирующие

связывающие белки, специфичные к WT-1, как описано в настоящем документе, могут быть продуцированы и получены в соответствии с различными способами и методиками в области молекулярной биологии или очистки полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является кодон-оптимизированным для эффективной экспрессии в клетке-хозяине-мишени. Оптимизация по кодонам может быть выполнена с применением известных способов и инструментов, например, с помощью инструмента GenScript® OptimumGene™; GeneArt® GeneOptimizer™(Sigma) и т. п. Кодон-оптимизированные последовательности включают частично кодон-оптимизированные последовательности (т. е. по меньшей мере один кодон оптимизирован для экспрессии в клетке-хозяине) и полностью кодон-оптимизированные последовательности. Оптимизация по кодонам для экспрессии в определенных иммунных клетках-хозяевах описана, например, в Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135, 2006.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, полинуклеотид может относиться к одноцепочечной или двухцепочечной ДНК, кДНК или РНК в любой форме и может включать положительную и отрицательную цепи нуклеиновой кислоты, комплементарные друг другу, включая антисмысловую ДНК, кДНК и РНК. Также включены миРНК, микроРНК, гибриды РНК-ДНК, рибозимы и другие различные встречающиеся в природе или синтетические формы ДНК или РНК.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий связывающий белок согласно настоящему изобретению, содержит полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью (например, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 62-81.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержит (i) полинуклеотид, кодирующий цепь TCRβ, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 74, и полинуклеотид, кодирующий цепь TCRα, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66; (ii) полинуклеотид, кодирующий цепь TCRβ, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 75, и полинуклеотид, кодирующий цепь TCRα, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 67; (iii) полинуклеотид, кодирующий цепь TCRβ, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76,

и полинуклеотид, кодирующий цепь TCRα, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 68; или (iv) полинуклеотид, кодирующий цепь TCRβ, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 77, и полинуклеотид, кодирующий цепь TCRα, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления один полинуклеотид кодирует связывающий белок, как описано в настоящем документе, или, в качестве альтернативы, связывающий белок может кодироваться более чем одним полинуклеотидом. Другими словами, компоненты или части связывающего белка могут кодироваться двумя или более полинуклеотидами, которые могут содержаться в одной молекуле нуклеиновой кислоты или могут содержаться в двух или более молекулах нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий два или более компонентов или частей связывающего белка согласно настоящему изобретению, содержит две или более кодирующих последовательностей, функционально связанных в одной открытой рамке считывания. Такое расположение может преимущественно обеспечивать скоординированную экспрессию желаемых продуктов генов, например, одновременную экспрессию альфа- и бета-цепей TCR, так что они продуцируются в соотношении приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления два или более продукта гена-заместителя связывающего белка согласно настоящему изобретению, например, TCR (например, альфа- и бета-цепи) или CAR, экспрессируются как отдельные молекулы и связываются посттрансляционно. В дополнительных вариантах осуществления два или более продукта гена-заместителя связывающего белка согласно настоящему изобретению экспрессируются как один полипептид, части которого разделены расщепляемым или удаляемым сегментом. Например, саморасщепляющиеся пептиды, пригодные для экспрессии разделяемых полипептидов, кодируемых одним полинуклеотидом или вектором, известны в данной области техники и включают, например, пептид 2A свиного тешовируса-1 (P2A-1), пептид 2A свиного тешовируса-2 (P2A-2), пептид 2A вируса Thosea asigna (T2A), пептид 2A вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A) и пептид 2A вируса ящура (F2A). Иллюстративные нуклеотидные и аминокислотные последовательности саморасщепляющихся пептидов представлены в SEQ ID NO: 84-93. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 89-93. В

некоторых вариантах осуществления кодируемый саморасщепляющийся пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 84-88.

Следует исходить из того, что различные комбинации полинуклеотидов, кодирующих два представляющих интерес полипептида, разделенных саморасщепляющимся пептидом (например, кодирующий β-цепь полинуклеотид-саморасщепляющийся пептид-кодирующий α-цепь полинуклеотид; кодирующий α-цепь полинуклеотид-саморасщепляющийся пептид-кодирующий β-цепь полинуклеотид).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, имеет структуру, содержащую или имеющую, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, (кодирующий домен TCRβ (например, цепь) полинуклеотид)-(кодирующий саморасщепляющийся пептид полинуклеотид)-(кодирующий домен TCRα (например, цепь) полинуклеотид).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 78-81. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит полинуклеотидную последовательность, содержащую или состоящую из полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 78-81.

В дополнительных аспектах предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA и содержит Vα домен TCR и Vβ домен TCR, которые содержат: (i) аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37 или 40; (ii) аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35 или 38; (iii) аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 или 39; (iv) аминокислотную последовательность, содержащую, состоящую из или обладающую по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-4 или 9-12; (v) аминокислотную последовательность, содержащую, состоящую из или обладающую по

меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 5-8 или 13-16; (vi) аминокислотную последовательность, содержащую, состоящую из или обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 46-53; (vii) аминокислотную последовательность, содержащую, состоящую из или обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 54-61; или (viii) любую комбинацию (i)-(vii).

В дополнительных вариантах осуществления кодируемый связывающий белок экспрессируется как часть трансгенной конструкции, которая кодирует, и/или модифицированная иммунная клетка может кодировать: один или более дополнительных акцессорных белков, таких как белок-предохранитель; метка, маркер отбора; β-цепь корецептора CD8; α-цепь корецептора CD8 или обе цепи; или любую их комбинацию. Полинуклеотиды и трансгенные конструкции, пригодные для кодирования и экспрессии связывающих белков и акцессорных компонентов (например, одного или более из белков-предохранителей, маркеров отбора, β-цепи корецептора CD8 или α-цепи корецептора CD8), описаны в публикации PCT заявки WO 2018/058002, описанные в которой полинуклеотиды, трансгенные конструкции и акцессорные компоненты, включая их нуклеотидные и аминокислотные последовательности, настоящим включены посредством ссылки. Специалисту в данной области техники будет ясно, что любой или все связывающие белки согласно настоящему изобретению, белок-предохранитель, метка, маркер отбора, β-цепь корецептора CD8 или α-цепь корецептора CD8 могут кодироваться одной молекулой нуклеиновой кислоты или могут кодироваться полинуклеотидными последовательностями, которые представляют собой или присутствуют на отдельных молекулах нуклеиновых кислот.

Иллюстративные белки-предохранители включают, например, усеченный полипептид рецептора EGF (huEGFRt), который лишен внеклеточных N-концевых лигандсвязывающих доменов и активности внутриклеточной рецепторной тирозинкиназы, но который сохраняет свою нативную аминокислотную последовательность, имеет трансмембранный тип I локализации на клеточной поверхности и имеет конформационно интактный связывающий эпитоп для моноклонального антитела против EGFR фармацевтической категории, рецептор цетуксимаба (Erbitux) tEGF (tEGFr; Wang et al., Blood 118: 1255-1263, 2011); полипептид каспазы (например, iCasp9; Straathof et al., Blood 105:4247-4254, 2005; Di Stasi et al., N. Engl. J. Med. 365:1673-1683, 2011; Zhou and Brenner, Exp. Hematol. pii:S0301-472X(16)30513-6. doi:10.1016/j.exphem.2016.07.011), RQR8 (Philip et al., Blood 124:1277-1287, 2014); метку из 10 аминокислот, происходящую из

человеческого белка c-myc (Myc) (Kieback et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:623-628, 2008); и полипептид маркера/предохранителя, такой как RQR (CD20 + CD34; Philip et al., 2014).

Другие акцессорные компоненты, подходящие для модифицированных иммунных клеток согласно настоящему изобретению, включают метку или маркер отбора, который позволяет идентифицировать, сортировать, выделять, обогащать или отслеживать клетки. Например, меченые иммунные клетки, имеющие желаемые характеристики (например, антигенспецифический TCR и белок-предохранитель), можно отсортировать от немаркированных клеток в образце и более эффективно активировать и размножить для включения в продукт желаемой чистоты.

В контексте настоящего документа термин «маркер отбора» включает конструкцию нуклеиновой кислоты (и кодируемый продукт гена), который придает идентифицируемое изменение клетке, позволяющее обнаруживать и проводить позитивный отбор иммунных клеток, трансдуцированных полинуклеотидом, содержащим маркер отбора. RQR представляет собой маркер отбора, содержащий большую внеклеточную петлю CD20 и два минимальных сайта связывания CD34. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий RQR, включает полинуклеотид, который кодирует минимальный эпитоп CD34 из 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления минимальный эпитоп CD34 включен в аминоконцевое положение стеблевого домена корецептора CD8 (Q8). В дополнительных вариантах осуществления последовательность минимального сайта связывания CD34 может быть объединена с целевым эпитопом для CD20 с образованием компактного маркерного/«суицидального» гена для Т-клеток (RQR8) (Philip et al., 2014, включена в настоящее описание посредством ссылки). Такая конструкция позволяет осуществлять отбор иммунных клеток, экспрессирующих указанную конструкцию, например, с помощью CD34-специфичного антитела, связанного с магнитными гранулами (Miltenyi), для которого применяют клинически приемлемое фармацевтическое антитело ритуксимаб, позволяющее осуществлять селективную делецию трансгена, экспрессирующего сконструированные Т-клетки (Philip et al., 2014).

Дополнительные иллюстративные маркеры отбора также включают несколько усеченных трансмембранных белков I типа, в норме не экспрессируемых на Т-клетках: усеченный низкоаффинный фактор роста нервов, усеченный CD19 и усеченный CD34 (см., например, Di Stasi et al., N. Engl. J. Med. 365:1673-1683, 2011; Mavilio et al., Blood 83:1988-1997, 1994; Fehse et al., Mol. Ther. 1:448-456, 2000; содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Полезным признаком

CD19 и CD34 является наличие готовой к применению системы отбора Miltenyi CliniMACs™, которая может нацеливать данные маркеры для сортировки клинического уровня. Однако CD19 и CD34 представляют собой относительно большие поверхностные белки, которые могут влиять на способность упаковки вектора и эффективность транскрипции интегрирующего вектора. Также можно применять поверхностные маркеры, содержащие внеклеточные несигнальные домены или различные белки (например, CD19, CD34, LNGFR). Можно применять любой маркер отбора, и он должен соответствовать нормам надлежащей производственной практики. В некоторых вариантах осуществления маркеры отбора экспрессируются с полинуклеотидом, который кодирует продукт гена, представляющий интерес (например, связывающий белок согласно настоящему изобретению, такой как TCR или CAR). Дополнительные примеры маркеров отбора включают, например, репортеры, такие как GFP, EGFP, β-gal или хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT). В некоторых вариантах осуществления маркер отбора, такой как, например, CD34, экспрессируется клеткой, и CD34 можно применять для отбора для обогащения или выделения (например, иммуномагнитного разделения) трансдуцированных клеток, представляющих интерес, для применения в способах согласно настоящему изобретению. В контексте настоящего документа маркер CD34 отличается от антитела против CD34 или, например, scFv, TCR или другого антигенраспознающего фрагмента, который связывается с CD34.

В некоторых вариантах осуществления маркер отбора содержит полипептид RQR, низкоаффинный усеченный фактор роста нервов (tNGFR), усеченный CD19 (tCD19), усеченный CD34 (tCD34) или любую их комбинацию.

В качестве пояснения, включение $CD4^+$ Т-клеток в клеточный продукт для иммунотерапии может обеспечить антиген-индуцированную секрецию IL-2 и увеличить персистенцию и функцию введенных цитотоксических $CD8^+$ Т-клеток (см., например, Kennedy et al., Immunol. Rev. 222:129 (2008); Nakanishi et al., Nature 462(7272):510 (2009)). В определенных обстоятельствах рестриктированный I классом TCR в $CD4^+$ Т-клетках может потребовать переноса корецептора CD8 для повышения чувствительности TCR к комплексам HLA I класса с пептидом. Корецепторы CD4 отличаются по структуре от CD8, и было показано, что они являются неэффективными заменителями корецепторов CD8 (см., например, Stone & Kranz, Front. Immunol. 4:244 (2013); см. также Cole et al., Immunology 137(2):139 (2012). Таким образом, другой акцессорный белок для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению содержит корецептор CD8 или его компонент.

Сконструированные иммунные клетки, содержащие гетерологичный

полинуклеотид, кодирующий связывающий белок согласно настоящему изобретению, могут, в некоторых вариантах осуществления, дополнительно содержать гетерологичный полинуклеотид, кодирующий корецепторный белок CD8, или компонент его бета-цепи или альфа-цепи.

Кодируемый корецептор CD8 включает, в некоторых вариантах осуществления, α-цепь или ее фрагмент или вариант. Аминокислотная последовательность предшественника α-цепи человеческого корецептора CD8 известна и представлена, например, в UniProtKB –P30433 (см. также UniProtKB – P31783; -P10732; и -P10731).

Кодируемый корецептор CD8 включает, в некоторых вариантах осуществления, β-цепь или ее фрагмент или вариант. Аминокислотная последовательность предшественника β-цепи человеческого корецептора CD8 известна и представлена, например, в UniProtKB –P10966 (см. также UniProtKB – Q9UQ56; -E9PD41; Q8TD28; и -P30434; и -P05541).

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что расстояние от поверхности клетки-хозяина важно для того, чтобы полипептиды RQR функционировали в качестве маркеров отбора/предохранителей (Philip et al., 2010 (см. выше)). В некоторых вариантах осуществления кодируемый полипептид RQR содержится в β-цепи, α-цепи или в обеих цепях, или в фрагменте или варианте одной или обеих цепей, кодируемого корецептора CD8. В конкретных вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий iCasp9, и гетерологичный полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный корецепторный белок CD8, который содержит β-цепь, содержащую полипептид RQR, и дополнительно содержит α-цепь CD8.

Выделенный полинуклеотид согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать полинуклеотид, кодирующий белок-предохранитель, маркер отбора, бета-цепь корецептора CD8 или альфа-цепь корецептора CD8, как раскрыто в настоящем документе, или может содержать полинуклеотид, кодирующий любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка согласно настоящему изобретению дополнительно содержит: (i) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит внеклеточную часть α-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит α-цепь корецептора CD8; (ii) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит внеклеточную часть β-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит β-цепь корецептора CD8; или (iii) полинуклеотид согласно (i) и полинуклеотид согласно (ii), где,

необязательно, клетка-хозяин включает CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или и то, и другое.

В дополнительных вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка содержит: (a) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть α-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит α-цепь корецептора CD8; (b) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть β-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит β-цепь корецептора CD8; и (c) полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом согласно (a) и полинуклеотидом согласно (b).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий маркер отбора.

Могут быть использованы стандартные методики для синтеза рекомбинантной ДНК, пептида и олигонуклеотида, иммуноанализов и культивирования ткани и трансформации (например, электропорации и липофекции). Ферментативные реакции и способы очистки могут быть выполнены в соответствии с рекомендациями производителя или в соответствии с обычными способами, применяемыми в данной области техники, или описанными в настоящем документе. Эти и родственные методы и процедуры могут быть, как правило, выполнены в соответствии с обычными методами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных источниках по микробиологии, молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетике, клеточной биологии, вирусологии и иммунологии, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. См., например, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, updated July 2008); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985); Current Protocols in Immunology (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); Real-Time PCR: Current Technology and Applications, Edited by Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK; Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press, New York, 1991); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, Ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985); Transcription and

Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, Ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Next-Generation Genome Sequencing (Janitz, 2008 Wiley-VCH); PCR Protocols (Methods in Molecular Biology) (Park, Ed., 3rd Edition, 2010 Humana Press); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir andCC Blackwell, eds., 1986); Roitt, Essential Immunology, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2002); Embryonic Stem Cell Protocols: Volume I: Isolation and Characterization (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006); Embryonic Stem Cell Protocols: Volume II: Differentiation Models (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006); Human Embryonic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kursad Turksen Ed., 2006); Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, and Bruce A. Bunnell Eds., 2008); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Medicine) (Christopher A. Klug, and Craig T. Jordan Eds., 2001); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kevin D. Bunting Ed., 2008) Neural Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Leslie P. Weiner Ed., 2008).

Некоторые варианты осуществления включают полинуклеотид, содержащийся в векторе. Специалист в данной области техники может легко определить подходящие векторы для применения в отдельных вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе. Типичный вектор может содержать полинуклеотид, способный транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой он связан, или который способен реплицироваться в организме хозяина. Некоторые примеры векторов включают плазмиды, вирусные векторы, космиды и другие. Некоторые векторы могут быть способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих), тогда как другие векторы могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяин и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. В соответствии со связанными вариантами осуществления также следует исходить из того, что, если один

или более агентов (например, полинуклеотиды, кодирующие связывающие белки, специфичные к WT-1, или их варианты) совместно вводят субъекту, то каждый агент может находиться в отдельных или одном и том же векторе, и множество векторов (каждый из которых содержит другой агент или один и тот же агент) могут быть введены в клетку или популяцию клеток, или введены субъекту.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть функционально связаны с определенными элементами вектора. Например, полинуклеотидные последовательности, необходимые для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы, могут быть функционально связаны. Последовательности контроля экспрессии могут включать подходящие последовательности инициации, терминации, промотора и энхансера транскрипции; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т. е. консенсусные последовательности Козака); последовательности, повышающие стабильность белка; и, необязательно, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Последовательности контроля экспрессии могут быть функционально связаны, если они являются смежными с геном, представляющим интерес, и последовательностями контроля экспрессии, которые являются транс-активными или оказывают действие на расстоянии, чтобы контролировать ген, представляющий интерес.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает плазмидный вектор или вирусный вектор (например, вектор, выбранный из лентивирусного вектора или γ-ретровирусного вектора). Вирусные векторы включают ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирус, вирусы с отрицательной цепью РНК, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, кори и Сендай), вирусы с положительной цепью РНК, такие как пикорнавирус и альфавирус, и вирусы с двухцепочечной ДНК, включая аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и поксвирус (например, коровьей оспы, птичьей оспы и оспы канареек). Другие вирусы включают, например, вирус Норуолк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают лейкоз-саркому птиц, вирусы С-типа, В-типа, D-типа млекопитающих, группу HTLV-BLV, лентивирус и спумавирус (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia,

1996).

«Ретровирусы» представляют собой вирусы, имеющие РНК-геном, который подвергается обратной транскрипции в ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы, после чего обратно транскрибированная ДНК встраивается в геном клетки-хозяина. «Гаммаретровирус» относится к роду семейства Ретровирусы. Примеры гаммаретровирусов включают вирус стволовых клеток мыши, вирус лейкоза мышей, вирус лейкоза кошачьих, вирус саркомы кошачьих и вирусы ретикулоэндотелиоза птиц. «Лентивирусный вектор» в контексте настоящего документа означает лентивирусные векторы на основе ВИЧ для доставки генов, которые могут быть интегративными или неинтегративными, обладают относительно большой упаковочной способностью и могут трансдуцировать ряд различных типов клеток. Лентивирусные векторы обычно образуются после временной трансфекции трех (упаковочной, оболочечной и плазмиды переноса) или более плазмид в клетки-продуценты. Подобно ВИЧ, лентивирусные векторы проникают в клетку-мишень за счет взаимодействия гликопротеинов на поверхности вируса с рецепторами на поверхности клетки. После проникновения вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, которая опосредуется комплексом обратной транскриптазы вируса. Продукт обратной транскрипции представляет собой двухцепочечную линейную вирусную ДНК, которая является субстратом для интеграции вируса в ДНК инфицированных клеток.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой гаммаретровирус, например векторы, полученные из вируса мышиного лейкоза Молони (MLV). В других вариантах осуществления вирусный вектор может быть вектором, полученным из более сложного ретровируса, например, вектором, полученным из лентивируса. К этой категории относятся векторы, полученные из ВИЧ-1. Другие примеры включают лентивирусные векторы, полученные из ВИЧ-2, FIV, вируса инфекционной анемии лошадей, SIV и вируса висна-маеди (лентивирус овец). Способы применения ретровирусных и лентивирусных векторов и упаковывающих клеток для трансдукции клеток-хозяев млекопитающих вирусными частицами, содержащими трансгены TCR или CAR, известны в данной области техники и были ранее описаны, например, в патенте США № 8119772; Walchli et al., PLoS One 6:327930, 2011; Zhao et al., J. Immunol. 174:4415, 2005; Engels et al., Hum. Gene Ther. 14:1155, 2003; Frecha et al., Mol. Ther. 18:1748, 2010; и Verhoeyen et al., Methods Mol. Biol. 506:97, 2009. Ретровирусные и лентивирусные векторные конструкции и системы экспрессии также коммерчески доступны. Другие вирусные векторы также можно применять для доставки полинуклеотидов, включая ДНК-вирусные векторы, включая, например, векторы на

основе аденовируса и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV); векторы, полученные из вирусов простого герпеса (HSV), включая ампликон-векторы, HSV с дефектом репликации и ослабленный HSV (Krisky et al., Gene Ther. 5:1517, 1998).

Другие векторы, полученные для применения в генной терапии, также можно применять с композициями и способами согласно настоящему изобретению. К таким векторам относятся векторы, полученные из бакуловирусов и α-вирусов (Jolly, D J. 1999. Emerging Viral Vectors. pp 209-40 в Friedmann T. ed. The Development of Human Gene Therapy. New York: Cold Spring Harbor Lab), или плазмидные векторы (такие как Sleeping Beauty (Спящая красавица) или другие транспозонные векторы).

Когда геном вирусного вектора содержит множество полинуклеотидов, которые должны быть экспрессированы в клетке-хозяине в виде отдельных транскриптов, вирусный вектор может также содержать дополнительные последовательности между двумя (или более) транскриптами, обеспечивающие бицистронную или мультицистронную экспрессию. Примеры таких последовательностей, применяемых в вирусных векторах, включают сайты внутренней посадки рибосомы (IRES), сайты расщепления фурином, вирусный пептид 2A или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления вектор способен доставлять полинуклеотидную или трансгенную конструкцию в клетку-хозяина (например, гемопоэтическую клетку-предшественника или клетку иммунной системы человека). В конкретных вариантах осуществления вектор способен доставлять полинуклеотидную или трансгенную конструкцию в клетку иммунной системы человека, такую как, например, CD4+ Т-клетка, CD8+ Т-клетка, CD4- CD8- двойная негативная Т-клетка, стволовая Т-клетка памяти, γδ-Т-клетка, естественная киллерная клетка, дендритная клетка или любая их комбинация. В дополнительных вариантах осуществления вектор способен доставлять трансгенную конструкцию к наивной Т-клетке, центральной Т-клетке памяти, эффекторной Т-клетке памяти или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий полинуклеотидную или трансгенную конструкцию согласно настоящему изобретению, может дополнительно содержать полинуклеотид, кодирующий нуклеазу, которая может быть использована для осуществления нокаута хромосомного гена в клетке-хозяине (например, эндонуклеаза CRISPR-Cas или другая эндонуклеаза, как раскрыто в настоящем документе), или которую можно использовать для доставки терапевтического полинуклеотида или трансгена или его части в клетку-хозяина в заместительной генной терапии или терапии репарации генов. В качестве альтернативы, нуклеаза, применяемая для нокаута хромосомного гена, замены гена или терапии репарации генов, может быть доставлена в клетку-хозяина независимо от вектора,

кодирующего полинуклеотидную или трансгенную конструкцию согласно настоящему изобретению.

Клетки-хозяева

В настоящем документе также предложены клетки-хозяева, содержащие гетерологичный полинуклеотид согласно настоящему изобретению (например, кодирующий любой описанный в настоящем документе связывающий белок или слитый белок и необязательно кодирующий один или более дополнительных белков, таких как маркер отбора, саморасщепляющийся пептид, корецепторный полипептид CD8 или любую их комбинацию) и/или экспрессирующие любой связывающий белок, как раскрыто в настоящем документе. Такая клетка-хозяин может быть получена, например, путем трансфекции или трансдукции вектором согласно настоящему изобретению и/или путем редактирования генов.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин включает клетку иммунной системы, которая может быть любой клеткой иммунной системы человека, такой как иллюстративные клетки иммунной системы, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин включает Т-клетку, NK-клетку, NK-Т-клетку или любую их комбинацию. В дополнительных вариантах осуществления Т-клетка включает $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^+$ Т-клетку или обе из них.

Соответственно, в частных вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка содержит гетерологичный полинуклеотид, который кодирует связывающий белок согласно настоящему изобретению, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):человеческий лейкоцитарный антиген (HLA).

В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом SEQ ID NO: 94:HLA со значением pEC_{50} при родукции IFNγ, равным 4,0, 4,5, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5 или выше.

В некоторых вариантах осуществления комплекс пептид:HLA включает комплекс пептид:HLA-A*201.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления 50 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции продуцируют интерферон-гамма (IFN-γ), когда популяцию модифицированных иммунных клеток в течение 4 часов культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками (например, клетками Т2, клетками Jurkat, дендритными клетками, экспрессирующими HLA, такой как HLA-A*0201), в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной

последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-4} мкМ, или 10^{-5} мкМ, или 10^{-6} мкМ в совместной культуре. В некоторых вариантах осуществления 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции являются $Nur77^+$ (т. е. экспрессируют Nur77), когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками (также называемыми «клетками-мишенями» в некоторых контекстах), в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида приблизительно 10^{-2} мкМ в совместной культуре, где антигенпрезентирующие клетки необязательно включают клетки T2, клетки Jurkat или и те, и другие, и необязательно являются HLA-A*0201+.

В некоторых вариантах осуществления 10 %, 15 %, 20 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции являются $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-3} мкМ в совместной культуре.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок имеет значение pEC50 при экспрессии Nur77 (SEQ ID NO: 94:HLA, такой как HLA-A*0201), равное 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6 или более.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления модифицированная иммунная клетка способна уничтожить по меньшей мере 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 20 %, 25 % или более $HLA\text{-}A*0201^+$ клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 10 % или более $HLA\text{-}A*0201^+$ клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 10:1. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка способна уничтожить приблизительно 5 % или более $HLA\text{-}A*0201^+$ клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 1:1.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления уничтожение может быть измерено с помощью 4-часового анализа совместного культивирования, необязательно с использованием меченого хрома (например, ^{51}Cr), как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 30:1. В дополнительных вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 10 %, 15 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 10:1. В дополнительных вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 10 %, 15 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 9:1, 8:1, 7:1, 6:1 или 5:1.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка: имеет повышенную активность уничтожения в отношении HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 и/или в отношении клеток Panc1 при совместном культивировании в течение 4 часов, и/или имеет повышенный уровень продукции IFN-γ при совместном культивировании в течение 4 часов с клетками-мишенями, в которые вводили пептид, и/или дополнительно снижает пролиферацию раковых клеток Panc-1 (например, более чем на 60, 75, 100, 125, 150 или более часов, при измерении с использованием IncuCyte, при соотношении эффектор:клетка-мишень 8:1), по сравнению с эталонной иммунной клеткой, содержащей полинуклеотид, кодирующий Т-клеточный рецептор, содержащий цепь TCRα, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82, и цепь TCRβ, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка согласно настоящему изобретению предотвращает или по существу предотвращает рост и/или пролиферацию раковых клеток Panc-1 в течение более 50, 100, 150 часов или более, при этом, необязательно, модифицированная иммунная клетка и раковые клетки Panc-1 присутствуют в соотношении эффектор:клетка-мишень 8:1.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления уничтожение может быть измерено с помощью анализа совместного культивирования в течение 4 часов, необязательно с использованием меченого хрома (например, ^{51}Cr), как описано в настоящем документе.

Следует исходить из того, что «эталонная» иммунная клетка относится к тому же типу иммунных клеток и фенотипически идентична или по существу идентична модифицированной иммунной клетке субъекта, за исключением кодируемого связывающего белка. Например, для модифицированной человеческой CD8+ Т-клетки эталонная иммунная клетка представляет собой человеческую CD8+ Т-клетку и может происходить, например, из того же источника или донора, что и модифицированная

иммунная клетка.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления кодируемый связывающий белок может представлять собой TCR, CAR или scTCR. В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом пептид WT-1 (SEQ ID NO: 94):HLA на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления связывающий белок, экспрессируемый модифицированной иммунной клеткой, может содержать TCR, одноцепочечный TCR (scTCR), химерный антигенный рецептор (CAR) или любую их комбинацию.

Любая подходящая иммунная клетка может быть модифицирована для включения гетерологичного полинуклеотида, кодирующего связывающий белок согласно настоящему изобретению, включая, например, Т-клетку, NK-клетку, NK-Т-клетку, макрофаг, моноцит или дендритную клетку. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка включает $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку или обе из них. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка включает CD4-CD8- двойную негативную Т-клетку или γδ-Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию. Способы трансфекции/трансдукции Т-клеток желаемыми нуклеиновыми кислотами были описаны (например, публикация заявки на патент США US 2004/0087025), а также методы адоптивного переноса с применением Т-клеток с желаемой антигенной специфичностью (например, Schmitt et al., Hum. Gen. 20:1240, 2009; Dossett et al., Mol. Ther. 17:742, 2009; Till et al., Blood 112:2261, 2008; Wang et al., Hum. Gene Ther. 18:712, 2007; Kuball et al., Blood 109:2331, 2007; US 2011/0243972; US 2011/0189141; Leen et al., Ann. Rev. Immunol. 25:243, 2007), таким образом предполагается адаптация указанных методов к раскрытым в настоящем документе вариантам осуществления, на основе сведений, приведенных в настоящем документе.

Любой подходящий способ может быть использован для трансфекции или трансдукции клеток, например Т-клеток, или для введения полинуклеотидов или композиций в соответствии с настоящими способами. Известные способы доставки полинуклеотидов в клетки-хозяева включают, например, использование катионных полимеров, липидоподобных молекул и некоторых коммерческих продуктов, таких как, например, IN-VIVO-JET PEI. Другие способы включают ex vivo трансдукцию, инъекцию, электропорацию, DEAE-декстран, обработку ультразвуком, трансфекцию,

опосредованную липосомами, трансдукцию, опосредованную рецепторами, бомбардировку микрочастицами, перенос, опосредованный транспозонами, и т. п. Другие дополнительные способы трансфекции или трансдукции клеток-хозяев включают использование векторов, более подробно описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин подвергается редактированию генов для включения в ее геном полинуклеотида, который кодирует связывающий белок (или другой белок или полипептид), предложенный в настоящем документе.

В любом из вышеприведенных вариантов осуществления модифицированная иммунная клетка может быть модифицирована для снижения или устранения экспрессии (например, путем нокаута хромосомного гена, как описано в настоящем документе) одного или более эндогенных генов, которые кодируют полипептид, участвующий в передаче иммунных сигналов или других родственных действиях, и/или таким образом, чтобы она содержала гетерологичный полинуклеотид, предложенный в настоящем документе. Иллюстративные нокауты генов включают нокауты генов, кодирующих PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3, молекулу HLA, молекулу TCR и т. п. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что некоторые эндогенно экспрессируемые белки иммунных клеток могут быть распознаны как чужеродные аллогенным хозяином, получающим модифицированные иммунные клетки, что может привести к устранению модифицированных иммунных клеток (например, аллеля HLA) или может привести к подавлению иммунной активности модифицированных иммунных клеток (например, PD-1, LAG-3, CTLA4), или может препятствовать связывающей активности гетерологически экспрессируемого связывающего белка согласно настоящему изобретению (например, эндогенного TCR модифицированной Т-клетки, которая связывает антиген, отличный от WT-1, и может препятствовать связыванию модифицированной иммунной клеткой клетки, которая экспрессирует антиген WT-1), или может конкурировать за экспрессию с гетерологичным связывающим белком.

Соответственно, снижение или устранение экспрессии или активности таких эндогенных генов или белков может улучшить активность, толерантность, экспрессию связывающего белка или персистенцию модифицированных иммунных клеток в условиях аутологичного или аллогенного хозяина, и может сделать возможным универсальное введение клеток (например, любому реципиенту независимо от типа HLA). В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка представляет собой донорскую клетку (например, аллогенную) или аутологичную клетку. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка согласно настоящему изобретению содержит нокаут одного или более хромосомных генов, кодирующих PD-1,

LAG-3, CTLA4, TIM3, TIGIT, компонент HLA (например, ген, который кодирует макроглобулин α1, макроглобулин α2, макроглобулин α3, микроглобулин β1 или микроглобулин β2) или компонент TCR (например, ген, кодирующий вариабельную область TCR или константную область TCR) (см., например, Torikai et al., Nature Sci. Rep. 6:21757 (2016); Torikai et al., Blood 119(24):5697 (2012); и Torikai et al., Blood 122(8):1341 (2013), раскрытые в которых технологии редактирования генов, композиции и терапии адоптивного клеточного переноса полностью включены в настоящий документ посредством ссылки).

В контексте настоящего документа термин «нокаут хромосомного гена» относится к генетическому изменению или введенному ингибирующему агенту в клетку-хозяина, в результате которого предотвращается (например, уменьшается, задерживается, подавляется или отменяется) продукция клеткой-хозяином функционально активного эндогенного полипептидного продукта. Изменения, приводящие к нокауту хромосомного гена, могут включать, например, введенные нонсенс-мутации (в том числе образование преждевременных стоп-кодонов), миссенс-мутации, делеции генов и разрывы цепей, а также гетерологичную экспрессию ингибирующих молекул нуклеиновых кислот, которые ингибируют экспрессию эндогенных генов в клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления нокаут хромосомного гена или нокин гена осуществляют путем хромосомного редактирования клетки-хозяина. Хромосомное редактирование может быть проведено, например, с помощью эндонуклеаз. В контексте настоящего документа термин «эндонуклеаза» относится к ферменту, способному катализировать расщепление фосфодиэфирной связи в полинуклеотидной цепи. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза способна расщеплять ген-мишень, при этом инактивируя или «нокаутируя» ген-мишень. Эндонуклеаза может быть встречающейся в природе, рекомбинантной, генетически модифицированной или гибридной эндонуклеазой. Разрывы цепи нуклеиновой кислоты, вызванные эндонуклеазой, обычно репарируются с помощью различных механизмов гомологичной рекомбинации или негомологичного соединения концов (NHEJ). Во время гомологичной рекомбинации молекула донорной нуклеиновой кислоты может быть использована для «нокина» донорного гена, для «нокаута» гена-мишени и, необязательно, для инактивации гена-мишени посредством события нокина донорного гена или нокаута гена-мишени. NHEJ представляет собой подверженный ошибкам процесс репарации, который часто приводит к изменениям в последовательности ДНК в месте расщепления, например, к замене, делеции или добавлению по меньшей мере одного нуклеотида. NHEJ может быть использована для «нокаута» гена-мишени. Примеры эндонуклеаз включают нуклеазы с

цинковыми пальцами, нуклеазы TALE, нуклеазы CRISPR-Cas, мегануклеазы и megaTAL.

В контексте настоящего документа «нуклеаза с цинковыми пальцами» (ZFN) относится к слитому белку, содержащему ДНК-связывающий домен с цинковыми пальцами, слитый с неспецифическим доменом расщепления ДНК, таким как эндонуклеаза Fokl. Каждый мотив цинкового пальца из приблизительно 30 аминокислот связывается приблизительно с 3 парами оснований ДНК, и аминокислоты в определенных остатках могут быть изменены для изменения специфичности триплетной последовательности (см., например, Desjarlais et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2256-2260, 1993; Wolfe et al., J. Mol. Biol. 285:1917-1934, 1999). Несколько мотивов цинковых пальцев могут быть связаны в тандем для создания специфичности связывания к желаемым последовательностям ДНК, таким как области, имеющие длину в диапазоне от приблизительно 9 до приблизительно 18 пар оснований. В качестве пояснения, ZFN опосредуют редактирование генома, катализируя образование сайт-специфического двухцепочечного разрыва ДНК (DSB) в геноме, а направленная интеграция трансгена, содержащего фланкирующие последовательности, гомологичные геному в сайте DSB, облегчается за счет гомологичной репарации. В качестве альтернативы, DSB, генерируемый ZFN, может привести к нокауту гена-мишени посредством репарации путем негомологичного соединения концов (NHEJ), что представляет собой подверженный ошибкам путь клеточной репарации, который приводит к вставке или делеции нуклеотидов в сайте расщепления. В некоторых вариантах осуществления нокаут гена включает вставку, делецию, мутацию или их комбинацию, введенную с помощью молекулы ZFN.

В контексте настоящего документа «эффекторная нуклеаза, подобная активатору транскрипции» (TALEN) относится к слитому белку, содержащему ДНК-связывающий домен TALE и домен расщепления ДНК, такому как эндонуклеаза FokI. «ДНК-связывающий домен TALE» или «TALE» состоит из одного или более повторяющихся доменов/единиц TALE, каждый из которых обычно имеет высококонсервативную последовательность из 33-35 аминокислот с дивергентными 12-ой и 13-ой аминокислотами. Повторяющиеся домены TALE участвуют в связывании TALE с последовательностью ДНК-мишенью. Дивергентные аминокислотные остатки, называемые парой вариабельных аминокислотных остатков (RVD), коррелируют со специфическим распознаванием нуклеотидов. Естественный (канонический) код распознавания ДНК таких TALE был определен таким образом, что последовательность HD (гистидин-аспарагиновая кислота) в положениях 12 и 13 TALE приводит к связыванию TALE с цитозином (C), NG (аспарагин-глицин) связывается с нуклеотидом T,

NI (аспарагин-изолейцин) с A, NN (аспарагин-аспарагин) связывается с нуклеотидом G или A, и NG (аспарагин-глицин) связывается с нуклеотидом T. Также известны неканонические (атипичные) RVD (см., например, публикация патента США US 2011/0301073, раскрытые в котором атипичные RVD полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). TALEN могут быть использованы для управления сайт-специфическими двухцепочечными разрывами (DSB) в геноме Т-клеток. Негомологичное соединение концов (NHEJ) приводит к лигированию ДНК с обеих сторон двухцепочечного разрыва, где имеет место небольшое перекрытие последовательностей, или оно отсутствует, для отжига, тем самым обеспечивая введение ошибок, вызывающих нокаут экспрессии гена. В качестве альтернативы, с помощью гомологичной репарации можно вводить трансген в сайт DSB, обеспечивая присутствие в трансгене гомологичных фланкирующих последовательностей. В некоторых вариантах осуществления нокаут гена включает вставку, делецию, мутацию или их комбинацию, введенные с помощью молекулы TALEN.

В контексте настоящего документа нуклеазная система «кластерные короткие палиндромные повторы, разделённые регулярными промежутками/Cas» (CRISPR/Cas) относится к системе, в которой применяется нуклеаза Cas, направляемая CRISPR-РНК (crРНК), для распознавания сайтов-мишеней в геноме (известные в качестве протоспейсеров) посредством комплементарности спаривания оснований, а затем расщепления ДНК, если короткий консервативный мотив, связанный с протоспейсером (PAM), следует сразу за 3' комплементарной последовательности-мишени. Системы CRISPR/Cas подразделяют на три типа (т.е. тип I, тип II и тип III) в зависимости от последовательности и структуры нуклеаз Cas. Контрольные комплексы, направляемые crРНК, в типах I и III нуждаются в нескольких субъединицах Cas. Система типа II, наиболее изученная, содержит по меньшей мере три компонента: РНК-направляемую нуклеазу Cas9, crРНК и транс-активную crРНК (tracrРНК). tracrRNA содержит дуплекс-образующую область. crРНК и tracrРНК образуют дуплекс, способный взаимодействовать с нуклеазой Cas9 и направлять комплекс Cas9/crРНК:tracrРНК к определенному сайту на ДНК-мишени посредством образования спаривания оснований по Уотсону-Крику между спейсером на crРНК и протоспейсером на ДНК-мишени против хода транскрипции от PAM. Нуклеаза Cas9 расщепляет двухцепочечный разрыв в области, определяемой спейсером crРНК. Репарация посредством NHEJ приводит к вставкам и/или делециям, которые нарушают экспрессию целевого локуса. В качестве альтернативы, трансген с гомологичными фланкирующими последовательностями может быть введен в сайт DSB посредством гомологичной репарации. crРНК и tracrРНК могут быть сконструированы в

одиночную направляющую РНК (sgРНК или gРНК) (см., например, Jinek et al., Science 337:816-21, 2012). Кроме того, область направляющей РНК, комплементарная сайту-мишени, может быть изменена или запрограммирована для нацеливания на желаемую последовательность (Xie et al., PLOS One 9:e100448, 2014; публикация заявки на патент США US 2014/0068797, публикация заявки на патент США US 2014/0186843; патент США № 8697359 и публикация PCT заявки WO 2015/071474; содержание каждого из которых включено посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления нокаут гена включает вставку, делецию, мутацию или их комбинацию и выполняется с применением системы нуклеаз CRISPR/Cas.

Иллюстративные последовательности gРНК и способы их применения для нокаута эндогенных генов, кодирующих белки иммунных клеток, включают описанные в публикации Ren et al., Clin. Cancer Res. 23(9):2255-2266 (2017), раскрытые в которой gРНК, ДНК Cas9, векторы и методики нокаута генов настоящим полностью включены посредством ссылки.

Могут быть использованы альтернативные нуклеазы Cas, включая, не ограничиваясь перечисленным, нуклеазы Cas 12, Cas 13 и Cas 14 и их варианты. Например, могут быть использованы нуклеазы Cas, раскрытые в публикации WO 2019/178427, настоящим полностью включенной посредством ссылки (включая раскрытые в ней нуклеазы Cas, системы CRISPR-Cas и связанные способы).

В контексте настоящего документа «мегануклеаза», также называемая «хоминг-эндонуклеазой», относится к эндодезоксирибонуклеазе, характеризующейся большим сайтом распознавания (двухцепочечные последовательности ДНК от приблизительно 12 до приблизительно 40 пар оснований). Мегануклеазы можно разделить на пять семейств на основе последовательности и структурных мотивов: LAGLIDADG (SEQ ID NO: 97), GIY-YIG (SEQ ID NO: 98), HNH, His-Cys бокс и PD-(D/E)XK (SEQ ID NO: 99). Иллюстративные мегануклеазы включают I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII, последовательности распознавания которых известны (см., например, патенты США № 5420032 и 6833252; Belfort et al., Nucleic Acids Res. 25:3379-3388, 1997; Dujon et al., Gene 82:115-118, 1989; Perler et al., Nucleic Acids Res. 22:1125-1127, 1994; Jasin, Trends Genet.12:224-228, 1996; Gimble et al., J. Mol. Biol. 263:163-180, 1996; Argast et al., J. Mol. Biol. 280:345-353, 1998).

В некоторых вариантах осуществления встречающиеся в природе мегануклеазы можно применять для стимуляции сайт-специфической модификации генома мишени, выбранной из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA4, TIGIT, гена, кодирующего HLA, или гена, кодирующего компонент TCR. В других вариантах осуществления сконструированную

мегануклеазу, обладающую новой специфичностью связывания с геном-мишенью, применяют для сайт-специфической модификации генома (см., например, Porteus et al., Nat. Biotechnol. 23:967-73, 2005; Sussman et al., J. Mol. Biol. 342:31-41, 2004; Epinat et al., Nucleic Acids Res. 31:2952-62, 2003; Chevalier et al., Molec. Cell 10:895-905, 2002; Ashworth et al., Nature 441:656-659, 2006; Paques et al., Curr. Gene Ther. 7:49-66, 2007; публикации заявок на патент США US 2007/0117128; US 2006/0206949; US 2006/0153826; US 2006/0078552; и US 2004/0002092). В дополнительных вариантах осуществления нокаут хромосомного гена осуществляют с применением хоминг-эндонуклеазы, модифицированной модульными ДНК-связывающими доменами TALEN для получения слитого белка, известного как megaTAL. MegaTAL могут быть использованы не только для нокаута одного или более генов-мишеней, но также для введения (нокина) гетерологичных или экзогенных полинуклеотидов при использовании в сочетании с экзогенной донорной матрицей, кодирующей представляющий интерес полипептид.

В некоторых вариантах осуществления нокаут хромосомного гена включает ингибирующую молекулу нуклеиновой кислоты, которую вводят в клетку-хозяина (например, иммунную клетку), содержащую гетерологичный полинуклеотид, кодирующий антигенспецифический рецептор, который специфически связывается с опухолеассоциированным антигеном, где ингибирующая молекула нуклеиновой кислоты кодирует мишень-специфический ингибитор, и где кодируемый мишень-специфический ингибитор ингибирует экспрессию эндогенного гена (т.е. PD-1, TIM3, LAG3, CTLA4, TIGIT, компонента HLA или компонента TCR или любой их комбинации) в иммунной клетке-хозяине.

Нокаут хромосомного гена может быть подтвержден непосредственно секвенированием ДНК иммунной клетки-хозяина после использования процедуры или агента для нокаута. Сделать вывод о нокауте хромосомного гена можно также при отсутствии экспрессии гена (например, отсутствии продукта мРНК или полипептида, кодируемого геном) после нокаута.

Любая из вышеуказанных методик редактирования генов может быть использована для введения полинуклеотида согласно настоящему изобретению (например, кодирующего связывающий белок и/или корецепторный полипептид CD8) в геном клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полинуклеотид вводят в локус, кодирующий эндогенный компонент TCR, компонент HLA, PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3 или TIGIT, или локус «безопасная гавань», такой как Rosa26, AAVS1, CCR5, и т. п. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок и/или кодирующий корецепторный полипептид CD8,

вводят в локус TRAC клетки-хозяина. В дополнительных вариантах осуществления вводят нокаут хромосомного гена локуса TRBC клетки-хозяина.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления предложена клетка-хозяин (например, модифицированная иммунная клетка), которая содержит в эндогенном локусе TRAC гетерологичный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок согласно настоящему изобретению, корецептор CD8 согласно настоящему изобретению или оба из них. В дополнительных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит нокаут хромосомного гена эндогенного локуса TRBC.

В другом аспекте в настоящем документе предложены композиции, которые содержат модифицированную иммунную клетку согласно настоящему изобретению (и/или полинуклеотид, вектор или связывающий белок) и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

В настоящем документе также предложены однократные дозы, которые содержат эффективное количество модифицированной иммунной клетки или композиции, содержащей модифицированную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 30 %, по меньшей мере приблизительно 40 %, по меньшей мере приблизительно 50 %, по меньшей мере приблизительно 60 %, по меньшей мере приблизительно 70 %, по меньшей мере приблизительно 80 %, по меньшей мере приблизительно 85 %, по меньшей мере приблизительно 90 % или по меньшей мере приблизительно 95 % модифицированных CD4+ Т-клеток в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 30 %, по меньшей мере приблизительно 40 %, по меньшей мере приблизительно 50 %, по меньшей мере приблизительно 60 %, по меньшей мере приблизительно 70 %, по меньшей мере приблизительно 80 %, по меньшей мере приблизительно 85 %, по меньшей мере приблизительно 90 % или по меньшей мере приблизительно 95 % модифицированных CD8+ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток (т. е. имеет менее приблизительно 50 %, менее приблизительно 40 %, менее приблизительно 30 %, менее приблизительно 20 %, менее приблизительно 10 %, менее приблизительно 5 % или менее приблизительно 1 % популяции наивных Т-клеток, присутствующих в однократной дозе, по сравнению с образцом пациента, имеющим сопоставимое количество МНПК).

В некоторых вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 50 % модифицированных CD4+ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 50 %

модифицированных CD8+ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В дополнительных вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 60 % модифицированных CD4+ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицей, содержащей по меньшей мере приблизительно 60 % модифицированных CD8+ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В дополнительных вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 70 % модифицированных CD4+ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицей, содержащей по меньшей мере приблизительно 70 % модифицированных CD8+ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 80 % модифицированных CD4+ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 80 % модифицированных CD8+ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 85 % модифицированных CD4+ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 85 % модифицированных CD8+ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 90 % модифицированных CD4+ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 90 % модифицированных CD8+ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток.

Следует исходить из того, что однократная доза согласно настоящему изобретению может содержать модифицированную иммунную клетку, как описано в настоящем документе (т. е. экспрессирующую связывающий белок, специфичный к антигену WT-1, соответствующий SEQ ID NO: 94), и модифицированную иммунную клетку, экспрессирующую связывающий белок, специфичный к другому антигену (например, другому антигену WT-1 (например, содержащему SEQ ID NO: 100), или антигену от другого белка или мишени, такому как, например, BCMA, CD3, CEACAM6, c-Met, EGFR, EGFRvIII, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EphA2, IGF1R, GD2, O-ацетил GD2, O-ацетил GD3,

GHRHR, GHR, FLT1, KDR, FLT4, CD44v6, CD151, CA125, CEA, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, Lewis A, Lewis Y, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, HVEM, MAGE-A (например, включая MAGE-A1, MAGE-A3 и MAGE-A4), мезотелин, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, CD40, CD137, TWEAK-R, HLA, опухоль- или патоген-ассоциированный пептид, связанный с HLA, пептид hTERT, связанный с HLA, пептид тирозиназы, связанный с HLA, пептид KRAS, связанный с HLA, LTβR, LIFRβ, LRP5, MUC1, OSMRβ, TCRα, TCRβ, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD52, CD56, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86, CD123, CD171, CD276, B7H4, TLR7, TLR9, PTCH1, HA1-H, Robo1, α-фетопротеин (AFP), Frizzled, OX40, PRAME, BRAF, основной связывающий фактор (Core Binding Factor), MR-1 (Crowther et al., Nature Immunol. 21:175-185 (2020)) и SSX-2, и т. п.). Например, однократная доза может содержать модифицированные $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие связывающий белок, который специфически связывается с комплексом WT-1:HLA, и модифицированные $CD4^+$ Т-клетки (и/или модифицированные CD8+ Т-клетки), экспрессирующие связывающий белок (например, CAR), который специфически связывается с антигеном CD19.

В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, однократная доза содержит равное или приблизительно равное количество сконструированных $CD45RA^-$ $CD3^+$ $CD8^+$ и модифицированных $CD45RA^-$ $CD3^+$ $CD4^+$ TM клеток.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая (i) модифицированную иммунную клетку, как раскрыто в настоящем документе, и дополнительно содержит (ii) иммунную клетку, содержащую полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержащий Vα TCR и Vβ TCR и способный специфически связываться с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 100):HLA, где, необязательно, HLA включает HLA-A*0201, и где, необязательно, каждая из модифицированной иммунной клетки согласно (i) и иммунной клетки согласно (ii) независимо выбрана из Т-клетки, NK-клетки и NK-T-клетки.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления связывающий белок иммунной клетки в (ii) содержит: (a) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 101-103 и 105-107, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 104, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 108; (b) аминокислотные последовательности CDR1α,

CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 109-110 и 113-115, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 112, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116; или (c) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 117-119 и 121-123, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 120, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 124.

Применения

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией WT-1, путем введения нуждающемуся в этом субъекту-человеку эффективного количества связывающего белка, полинуклеотида, вектора, клетки или композиции в соответствии с любым из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления.

«Лечить», или «лечение», или «улучшить» относится к медицинскому лечению заболевания, расстройства или состояния субъекта (например, человека или млекопитающего, не относящегося к человеку, такого как примат, лошадь, кошка, собака, коза, мышь или крыса). Терапевтический или профилактический/предупредительный эффект включает улучшение клинического исхода; уменьшение или облегчение симптомов, связанных с заболеванием; уменьшение проявления симптомов; улучшение качества жизни; более длительный статус без признаков заболевания; уменьшение степени заболевания; стабилизацию болезненного состояния; задержку прогрессирования заболевания; ремиссию; выживаемость; увеличенную продолжительность жизни; или любую их комбинацию.

«Терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» в контексте настоящего документа относится к количеству модифицированных иммунных клеток, достаточному для достижения терапевтического эффекта, включая улучшение клинического исхода; уменьшение или облегчение симптомов, связанных с заболеванием; уменьшение проявления симптомов; улучшение качества жизни; более длительный статус без признаков заболевания; уменьшение степени заболевания; стабилизацию болезненного состояния; задержку прогрессирования заболевания; ремиссию;

выживаемость или увеличенную продолжительность жизни, статистически значимым образом.

В контексте настоящего документа термин «статистически значимый» относится к значению p 0,050 или менее при расчете с использованием t-критерия Стьюдента и указывает на маловероятность случайного возникновения конкретного измеряемого события или результата.

Субъекты, которых можно лечить способами согласно настоящему изобретению, как правило, представляют собой людей и других приматов-субъектов, таких как мартышки и человекообразные обезьяны, для ветеринарной медицины и/или исследовательских целей. Мыши или крысы также могут использоваться в исследовательских целях. В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления субъект может представлять собой субъекта-человека. Субъект может быть мужчиной или женщиной и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, подростков, юношей, взрослых и пожилых субъектов. Клетки согласно настоящему изобретению могут быть введены способом, подходящим для заболевания, состояния или расстройства, подлежащего лечению, как определено специалистами в области медицины. В любом из приведенных выше вариантов осуществления модифицированную иммунную клетку или однократную дозу, как описано в настоящем документе, вводят внутривенно, внутрибрюшинно, внутритуморально, в костный мозг, в лимфатический узел или в спинномозговую жидкость, чтобы она встретила на своем пути клетки-мишени (например, клетки лейкоза). Подходящая доза, подходящая продолжительность и частота введения композиций будут определяться такими факторами, как состояние пациента; размер, тип и тяжесть заболевания, состояния или расстройства; конкретная форма активного ингредиента и способ введения.

Применительно к отдельному активному ингредиенту или клетке, экспрессирующей один активный ингредиент, вводимым по отдельности, терапевтически эффективное количество относится к действию этого ингредиента или клетки, экспрессирующей только этот ингредиент. Применительно к комбинации терапевтически эффективное количество относится к комбинированным количествам активных ингредиентов или комбинированному дополнительному активному ингредиенту с клеткой, экспрессирующей активный ингредиент, приводящим к терапевтическому эффекту, независимо от того, вводятся ли они последовательно или одновременно. Комбинация также может представлять собой клетку, экспрессирующую более одного активного ингредиента.

В контексте настоящего документа термин «адоптивная иммунная терапия» или

«адоптивная иммунотерапия» относится к введению встречающихся в природе или генетически сконструированных специфичных к заболеванию или антигену иммунных клеток (например, Т-клеток). Адоптивная клеточная иммунотерапия может быть аутологичной (иммунные клетки происходят от реципиента), аллогенной (иммунные клетки происходят от донора того же вида) или сингенной (иммунные клетки происходят от донора, генетически идентичного реципиенту).

Состояние, связанное с экспрессией WT-1, включает любое расстройство или состояние, при котором имеет место недостаточная активность, гиперактивность или некорректная активность клеточного или молекулярного объекта WT-1, и обычно возникает в результате необычно высоких (со статистической значимостью) уровней экспрессии WT-1 в пораженных клетках (например, клетках лейкоза) по сравнению с нормальными клетками. Субъект, имеющий такое расстройство или состояние, получит пользу от лечения композицией или способом согласно описанным в настоящем документе вариантам осуществления. Таким образом, некоторые состояния, связанные со сверхэкспрессией WT-1, могут включать как острые, так и хронические расстройства и заболевания, такие как те патологические состояния, которые делают субъекта предрасположенным к определенному расстройству.

Заболевания и расстройства, связанные с экспрессией WT-1, включают наличие диспластических, раковых и/или трансформированных клеток у субъекта, включая, например, неопластические, опухолевые, бесконтактно ингибированные или онкогенно трансформированные клетки и т. п. (например, солидные раковые заболевания; гематологические раковые заболевания, включая лимфомы и лейкозы, такие как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и т. д.), которые известны в данной области и для которых установлены критерии диагностики и классификации (например, Hanahan and Weinberg, 2011 Cell 144:646; Hanahan and Weinberg 2000 Cell 100:57; Cavallo et al., 2011 Canc. Immunol. Immunother. 60:319; Kyrigideis et al., 2010 J. Carcinog. 9:3). В некоторых вариантах осуществления такие раковые клетки могут быть клетками острого миелоидного лейкоза, В-клеточного лимфобластного лейкоза, Т-клеточного лимфобластного лейкоза или миеломы, включая раковые стволовые клетки, которые способны инициировать и последовательно трансплантировать любые из этих типов рака (см., например, Park et al. 2009 Molec. Therap. 17:219). Согласно некоторым вариантам осуществления практически любой тип рака, характеризующийся сверхэкспрессией WT-1, подлежит лечению с помощью применения раскрытых в настоящем документе композиций и способов, включая гематологические раковые заболевания (например, лейкоз, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), Т- или В-клеточную лимфомы,

миеломы и т. д.). Кроме того, «рак» может относиться к любой ускоренной пролиферации клеток, включая солидные опухоли, асцитные опухоли, опухоли крови или лимфы или другие злокачественные новообразования; злокачественные новообразования соединительной ткани; метастатическое заболевание; минимальное остаточное заболевание после трансплантации органов или стволовых клеток; раковые заболевания с множественной лекарственной устойчивостью, первичные или вторичные злокачественные новообразования, ангиогенез, связанный со злокачественным новообразованием, или другие формы рака. Также в раскрытых в настоящем документе вариантах осуществления рассматриваются конкретные варианты осуществления, в которых включен только один из вышеуказанных типов заболевания или где определенные состояния могут быть исключены независимо от того, характеризуются ли они сверхэкспрессией WT-1 или нет.

Некоторые примеры состояний, связанных со сверхэкспрессией WT-1, включают гиперпролиферативные расстройства и пролиферативные расстройства у субъекта, включая опухоли, новообразования, рак, злокачественное новообразование и т. д. Помимо активированных или пролиферирующих клеток гиперпролиферативные или пролиферативные расстройства могут также включать аберрацию или нарушение регуляции процессов гибели клеток, будь то посредством некроза или апоптоза. Такая аберрация процессов гибели клеток может быть связана с различными состояниями, включая рак (включая первичные, вторичные злокачественные новообразования, а также метастазы) или другие состояния.

В некоторых вариантах осуществления настоящие способы пригодны для лечения гемобластоза или солидного рака. Иллюстративные гемобластозы включают острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ, включая рефрактерный и рецидивирующий ОМЛ, и включая острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз (например, с эозинофилией или без нее), острый моноцитарный лейкоз, острый эритроидный лейкоз и острый мегакариобластный лейкоз), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), хронический миелоцитарный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз (ХЭЛ), миелодиспластический синдром (МДС), неходжкинскую лимфому (НХЛ) или множественную миелому (ММ, включая рефрактерную и рецидивирующую ММ).

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе способы пригодны для лечения солидного рака, такого как рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, карцинома костей и мягких тканей, опухоль головного мозга, рак молочной

железы, карцинома молочной железы, рак шейки матки, рак ободочной кишки, колоректальная аденокарцинома, колоректальный рак, десмоидная опухоль, эмбриональный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, аденокарцинома желудка, мультиформная глиобластома, глиобластома, меланома, диффузная мезотелиома брюшины, злокачественная мезотелиома плевры, глиома, астроцитома, гинекологическая опухоль, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, рак печени, гепатоцеллюлярная карцинома, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, злокачественная меланома, остеосаркома, рак яичника (например, эпителиальный рак яичника, карцинома яичника), рак маточной трубы, карцинома эндометрия, рак поджелудочной железы, протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, первичная астроцитарная опухоль, первичный рак щитовидной железы, рак предстательной железы, рак почки, почечно-клеточная карцинома, рабдомиосаркома, рак кожи, саркома мягких тканей, остеогенная саркома, герминогенная опухоль яичка, уротелиальный рак, саркома матки, карциносаркома матки или рак матки.

Также предложены фармацевтические композиции, содержащие связывающий белок, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина и/или модифицированную иммунную клетку (необязательно в комбинации с иммунной клеткой, кодирующей связывающий белок, способный связываться с комплексом SEQ ID NO: 100:HLA) для применения согласно любому из описанных в настоящем документе способов. Фармацевтические композиции могут быть введены способом, подходящим для заболевания или состояния, подлежащего лечению (или предупреждению), как это определено специалистами в области медицины. Подходящая доза, подходящая продолжительность и частота введения композиций будут определяться такими факторами, как состояние здоровья пациента, размер пациента (то есть вес, масса или площадь поверхности тела), тип и тяжесть состояния пациента, конкретная форма активного ингредиента и способ введения. Как правило, подходящая доза и схема лечения обеспечивают композицию(ии) в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического и/или профилактического эффекта (например, как описано в настоящем документе, включая улучшенный клинический исход, такой как более частые полные или частичные ремиссии, или более длительную выживаемость без признаков заболевания и/или общую выживаемость, или уменьшение выраженности симптомов).

Эффективное количество фармацевтической композиции относится к количеству, достаточному, в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемых клинических результатов или лечения, оказывающего положительное действие, как описано в настоящем документе. Эффективное количество

может быть доставлено за одно или более введений. Если введение выполняют субъекту, у которого уже известно или подтверждено наличие заболевания или болезненного состояния, термин «терапевтическое количество» может относиться к лечению, тогда как «профилактически эффективное количество» может использоваться для описания введения эффективного количества субъекту, который предрасположен к или подвержен риску развития заболевания или болезненного состояния (например, рецидива), в качестве профилактического курса.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение модифицированной иммунной клетки, как предложено в настоящем документе, субъекту, который получил, получает или будет получать иммунную клетку, содержащую полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержащий Vα TCR и Vβ TCR и способный специфически связываться с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 100):HLA, где, необязательно, HLA включает HLA-A*0201, и где, необязательно, каждая из модифицированной иммунной клетки и иммунной клетки независимо выбрана из Т-клетки, NK-клетки и NK-T-клетки. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок, способный специфически связываться с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 100):HLA, содержит: (a) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 101-103 и 105-107, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 104, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 108;

(b) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 109-110 и 113-115, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 112, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116; или (c) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 117-119 и 121-123, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 120, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 124.

В целом, подходящая дозировка и схема лечения обеспечивают активные

молекулы или клетки в количестве, достаточном для обеспечения эффекта. Такой ответ можно контролировать путем установления улучшенного клинического исхода (например, более частых ремиссий, полной или частичной, или более длительной выживаемости без признаков заболевания) у субъектов, получивших лечение, по сравнению с субъектами, не получившими лечение. Увеличение ранее существовавших иммунных ответов на опухолевый белок, как правило, коррелирует с улучшением клинического исхода. Такие иммунные ответы обычно можно оценивать с использованием стандартных анализов пролиферации, цитотоксичности или цитокинов, которые являются обычными в данной области и могут быть выполнены с использованием образцов, полученных от субъекта до и после лечения.

Для профилактического применения доза должна быть достаточной для предупреждения, задержки начала или уменьшения тяжести заболевания, связанного с заболеванием или расстройством. Профилактическое действие композиций, вводимых в соответствии с описанными в настоящем документе способами, может быть определено путем проведения доклинических (включая исследования на животных in vitro и in vivo) и клинических исследований и анализа данных, полученных на их основе, с помощью соответствующих статистических, биологических и клинических способов и процедур, легко осуществляемых специалистом в данной области техники.

Отдельные способы лечения или предупреждения, рассматриваемые в настоящем документе, включают введение клетки-хозяина (которая может быть аутологичной, аллогенной или сингенной), содержащей желаемую молекулу нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, которая стабильно интегрирована в хромосому клетки или присутствует в виде внехромосомной молекулы нуклеиновой кислоты. Например, такая клеточная композиция может быть получена ex vivo с использованием аутологичных, аллогенных или сингенных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, антигенпрезентирующих клеток, естественных киллерных клеток) для введения желаемой WT-1-нацеленной Т-клеточной композиции субъекту в качестве адоптивной иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^-CD8^-$ двойную негативную Т-клетку, γδ-Т-клетку, естественную киллерную клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию. В дополнительных вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию.

Количество клеток в композиции или однократной дозе составляет по меньшей мере одну клетку (например, одну субпопуляцию модифицированных $CD8^+$ Т-клеток

(например, необязательно содержащую $CD8^+$ Т-клетки памяти и/или наивные $CD8^+$ Т-клетки); одну субпопуляцию модифицированных $CD4^+$ Т-клеток (например, необязательно содержащую $CD4^+$ Т-клетки памяти и/или наивные $CD4^+$ Т-клетки)), или чаще составляет более 10^2 клеток, например, вплоть до 10^4, вплоть до 10^5, вплоть до 10^6, вплоть до 10^7, вплоть до 10^8, вплоть до 10^9, вплоть до 10^{10} или вплоть до 10^{11} клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в количестве от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{11} клеток/м^2, предпочтительно от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 клеток/м^2. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза содержит вплоть до приблизительно $3{,}3\times10^5$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза содержит вплоть до приблизительно 1×10^6 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза содержит вплоть до приблизительно $3{,}3\times10^6$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза содержит вплоть до приблизительно 1×10^7 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку вводят субъекту в дозе, содержащей вплоть до приблизительно 5×10^4 клеток/кг, 5×10^5 клеток/кг, 5×10^6 клеток/кг или вплоть до приблизительно 5×10^7 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку вводят субъекту в дозе, содержащей по меньшей мере приблизительно 5×10^4 клеток/кг, 5×10^5 клеток/кг, 5×10^6 клеток/кг или вплоть до приблизительно 5×10^7 клеток/кг. Количество клеток будет зависеть от конечного применения, для которого предназначена композиция, а также от типа включенных в нее клеток. Например, клетки, модифицированные таким образом, чтобы они содержали связывающий белок, будут включать клеточную популяцию, содержащую по меньшей мере 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % и более таких клеток. Для применений, предложенных в настоящем документе, клетки обычно имеют объем, равный литру или менее, 500 мл или менее, 250 мл или менее или 100 мл или менее. В вариантах осуществления плотность желаемых клеток обычно составляет более 10^4 клеток/мл и обычно составляет более 10^7 клеток/мл, обычно 10^8 клеток/мл или более. Клетки могут быть введены в виде одной инфузии или в нескольких инфузиях в течение некоторого периода времени. Клинически значимое количество иммунных клеток может быть распределено на несколько инфузий, которое в совокупности равно или более 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10} или 10^{11} клеток. В некоторых вариантах осуществления однократную дозу модифицированных иммунных клеток можно вводить совместно (например, одновременно или параллельно с) гемопоэтическими стволовыми клетками от аллогенного донора. В некоторых вариантах осуществления одна или более модифицированных иммунных клеток, содержащихся в однократной дозе,

являются аутологичными для субъекта.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть представлены в контейнерах для однократной или многократных доз, таких как запечатанные ампулы или флаконы. Такие контейнеры могут быть заморожены для сохранения стабильности состава до использования. В некоторых вариантах осуществления однократная доза содержит рекомбинантную клетку-хозяина, как описано в настоящем документе, в дозе от приблизительно 10^4 клеток/м^2 до приблизительно 10^{11} клеток/м^2. Разработка подходящих схем дозирования и лечения для использования конкретных композиций, описанных в настоящем документе, в различных схемах лечения, включая, например, парентеральное или внутривенное введение или состав.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая модифицированную иммунную клетку, как раскрыто в настоящем документе, дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент. Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель» или «физиологически приемлемый эксципиент или носитель» относится к биологически совместимым носителям, например, физиологическому раствору, которые более подробно описаны в настоящем документе и которые подходят для введения человеку или другому млекопитающему, не являющемуся человеком, и в целом признаны безопасными или не вызывающими серьезных нежелательных явлений.

Подходящие эксципиенты включают воду, физиологический раствор, декстрозу, глицерин и т. п., и их комбинации. В вариантах осуществления композиции, содержащие слитые белки или клетки-хозяева, как раскрыто в настоящем документе, дополнительно содержат подходящие инфузионные среды. Подходящая инфузионная среда может представлять собой любую изотоническую композицию среды, как правило, могут быть использованы физиологический раствор, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), 5% раствор декстрозы в воде, лактат Рингера. Инфузионная среда может быть дополнена человеческим сывороточным альбумином или другими компонентами человеческой сыворотки.

Если композицию субъекту вводят парентерально, то композиция также может включать стерильный водный или масляный раствор или суспензию. Подходящие нетоксичные разбавители или растворители, подходящие для парентерального введения, включают воду, раствор Рингера, изотонический солевой раствор, 1,3-бутандиол, этанол, пропиленгликоль или полиэтиленгликоли в смесях с водой. Водные растворы или суспензии могут дополнительно содержать один или более буферных агентов, таких как ацетат натрия, цитрат натрия, борат натрия или тартрат натрия. Безусловно, любой

материал, используемый при приготовлении любой стандартной лекарственной формы, должен быть фармацевтически чистым и по существу нетоксичным в используемых количествах. Кроме того, активные соединения могут быть включены в препараты и составы с замедленным высвобождением. Стандартная лекарственная форма в контексте настоящего документа относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве однократных доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица может содержать заранее определенное количество рекомбинантных клеток или активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с подходящим фармацевтическим носителем.

В контексте настоящего документа введение композиции или терапии относится к их доставке субъекту независимо от пути или способа доставки. Введение может осуществляться непрерывно или периодически, а также парентерально. Введение может быть предназначено для лечения субъекта, у которого уже диагностировано распознанное состояние, заболевание или болезненное состояние, или для лечения субъекта, предрасположенного к или подверженного риску развития такого состояния, заболевания или болезненного состояния. Совместное введение с дополнительной терапией может включать одновременную и/или последовательную доставку нескольких агентов в любом порядке и по любой схеме дозирования (например, модифицированные иммунные клетки с одним или более цитокинами; иммуносупрессивной терапией, такой как ингибиторы кальциневрина, кортикостероиды, ингибиторы микротрубочек, низкая доза пролекарства микофеноловой кислоты или любой их комбинацией).

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят множество доз модифицированной иммунной клетки или связывающего белка, как описано в настоящем документе, которые могут быть введены с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель. В дополнительных вариантах осуществления цитокин вводят последовательно, при условии, что субъекту вводили модифицированную иммунную клетку по меньшей мере три или четыре раза до введения цитокина. В некоторых вариантах осуществления цитокин вводят подкожно (например, IL-2, IL-15, IL-21). В других вариантах осуществления субъект, проходящий лечение, дополнительно получает иммуносупрессивную терапию, такую как ингибиторы кальциневрина, кортикостероиды, ингибиторы микротрубочек, низкая доза пролекарства микофеноловой кислоты или любая их комбинация.

Способы лечения или предупреждения согласно настоящему изобретению могут быть применены к субъекту как часть курса или схемы лечения, которые могут включать дополнительные виды лечения до или после введения однократных доз, клеток или

композиций, раскрытых в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления субъект, получающий однократную дозу модифицированной иммунной клетки, получает или ранее получил трансплантацию гемопоэтических клеток (HCT; включая миелоаблативную и немиелоаблативную HCT). В некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка может быть введена через от по меньшей мере двух до по меньшей мере трех месяцев после немиелоаблативной трансплантации гемопоэтических клеток. Способы и схемы проведения HCT известны в данной области техники и могут включать трансплантацию любой подходящей донорской клетки, такой как клетка, полученная из пуповинной крови, костного мозга или периферической крови, гемопоэтическая стволовая клетка, мобилизованная стволовая клетка или клетка из околоплодных вод. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления модифицированная иммунная клетка согласно настоящему изобретению может быть введена вместе с гемопоэтическими стволовыми клетками или вскоре после их введения в составе модифицированной терапии HCT. В некоторых вариантах осуществления HCT включает донорскую гемопоэтическую клетку, содержащую нокаут хромосомного гена, кодирующего компонент HLA, нокаут хромосомного гена, кодирующего компонент TCR, или оба таких нокаута.

В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий модифицированную иммунную клетку или связывающий белок, ранее получал лимфодеплетирующую химиотерапию. В дополнительных вариантах осуществления лимфодеплетирующая химиотерапия включает циклофосфамид, флударабин, антитимоцитарный глобулин или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал терапию ОМЛ или подвержен риску развития или прогрессирования ОМЛ.

Способы согласно настоящему изобретению могут дополнительно включать введение одного или более дополнительных агентов для лечения заболевания или расстройства в составе комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение модифицированной иммунной клетки или связывающего белка с (параллельно, одновременно или последовательно) ингибитором иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение модифицированной иммунной клетки с агонистом агента-стимулятора иммунной контрольной точки. В дополнительных вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение модифицированной иммунной клетки со вспомогательной терапией, такой как химиотерапевтический агент, лучевая терапия, хирургическое вмешательство, антитела или любая их комбинация.

В контексте настоящего документа термин «иммунный супрессирующий агент» или «иммуносупрессирующий агент» относится к одной или более клеткам, белкам, молекулам, соединениям или комплексам, обеспечивающим ингибирующие сигналы для помощи в управлении или подавлении иммунного ответа. Например, иммуносупрессирующие агенты включают молекулы, которые частично или полностью блокируют иммунную стимуляцию; уменьшают, предотвращают или задерживают активацию иммунной системы; или увеличивают, активируют или повышающе регулируют иммунную супрессию. Иллюстративные иммуносупрессивные агенты для мишени (например, с ингибитором иммунной контрольной точки) включают PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, CTLA4, B7-H3, B7-H4, CD244/2B4, HVEM, BTLA, CD160, TIM3, GAL9, KIR, PVR1G (CD112R), PVRL2, аденозин, A2aR, иммуносупрессивные цитокины (например, IL-10, IL-4, IL-1RA, IL-35), IDO, аргиназу, VISTA, TIGIT, LAIR1, CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5, клетки Treg или любую их комбинацию.

Ингибитор иммунного супрессирующего агента (также называемый ингибитором иммунной контрольной точки) может представлять собой соединение, антитело, фрагмент антитела или слитый полипептид (например, слитый Fc, такой как CTLA4-Fc или LAG3-Fc), антисмысловую молекулу, молекулу рибозима или РНКи или низкомолекулярную органическую молекулу. В любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, способ может включать модифицированную иммунную клетку или связывающий белок с одним или более ингибиторами любого из следующих иммунных супрессирующих компонентов, отдельно или в любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором PD-1, например, PD-1-специфичным антителом или его связывающим фрагментом, таким как пидилизумаб, ниволумаб, пембролизумаб, MEDI0680 (ранее AMP-514), AMP-224, BMS-936558, или любой их комбинацией. В дополнительных вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок по настоящему изобретению применяют в комбинации с PD-L1-специфичным антителом или его связывающим фрагментом, таким как BMS-936559, дурвалумаб (MEDI4736), атезолизумаб (RG7446), авелумаб (MSB0010718C), MPDL3280A, или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок согласно настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором LAG3, таким как LAG525, IMP321, IMP701, 9H12, BMS-986016, или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или

связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором CTLA4. В частных вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с CTLA4-специфичным антителом или его связывающим фрагментом, таким как ипилимумаб, тремелимумаб, слитые белки CTLA4-Ig (например, абатацепт, белатацепт), или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с B7-H3-специфичным антителом или его связывающим фрагментом, таким как эноблитузумаб (MGA271), 376.96 или с обоими из них. Связывающий фрагмент антитела B7-H4 может представлять собой scFv или содержащий его слитый белок, как описано, например, в Dangaj et al., Cancer Res. 73:4820, 2013, а также описанные в патенте США № 9574000 и публикации PCT заявки WO/201640724A1 и WO 2013/025779A1.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором CD244.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором BLTA, HVEM, CD160 или любой их комбинацией. Антитела к CD-160 описаны, например, в публикации PCT заявки WO 2010/084158.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором TIM3.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором Gal9.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором передачи сигналов аденозина, таким как аденозиновый рецептор-ловушка.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором A2aR.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором KIR, таким как лирилумаб (BMS-986015).

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку применяют в комбинации с ингибитором ингибирующего цитокина (как правило, цитокина, отличного от TGFβ) или развития или активности Treg.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором IDO, таким как лево-1-

метилтриптофан, эпакадостат INCB024360; Liu et al., Blood 115:3520-30, 2010), эбселен (Terentis et al., Biochem. 49:591-600, 2010), индоксимод, NLG919 (Mautino et al., American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013; Apr 6-10, 2013), 1-метилтриптофан (1-MT), тирапазамин, или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором аргиназы, таким как метиловый эфир N(омега)-нитро-L-аргинина (L-NAME), N-омега-гидрокси-нор-l-аргинин (нор-NOHA), L-NOHA, 2(S)-амино-6-бороногексановая кислота (ABH), S-(2-бороноэтил)-L-цистеин (BEC), или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором VISTA, таким как CA-170 (Curis, Лексингтон, Массачусетс).

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку применяют в комбинации с ингибитором TIGIT, таким как, например, COM902 (Compugen, Торонто, Онтарио, Канада), ингибитором CD155, таким как, например, COM701 (Compugen) или и тем, и другим.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором PVRIG, PVRL2 или обоими из них. Антитела к PVRIG описаны, например, в публикации PCT заявки WO 2016/134333. Антитела к PVRL2 описаны, например, в публикации PCT заявки WO 2017/021526.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором LAIR1.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с ингибитором CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5, или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку или связывающий белок применяют в комбинации с агентом, который повышает активность (т. е. является агонистом) молекулы-стимулятора иммунной контрольной точки. Например, модифицированную иммунную клетку или связывающий белок можно применять в комбинации с агонистом CD137 (4-1BB) (таким как, например, урелумаб), агонистом CD134 (OX-40) (таким как, например, MEDI6469, MEDI6383 или MEDI0562), леналидомидом, помалидомидом, агонистом CD27 (таким как, например, CDX-1127), агонистом CD28 (таким как, например, TGN1412, CD80 или CD86), агонистом CD40 (таким как, например, CP-870,893, rhuCD40L или SGN-40), агонистом CD122 (таким как, например, IL-2), агонистом GITR (таким как, например, гуманизированные

моноклональные антитела, описанные в публикации заявки PCT WO 2016/054638), агонистом ICOS (CD278) (таким как, например, GSK3359609, mAb 88.2, JTX-2011, Icos 145-1, Icos 314-8 или любой их комбинацией). В любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, способ может включать введение модифицированной иммунной клетки или связывающего белка с одним или более агонистами молекулы-стимулятора иммунной контрольной точки, включая любой из вышеперечисленных, отдельно или в любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает модифицированную иммунную клетку или связывающий белок и вспомогательную терапию, включающую одно или более из следующего: антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфичные к раковому антигену, экспрессируемому солидной опухолью без воспаления, лучевая терапия, хирургическое вмешательство, химиотерапевтический агент, цитокин, РНКи или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления метод комбинированной терапии включает введение модифицированной иммунной клетки или связывающего белка и дополнительное проведение лучевой терапии или хирургического вмешательства. Лучевая терапия хорошо известна в данной области техники и включает рентгеновскую терапию, такую как гамма-облучение, и радиофармацевтическую терапию. Операции и хирургические методы, подходящие для лечения отдельно взятого вида рака у субъекта, хорошо известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления метод комбинированной терапии включает введение модифицированной иммунной клетки или связывающего белка и дополнительное введение химиотерапевтического агента. Химиотерапевтический агент включает, не ограничиваясь перечисленным, ингибитор функции хроматина, ингибитор топоизомеразы, лекарственное средство, ингибирующее микротрубочки, агент, повреждающий ДНК, антиметаболит (например, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и аналоги с модифицированным сахаром), ингибитор синтеза ДНК, агент, взаимодействующий с ДНК (такой как интеркалирующий агент) и ингибитор репарации ДНК. Иллюстративные химиотерапевтические агенты включают, не ограничиваясь перечисленным, следующие группы: антиметаболиты/противораковые агенты, такие как аналоги пиримидина (5-фторурацил, флоксуридин, капецитабин, гемцитабин и цитарабин) и аналоги пурина, антагонисты фолиевой кислоты и родственные ингибиторы (меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и 2-хлордезоксиаденозин (кладрибин)); антипролиферативные/антимитотические агенты, включая натуральные продукты, такие как алкалоиды барвинка (винбластин, винкристин

и винорелбин), разрушители микротрубочек, такие как таксан (паклитаксел, доцетаксел), винкристин, винбластин, нокодазол, эпотилоны и навелбин, эпидиподофиллотоксины (этопозид, тенипозид), агенты, повреждающие ДНК (актиномицин, амсакрин, антрациклины, блеомицин, бусульфан, камптотецин, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид, цитоксан, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, гексаметилмеламиноксалиплатин, ифосфамид, мелфалан, мерхлорэтамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевина, пликамицин, прокарбазин, таксол, таксотер, темозоламид, тенипозид, триэтилентиофосфорамид и этопозид (VP 16)); антибиотики, такие как дактиномицин (актиномицин D), даунорубицин, доксорубицин (адриамицин), идарубицин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин) и митомицин; ферменты (L-аспарагиназа, системно метаболизирующая L-аспарагин и удаляющая клетки, неспособные синтезировать собственный аспарагин); антиагрегантные агенты; антипролиферативные/антимитотические алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (мехлорэтамин, циклофосфамид и его аналоги, мелфалан, хлорамбуцил), этиленимины и метилмеламины (гексаметилмеламин и тиотепа), алкилсульфонаты-бусульфан, нитрозомочевины (кармустин (BCNU) и аналоги, стрептозоцин), тразены – дакарбазин (DTIC); антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат); координационные комплексы платины (цисплатин, карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевина, митотан, аминоглутетимид; гормоны, аналоги гормонов (эстроген, тамоксифен, гозерелин, бикалутамид, нилутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол, анастрозол); антикоагулянты (гепарин, синтетические соли гепарина и другие ингибиторы тромбина); фибринолитические агенты (такие как тканевой активатор плазминогена, стрептокиназа и урокиназа), аспирин, дипиридамол, тиклопидин, клопидогрел, абциксимаб; антимиграционные агенты; антисекреторные средства (бревелдин); иммунодепрессанты (циклоспорин, такролимус (FK-506), сиролимус (рапамицин), азатиоприн, микофенолата мофетил); антиангиогенные соединения (TNP470, генистеин) и ингибиторы фактора роста (ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ингибиторы фактора роста фибробластов (FGF)); блокатор рецепторов ангиотензина; доноры оксида азота; антисмысловые олигонуклеотиды; антитела (трастузумаб, ритуксимаб); химерные антигенные рецепторы; ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки (третиноин); ингибиторы mTOR, ингибиторы топоизомеразы (доксорубицин (адриамицин), амсакрин, камптотецин, даунорубицин, дактиномицин, энипозид, эпирубицин, этопозид, идарубицин, иринотекан (CPT-11) и митоксантрон, топотекан, иринотекан), кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон,

метилпреднизолон, преднизон и пренизолон); ингибиторы сигнальной киназы фактора роста; индукторы митохондриальной дисфункции, токсины, такие как холерный токсин, рицин, экзотоксин Pseudomonas, токсин аденилатциклазы Bordetella pertussis или дифтерийный токсин, и активаторы каспаз; и разрушители хроматина.

Цитокины могут применяться для модификации иммунного ответа хозяина в сторону противораковой активности. См., например, Floros & Tarhini, Semin. Oncol. 42(4):539-548, 2015. Цитокины, пригодные для стимулирования иммунного противоракового или противоопухолевого ответа, включают, например, IFN-α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-24 и ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) отдельно или в любой комбинации с модифицированной иммунной клеткой или связывающим белком согласно настоящему изобретению.

В дополнительных аспектах предложены способы получения композиции согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способы включают объединение (i) аликвоты клетки-хозяина, трансдуцированной вектором согласно настоящему изобретению, с (ii) фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления векторы согласно настоящему изобретению применяют для трансфекции/трансдукции клетки-хозяина (например, Т-клетки) для применения в терапии адоптивного переноса (например, нацеливания на раковый антиген).

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают, перед взятием аликвоты, культивирование трансдуцированной клетки-хозяина и отбор трансдуцированной клетки как содержащей (т. е. экспрессирующей) вектор. В дополнительных вариантах осуществления способы включают после культивирования и отбора и до взятия аликвоты размножение трансдуцированной клетки-хозяина. В любом из вариантов осуществления настоящих способов полученная композиция или однократная доза могут быть заморожены для последующего использования. Любая подходящая клетка-хозяин может быть использована для получения композиции или однократной дозы в соответствии с настоящими способами, включая, например, гемопоэтическую стволовую клетку, Т-клетку, первичную Т-клетку, Т-клеточную линию, NK-клетку или NK-T клетку. В конкретных вариантах осуществления способы включают клетку-хозяина, которая представляет собой CD8+ Т-клетку, CD4+ Т-клетку или обе из них.

Настоящее изобретение также включает следующие иллюстративные варианты осуществления:

Вариант осуществления 1. Модифицированная иммунная клетка, содержащая

гетерологичный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, где кодируемый связывающий белок содержит: (a) вариабельный домен α-цепи (Vα) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3α) согласно любой из SEQ ID NO: 28, 19, 22 или 25 или ее вариант, и вариабельный домен β-цепи (Vβ) TCR; или (b) Vβ домен TCR, содержащий аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3β) согласно любой из SEQ ID NO: 40, 31, 34 или 37 или ее вариант, и Vα домен TCR; или (c) Vα домен TCR согласно (a) и Vβ домен TCR согласно (b), где кодируемый связывающий белок способен связываться с RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):человеческий лейкоцитарный антиген (HLA), где, необязательно, HLA включает HLA-A*0201.

Вариант осуществления 2. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 1, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 4,0 или выше, или 4,5 или выше.

Вариант осуществления 3. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 1 или 2, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 5,0 или выше.

Вариант осуществления 4. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 5,5 или выше.

Вариант осуществления 5. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 6,0 или выше.

Вариант осуществления 6. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-5, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 6,5 или выше.

Вариант осуществления 7. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где HLA включает HLA-A*201.

Вариант осуществления 8. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-7, где 50 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции продуцируют IFN-γ, когда популяцию модифицированных иммунных

клеток в течение 4 часов культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками (например, HLA-A*0201+), в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-4} мкМ, 10^{-5} мкМ или 10^{-6} мкМ в совместной культуре, где антигенпрезентирующие клетки необязательно включают клетки T2.

Вариант осуществления 9. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-8, где 10 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции являются $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно (например, в течение приблизительно 24 часов) с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-2} мкМ в совместной культуре, где антигенпрезентирующие клетки необязательно включают клетки T2, клетки Jurkat или и те, и другие.

Вариант осуществления 10. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 9, где 15 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции являются $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно (например, в течение приблизительно 24 часов) с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-2} мкМ в совместной культуре.

Вариант осуществления 11. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 9 или 10, где 20 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции являются $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно (например, в течение приблизительно 24 часов) с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-2} мкМ в совместной культуре.

Вариант осуществления 12. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 9-11, где 40 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции являются $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно (например, в течение приблизительно 24 часов) с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-2} мкМ в совместной культуре.

Вариант осуществления 13. Модифицированная иммунная клетка согласно

любому из вариантов осуществления 9-12, где 50 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции являются $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно (например, в течение приблизительно 24 часов) с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-2} мкМ в совместной культуре.

Вариант осуществления 14. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-13, где 10 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции являются $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно (например, в течение приблизительно 24 часов) с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-3} мкМ в совместной культуре.

Вариант осуществления 15. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 14, где 15 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции являются $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно (например, в течение приблизительно 24 часов) с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-3} мкМ в совместной культуре.

Вариант осуществления 16. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 14 или 15, где 20 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции являются $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно (например, в течение приблизительно 24 часов) с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида приблизительно 10^{-3} мкМ в совместной культуре.

Вариант осуществления 17. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-16, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 11 % или более $HLA\text{-}A*0201^+$ клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

Вариант осуществления 18. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 17, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 12 % или более $HLA\text{-}A*0201^+$ клеток MDA-MB-468 в образце, когда

модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

Вариант осуществления 19. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 17 или 18, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 14 % или более HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

Вариант осуществления 20. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 17-19, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 15 % или более HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

Вариант осуществления 21. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 17-20, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 20 % или более HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

Вариант осуществления 22. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 17-21, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 25 % или более HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

Вариант осуществления 23. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-22, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 10 % или более HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 10:1.

Вариант осуществления 24. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-23, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить приблизительно 5 % или более HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 1:1.

Вариант осуществления 25. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-24, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 21 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная

иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 30:1.

Вариант осуществления 26. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 25, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 22 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 30:1.

Вариант осуществления 27. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 25 или 26, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 23 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 30:1.

Вариант осуществления 28. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 25-27, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 24 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 30:1.

Вариант осуществления 29. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 25-28, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 25 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 30:1.

Вариант осуществления 30. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-29, где модифицированная иммунная клетка имеет повышенную активность в отношении уничтожения HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 и/или в отношении клеток Panc1 совместном культивировании в течение 4 часов по сравнению с эталонной иммунной клеткой, содержащей полинуклеотид, кодирующий Т-клеточный рецептор, содержащий цепь TCRα, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82, и цепь TCRβ, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83.

Вариант осуществления 31. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-30, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом пептид WT-1:HLA на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8.

Вариант осуществления 32. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-31, где: (i) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 16, 5, 6, 7, 8, 13, 14 или 15; и/или (ii) кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью

аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 12, 1, 2, 3, 4, 9, 10 или 11.

Вариант осуществления 33. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-32, где кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью любой из SEQ ID NO: 16, 5, 6, 7, 8, 13, 14 или 15, и/или кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью любой из SEQ ID NO: 12, 1, 2, 3, 4, 9, 10 или 11, при условии, что: (i) по меньшей мере три или четыре CDR не имеют мутаций; (ii) CDR, которые имеют мутации, имеют только до двух аминокислотных замен, делецию до пяти аминокислот подряд или их комбинацию; и (iii) кодируемый связывающий белок сохраняет свою способность связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA, необязательно со значением pEC50 при продукции интерферона-гамма (IFNγ), равным 4,0, 4,5, 5,0, 5,1, 5,2,, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5 или выше.

Вариант осуществления 34. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-33, где: (i) кодируемая CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40, и кодируемая CDR3α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28; (ii) кодируемая CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31, и кодируемая CDR3α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19; (iii) кодируемая CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 34, и кодируемая CDR3α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22; или (iv) кодируемая CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, и кодируемая CDR3α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25.

Вариант осуществления 35. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-34, где: (i) кодируемый Vβ домен содержит аминокислотную последовательность CDR1β согласно любой из SEQ ID NO: 38, 29, 32 или 35 и/или аминокислотную последовательность CDR2β согласно любой из SEQ ID NO: 39, 30, 33 или 36; и/или (ii) кодируемый Vα домен содержит аминокислотную последовательность CDR1α согласно любой из SEQ ID NO: 26, 17, 20 или 23 и/или аминокислотную последовательность CDR2α согласно любой из SEQ ID NO: 27, 18, 21

или 24.

Вариант осуществления 36. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-35, где кодируемые Vα и Vβ домены TCR содержат аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α и CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно: (i) SEQ ID NO: 26-28 и 38-40, соответственно; (ii) SEQ ID NO: 23, 27, 28 и 38-40, соответственно; (iii) SEQ ID NO: 17-19 и 29-31, соответственно; (iv) SEQ ID NO: 20-22 и 32-34, соответственно; или (v) SEQ ID NO: 23-25 и 35-37, соответственно.

Вариант осуществления 37. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-36, где кодируемый Vβ домен TCR содержит (i) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBJ02-03; и/или (ii) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV06-05, аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV07-09, или аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV20-01.

Вариант осуществления 38. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-37, где кодируемый Vα домен TCR содержит (i) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAJ43; и/или (ii) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV20-02; аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV38DV08; или аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV38-01.

Вариант осуществления 39. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 38, где:

(i) кодируемый Vβ домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBJ02-03; и (ii) кодируемый Vα домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAJ43.

Вариант осуществления 40. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 38, где:

(i) кодируемый Vβ домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV06-05; и (ii) кодируемый Vα домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV20.

Вариант осуществления 41. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 38, где:

(i) кодируемый Vβ домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV07-09; и (ii) кодируемый Vα домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV38DV08.

Вариант осуществления 42. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 38, где:

(i) кодируемый Vβ домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV20-01; и (ii) кодируемый Vα домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV38-01.

Вариант осуществления 43. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-42, где: (i) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16 или 8, и кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12 или 4; (ii) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13 или 5, и кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 или 1; (iii) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14 или 6, и кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10 или 2; или (iv) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15 или 7, и кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11 или 3.

Вариант осуществления 44. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-43, где кодируемый связывающий белок дополнительно содержит: (i) константный домен α-цепи (Cα) TCR или его фрагмент; и/или (ii) константный домен β-цепи (Cβ) TCR или его фрагмент.

Вариант осуществления 45. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 44, где кодируемый Cα содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью любой из SEQ ID NO: 41-44.

Вариант осуществления 46. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 44 или 45, где кодируемый Cβ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью

SEQ ID NO: 45.

Вариант осуществления 47. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 44-46, где кодируемый связывающий белок содержит: (i) β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 61 или 57, и α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53 или 49; (ii) β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 58 или 54, и α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50 или 46; (iii) β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 59 или 55, и α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере на 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 51 или 52; или (iv) β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 60 или 56, и α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 52 или 48.

Вариант осуществления 48. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-47, где кодируемый связывающий белок представляет собой TCR, химерный антигенный рецептор (CAR) или одноцепочечный TCR (scTCR).

Вариант осуществления 49. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-48, где иммунная клетка представляет собой клетку иммунной системы человека.

Вариант осуществления 50. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-49, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, необязательно $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^-CD8^-$ двойную негативную Т-клетку или γδ-Т-клетку, естественную киллерную клетку, NK-Т-клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 51. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 50, где Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку,

центральную Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 52. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-51, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, является кодон-оптимизированным для экспрессии в иммунной клетке.

Вариант осуществления 53. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-52, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержит полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 62-77.

Вариант осуществления 54. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 53, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержит (i) полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 77, и полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 69; (ii) полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 74, и полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66; (iii) полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 75, и полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 67; или (iv) полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 68.

Вариант осуществления 55. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-54, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом, кодирующим Vβ, и полинуклеотидом, кодирующим Vα.

Вариант осуществления 56. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 55, где кодируемый саморасщепляющийся пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID

NO: 84-88.

Вариант осуществления 57. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 55 или 56, где полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 89-93.

Вариант осуществления 58. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 55-57, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, имеет структуру, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, (кодирующий цепь TCRβ полинуклеотид)-(кодирующий саморасщепляющийся пептид полинуклеотид)-(кодирующий цепь TCRα полинуклеотид).

Вариант осуществления 59. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 55-58, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержит полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 78-81.

Вариант осуществления 60. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 53, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержит полинуклеотид, содержащий или состоящий из полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 78-81.

Вариант осуществления 61. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-60, дополнительно содержащая: (i) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит внеклеточную часть α-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит α-цепь корецептора CD8; (ii) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит внеклеточную часть β-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит β-цепь корецептора CD8; или (iii) полинуклеотид согласно (i) и полинуклеотид согласно (ii),

где, необязательно, клетка-хозяин включает CD4+ Т-клетку.

Вариант осуществления 62. Клетка-хозяин согласно варианту осуществления 61, содержащая:

(a) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть α-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит α-цепь корецептора CD8; (b)

гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть β-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит β-цепь корецептора CD8; и

(c) полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом согласно (a) и полинуклеотидом согласно (b).

Вариант осуществления 63. Модифицированная иммунная клетка согласно любому из вариантов осуществления 1-62, где иммунная клетка содержит нокаут хромосомного гена для гена PD-1; гена LAG3; гена TIM3; гена CTLA4; гена компонента HLA; гена компонента TCR; или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 64. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 63, где нокаут хромосомного гена включает нокаут гена компонента HLA, выбранного из гена макроглобулина α1; гена макроглобулина α2; гена макроглобулина α3; гена микроглобулина β1; или гена микроглобулина β2 или любой их комбинации.

Вариант осуществления 65. Модифицированная иммунная клетка согласно варианту осуществления 63 или 64, где нокаут хромосомного гена включает нокаут гена компонента TCR, выбранного из гена вариабельной области TCR α; гена вариабельной области TCR β; гена константной области TCR или любой их комбинации.

Вариант осуществления 66. Выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, где кодируемый связывающий белок содержит Vα домен TCR и Vβ домен TCR и способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA, где: (i) кодируемый Vα домен содержит аминокислотную последовательность CDR3, представленную в любой из SEQ ID NO: 28, 19, 22 или 25; (ii) кодируемый Vβ домен содержит аминокислотную последовательность CDR3, представленную в любой из SEQ ID NO: 40, 31, 34 или 37; (iii) кодируемый Vα домен содержит аминокислотную последовательность CDR1, представленную в любой из SEQ ID NO: 26, 17, 20 или 23; (iv) кодируемый Vβ домен содержит аминокислотную последовательность CDR1, представленную в любой из SEQ ID NO: 38, 32 или 35; (v) кодируемый Vα домен содержит аминокислотную последовательность CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO: 27, 18, 21 или 24; (vi) кодируемый Vβ домен содержит аминокислотную последовательность CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO: 39, 30, 33 или 36; (vii) кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 4, 1-3, 12 или 9-11; (viii) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей

мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 8, 5-7, 16 или 13-15; (ix) кодируемый Vα TCR содержится в цепи TCRα, где цепь TCRα содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 53 и 46-52; (x) кодируемый Vβ TCR содержится в цепи TCRβ, где цепь TCRβ имеет аминокислотную последовательность, содержащую, состоящую из или обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 61 и 54-60; или (xi) любая комбинация (i)-(x).

Вариант осуществления 67. Выделенный полинуклеотид согласно варианту осуществления 66, где полинуклеотид является кодон-оптимизированным для экспрессии в клетке-хозяине, где, необязательно, клетка-хозяин представляет собой человеческую Т-клетку, NK-клетку или NK-T-клетку.

Вариант осуществления 68. Выделенный полинуклеотид согласно варианту осуществления 66 или 67, где полинуклеотид содержит полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 62-81.

Вариант осуществления 69. Вектор, содержащий полинуклеотид согласно любому из вариантов осуществления 66-68.

Вариант осуществления 70. Вектор согласно варианту осуществления 69, где вектор представляет собой лентивирусный вектор или ретровирусный вектор.

Вариант осуществления 71. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид согласно любому из вариантов осуществления 66-68 и способная экспрессировать кодируемый связывающий белок.

Вариант осуществления 72. Композиция, содержащая: (i) модифицированную иммунную клетку согласно любому из вариантов осуществления 1-65; (ii) полинуклеотид согласно любому из вариантов осуществления 66-68; (iii) вектор согласно варианту осуществления 69 или 70; и/или (iv) клетку-хозяина согласно варианту осуществления 71; и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Вариант осуществления 73. Композиция согласно варианту осуществления 72, содержащая:

(i) модифицированную иммунную клетку согласно любому из вариантов осуществления 1-65; и (ii) иммунную клетку, содержащую полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержащий Vα TCR и Vβ TCR и способный специфически связываться с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 100):HLA, где, необязательно, HLA включает HLA-A*0201, и где, необязательно, каждая из модифицированной иммунной

клетки согласно (i) и иммунной клетки согласно (ii) независимо выбрана из Т-клетки, NK-клетки и NK-Т-клетки.

Вариант осуществления 74. Композиция согласно варианту осуществления 73, где связывающий белок иммунной клетки в (ii) содержит: (a) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 101-103 и 105-107, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 104, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 108; (b) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 109-110 и 113-115, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 112, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116; или

(c) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 117-119 и 121-123, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 120, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 124.

Вариант осуществления 75. Способ лечения субъекта, имеющего заболевание или расстройство, связанное с экспрессией WT-1, включающий введение указанному субъекту эффективного количества: (i) модифицированной иммунной клетки согласно любому из вариантов осуществления 1-65; (ii) полинуклеотида согласно любому из вариантов осуществления 66-68; (iii) вектора согласно варианту осуществления 69 или 70; (iv) клетки-хозяина согласно варианту осуществления 71; и/или (v) композиции согласно любому из вариантов осуществления 72-74.

Вариант осуществления 76. Способ согласно варианту осуществления 75, включающий введение модифицированной иммунной клетки согласно любому из вариантов осуществления 1-65 субъекту, который получил, получает или будет получать иммунную клетку, содержащую полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержащий Vα TCR и Vβ TCR и способный специфически связываться с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 100):HLA, где, необязательно, HLA включает HLA-A*0201, и

где, необязательно, каждая из модифицированной иммунной клетки и иммунной клетки независимо выбрана из Т-клетки, NK-клетки и NK-Т-клетки.

Вариант осуществления 77. Способ согласно варианту осуществления 76, где связывающий белок, способеный специфически связываться с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 100):HLA, содержит: (a) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 101-103 и 105-107, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 104, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 108; (b) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 109-110 и 113-115, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 112, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116; или (c) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 117-119 и 121-123, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 120, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 124.

Вариант осуществления 78. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-77, где заболевание или расстройство представляет собой гемобластоз или солидный рак.

Вариант осуществления 79. Способ согласно варианту осуществления 78, где гемобластоз выбран из острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ, включая рефрактерный и рецидивирующий ОМЛ, и включая острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз (например, с эозинофилией или без нее), острый моноцитарный лейкоз, острый эритроидный лейкоз и острый мегакариобластный лейкоз), хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), хронического миелоцитарного лейкоза, хронического эозинофильного лейкоза (ХЭЛ), миелодиспластического синдрома (МДС),

неходжкинской лимфомы (НХЛ) или множественной миеломы (ММ, включая рефрактерную и рецидивирующую ММ).

Вариант осуществления 80. Способ согласно варианту осуществления 78, где солидный рак выбран из рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, карциномы костей и мягких тканей, опухоли головного мозга, рака молочной железы, карциномы молочной железы, рака шейки матки, рака ободочной кишки, колоректальной аденокарциномы, колоректального рака, десмоидной опухоли, эмбрионального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, глиобластомы, меланомы, диффузной мезотелиомы брюшины, злокачественной мезотелиомы плевры, глиомы, астроцитомы, гинекологической опухоли, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, злокачественной меланомы, остеосаркомы, рака яичника (например, эпителиального рака яичника, карциномы яичника), рака маточной трубы, карциномы эндометрия, рака поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, первичной астроцитарной опухоли, первичного рака щитовидной железы, рака предстательной железы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, остеогенной саркомы, герминогенной опухоли яичка, уротелиального рака, саркомы матки, карциносаркомы матки или рака матки.

Вариант осуществления 81. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-80, где модифицированную иммунную клетку модифицируют ex vivo, чтобы она содержала гетерологичный полинуклеотид.

Вариант осуществления 82. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-81, где модифицированная иммунная клетка является аллогенной, сингенной или аутологичной по отношению к субъекту.

Вариант осуществления 83. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-82, где модифицированная иммунная клетка представляет собой гемопоэтическую клетку-предшественника или клетку иммунной системы человека.

Вариант осуществления 84. Способ согласно варианту осуществления 83, где клетка иммунной системы представляет собой $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^-$ $CD8^-$ двойную негативную Т-клетку, γδ-Т-клетку, естественную киллерную клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 85. Способ согласно варианту осуществления 84, где Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 86. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-85, где способ включает введение субъекту множества доз модифицированной иммунной клетки.

Вариант осуществления 87. Способ согласно варианту осуществления 86, где множество доз вводят с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель.

Вариант осуществления 88. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-87, где модифицированную иммунную клетку вводят субъекту в дозе от приблизительно 10^4 клеток/кг до приблизительно 10^{11} клеток/кг.

Вариант осуществления 89. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-88, где способ дополнительно включает введение субъекту цитокина.

Вариант осуществления 90. Способ согласно варианту осуществления 89, где цитокин представляет собой IL-2, IL-15, IL-21 или любую их комбинацию.

Вариант осуществления 91. Способ согласно варианту осуществления 90, где цитокин представляет собой IL-2 и его вводят одновременно или последовательно с модифицированной иммунной клеткой.

Вариант осуществления 92. Способ согласно варианту осуществления 91, где цитокин вводят последовательно, при условии, что субъекту вводили модифицированную иммунную клетку по меньшей мере три или четыре раза до введения цитокина.

Вариант осуществления 93. Способ согласно любому из вариантов осуществления 89-92, где цитокин представляет собой IL-2 и его вводят подкожно.

Вариант осуществления 94. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-93, где субъект дополнительно получает иммуносупрессивную терапию.

Вариант осуществления 95. Способ согласно варианту осуществления 94, где иммуносупрессивная терапия выбрана из ингибиторов кальциневрина, кортикостероидов, ингибиторов микротрубочек, низкой дозы пролекарства микофеноловой кислоты или любой их комбинации.

Вариант осуществления 96. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-95, где субъект получил немиелоаблативную или миелоаблативную трансплантацию гемопоэтических клеток.

Вариант осуществления 97. Способ согласно варианту осуществления 96, где модифицированную иммунную клетку вводят субъекту через по меньшей мере три месяца после немиелоаблативной трансплантации гемопоэтических клеток.

Вариант осуществления 98. Способ согласно варианту осуществления 97, где

модифицированную иммунную клетку вводят субъекту через по меньшей мере два месяца после миелоаблативной трансплантации гемопоэтических клеток.

Вариант осуществления 99. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-98, где субъект ранее получал терапию ОМЛ.

Вариант осуществления 100. Композиция, содержащая: (i) модифицированную иммунную клетку согласно любому из вариантов осуществления 1-65; (ii) полинуклеотид согласно любому из вариантов осуществления 66-68; (iii) вектор согласно варианту осуществления 69 или 70; и/или (iv) клетку-хозяина согласно варианту осуществления 71, для применения при лечении заболевания или расстройства, связанного с экспрессией WT-1.

Вариант осуществления 101. Композиция, содержащая: (i) модифицированную иммунную клетку согласно любому из вариантов осуществления 1-65; (ii) полинуклеотид согласно любому из вариантов осуществления 66-68; (iii) вектор согласно варианту осуществления 69 или 70; и/или (iv) клетку-хозяина согласно варианту осуществления 71, для применения при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией WT-1.

Вариант осуществления 102. Композиция для применения согласно варианту осуществления 100 или 101, где заболевание или расстройство представляет собой гемобластоз или солидный рак.

Вариант осуществления 103. Композиция для применения согласно варианту осуществления 102, где гемобластоз выбран из острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ, включая рефрактерный и рецидивирующий ОМЛ, и включая острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз (например, с эозинофилией или без нее), острый моноцитарный лейкоз, острый эритроидный лейкоз и острый мегакариобластный лейкоз), хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), хронического миелоцитарного лейкоза, хронического эозинофильного лейкоза (ХЭЛ), миелодиспластического синдрома (МДС), неходжкинской лимфомы (НХЛ) или множественной миеломы (ММ, включая рефрактерную и рецидивирующую ММ).

Вариант осуществления 104. Композиция для применения согласно варианту осуществления 102, где солидный рак выбран из рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, карциномы костей и мягких тканей, опухоли головного мозга, рака молочной железы, карциномы молочной железы, рака шейки матки, рака ободочной кишки, колоректальной аденокарциномы, колоректального рака, десмоидной опухоли,

эмбрионального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, глиобластомы, меланомы, диффузной мезотелиомы брюшины, злокачественной мезотелиомы плевры, глиомы, астроцитомы, гинекологической опухоли, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, злокачественной меланомы, остеосаркомы, рака яичника (например, эпителиального рака яичника, карциномы яичника), рака маточной трубы, карциномы эндометрия, рака поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, первичной астроцитарной опухоли, первичного рака щитовидной железы, рака предстательной железы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, остеогенной саркомы, герминогенной опухоли яичка, уротелиального рака, саркомы матки, карциносаркомы матки или рака матки.

Вариант осуществления 105. Связывающий белок, содержащий вариабельный домен α-цепи (Vα) Т-клеточного рецептора (TCR) и вариабельный домен β-цепи (Vβ) TCR, где: Vα домен содержит: (i) аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3α) согласно любой из SEQ ID NO: 28, 19, 22, или 25, или 28, или ее вариант; (ii) аминокислотную последовательность CDR1 (CDR1α) согласно любой из SEQ ID NO: 26, 17, 20 или 23; (iii) аминокислотную последовательность CDR2 (CDR2α) согласно любой из SEQ ID NO: 27, 18, 21 или 24; (iv) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-4 или 9-12; или (v) любую комбинацию (i)-(iv); и Vβ домен содержит: (vi) аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3β) согласно любой из SEQ ID NO: 40, 31, 34 или 37, или ее вариант; (vii) аминокислотную последовательность CDR1 (CDR1β) согласно любой из SEQ ID NO: 38, 29, 32 или 35; (viii) аминокислотную последовательность CDR2 (CDR2β) согласно любой из SEQ ID NO: 39, 30, 33 или 36; (ix) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 5-8 или 13-16; или (x) любую комбинацию (vi)-(x), и где связывающий белок согласно варианту осуществления 105, который способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA, где, необязательно, HLA включает HLA-A*0201.

Вариант осуществления 106. Связывающий белок согласно варианту осуществления 105, дополнительно содержащий: (1) константный домен α-цепи (Cα) TCR или его фрагмент; и/или

(2) константный домен β-цепи (Cβ) TCR или его фрагмент.

Вариант осуществления 107. Связывающий белок согласно варианту

осуществления 106, где Cα содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 41-44.

Вариант осуществления 108. Связывающий белок согласно варианту осуществления 106 или 107, где Cβ содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45.

Вариант осуществления 109. Выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок согласно любому из вариантов осуществления 105-108.

Вариант осуществления 110. Полинуклеотид согласно варианту осуществления 109, который является кодон-оптимизированным для экспрессии в клетке-хозяине.

Вариант осуществления 111. Модифицированная иммунная клетка, содержащая полинуклеотид согласно любому из вариантов осуществления 109-110, где полинуклеотид является гетерологичным по отношению к иммунной клетке.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO: 1 (вариабельный домен α-цепи №4 с лидерной последовательностью)
MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSF
FWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVNI
GNHDMRFGAGTRLTVKPN

SEQ ID NO: 2 (вариабельный домен α-цепи №6 с лидерной последовательностью)
MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGESSSLNCSYTVSGLRGL
FWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKEKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCAVQT
MDGNQFYFGTGTSLTVIPN

SEQ ID NO: 3 (вариабельный домен α-цепи №7 с лидерной последовательностью)
MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYL
FWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCA
SSPGTYKYIFGTGTRLKVLAN

SEQ ID NO: 4 (вариабельный домен α-цепи №10 с лидерной последовательностью)
MTRVSLLWAVVVSTCLESGMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESNYY
LFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFC
AFNPWENYGQNFVFGPGTRLSVLPY

SEQ ID NO: 5 (вариабельный домен β-цепи №4 с лидерной последовательностью)

MGCRLLCCAVLCLLGAVPIDTEVTQTPKHLVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMY
WYKQKAKKPPELMFVYSYEKLSINESVPSRFSPECPNSSLLNLHLHALQPEDSALYLCAS
SQGTSGADTQYFGPGTRLTVLE

SEQ ID NO: 6 (вариабельный домен β-цепи №6 с лидерной последовательностью)

MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMS
WYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA
SSYSLWDLQETQYFGPGTRLLVLE

SEQ ID NO: 7 (вариабельный домен β-цепи №7 с лидерной последовательностью)

MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYW
YRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCAS
SFSDGGATDTQYFGPGTRLTVLE

SEQ ID NO: 8 (вариабельный домен β-цепи №10 с лидерной последовательностью)

MLLLLLLLGPAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQF
PKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARPH
SLTDTQYFGPGTRLTVLE

SEQ ID NO: 9 (вариабельный домен α-цепи №4 с удаленной лидерной последовательностью)

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD
KEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVNIGNHDMRFGAGTRLTVKPN

SEQ ID NO: 10 (вариабельный домен α-цепи №6 с удаленной лидерной последовательностью)

EDQVTQSPEALRLQEGESSSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGE
EKEKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCAVQTMDGNQFYFGTGTSLTVIPN

SEQ ID NO: 11 (вариабельный домен α-цепи №7 с удаленной лидерной последовательностью)

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAY
KQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCASSPGTYKYIFGTGTRLKVLA

N

SEQ ID NO: 12 (вариабельный домен α-цепи №10 с удаленной лидерной последовательностью)

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESNYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAY KQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFCAFNPWENYGQNFVFGPGTRL SVLPY

SEQ ID NO: 13 (вариабельный домен β-цепи №4 с удаленной лидерной последовательностью)

DTEVTQTPKHLVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYKQKAKKPPELMFVYSY EKLSINESVPSRFSPECPNSSLLNLHLHALQPEDSALYLCASSQGTSGADTQYFGPGTRLT VLE

SEQ ID NO: 14 (вариабельный домен β-цепи №6 с удаленной лидерной последовательностью)

NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGA GITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYSLWDLQETQYFGPGTRL LVLE

SEQ ID NO: 15 (вариабельный домен β-цепи №7 с удаленной лидерной последовательностью)

DTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQ LEKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSFSDGGATDTQYFGPGTRLT VLE

SEQ ID NO: 16 (вариабельный домен β-цепи №10 с удаленной лидерной последовательностью)

GAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGS KATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARPHSLTDTQYFGPGTRLTV LE

SEQ ID NO: 17 (CDR1α №4)

DRGSQS

SEQ ID NO: 18 (CDR2α №4)
IYSNGD

SEQ ID NO: 19 (CDR3α №4)
CAVNIGNHDMRF

SEQ ID NO: 20 (CDR1α №6)
VSGLRG

SEQ ID NO: 21 (CDR2α №6)
LYSAGEE

SEQ ID NO: 22 (CDR3α №6)
CAVQTMDGNQFYF

SEQ ID NO: 23 (CDR1α №7)
TSESDYY

SEQ ID NO: 24 (CDR2α №7)
QEAYKQQN

SEQ ID NO: 25 (CDR3α №7)
CASSPGTYKYIF

SEQ ID NO: 26 (CDR1α №10)
TSESNYY

SEQ ID NO: 27 (CDR2α №10)
QEAYKQQN

SEQ ID NO: 28 (CDR3α №10)
CAFNPWENYGQNFVF

SEQ ID NO: 29 (CDR1β №4)
MGHRA

SEQ ID NO: 30 (CDR2β №4)
YSYEKL

SEQ ID NO: 31 (CDR3β №4)
CASSQGTSGADTQYF

SEQ ID NO: 32 (CDR1β №6)
MNHEY

SEQ ID NO: 33 (CDR2β №6)
SVGAGI

SEQ ID NO: 34 (CDR3β №6)
CASSYSLWDLQETQYF

SEQ ID NO: 35 (CDR1β №7)
SEHNR

SEQ ID NO: 36 (CDR2β №7)
FQNEAQ

SEQ ID NO: 37 (CDR3β №7)
CASSFSDGGATDTQYF

SEQ ID NO: 38 (CDR1β №10)
DFQATT

SEQ ID NO: 39 (CDR2β №10)
SNEGSKA

SEQ ID NO: 40 (CDR3β №10)
CSARPHSLTDTQYF

SEQ ID NO: 41 (константный домен TCRα №4)

IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSM
DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLS
VIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 42 (константный домен TCRα №6)

IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSM
DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLS
VIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 43 (константный домен TCRα №7)

IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSM
DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLS
VIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 44 (константный домен TCRα №10)

IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSM
DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLS
VIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 45 (константный домен TCRβ)

DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSG
VCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR
AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM
VKRKDSRG

SEQ ID NO: 46 (α-цепь №4 с лидерной последовательностью)

MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSF
FWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVNI
GNHDMRFGAGTRLTVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSD
VYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVE
KSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 47 (α-цепь №6 с лидерной последовательностью)

MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGESSSLNCSYTVSGLRGL
FWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKEKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCAVQT

MDGNQFYFGTGTSLTVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSD
VYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVE
KSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 48 (α-цепь №7 с лидерной последовательностью)

MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYL
FWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCA
SSPGTYKYIFGTGTRLKVLANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS
DVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL
VEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 49 (α-цепь №10 с лидерной последовательностью)

MTRVSLLWAVVVSTCLESGMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESNYY
LFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFC
AFNPWENYGQNFVFGPGTRLSVLPYIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS
QSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSC
DVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 50 (α-цепь №4 с удаленной лидерной последовательностью)

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD
KEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVNIGNHDMRFGAGTRLTVKPNIQN
PDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSA
VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILL
LKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 51 (α-цепь №6 с удаленной лидерной последовательностью)

EDQVTQSPEALRLQEGESSSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGE
EKEKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCAVQTMDGNQFYFGTGTSLTVIPNIQNP
DPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAV
AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLL
KVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 52 (α-цепь №7 с удаленной лидерной последовательностью)

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAY
KQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCASSPGTYKYIFGTGTRLKVLA

NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKS
NSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGF
RILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 53 (α-цепь №10 с удаленной лидерной последовательностью)

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESNYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAY
KQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFCAFNPWENYGQNFVFGPGTRL
SVLPYIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSM
DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLS
VIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 54 (β-цепь №4 с лидерной последовательностью)

MGCRLLCCAVLCLLGAVPIDTEVTQTPKHLVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMY
WYKQKAKKPPELMFVYSYEKLSINESVPSRFSPECPNSSLLNLHLHALQPEDSALYLCAS
SQGTSGADTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD
HVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRC
QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGK
ATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

SEQ ID NO: 55 (β-цепь №6 с лидерной последовательностью)

MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMS
WYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA
SSYSLWDLQETQYFGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFY
PDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR
CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG
KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

SEQ ID NO: 56 (β-цепь №7 с лидерной последовательностью)

MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYW
YRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCAS
SFSDGGATDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYP
DHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR
CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG
KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

SEQ ID NO: 57 (β-цепь №10 с лидерной последовательностью)

MLLLLLLLGPAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQF
PKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARPH
SLTDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVEL
SWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQF
YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY
AVLVSALVLMAMVKRKDSRG

SEQ ID NO: 58 (β-цепь №4 с удаленной лидерной последовательностью)

DTEVTQTPKHLVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYKQKAKKPPELMFVYSY
EKLSINESVPSRFSPECPNSSLLNLHLHALQPEDSALYLCASSQGTSGADTQYFGPGTRLT
VLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGV
CTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA
KPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV
KRKDSRG

SEQ ID NO: 59 (β-цепь №6 с удаленной лидерной последовательностью)

NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGA
GITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYSLWDLQETQYFGPGTRL
LVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSG
VCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR
AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM
VKRKDSRG

SEQ ID NO: 60 (β-цепь №7 с удаленной лидерной последовательностью)

DTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQ
LEKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSFSDGGATDTQYFGPGTRLT
VLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGV
CTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA
KPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV
KRKDSRG

SEQ ID NO: 61 (β-цепь №10 с удаленной лидерной последовательностью)

GAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGS
KATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARPHSLTDTQYFGPGTRLTV

LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT
DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP
VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR
KDSRG

SEQ ID NO: 62 (генный фрагмент α №4)

ATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGATCCTGTGGCTTCAGTTGAGCTGGGT
TTGGAGCCAACAGAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGGACCCCTCAGTGTTCCAGAGG
GAGCCATTGCCTCTCTCAACTGCACTTACAGTGACCGAGGTTCCCAGTCCTTCTTCTG
GTACAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTGAGTTGATAATGTTCATATACTCCAATGG
TGACAAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCACAGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTT
CTCTGCTCATCAGAGACTCCCAGCCCAGTGATTCAGCCACCTACCTCTGTGCCGTGA
ACATAGGAAACCATGACATGCGCTTTGGAGCAGGGACCAGACTGACAGTAAAACCA
AATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGAC
AAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAG
GATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTC
AAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGC
CTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTTCCTG
TGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAACTTTCAAA
ACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTTAATCTGC
TCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 63 (генный фрагмент α №6)

ATGGAGAAAATGTTGGAGTGTGCATTCATAGTCTTGTGGCTTCAGCTTGGCTG
GTTGAGTGGAGAAGACCAGGTGACGCAGAGTCCCGAGGCCCTGAGACTCCAGGAGG
GAGAGAGTAGCAGTCTCAACTGCAGTTACACAGTCAGCGGTTTAAGAGGGCTGTTC
TGGTATAGGCAAGATCCTGGGAAAGGCCCTGAATTCCTCTTCACCCTGTATTCAGCT
GGGGAAGAAAAGGAGAAAGAAAGGCTAAAAGCCACATTAACAAAGAAGGAAAGCT
TTCTGCACATCACAGCCCCTAAACCTGAAGACTCAGCCACTTATCTCTGTGCTGTGC
AGACCATGGACGGTAACCAGTTCTATTTTGGGACAGGGACAAGTTTGACGGTCATTC
CAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG
ACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTA
AGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACT
TCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAAC
GCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTTCC

TGTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAACTTTCA
AAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTTAATCT
GCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 64 (генный фрагмент α №7)

ATGGCATGCCCTGGCTTCCTGTGGGCACTTGTGATCTCCACCTGTCTTGAATT
TAGCATGGCTCAGACAGTCACTCAGTCTCAACCAGAGATGTCTGTGCAGGAGGCAG
AGACCGTGACCCTGAGCTGCACATATGACACCAGTGAGAGTGATTATTATTTATTCT
GGTACAAGCAGCCTCCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTTATTCGCCAAGAAGCTTATA
AGCAACAGAATGCAACAGAGAATCGTTTCTCTGTGAACTTCCAGAAAGCAGCCAAA
TCCTTCAGTCTCAAGATCTCAGACTCACAGCTGGGGGATGCCGCGATGTATTTCTGT
GCTTCCAGTCCAGGAACCTACAAATACATCTTTGGAACAGGCACCAGGCTGAAGGT
TTTAGCAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATC
CAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACA
AAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTAT
GGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTG
CAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAA
GTTCCTGTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAAC
TTTCAAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTT
AATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 65 (генный фрагмент α №10)

ATGACACGAGTTAGCTTGCTGTGGGCAGTCGTGGTCTCCACCTGTCTTGAATC
CGGCATGGCCCAGACAGTCACTCAGTCTCAACCAGAGATGTCTGTGCAGGAGGCAG
AGACTGTGACCCTGAGTTGCACATATGACACCAGTGAGAGTAATTATTATTTGTTCT
GGTACAAACAGCCTCCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTTATTCGCCAAGAAGCTTATA
AGCAACAGAATGCAACGGAGAATCGTTTCTCTGTGAACTTCCAGAAAGCAGCCAAA
TCCTTCAGTCTCAAGATCTCAGACTCACAGCTGGGGGACACTGCGATGTATTTCTGT
GCTTTCAACCCTTGGGAGAACTATGGTCAGAATTTTGTCTTTGGTCCCGGAACCAGA
TTGTCCGTGCTGCCCTATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGAC
TCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAAT
GTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACTGTGCTAGACAT
GAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT
TTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCA
GCCCAGAAAGTTCCTGTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACG

AACCTAAACTTTCAAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTG
GCCGGGTTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 66 (генный фрагмент α №4, кодон-оптимизированный)

ATGAAGAGCCTGAGAGTCCTGCTGGTGATTTTGTGGCTGCAGCTGTCTTGGGT
TTGGTCTCAGCAGAAAGAAGTGGAGCAGAATAGCGGCCCTCTGTCTGTTCCTGAAG
GCGCTATTGCTAGCCTGAATTGCACATACAGCGATAGAGGATCTCAGAGCTTCTTCT
GGTACCGGCAGTACAGCGGCAAGAGCCCAGAACTGATCATGTTCATCTACAGCAAT
GGCGACAAGGAGGATGGCAGGTTTACAGCCCAGCTGAACAAGGCCAGCCAGTATGT
TTCTCTGCTGATCAGAGATAGCCAGCCTAGCGATTCTGCCACCTACCTGTGTGCCGT
GAACATCGGAAATCACGACATGAGATTTGGAGCCGGCACAAGACTGACCGTGAAGC
CCAATATCCAGAACCCTGATCCTGCTGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGC
GACAAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAG
CAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGG
ACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCC
AACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGC
AGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTT
CCAGAACCTCAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAA
CCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 67 (генный фрагмент α №6, кодон-оптимизированный)

ATGGAGAAGATGCTGGAGTGTGCGTTCATCGTTCTGTGGCTGCAACTTGGAT
GGCTGTCTGGAGAGGATCAGGTTACACAGTCTCCTGAAGCCCTGAGACTGCAAGAA
GGAGAAAGCTCTAGCCTGAACTGCAGCTACACAGTGTCTGGACTGAGAGGCCTGTT
CTGGTACAGACAGGATCCTGGAAAAGGCCCAGAGTTCCTGTTTACCCTGTATTCTGC
CGGCGAGGAGAAGGAGAAAGAGAGACTGAAAGCTACCCTGACCAAGAAGGAGAGC
TTCCTGCACATTACCGCCCCCAAACCTGAGGATTCTGCCACATATCTGTGTGCTGTG
CAGACCATGGATGGCAACCAGTTCTACTTCGGCACAGGCACATCTCTGACCGTTATC
CCCAATATCCAGAACCCTGATCCTGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAG
CGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGA
GCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATG
GACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGC
CAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAG
CAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACT
TCCAGAACCTCAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCA

ACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 68 (генный фрагмент α №7, кодон-оптимизированный)

ATGGCTTGTCCTGGATTCTTATGGGCTCTGGTGATCAGCACCTGTCTGGAGTT
CTCTATGGCCCAGACAGTGACACAGTCTCAGCCTGAAATGTCTGTGCAGGAAGCCG
AAACCGTGACACTGTCTTGCACCTACGATACAAGCGAGAGCGACTACTACCTGTTCT
GGTACAAGCAGCCTCCCTCTAGGCAGATGATCCTGGTGATTAGACAGGAGGCCTAC
AAACAGCAGAATGCCACCGAGAACCGGTTTAGCGTGAACTTCCAGAAAGCCGCCAA
GAGCTTCAGCCTGAAAATCTCTGACAGCCAGCTGGGAGATGCTGCCATGTACTTTTG
TGCCAGCTCTCCAGGCACCTACAAGTACATTTTTGGCACCGGCACCAGACTGAAGGT
GCTGGCCAATATCCAGAATCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGA
GCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCC
CAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAG
CATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCT
GCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCG
AGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTG
AACTTCCAGAACCTCAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGC
TTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 69 (генный фрагмент α №10, кодон-оптимизированный)

ATGACCAGAGTTAGCCTGTTATGGGCTGTGGTGGTGAGCACATGTCTGGAAT
CTGGAATGGCCCAGACAGTGACACAGTCTCAGCCTGAAATGTCTGTGCAGGAAGCC
GAAACCGTTACACTGAGCTGCACCTACGATACAAGCGAGAGCAACTACTACCTGTT
CTGGTACAAGCAGCCCCCTTCTAGGCAGATGATCCTGGTGATCAGACAGGAGGCCT
ATAAACAGCAGAATGCCACCGAGAACCGGTTTAGCGTGAACTTCCAGAAAGCCGCC
AAGAGCTTCAGCCTGAAAATCTCTGACAGCCAGCTGGGCGATACAGCCATGTACTTT
TGTGCCTTCAACCCCTGGGAGAACTATGGCCAGAATTTCGTGTTCGGCCCTGGCACC
AGACTGTCTGTTCTGCCTTATATCCAGAACCCCGATCCTGCTGTGTACCAGCTGCGG
GACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGAC
CAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGG
ACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGC
GACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTC
CCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAG
ACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGA
AGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 70 (генный фрагмент β №4)

ATGGGCTGCAGGCTGCTCTGCTGTGCGGTTCTCTGTCTCCTGGGAGCAGTTCC
CATAGACACTGAAGTTACCCAGACACCAAAACACCTGGTCATGGGAATGACAAATA
AGAAGTCTTTGAAATGTGAACAACATATGGGGCACAGGGCTATGTATTGGTACAAG
CAGAAAGCTAAGAAGCCACCGGAGCTCATGTTTGTCTACAGCTATGAGAAACTCTCT
ATAAATGAAAGTGTGCCAAGTCGCTTCTCACCTGAATGCCCCAACAGCTCTCTCTTA
AACCTTCACCTACACGCCCTGCAGCCAGAAGACTCAGCCCTGTATCTCTGCGCCAGC
AGCCAAGGGACTAGCGGGGCAGATACGCAGTATTTTGGCCCAGGCACCCGGCTGAC
AGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATC
AGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCT
TCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGT
GGGGTCAGCACAGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAG
ATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGCAA
CCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCA
GGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCAG
ACTGTGGCTTCACCTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGGTCCTGTCTGCCACCATCCTCT
ATGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAGTGCCCTCGTGC
TGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAG

SEQ ID NO: 71 (генный фрагмент β №6)

ATGAGCATCGGCCTCCTGTGCTGTGCAGCCTTGTCTCTCCTGTGGGCAGGTCC
AGTGAATGCTGGTGTCACTCAGACCCCAAAATTCCAGGTCCTGAAGACAGGACAGA
GCATGACACTGCAGTGTGCCCAGGATATGAACCATGAATACATGTCCTGGTATCGAC
AAGACCCAGGCATGGGGCTGAGGCTGATTCATTACTCAGTTGGTGCTGGTATCACTG
ACCAAGGAGAAGTCCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTTC
CCGCTCAGGCTGCTGTCGGCTGCTCCCTCCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGC
AGTTACTCTCTTTGGGACCTTCAAGAGACCCAGTACTTCGGGCCAGGCACGCGGCTC
CTGGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCA
TCAGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGG
CTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACA
GTGGGGTCAGCACAGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCC
AGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGC
AACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACC
CAGGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGC

AGACTGTGGCTTCACCTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGGTCCTGTCTGCCACCATCCT
CTATGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAGTGCCCTCGT
GCTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAG

SEQ ID NO: 72 (генный фрагмент β №7)

ATGGGCACCAGCCTCCTCTGCTGGATGGCCCTGTGTCTCCTGGGGGCAGATC
ACGCAGATACTGGAGTCTCCCAGGACCCCAGACACAAGATCACAAAGAGGGGACA
GAATGTAACTTTCAGGTGTGATCCAATTTCTGAACACAACCGCCTTTATTGGTACCG
ACAGACCCTGGGGCAGGGCCCAGAGTTTCTGACTTACTTCCAGAATGAAGCTCAACT
AGAAAAATCAAGGCTGCTCAGTGATCGGTTCTCTGCAGAGAGGCCTAAGGGATCTT
TCTCCACCTTGGAGATCCAGCGCACAGAGCAGGGGGACTCGGCCATGTATCTCTGTG
CCAGCAGCTTTTCAGACGGGGGGGCTACAGATACGCAGTATTTTGGCCCAGGCACC
CGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTT
GAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGC
CACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGG
TGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAAT
GACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAAC
CCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAG
TGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGG
TAGAGCAGACTGTGGCTTCACCTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGGTCCTGTCTGCCAC
CATCCTCTATGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAGTGC
CCTCGTGCTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAG

SEQ ID NO: 73 (генный фрагмент β №10)

ATGCTGCTGCTTCTGCTGCTTCTGGGGCCAGCAGGCTCCGGGCTTGGTGCTGT
CGTCTCTCAACATCCGAGCTGGGTTATCTGTAAGAGTGGAACCTCTGTGAAGATCGA
GTGCCGTTCCCTGGACTTTCAGGCCACAACTATGTTTTGGTATCGTCAGTTCCCGAA
ACAGAGTCTCATGCTGATGGCAACTTCCAATGAGGGCTCCAAGGCCACATACGAGC
AAGGCGTCGAGAAGGACAAGTTTCTCATCAACCATGCAAGCCTGACCTTGTCCACTC
TGACAGTGACCAGTGCCCATCCTGAAGACAGCAGCTTCTACATCTGCAGTGCTAGAC
CCCATTCTCTCACAGATACGCAGTATTTTGGCCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCG
AGGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCA
GAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCC
GACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCA
GCACAGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGC

CTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGCAACCACTTC
CGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAG
GGCCAAACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTG
GCTTCACCTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGGTCCTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGA
TCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAGTGCCCTCGTGCTGATGG
CCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAG

SEQ ID NO: 74 (генный фрагмент β №4, кодон-оптимизированный)

ATGGGCTGTAGACTGTTGTGTTGTGCTGTGCTGTGTCTGTTGGGAGCTGTGCC
TATCGATACAGAGGTGACCCAGACCCCTAAACATCTGGTTATGGGCATGACCAACA
AGAAGAGCCTGAAGTGCGAGCAGCACATGGGCCATAGGGCCATGTATTGGTATAAG
CAGAAGGCCAAGAAACCTCCTGAGCTGATGTTCGTGTACAGCTACGAGAAGCTGAG
CATCAACGAGAGCGTGCCCAGCAGATTTTCTCCTGAGTGCCCTAATTCTAGCCTGCT
GAATCTGCACCTGCATGCTCTGCAGCCTGAGGATTCTGCTCTGTACCTGTGTGCTTCT
TCTCAGGGCACATCTGGAGCTGATACACAGTACTTCGGACCTGGCACAAGACTGAC
AGTGCTGGAAGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTA
GCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGC
TTTTACCCCGACCACGTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAG
CGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAACGACAGCC
GGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGG
AACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGAC
CCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAG
CCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCATC
CTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTG
GTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGC

SEQ ID NO: 75 (генный фрагмент β №6, кодон-оптимизированный)

ATGTCTATCGGTCTGCTGTGCTGTGCTGCTCTTTCTCTGCTTTGGGCTGGACCT
GTGAATGCTGGAGTTACACAAACCCCCAAGTTCCAAGTGCTGAAGACAGGACAGAG
CATGACCCTGCAGTGTGCTCAGGACATGAATCACGAGTACATGAGCTGGTACAGAC
AGGATCCTGGAATGGGCCTGAGGCTGATCCACTACTCTGTTGGAGCCGGAATTACA
GATCAGGGAGAAGTGCCAAATGGCTACAACGTGAGCAGGAGCACAACCGAGGACT
TCCCCTTAAGACTGTTGTCTGCTGCTCCATCTCAGACAAGCGTGTACTTTTGCGCCAG
CTCCTACTCTCTGTGGGATCTGCAGGAAACCCAGTACTTTGGACCAGGCACAAGACT
GTTAGTGCTGGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGC

CTAGCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACC
GGCTTTTACCCCGACCACGTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCA
CAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAACGACA
GCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCC
GGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGG
ACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAG
AGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCA
TCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCC
TGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGC

SEQ ID NO: 76 (генный фрагмент β №7, кодон-оптимизированный)

ATGGGCACATCTCTTCTCTGCTGGATGGCTCTTTGTCTGCTTGGAGCCGATCA
TGCCGATACAGGAGTTAGCCAGGATCCTAGACACAAGATCACCAAGAGAGGCCAGA
ATGTGACCTTCCGGTGCGATCCTATCTCTGAGCACAACAGGCTGTACTGGTACAGAC
AAACACTGGGACAAGGACCTGAGTTCCTGACCTACTTCCAGAACGAAGCCCAGCTG
GAGAAGTCTAGACTTCTGAGCGACAGATTTAGCGCCGAGAGACCTAAAGGCAGCTT
TAGCACCCTGGAGATCCAGAGAACAGAACAGGGCGATTCTGCCATGTACCTGTGTG
CTAGCAGCTTTTCTGATGGAGGCGCCACCGATACACAGTATTTCGGACCTGGCACAA
GACTGACAGTGCTGGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTC
GAGCCTAGCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGC
CACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGT
GCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAACG
ACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAAC
CCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGA
GTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGG
GCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCC
ACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCC
GCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGC

SEQ ID NO: 77 (генный фрагмент β №10, кодон-оптимизированный)

ATGCTGCTTCTTCTCCTCCTTCTCGGACCTGCTGGATCTGGATTAGGAGCTGTT
GTGTCTCAGCACCCTTCTTGGGTGATCTGTAAAAGCGGCACAAGCGTGAAGATCGA
GTGCAGAAGCCTGGACTTTCAGGCCACAACCATGTTCTGGTATAGGCAGTTCCCCAA
GCAGTCTCTGATGCTGATGGCCACCTCTAATGAGGGCTCTAAGGCCACATATGAACA
GGGAGTGGAGAAGGACAAGTTCCTGATCAACCACGCCTCTCTGACCCTGTCTACCCT

GACAGTTACATCTGCCCACCCTGAGGATAGCAGCTTTTACATCTGTAGCGCCAGACC
TCACAGCCTGACCGATACACAGTACTTTGGCCCTGGCACAAGACTGACAGTGTTAGA
AGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTAGCGAGGCCG
AGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCG
ACCACGTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGC
ACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGTCT
GAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCA
GATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGG
GCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGG
CTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCATCCTGTACGAGA
TCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGG
CCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGC

SEQ ID NO: 78 (β №4-P2A-α №4, кодон-оптимизированный)

ATGGGCTGTAGACTGTTGTGTTGTGCTGTGCTGTGTCTGTTGGGAGCTGTGCC
TATCGATACAGAGGTGACCCAGACCCCTAAACATCTGGTTATGGGCATGACCAACA
AGAAGAGCCTGAAGTGCGAGCAGCACATGGGCCATAGGGCCATGTATTGGTATAAG
CAGAAGGCCAAGAAACCTCCTGAGCTGATGTTCGTGTACAGCTACGAGAAGCTGAG
CATCAACGAGAGCGTGCCCAGCAGATTTTCTCCTGAGTGCCCTAATTCTAGCCTGCT
GAATCTGCACCTGCATGCTCTGCAGCCTGAGGATTCTGCTCTGTACCTGTGTGCTTCT
TCTCAGGGCACATCTGGAGCTGATACACAGTACTTCGGACCTGGCACAAGACTGAC
AGTGCTGGAAGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTA
GCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGC
TTTTACCCCGACCACGTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAG
CGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAACGACAGCC
GGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGG
AACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGAC
CCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAG
CCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCATC
CTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTG
GTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACGAA
CTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGAAGA
GCCTGAGAGTCCTGCTGGTGATTTTGTGGCTGCAGCTGTCTTGGGTTTGGTCTCAGC
AGAAAGAAGTGGAGCAGAATAGCGGCCCTCTGTCTGTTCCTGAAGGCGCTATTGCT
AGCCTGAATTGCACATACAGCGATAGAGGATCTCAGAGCTTCTTCTGGTACCGGCAG

TACAGCGGCAAGAGCCCAGAACTGATCATGTTCATCTACAGCAATGGCGACAAGGA
GGATGGCAGGTTTACAGCCCAGCTGAACAAGGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTGAT
CAGAGATAGCCAGCCTAGCGATTCTGCCACCTACCTGTGTGCCGTGAACATCGGAA
ATCACGACATGAGATTTGGAGCCGGCACAAGACTGACCGTGAAGCCCAATATCCAG
AACCCTGATCCTGCTGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGT
GTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCG
ACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGC
AACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAA
CAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACG
TGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTC
AGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATG
ACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 79 (β №6-P2A-α №6, кодон-оптимизированный)

ATGTCTATCGGTCTGCTGTGCTGTGCTGCTCTTTCTCTGCTTTGGGCTGGACCT
GTGAATGCTGGAGTTACACAAACCCCCAAGTTCCAAGTGCTGAAGACAGGACAGAG
CATGACCCTGCAGTGTGCTCAGGACATGAATCACGAGTACATGAGCTGGTACAGAC
AGGATCCTGGAATGGGCCTGAGGCTGATCCACTACTCTGTTGGAGCCGGAATTACA
GATCAGGGAGAAGTGCCAAATGGCTACAACGTGAGCAGGAGCACAACCGAGGACT
TCCCCTTAAGACTGTTGTCTGCTGCTCCATCTCAGACAAGCGTGTACTTTTGCGCCAG
CTCCTACTCTCTGTGGGATCTGCAGGAAACCCAGTACTTTGGACCAGGCACAAGACT
GTTAGTGCTGGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGC
CTAGCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACC
GGCTTTTACCCCGACCACGTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCA
CAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAACGACA
GCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCC
GGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGG
ACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAG
AGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCA
TCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCC
TGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACG
AACTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGGA
GAAGATGCTGGAGTGTGCGTTCATCGTTCTGTGGCTGCAACTTGGATGGCTGTCTGG
AGAGGATCAGGTTACACAGTCTCCTGAAGCCCTGAGACTGCAAGAAGGAGAAAGCT
CTAGCCTGAACTGCAGCTACACAGTGTCTGGACTGAGAGGCCTGTTCTGGTACAGAC

AGGATCCTGGAAAAGGCCCAGAGTTCCTGTTTACCCTGTATTCTGCCGGCGAGGAGA
AGGAGAAAGAGAGACTGAAAGCTACCCTGACCAAGAAGGAGAGCTTCCTGCACATT
ACCGCCCCCAAACCTGAGGATTCTGCCACATATCTGTGTGCTGTGCAGACCATGGAT
GGCAACCAGTTCTACTTCGGCACAGGCACATCTCTGACCGTTATCCCCAATATCCAG
AACCCTGATCCTGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGT
GTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCG
ACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGC
AACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAA
CAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACG
TGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTC
AGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATG
ACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 80 (β №7-P2A-α №7, кодон-оптимизированный)

ATGGGCACATCTCTTCTCTGCTGGATGGCTCTTTGTCTGCTTGGAGCCGATCA
TGCCGATACAGGAGTTAGCCAGGATCCTAGACACAAGATCACCAAGAGAGGCCAGA
ATGTGACCTTCCGGTGCGATCCTATCTCTGAGCACAACAGGCTGTACTGGTACAGAC
AAACACTGGGACAAGGACCTGAGTTCCTGACCTACTTCCAGAACGAAGCCCAGCTG
GAGAAGTCTAGACTTCTGAGCGACAGATTTAGCGCCGAGAGACCTAAAGGCAGCTT
TAGCACCCTGGAGATCCAGAGAACAGAACAGGGCGATTCTGCCATGTACCTGTGTG
CTAGCAGCTTTTCTGATGGAGGCGCCACCGATACACAGTATTTCGGACCTGGCACAA
GACTGACAGTGCTGGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTC
GAGCCTAGCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGC
CACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGT
GCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAACG
ACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAAC
CCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGA
GTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGG
GCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCC
ACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCC
GCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGC
CACGAACTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCA
TGGCTTGTCCTGGATTCTTATGGGCTCTGGTGATCAGCACCTGTCTGGAGTTCTCTAT
GGCCCAGACAGTGACACAGTCTCAGCCTGAAATGTCTGTGCAGGAAGCCGAAACCG
TGACACTGTCTTGCACCTACGATACAAGCGAGAGCGACTACTACCTGTTCTGGTACA

AGCAGCCTCCCTCTAGGCAGATGATCCTGGTGATTAGACAGGAGGCCTACAAACAG
CAGAATGCCACCGAGAACCGGTTTAGCGTGAACTTCCAGAAAGCCGCCAAGAGCTT
CAGCCTGAAAATCTCTGACAGCCAGCTGGGAGATGCTGCCATGTACTTTTGTGCCAG
CTCTCCAGGCACCTACAAGTACATTTTTGGCACCGGCACCAGACTGAAGGTGCTGGC
CAATATCCAGAATCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCG
ACAAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGC
AAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGA
CTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCA
ACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCA
GCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTC
CAGAACCTCAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAAC
CTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 81 (β №10-P2A-α №10, кодон-оптимизированный)

ATGCTGCTTCTTCTCCTCCTTCTCGGACCTGCTGGATCTGGATTAGGAGCTGTT
GTGTCTCAGCACCCTTCTTGGGTGATCTGTAAAAGCGGCACAAGCGTGAAGATCGA
GTGCAGAAGCCTGGACTTTCAGGCCACAACCATGTTCTGGTATAGGCAGTTCCCCAA
GCAGTCTCTGATGCTGATGGCCACCTCTAATGAGGGCTCTAAGGCCACATATGAACA
GGGAGTGGAGAAGGACAAGTTCCTGATCAACCACGCCTCTCTGACCCTGTCTACCCT
GACAGTTACATCTGCCCACCCTGAGGATAGCAGCTTTTACATCTGTAGCGCCAGACC
TCACAGCCTGACCGATACACAGTACTTTGGCCCTGGCACAAGACTGACAGTGTTAGA
AGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTAGCGAGGCCG
AGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCG
ACCACGTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGC
ACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGTCT
GAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCA
GATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGG
GCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGG
CTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCATCCTGTACGAGA
TCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGG
CCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACGAACTTCTCTCTG
TTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGACCAGAGTTAGCCT
GTTATGGGCTGTGGTGGTGAGCACATGTCTGGAATCTGGAATGGCCCAGACAGTGA
CACAGTCTCAGCCTGAAATGTCTGTGCAGGAAGCCGAAACCGTTACACTGAGCTGC
ACCTACGATACAAGCGAGAGCAACTACTACCTGTTCTGGTACAAGCAGCCCCCTTCT

AGGCAGATGATCCTGGTGATCAGACAGGAGGCCTATAAACAGCAGAATGCCACCGA
GAACCGGTTTAGCGTGAACTTCCAGAAAGCCGCCAAGAGCTTCAGCCTGAAAATCT
CTGACAGCCAGCTGGGCGATACAGCCATGTACTTTTGTGCCTTCAACCCCTGGGAGA
ACTATGGCCAGAATTTCGTGTTCGGCCCTGGCACCAGACTGTCTGTTCTGCCTTATAT
CCAGAACCCCGATCCTGCTGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGA
GCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGAC
AGCGACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAA
GAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCT
TCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGC
GACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAA
CCTCAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCT
GATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 82 (α-цепь эталонного TCR)

MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWY
KQELGKRPQLIIDIRSNVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAATEDY
QLIWGAGTKLIIKPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD
KTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET
DTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 83 (β-цепь эталонного TCR)

MSNQVLCCVVLCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCEQNLNHDAMYW
YRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASS
PGALYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVE
LSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQF
YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY
AVLVSALVLMAMVKRKDSRG

SEQ ID NO: 84 (пептид 2A свиного тешовируса-1 (P2A-1))

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO: 85 (пептид 2A свиного тешовируса-2 (P2A-2))

SGATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO: 86 (пептид 2A вируса Thosea asigna (T2A))

GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP

SEQ ID NO: 87 (пептид 2A вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A))

GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO: 88 (пептид 2A вируса ящура (F2A))

GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO: 89 (пептид 2A свиного тешовируса-1 (P2A-1) – нуклеотидная последовательность)

GGAAGTGGAGCTACGAATTTTTCTTTATTAAAACAAGCAGGAGATGTTGAGG AGAATCCCGGTCCA

SEQ ID NO: 90 (пептид 2A свиного тешовируса-2 (P2A-2) – нуклеотидная последовательность)

AGCGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGGAAGAG AACCCTGGCCCT

SEQ ID NO: 91 (пептид 2A вируса Thosea asigna (T2A) – нуклеотидная последовательность)

GGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAG AATCCTGGACCT

SEQ ID NO: 92 (пептид 2A вируса ринита лошадей A (ERAV) (E2A) – нуклеотидная последовательность)

GGAAGCGGACAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTG AGAGCAACCCTGGACCT

SEQ ID NO: 93 (пептид 2A вируса ящура (F2A) – нуклеотидная последовательность)

GGAAGCGGAGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAG ACGTGGAGTCCAACCCTGGACCT

SEQ ID NO: 94 (пептидный антиген WT-1)

RMFPNAPYL

SEQ ID NO: 95 (линкер G-S)

GGGGS

SEQ ID NO: 96

GlyxSery, где каждый из X и Y независимо представляет собой ненулевое целое число

SEQ ID NO: 97 – сайт распознавания мегануклеазы

LAGLIDADG

SEQ ID NO: 98 – сайт распознавания мегануклеазы

GIY-YIG

SEQ ID NO: 99 – сайт распознавания мегануклеазы

PD-(D/E)XK

SEQ ID NO: 100 (WT-1, aa 37-45)

VLDFAPPGA

SEQ ID NO: 101 (CDR1α TCR 10.1)
DSAIYN

SEQ ID NO: 102 (CDR2α TCR 10.1)
IQSSQRE

SEQ ID NO: 103 (CDR3α TCR 10.1)
CAVKETSGSRLTF

SEQ ID NO: 104 (Vα TCR 10.1)
KQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQRE QTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVKETSGSRLTFGEGTQLTVNP

SEQ ID NO: 105 (CDR1β TCR 10.1)
SGHVS

SEQ ID NO: 106 (CDR2β TCR 10.1)
FNYEAQ

SEQ ID NO: 107 (CDR3β TCR 10.1)
CASSLTGSYEQYF

SEQ ID NO: 108 (Vβ TCR 10.1)
GAGVSQSPRYKVTKRGQDVALRCDPISGHVSLYWYRQALGQGPEFLTYFNYEA QQDKSGLPNDRFSAERPEGSISTLTIQRTEQRDSAMYRCASSLTGSYEQYFGPGTRLTVT E

SEQ ID NO: 109 (CDR1α TCR 13.1)
NSMFDY

SEQ ID NO: 110 (CDR2α TCR 13.1)
ISSIKDK

SEQ ID NO: 111 (CDR3α TCR 13.1)
CAASGIGDYKLSF

SEQ ID NO: 112 (Vα TCR 13.1)
DQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDK NEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASGIGDYKLSFGAGTTVTVRAN

SEQ ID NO: 113 (CDR1β TCR 13.1)
PRHDT

SEQ ID NO: 114 (CDR2β TCR 13.1)
FYEKMQ

SEQ ID NO: 115 (CDR3β TCR 13.1)
CASSLRLGRETQYF

SEQ ID NO: 116 (Vβ TCR 13.1)
AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQS DKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSLRLGRETQYFGPGTRLLVLE

SEQ ID NO: 117 (CDR1α TCR 16.1)
VSGLRG

SEQ ID NO: 118 (CDR2α TCR 16.1)
LYSAGEE

SEQ ID NO: 119 (CDR3α TCR 16.1)
CAVITGFQKLVF

SEQ ID NO: 120 (Vα TCR 16.1)
EDQVTQSPEALRLQEGESSSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGE EKEKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCAVITGFQKLVFGTGTRLLVSPN

SEQ ID NO: 121 (CDR1β TCR 16.1)
MNHEY

SEQ ID NO: 122 (CDR2β TCR 16.1)
SMNVEV

SEQ ID NO: 123 (CDR3β TCR 16.1)
CASSFSGGTYEQYF

SEQ ID NO: 124 (Vβ TCR 16.1)
EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVE
VTDKGDVPEGYKVSRKEKRNFPLILESPSPNQTSLYFCASSFSGGTYEQYFGPGTRLTVT
E

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Идентификация и определение характеристик TCR, специфичных к пептиду WT-1

$CD8^+$ Т-клетки от четырех доноров культивировали с аутологичными дендритными клетками (DC), в которые вводили пептид WT-1 RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94) (Ho, Greenberg et al., 2006). Т-клеточные линии объединяли, окрашивали CD8-независимым (CD8i) тетрамером пептид WT-1:HLA и отсортировывали клетки с высокой степенью окрашивания тетрамером. Всего было идентифицировано 40 поликлональных Т-клеточных линий с высокой степенью окрашивания тетрамером. Образцы отсортированных Т-клеток и фракцию общего несортированного образца анализировали с помощью анализа репертуара TCR (Adaptive Biotechnologies) для количественного определения каждого клонотипа TCR. Фракцию клеток с высокой степенью окрашивания тетрамером также анализировали с помощью секвенирования РНК единичных клеток и спаривания TCR (10X genomics). 24 клонотипа TCR были идентифицированы как WT-1-специфичные путем сравнения кратности обогащения каждого клонотипа в отсортированной и несортированной популяции и поверхностной экспрессии CD3 каждого клонотипа (фиг. 1). Из них 10 были отобраны для синтеза. Лишенные TCRα/TCRβ Т-клетки Jurkat J76 трансдуцировали для экспрессии TCR-кандидатов. Аффинность каждого кандидата к WT-1 оценивали путем измерения относительного окрашивания тетрамером пептид WT-1:HLA по сравнению с экспрессией CD3, которая является маркером общей поверхностной экспрессии трансгенного TCR. Результаты

сравнивали с результатами для клеток, экспрессирующих пептид WT-1:HLA-специфичный TCR, имеющий α-цепь согласно SEQ ID NO: 82 и β-цепь согласно SEQ ID NO: 83. Данные показаны на фиг. 2A-2C.

TCR-трансдуцированные клетки Jurkat, экспрессирующие маркер активации Nur77-tomato, оценивали на предмет активации в присутствии пептида. Данные показаны на фиг. 3A.

CD8+ Т-клетки, выделенные из донорских МНПК (мононуклеарные клетки периферической крови), трансдуцировали для экспрессии одного из восьми TCR, выбранных для дальнейшего исследования. Через одну неделю трансдуцированные клетки сортировали по окрашиванию тетрамером пептид WT-1:HLA и экспрессии CD8 (фиг. 4A). Тетрамер$^{+}$ CD8^{+} Т-клетки размножали и анализировали на предмет продукции IFNγ. Размноженные антигенспецифические клетки культивировали в течение четырех часов с клетками-мишенями T2, в которые вводили подобранные концентрации пептида WT-1, и определяли продукцию IFNγ с помощью проточной цитометрии (фиг. 4B). Процент клеток, продуцирующих IFNγ, аппроксимировали кривыми доза-ответ с помощью нелинейной регрессии для расчета EC_{50} пептида для каждого TCR (фиг. 4C).

Т-клетки, экспрессирующие два TCR с самыми низкими значениями EC_{50}, сравнивали с Т-клетками, экспрессирующими эталонный WT-1-специфичный TCR, по способности индуцировать лизис опухолевых клеток. Линию опухолевых клеток MDA-MB-468, которая была трансдуцирована для экспрессии HLA-A2, и линию опухолевых клеток Panc-1, которая от природы является HLA_A2^{+}, нагружали ^{51}Cr. Опосредованное TCR-трансдуцированными Т-клетками уничтожение рассчитывали путем измерения высвобождения Cr в ответ на уменьшение доз эффекторных Т-клеток относительно опухолевых клеток-мишеней (фиг. 5A и 5B).

Т-клетки, экспрессирующие иллюстративный TCR DL10, дополнительно исследовали на предмет продукции IFN-γ (фиг. 6) и способности снижать рост клеток линии опухолевых клеток (фиг. 7). Для продукции IFN-γ первичные CD8+ Т-клетки трансдуцировали эталонным TCR или TCRDL10 и культивировали с клетками-мишенями T2, в которые вводили пептид, как показано на фиг. 6. Через 4 часа продукцию IFNγ оценивали с помощью внутриклеточной проточной цитометрии, и процент IFNγ-положительных клеток аппроксимировали кривой доза-ответ с помощью нелинейной регрессии в Graphpad Prism. Для оценки способности контролировать рост опухоли первичные CD8+ Т-клетки трансдуцировали эталонным TCR (содержащим цепь TCRα, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82, и цепь TCRβ, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83)

или TCRDL10 и культивировали в трех параллельных анализах с HLA-A2+ WT1+ клеточной линией опухоли поджелудочной железы Panc-1 (трансдуцированной для экспрессии красного флуоресцентного белка) в соотношении 8:1 в анализе IncuCyte, и отслеживали пролиферацию/выживаемость клеток в течение 7 дней. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего.

Различные варианты осуществления, описанные выше, могут быть объединены для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. Содержание всех патентов США, публикаций заявок на патенты США, заявок на патенты США, иностранных патентов, иностранных патентных заявок и непатентных публикаций, упомянутых в настоящем описании и/или перечисленных в информационном листке заявки, включая заявку на патент США № 62889519, поданную 20 августа 2019 г., полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Аспекты вариантов осуществления при необходимости могут быть модифицированы для использования концепций различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения могут быть внесены в варианты осуществления в свете приведенного выше подробного описания. В целом, в следующей ниже формуле изобретения используемые термины должны толковаться не как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, а как включающие все возможные варианты осуществления, а также полный объем эквивалентов, охватываемых формулой изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничивается раскрытием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

для рассмотрения на региональной фазе в ЕАПВ

1. Модифицированная иммунная клетка, содержащая гетерологичный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, где кодируемый связывающий белок содержит:

(a) вариабельный домен α-цепи (Vα) Т-клеточного рецептора (TCR), содержащий аминокислотную последовательность CDR3 (CDR - область, определяющая комплементарность) (CDR3α) согласно любой из SEQ ID NO: 28, 19, 22 или 25 или ее вариант, и вариабельный домен β-цепи (Vβ) TCR; или

(b) Vβ домен TCR, содержащий аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3β) согласно любой из SEQ ID NO: 40, 31, 34 или 37 или ее вариант, и Vα домен TCR; или

(c) Vα домен TCR согласно (a) и Vβ домен TCR согласно (b),

где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):человеческий лейкоцитарный антиген (HLA), где, необязательно, HLA включает HLA-A*0201.

2. Модифицированная иммунная клетка по п. 1, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ (интерферона-гамма), равным 4,0 или выше или 4,5 или выше.

3. Модифицированная иммунная клетка по п. 1 или п. 2, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 5,0 или выше.

4. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-3, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 5,5 или выше.

5. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-4, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 6,0 или выше.

6. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-5, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA со значением pEC_{50} при продукции IFNγ, равным 6,5 или выше.

7. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-6, где HLA включает HLA-A*201.

8. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-7, где 50 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции продуцируют IFN-γ, когда популяцию модифицированных иммунных клеток в течение 4 часов культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-4} мкМ, 10^{-5} мкМ или 10^{-6} мкМ в совместной культуре, где антигенпрезентирующие клетки необязательно включают клетки T2.

9. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-8, где 10 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции представляют собой $Nur77^{+}$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-2} мкМ в совместной культуре, где антигенпрезентирующие клетки необязательно включают клетки T2, клетки Jurkat или и те, и другие.

10. Модифицированная иммунная клетка по п. 9, где 15 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции представляют собой $Nur77^{+}$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-2} мкМ в совместной культуре.

11. Модифицированная иммунная клетка по п. 9 или п. 10, где 20 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции представляют собой $Nur77^{+}$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-2} мкМ в совместной культуре.

12. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 9-11, где 40 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции представляют собой $Nur77^{+}$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-2} мкМ в совместной культуре.

13. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 9-12, где 50 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции представляют собой $Nur77^{+}$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно с

антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-2} мкМ в совместной культуре.

14. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-13, где 10 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции представляют собой $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-3} мкМ в совместной культуре.

15. Модифицированная иммунная клетка по п. 14, где 15 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции представляют собой $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида 10^{-3} мкМ в совместной культуре.

16. Модифицированная иммунная клетка по п. 14 или п. 15, где 20 % или более модифицированных иммунных клеток в популяции представляют собой $Nur77^+$, когда популяцию модифицированных иммунных клеток культивируют совместно с антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94), при концентрации пептида приблизительно 10^{-3} мкМ в совместной культуре.

17. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-16, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 11 % или более $HLA\text{-}A*0201^+$ клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

18. Модифицированная иммунная клетка по п. 17, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 12 % или более $HLA\text{-}A*0201^+$ клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

19. Модифицированная иммунная клетка по п. 17 или п. 18, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 14 % или более $HLA\text{-}A*0201^+$ клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

20. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 17-19, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 15 % или более $HLA\text{-}A*0201^+$

клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

21. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 17-20, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 20 % или более HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

22. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 17-21, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 25 % или более HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 30:1.

23. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-22, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 10 % или более HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 10:1.

24. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-23, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить приблизительно 5 % или более HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки MDA-MB-468 присутствуют в образце в соотношении 1:1.

25. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-24, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 21 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 30:1.

26. Модифицированная иммунная клетка по п. 25, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 22 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 30:1.

27. Модифицированная иммунная клетка по п. 25 или п. 26, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 23 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 30:1.

28. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 25-27, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 24 % или более клеток Panc1 в образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 30:1.

29. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 25-28, где модифицированная иммунная клетка способна уничтожить 25 % или более клеток Panc1 в

образце, когда модифицированная иммунная клетка и клетки Panc1 присутствуют в соотношении 30:1.

30. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-29, где модифицированная иммунная клетка имеет повышенную активность в отношении уничтожения HLA-A*0201^{+} клеток MDA-MB-468 и/или клеток Panc1 при совместном культивировании в течение 4 часов по сравнению с эталонной иммунной клеткой, содержащей полинуклеотид, кодирующий Т-клеточный рецептор, содержащий цепь TCRα, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82, и цепь TCRβ, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83.

31. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-30, где кодируемый связывающий белок способен связываться с комплексом пептид WT-1:HLA на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8.

32. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-31, где:

(i) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 16, 5, 6, 7, 8, 13, 14 или 15; и/или

(ii) кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 12, 1, 2, 3, 4, 9, 10 или 11.

33. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-32, где кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью любой из SEQ ID NO: 16, 5, 6, 7, 8, 13, 14 или 15; и/или кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью любой из SEQ ID NO: 12, 1, 2, 3, 4, 9, 10 или 11, при условии, что:

(i) по меньшей мере три или четыре CDR не имеют мутаций;

(ii) CDR, которые имеют мутации, имеют только до двух аминокислотных замен, делецию до пяти аминокислот подряд или их комбинацию; и

(iii) кодируемый связывающий белок сохраняет свою способность связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA, необязательно со значением pEC50 при продукции интерферона-гамма (IFNγ), равным 4,0 или выше.

34. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-33, где:

(i) кодируемая CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 40, и кодируемая CDR3α содержит

или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28;

(ii) кодируемая CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31, и кодируемая CDR3α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19;

(iii) кодируемая CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 34, и кодируемая CDR3α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22; или

(iv) кодируемая CDR3β содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, и кодируемая CDR3α содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 25.

35. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-34, где:

(i) кодируемый Vβ домен содержит аминокислотную последовательность CDR1β согласно любой из SEQ ID NO: 38, 29, 32 или 35 и/или аминокислотную последовательность CDR2β согласно любой из SEQ ID NO: 39, 30, 33 или 36; и/или

(ii) кодируемый Vα домен содержит аминокислотную последовательность CDR1α согласно любой из SEQ ID NO: 26, 17, 20 или 23 и/или аминокислотную последовательность CDR2α согласно любой из SEQ ID NO: 27, 18, 21 или 24.

36. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-35, где кодируемые Vα и Vβ домены TCR содержат аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно:

(i) SEQ ID NO: 26-28 и 38-40, соответственно;

(ii) SEQ ID NO: 23, 27, 28 и 38-40, соответственно;

(iii) SEQ ID NO: 17-19 и 29-31, соответственно;

(iv) SEQ ID NO: 20-22 и 32-34, соответственно; или

(v) SEQ ID NO: 23-25 и 35-37, соответственно.

37. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-36, где кодируемый Vβ домен TCR содержит:

(i) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBJ02-03; и/или

(ii) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV06-05, аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV07-09, или аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV20-01.

38. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-37, где

кодируемый Vα домен TCR содержит:

(i) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAJ43; и/или

(ii) аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV20-02, аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV38DV08, или аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV38-01.

39. Модифицированная иммунная клетка по п. 38, где:

(i) кодируемый Vβ домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBJ02-03; и

(ii) кодируемый Vα домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAJ43.

40. Модифицированная иммунная клетка по п. 38, где:

(i) кодируемый Vβ домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV06-05; и

(ii) кодируемый Vα домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV20.

41. Модифицированная иммунная клетка по п. 38, где:

(i) кодируемый Vβ домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV07-09; и

(ii) кодируемый Vα домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV38DV08.

42. Модифицированная иммунная клетка по п. 38, где:

(i) кодируемый Vβ домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRBV20-01; и

(ii) кодируемый Vα домен TCR содержит аминокислотную последовательность, соответствующую генному сегменту TRAV38-01.

43. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-42, где:

(i) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16 или 8, и кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12 или 4;

(ii) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13 или 5, и кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID

NO: 9 или 1;

(iii) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14 или 6, и кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10 или 2; или

(iv) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15 или 7, и кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11 или 3.

44. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-43, где кодируемый связывающий белок дополнительно содержит:

(i) константный домен α-цепи (Cα) TCR или его фрагмент и/или

(ii) константный домен β-цепи (Cβ) TCR или его фрагмент.

45. Модифицированная иммунная клетка по п. 44, где кодируемый Cα содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью любой из SEQ ID NO: 41-44.

46. Модифицированная иммунная клетка по п. 44 или п. 45, где кодируемый Cβ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью SEQ ID NO: 45.

47. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 44-46, где кодируемый связывающий белок содержит:

(i) β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 61 или 57, и α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53 или 49;

(ii) β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 58 или 54, и α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 50 или 46;

(iii) β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 59 или 55, и α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в

SEQ ID NO: 51 или 47; или

(iv) β-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 60 или 56, и α-цепь TCR, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 52 или 48.

48. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-47, где кодируемый связывающий белок представляет собой TCR, химерный антигенный рецептор (CAR) или одноцепочечный TCR (scTCR).

49. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-48, где иммунная клетка представляет собой клетку иммунной системы человека.

50. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-49, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку, необязательно $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^-$ $CD8^-$ двойную негативную Т-клетку или γδ-Т-клетку, естественную киллерную (NK) клетку, NK-Т-клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию.

51. Модифицированная иммунная клетка по п. 50, где Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, центральную Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти, стволовую Т-клетку памяти или любую их комбинацию.

52. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-51, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, является кодон-оптимизированным для экспрессии в иммунной клетке.

53. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-52, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержит полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 62-77.

54. Модифицированная иммунная клетка по п. 53, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержит:

(i) полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 77, и полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 69;

(ii) полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 74, и полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66;

(iii) полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 75, и полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 67; или

(iv) полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 76, и полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 68.

55. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-54, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом, кодирующим Vβ, и полинуклеотидом, кодирующим Vα.

56. Модифицированная иммунная клетка по п. 55, где кодируемый саморасщепляющийся пептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 84-88.

57. Модифицированная иммунная клетка по п. 55 или п. 56, где полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, содержит или состоит из полинуклеотидной последовательности, обладающей по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 89-93.

58. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 55-57, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, имеет структуру, в направлении от 5'-конца к 3'-концу, (кодирующий цепь TCRβ полинуклеотид)-(кодирующий саморасщепляющийся пептид полинуклеотид)-(кодирующий цепь TCRα полинуклеотид).

59. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 55-58, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержит полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 81 или 78-80.

60. Модифицированная иммунная клетка по п. 53, где полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержит полинуклеотид, содержащий или состоящий из полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 81 или 78-80.

61. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-60, дополнительно содержащая:

(i) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий

внеклеточную часть α-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит α-цепь корецептора CD8;

(ii) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть β-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит β-цепь корецептора CD8; или

(iii) полинуклеотид согласно (i) и полинуклеотид согласно (ii),

где, необязательно, клетка-хозяин включает CD4+ Т-клетку.

62. Модифицированная иммунная клетка по п. 61, содержащая:

(a) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть α-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит α-цепь корецептора CD8;

(b) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть β-цепи корецептора CD8, где, необязательно, кодируемый полипептид представляет собой или содержит β-цепь корецептора CD8; и

(c) полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом согласно (a) и полинуклеотидом согласно (b).

63. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 1-62, где иммунная клетка содержит нокаут хромосомного гена в отношении гена PD-1; гена LAG3; гена TIM3; гена CTLA4; гена компонента HLA; гена компонента TCR или любой их комбинации.

64. Модифицированная иммунная клетка по п. 63, где нокаут хромосомного гена включает нокаут гена компонента HLA, выбранного из гена макроглобулина α1; гена макроглобулина α2; гена макроглобулина α3; гена микроглобулина β1 или гена микроглобулина β2 или любой их комбинации.

65. Модифицированная иммунная клетка по п. 63 или п. 64, где нокаут хромосомного гена включает нокаут гена компонента TCR, выбранного из гена вариабельной области TCR α; гена вариабельной области TCR β; гена константной области TCR или любой их комбинации.

66. Выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, где кодируемый связывающий белок содержит Vα домен TCR и Vβ домен TCR и способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA, где HLA необязательно включает HLA-A*0201, и где:

(i) кодируемый Vα домен содержит аминокислотную последовательность CDR3, представленную в любой из SEQ ID NO: 28, 19, 22 или 25;

(ii) кодируемый Vβ домен содержит аминокислотную последовательность

CDR3, представленную в любой из SEQ ID NO: 40, 31, 34 или 37;

(iii) кодируемый Vα домен содержит аминокислотную последовательность CDR1, представленную в любой из SEQ ID NO: 26, 17, 20 или 23;

(iv) кодируемый Vβ домен содержит аминокислотную последовательность CDR1, представленную в любой из SEQ ID NO: 38, 32 или 35;

(v) кодируемый Vα домен содержит аминокислотную последовательность CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO: 27, 18, 21 или 24;

(vi) кодируемый Vβ домен содержит аминокислотную последовательность CDR2, представленную в любой из SEQ ID NO: 39, 30, 33 или 36;

(vii) кодируемый Vα домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 4, 1-3, 12 или 9-11;

(viii) кодируемый Vβ домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 8, 5-7, 16 или 13-15;

(ix) кодируемый Vα TCR содержится в цепи TCRα, где цепь TCRα содержит или состоит из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 53 и 46-52;

(x) кодируемый Vβ TCR содержится в цепи TCRβ, где цепь TCRβ имеет аминокислотную последовательность, содержащую, состоящую из или обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 61 и 54-60; или

(xi) любая комбинация (i)-(x).

67. Выделенный полинуклеотид по п. 66, где полинуклеотид является кодон-оптимизированным для экспрессии в клетке-хозяине, где, необязательно, клетка-хозяин представляет собой человеческую Т-клетку, NK-клетку или NK-T-клетку.

68. Выделенный полинуклеотид по п. 66 или п. 67, где полинуклеотид содержит полинуклеотид, обладающий по меньшей мере 75% идентичностью полинуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 62-81.

69. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 66-68.

70. Вектор по п. 69, где вектор представляет собой лентивирусный вектор или ретровирусный вектор.

71. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 66-68 и способная экспрессировать кодируемый связывающий белок.

72. Композиция, содержащая:

(i) модифицированную иммунную клетку по любому из пп. 1-65;

(ii) полинуклеотид по любому из пп. 66-68;

(iii) вектор по п. 69 или п. 70 и/или

(iv) клетку-хозяина по п. 71

и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

73. Композиция по п. 72, содержащая:

(i) модифицированную иммунную клетку по любому из пп. 1-65 и

(ii) иммунную клетку, содержащую полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержащий Vα TCR и Vβ TCR и способный специфически связываться с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 100):HLA, где, необязательно, HLA включает HLA-A*0201, и где, необязательно, каждая из модифицированной иммунной клетки согласно (i) и иммунной клетки согласно (ii) независимо выбрана из Т-клетки, NK-клетки и NK-Т-клетки.

74. Композиция по п. 73, где связывающий белок иммунной клетки в (ii) содержит:

(a) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 101-103 и 105-107, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 104, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 108;

(b) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 109-110 и 113-115, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 112, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116; или

(c) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 117-119 и 121-123, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 120, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 124.

75. Способ лечения субъекта, имеющего заболевание или расстройство,

связанное с экспрессией WT-1, включающий введение субъекту эффективного количества: (i) модифицированной иммунной клетки по любому из пп. 1-65; (ii) полинуклеотида по любому из пп. 66-68; (iii) вектора по п. 69 или п. 70; (iv) клетки-хозяина по п. 71 и/или (v) композиции по любому из пп. 72-74.

76. Способ по п. 75, включающий введение модифицированной иммунной клетки по любому из пп. 1-65 субъекту, который получил, получает или будет получать иммунную клетку, содержащую полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, содержащий Vα TCR и Vβ TCR и способный специфически связываться с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 100):HLA, где, необязательно, HLA включает HLA-A*0201, и где, необязательно, каждая из модифицированной иммунной клетки и иммунной клетки независимо выбрана из Т-клетки, NK-клетки и NK-Т-клетки.

77. Способ по п. 76, где связывающий белок, способный специфически связываться с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 100):HLA, содержит:

(a) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 101-103 и 105-107, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 104, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 108;

(b) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 109-110 и 113-115, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 112, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116; или

(c) аминокислотные последовательности CDR1α, CDR2α, CDR3α, CDR1β, CDR2β и CDR3β согласно SEQ ID NO: 117-119 и 121-123, соответственно, и где, необязательно, (1) Vα обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 120, и/или (2) Vβ обладает по меньшей мере 90% идентичностью, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 124.

78. Способ по любому из пп. 75-77, где заболевание или расстройство представляет собой гемобластоз или солидный рак.

79. Способ по п. 78, где гемобластоз выбран из острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоцитарного лейкоза,

острого миелоидного лейкоза (ОМЛ, включая рефрактерный и рецидивирующий ОМЛ, и включая острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз (например, с эозинофилией или без нее), острый моноцитарный лейкоз, острый эритроидный лейкоз и острый мегакариобластный лейкоз), хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), хронического миелоцитарного лейкоза, хронического эозинофильного лейкоза (ХЭЛ), миелодиспластического синдрома (МДС), неходжкинской лимфомы (НХЛ) или множественной миеломы (ММ, включая рефрактерную и рецидивирующую ММ).

80. Способ по п. 78, где солидный рак выбран из рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, карциномы костей и мягких тканей, опухоли головного мозга, рака молочной железы, карциномы молочной железы, рака шейки матки, рака ободочной кишки, колоректальной аденокарциномы, колоректального рака, десмоидной опухоли, эмбрионального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, глиобластомы, меланомы, диффузной мезотелиомы брюшины, злокачественной мезотелиомы плевры, глиомы, астроцитомы, гинекологической опухоли, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, злокачественной меланомы, остеосаркомы, рака яичника (например, эпителиального рака яичника, карциномы яичника), рака маточной трубы, карциномы эндометрия, рака поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, первичной астроцитарной опухоли, первичного рака щитовидной железы, рака предстательной железы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, остеогенной саркомы, герминогенной опухоли яичка, уротелиального рака, саркомы матки, карциносаркомы матки или рака матки.

81. Способ по любому из пп. 75-80, где модифицированную иммунную клетку модифицируют ex vivo, чтобы она содержала гетерологичный полинуклеотид.

82. Способ по любому из пп. 75-81, где модифицированная иммунная клетка является аллогенной, сингенной или аутологичной по отношению к субъекту.

83. Способ по любому из пп. 75-82, где модифицированная иммунная клетка представляет собой гемопоэтическую клетку-предшественника или клетку иммунной системы человека.

84. Способ по п. 83, где клетка иммунной системы представляет собой $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^-$ $CD8^-$ двойную негативную Т-клетку, γδ-Т-клетку, естественную киллерную клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию.

85. Способ по п. 84, где Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку,

центральную Т-клетку памяти, эффекторную Т-клетку памяти или любую их комбинацию.

86. Способ по любому из пп. 75-85, где способ включает введение субъекту множества доз модифицированной иммунной клетки.

87. Способ по п. 86, где множество доз вводят с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель.

88. Способ по любому из пп. 75-87, где модифицированную иммунную клетку вводят субъекту в дозе от приблизительно 10^4 клеток/кг до приблизительно 10^{11} клеток/кг.

89. Способ по любому из пп. 75-88, где способ дополнительно включает введение субъекту цитокина.

90. Способ по п. 89, где цитокин представляет собой IL-2, IL-15, IL-21 или любую их комбинацию.

91. Способ по п. 90, где цитокин представляет собой IL-2 и его вводят одновременно или последовательно с модифицированной иммунной клеткой.

92. Способ по п. 91, где цитокин вводят последовательно, при условии, что субъекту вводили модифицированную иммунную клетку по меньшей мере три или четыре раза до введения цитокина.

93. Способ по любому из пп. 89-92, где цитокин представляет собой IL-2 и его вводят подкожно.

94. Способ по любому из пп. 75-93, где субъект дополнительно получает иммуносупрессивную терапию.

95. Способ по п. 94, где иммуносупрессивная терапия выбрана из ингибиторов кальциневрина, кортикостероидов, ингибиторов микротрубочек, низкой дозы пролекарства микофеноловой кислоты или любой их комбинации.

96. Способ по любому из пп. 75-95, где субъект получил немиелоаблативную или миелоаблативную трансплантацию гемопоэтических клеток.

97. Способ по п. 96, где модифицированную иммунную клетку вводят субъекту через по меньшей мере три месяца после немиелоаблативной трансплантации гемопоэтических клеток.

98. Способ по п. 97, где модифицированную иммунную клетку вводят субъекту через по меньшей мере два месяца после миелоаблативной трансплантации гемопоэтических клеток.

99. Способ по любому из пп. 75-98, где субъект ранее получал терапию ОМЛ.

100. Применение композиции, содержащей:

(i) модифицированную иммунную клетку по любому из пп. 1-65;

(ii) полинуклеотид по любому из пп. 66-68;

(iii) вектор по п. 69 или п. 70 и/или

(iv) клетку-хозяина по п. 71,

для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией WT-1.

101. Применение композиции, содержащей:

(i) модифицированную иммунную клетку по любому из пп. 1-65;

(ii) полинуклеотид по любому из пп. 66-68;

(iii) вектор по п. 69 или п. 70 и/или

(iv) клетку-хозяина по п. 71,

для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией WT-1.

102. Применение по п. 100 или п. 101, где заболевание или расстройство представляет собой гемобластоз или солидный рак.

103. Применение по п. 102, где гемобластоз выбран из острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ, включая рефрактерный и рецидивирующий ОМЛ, и включая острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз (например, с эозинофилией или без нее), острый моноцитарный лейкоз, острый эритроидный лейкоз и острый мегакариобластный лейкоз), хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), хронического миелоцитарного лейкоза, хронического эозинофильного лейкоза (ХЭЛ), миелодиспластического синдрома (МДС), неходжкинской лимфомы (НХЛ) или множественной миеломы (ММ, включая рефрактерную и рецидивирующую ММ).

104. Применение по п. 102, где солидный рак выбран из рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, карциномы костей и мягких тканей, опухоли головного мозга, рака молочной железы, карциномы молочной железы, рака шейки матки, рака ободочной кишки, колоректальной аденокарциномы, колоректального рака, десмоидной опухоли, эмбрионального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, глиобластомы, меланомы, диффузной мезотелиомы брюшины, злокачественной мезотелиомы плевры, глиомы, астроцитомы, гинекологической опухоли, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, злокачественной меланомы, остеосаркомы, рака яичника (например, эпителиального рака яичника, карциномы яичника), рака маточной трубы, карциномы эндометрия, рака поджелудочной железы, протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, первичной

астроцитарной опухоли, первичного рака щитовидной железы, рака предстательной железы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, остеогенной саркомы, герминогенной опухоли яичка, уротелиального рака, саркомы матки, карциносаркомы матки или рака матки.

105. Связывающий белок, содержащий вариабельный домен α-цепи (Vα) Т-клеточного рецептора (TCR) и вариабельный домен β-цепи (Vβ) TCR, где:

Vα домен содержит:

(i) аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3α) согласно любой из SEQ ID NO: 28, 19, 22, или 25, или 28 или ее вариант;

(ii) аминокислотную последовательность CDR1 (CDR1α) согласно любой из SEQ ID NO: 26, 17, 20 или 23;

(iii) аминокислотную последовательность CDR2 (CDR2α) согласно любой из SEQ ID NO: 27, 18, 21 или 24;

(iv) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-4 или 9-12; или

(v) любую комбинацию (i)-(iv); и

Vβ домен содержит:

(vi) аминокислотную последовательность CDR3 (CDR3β) согласно любой из SEQ ID NO: 40, 31, 34 или 37 или ее вариант;

(vii) аминокислотную последовательность CDR1 (CDR1β) согласно любой из SEQ ID NO: 38, 29, 32 или 35;

(viii) аминокислотную последовательность CDR2 (CDR2β) согласно любой из SEQ ID NO: 39, 30, 33 или 36;

(ix) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 5-8 или 13-16; или

(x) любую комбинацию (vi)-(x),

где связывающий белок способен связываться с комплексом RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 94):HLA, где, необязательно, HLA включает HLA-A*0201.

106. Связывающий белок по п. 105, дополнительно содержащий:

(1) константный домен α-цепи (Cα) TCR или его фрагмент и/или

(2) константный домен β-цепи (Cβ) TCR или его фрагмент.

107. Связывающий белок по п. 106, где Cα содержит или состоит из

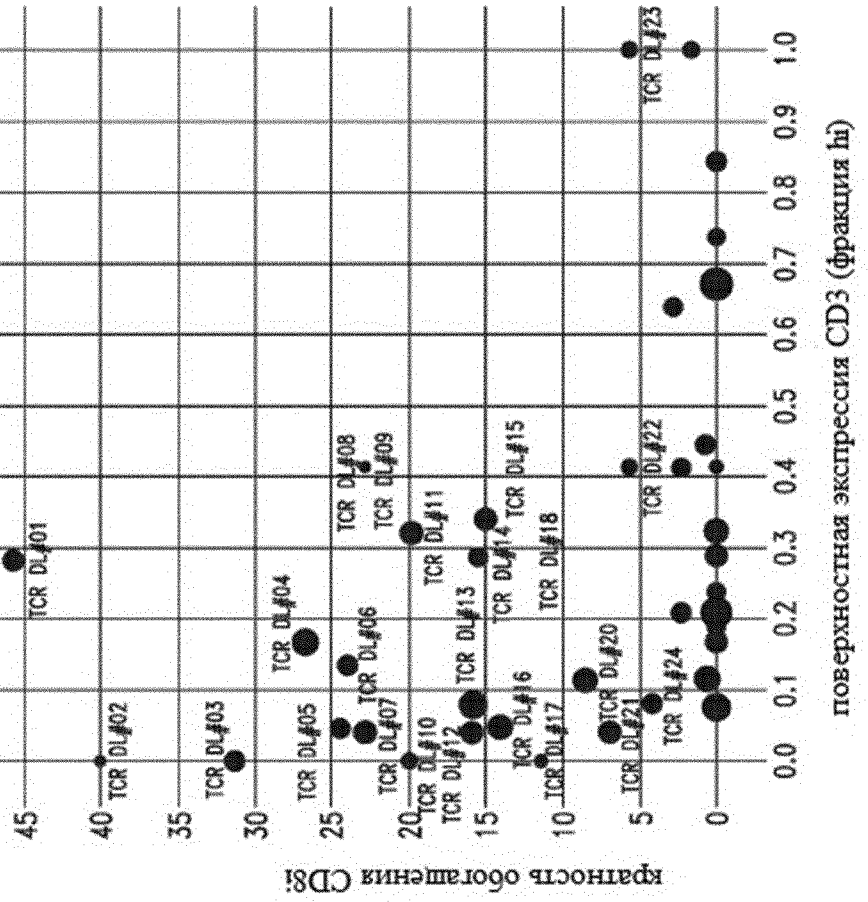
аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 41-44.

108. Связывающий белок по п. 106 или п. 107, где Cβ содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45.

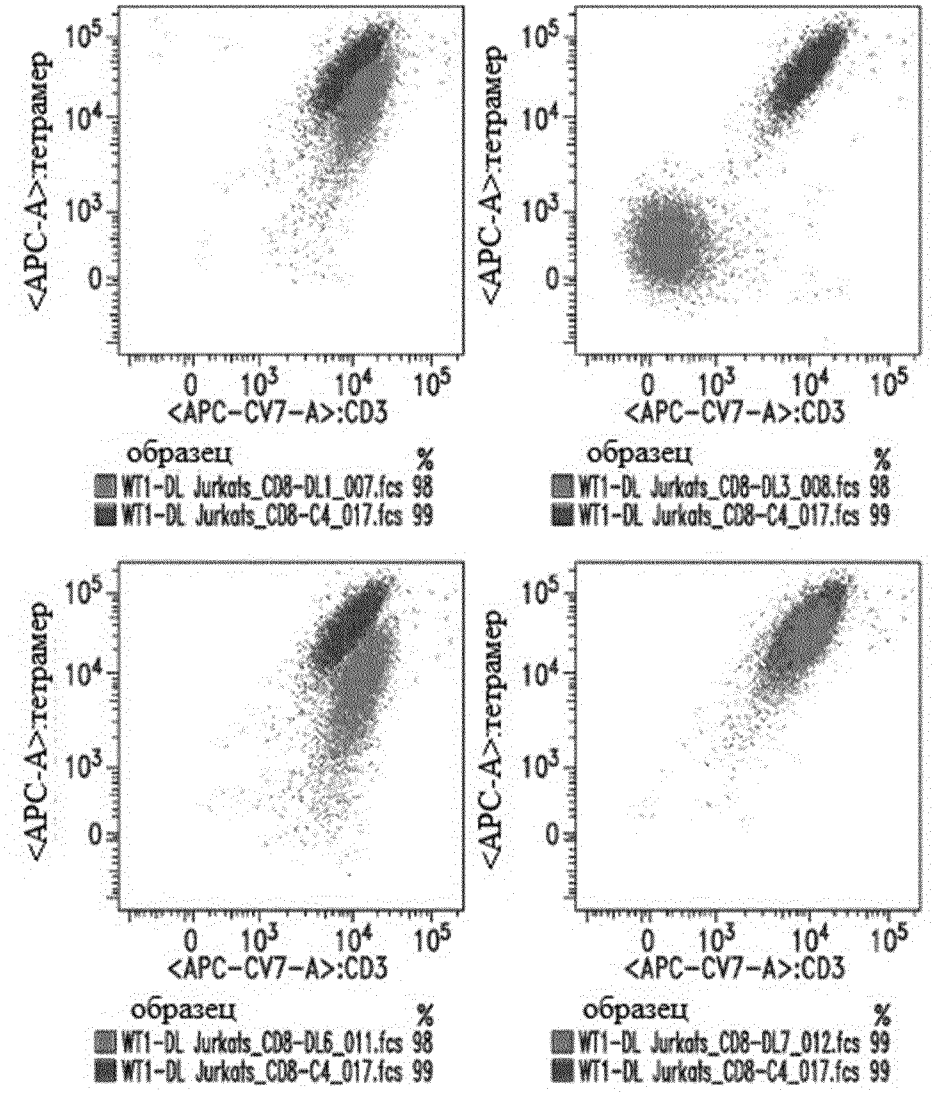
109. Выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок по любому из пп. 105-108.

110. Полинуклеотид по п. 109, который является кодон-оптимизированным для экспрессии в клетке-хозяине.

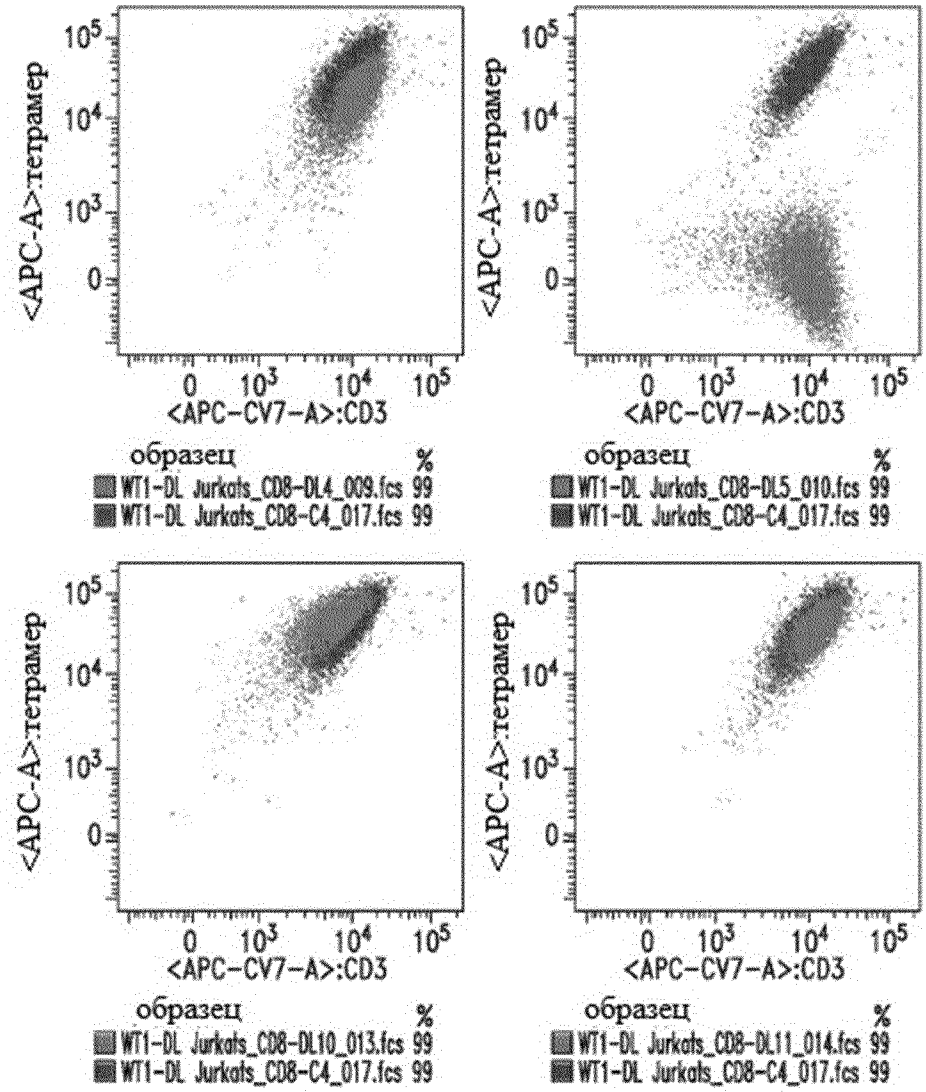
111. Модифицированная иммунная клетка, содержащая полинуклеотид по п. 109 или п. 110, где полинуклеотид является гетерологичным по отношению к иммунной клетке.


яркость окрашивания CD8i
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
поверхностная экспрессия CD3 (фракция hi)
TCR DL#01
TCR DL#02
TCR DL#03
TCR DL#04
TCR DL#05
TCR DL#06
TCR DL#07
TCR DL#08
TCR DL#09
TCR DL#10
TCR DL#11
TCR DL#12
TCR DL#13
TCR DL#14
TCR DL#15
TCR DL#16
TCR DL#17
TCR DL#18
TCR DL#20
TCR DL#21
TCR DL#22
TCR DL#23
TCR DL#24

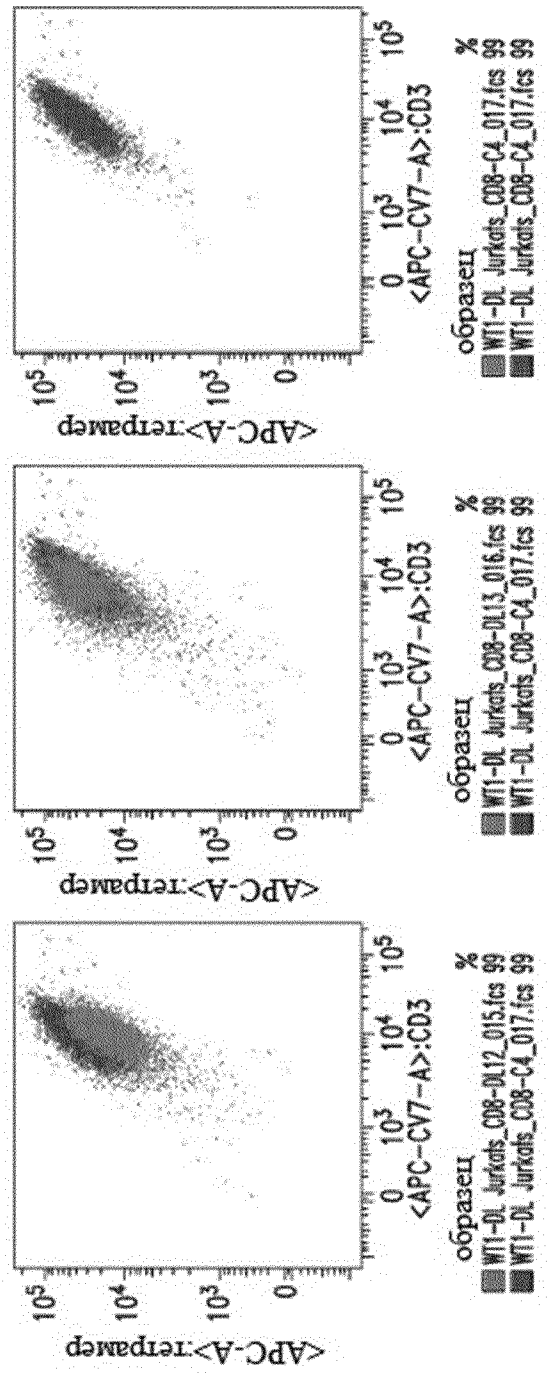
ФИГУРА 1


<APC-A>:тетрамер
<APC-CV7-A>:CD3
образец %
WT1-DL Jurkats_CD8-DL1_007.fcs 98
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
<APC-A>:тетрамер
<APC-CV7-A>:CD3
образец %
WT1-DL Jurkats_CD8-DL3_008.fcs 98
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
<APC-A>:тетрамер
<APC-CV7-A>:CD3
образец %
WT1-DL Jurkats_CD8-DL6_011.fcs 98
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
<APC-A>:тетрамер
<APC-CV7-A>:CD3
образец %
WT1-DL Jurkats_CD8-DL7_012.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99

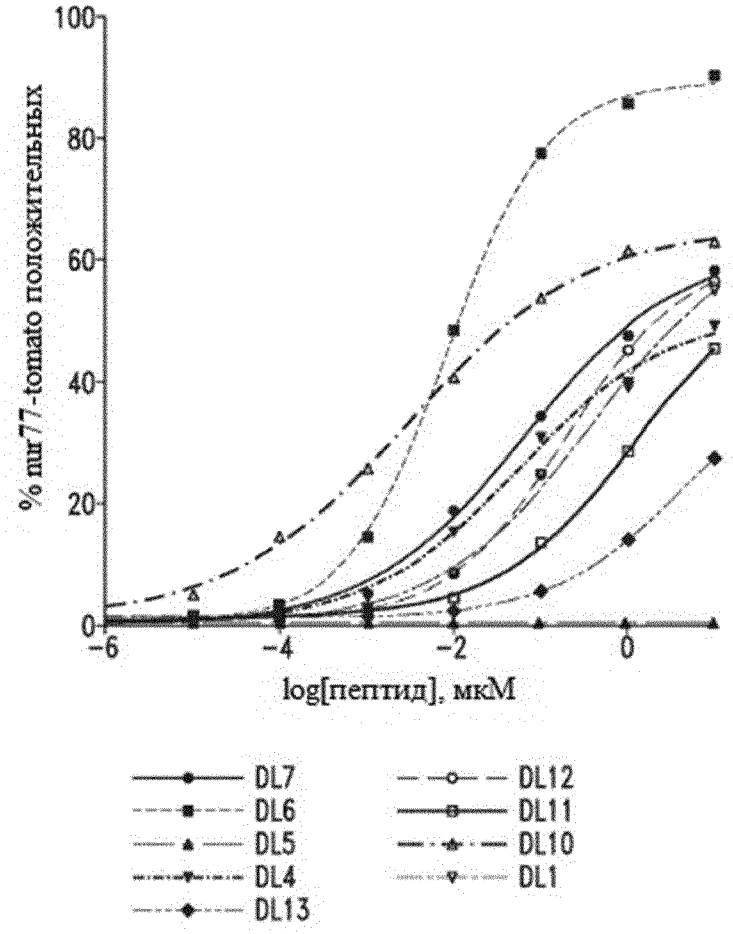
ФИГУРА 2А


<APC-A>:тетрамер
<APC-CV7-A>:CD3
образец %
WT1-DL Jurkats_CD8-DL4_009.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-DL5_010.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-DL10_013.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-DL11_014.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99

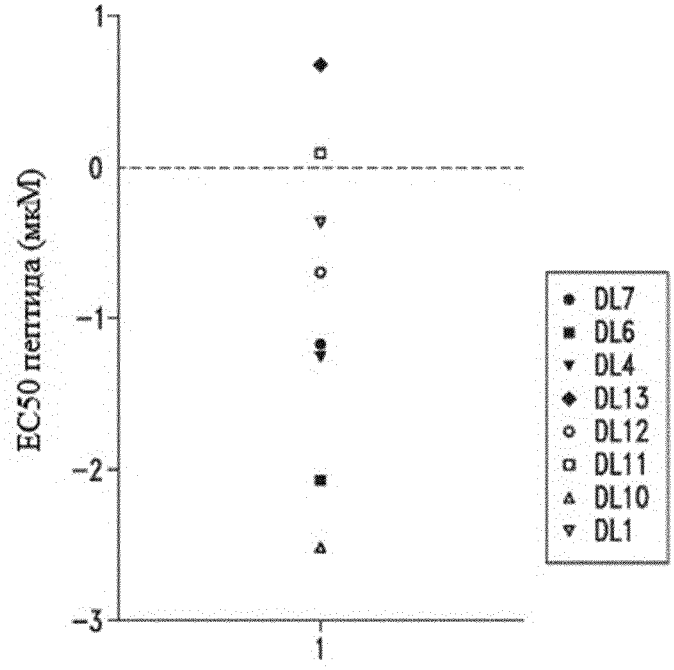
ФИГУРА 2B


<APC-A>:тетрамер
10^5
10^4
10^3
0
0
10^3
10^4
10^5
<APC-CY7-A>:CD3
образец
%
WT1-DL Jurkats_CD8-DL12_015.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
<APC-A>:тетрамер
10^5
10^4
10^3
0
0
10^3
10^4
10^5
<APC-CY7-A>:CD3
образец
%
WT1-DL Jurkats_CD8-DL13_016.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
<APC-A>:тетрамер
10^5
10^4
10^3
0
0
10^3
10^4
10^5
<APC-CY7-A>:CD3
образец
%
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99

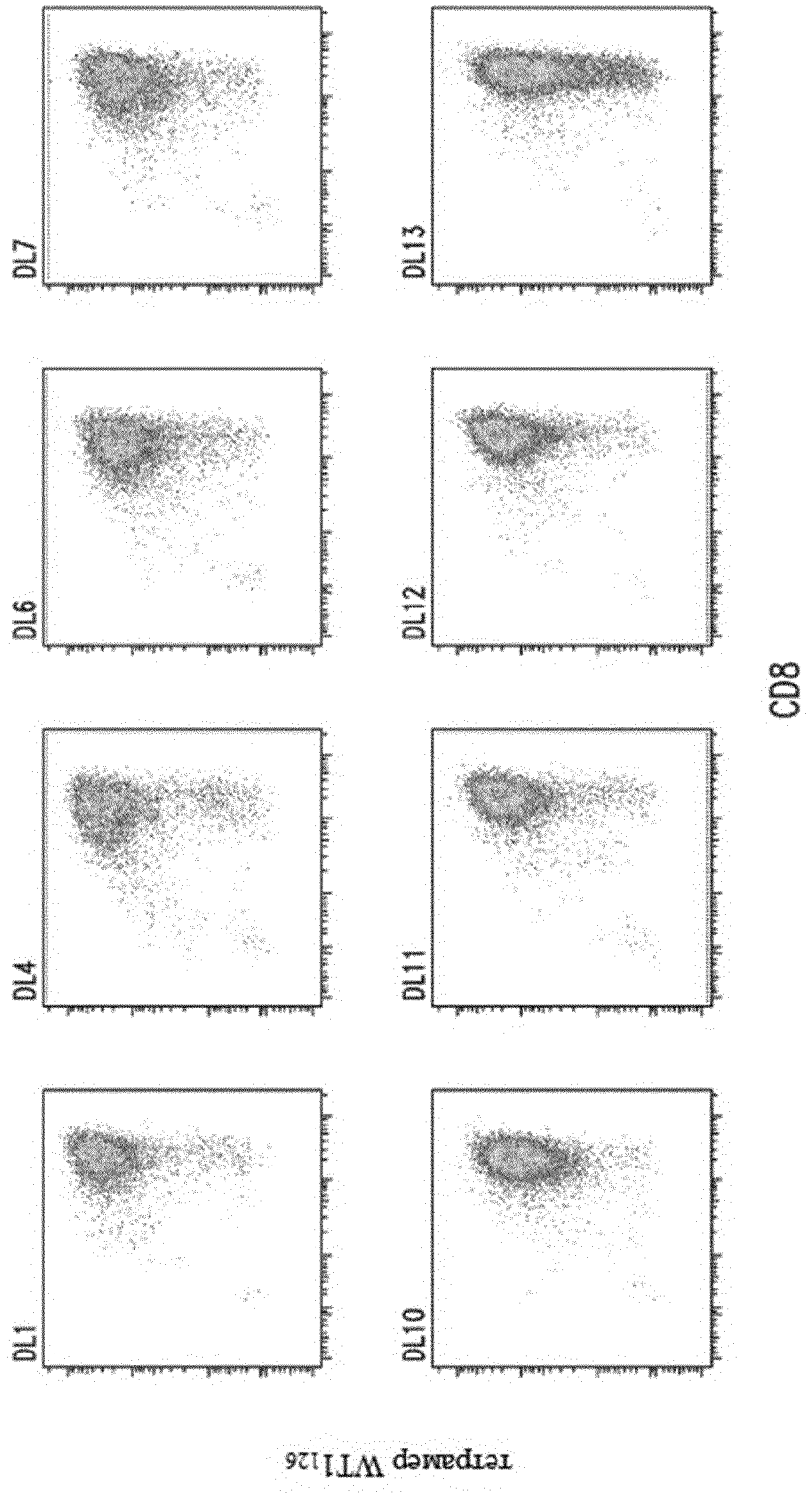
ФИГУРА 2С


100
80
60
40
20
0
% mu77-tomato положительных
−6
−4
−2
0
log[пептид], мкМ
DL7
DL6
DL5
DL4
DL13
DL12
DL11
DL10
DL1

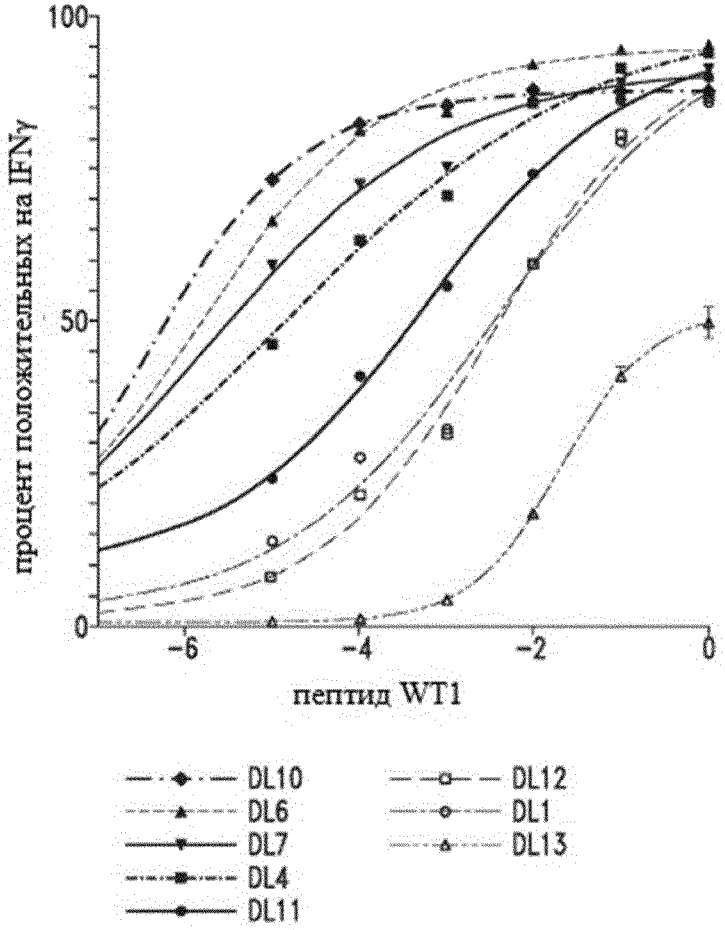
ФИГУРА 3А



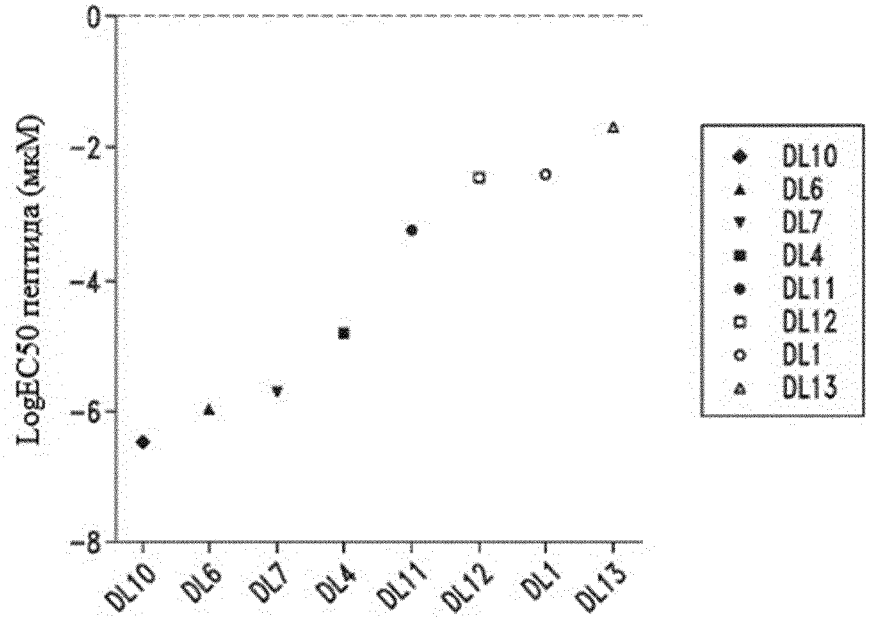
ФИГУРА 3B



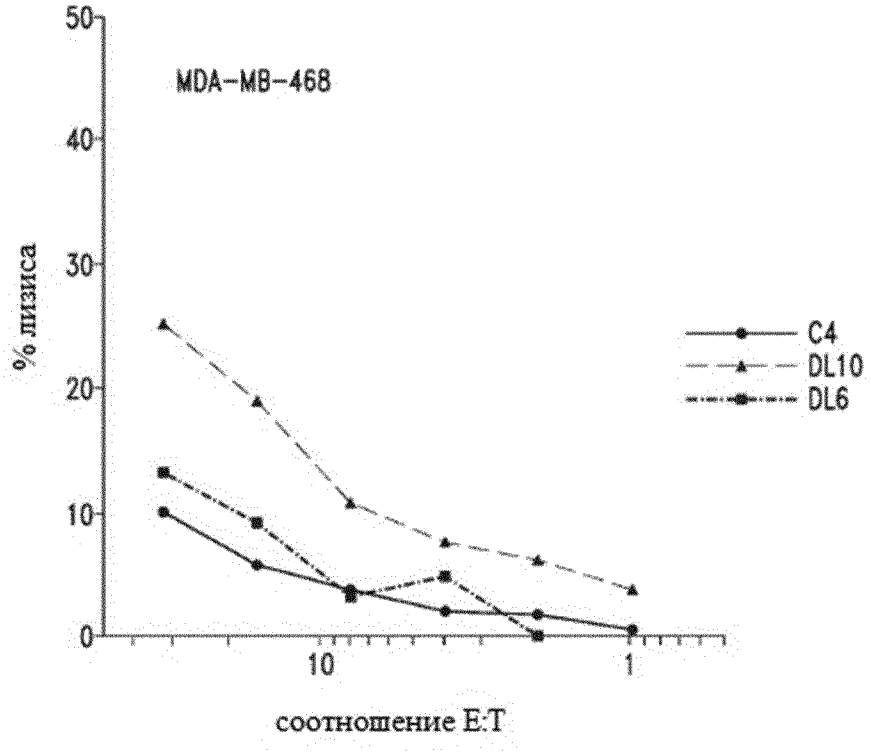
ФИГУРА 4А


100
50
0
процент положительных на IFNγ
-6
-4
-2
0
пептид WT1
DL10
DL6
DL7
DL4
DL11
DL12
DL1
DL13

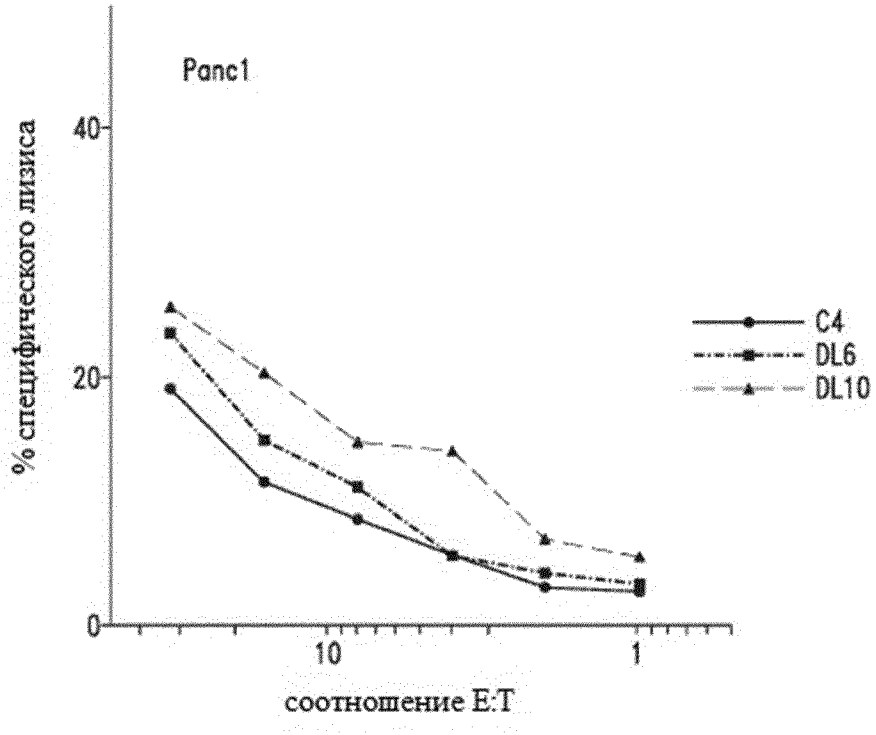
ФИГУРА 4B


0
-2
-4
-6
-8
LogEC50 пептида (мкМ)
DL10
DL6
DL7
DL4
DL11
DL12
DL1
DL13

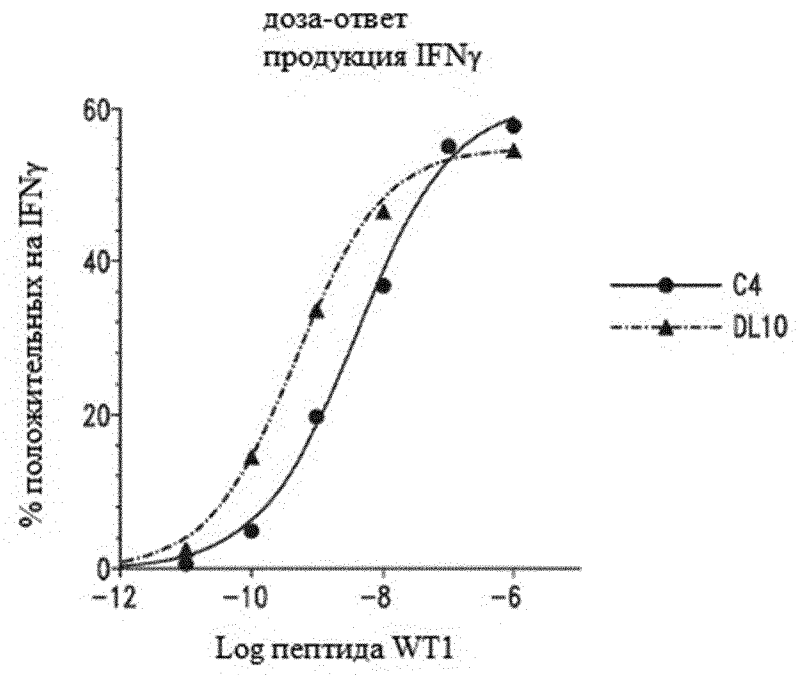
ФИГУРА 4C


MDA-MB-468
% лизиса
50
40
30
20
10
0
10
1
соотношение E:T
C4
DL10
DL6

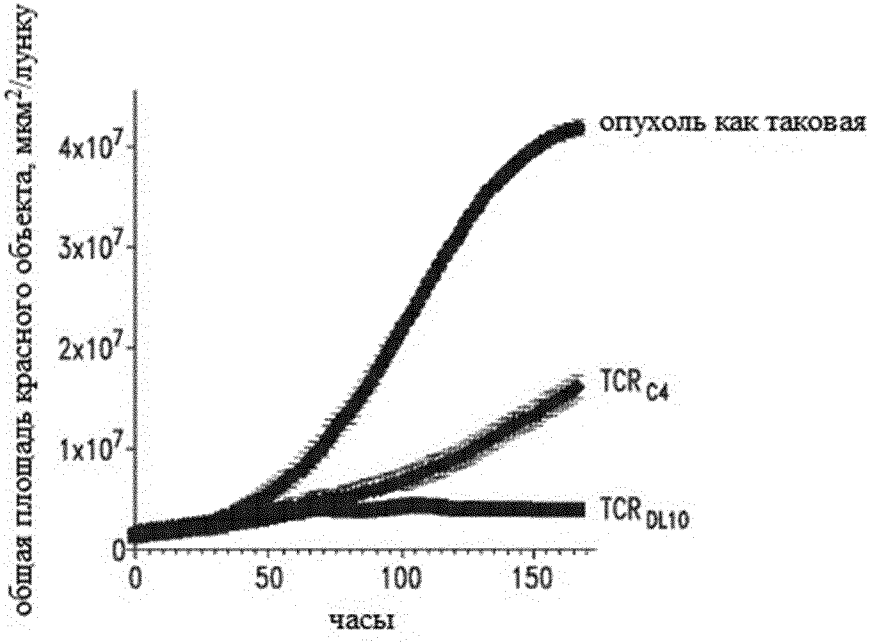
ФИГУРА 5А


Panc1
% специфического лизиса
40
20
0
10
1
соотношение E:T
C4
DL6
DL10

ФИГУРА 5B


доза-ответ
продукция IFNγ
% положительных на IFNγ
60
40
20
0
−12
−10
−8
−6
Log пептида WT1
C4
DL10

ФИГУРА 6


общая площадь красного объекта, мкм²/лунку
4x10⁷
3x10⁷
2x10⁷
1x10⁷
0
0
50
100
150
часы
опухоль как таковая
TCR C4
TCR DL10

ФИГУРА 7