

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992131 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.06

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C12N 5/07 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.15

(54) ВЫСОКОАФФИННЫЕ СПЕЦИФИЧНЫЕ К MAGE-A1 TCR И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/471,956

(72) Изобретатель:

(32) 2017.03.15

Шапюи Од, Шмитт Томас, Макефи
Меган (US)

(33) US

(86) PCT/US2018/022759

(74) Представитель:

(87) WO 2018/170338 2018.09.20

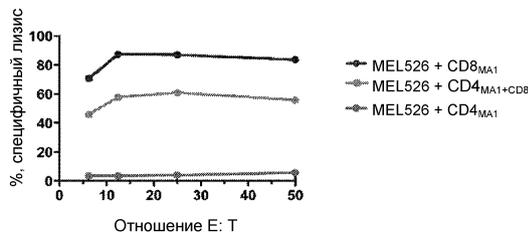
Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.
(RU)

(88) 2019.11.21

(71) Заявитель:

ФРЕД ХАТЧИНСОН КЭНСЕР
РИСЕРЧ СЕНТЕР (US)

(57) Настоящее изобретение обеспечивает TCR с высокой или повышенной аффинностью к различным опухолеассоциированным антигенам (включая эпитопы MAGE-A1 человека), Т-клетки, экспрессирующие такие высокоаффинные специфичные к антигену TCR, нуклеиновые кислоты, их кодирующие, и композиции для применения при лечении заболеваний или нарушений, при которых клетки сверхэкспрессируют один или несколько из таких антигенов, таких как онкологические заболевания.



201992131

A1

A1

201992131

ВЫСОКОАФФИННЫЕ СПЕЦИФИЧНЫЕ К MAGE-A1 TCR И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ИНФОРМАЦИЯ КАСАТЕЛЬНО ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, связанных с данной заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и, таким образом, включен в данное описание посредством ссылки. Имя текстового файла, содержащего список последовательностей:

360056_446WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Размер текстового файла составляет 86,3 КБ, он был создан 14 марта 2018 года и подается в электронном виде через EFS-Web.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Адоптивный перенос опухолеспецифичных Т-клеток является привлекательной стратегией для устранения существующих опухолей и требует создания устойчивой популяции антиген-специфичных Т-клеток *in vivo* для устранения существующих опухолей и предотвращения рецидивов (Stromnes *et al.*, *Immunol. Rev.* 257:145, 2014). Хотя перенос опухолеспецифичных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) является безопасным и может опосредовать прямую противоопухолевую активность у отдельных пациентов (Chapuis *et al.*, *Cancer Res.* 72:LB-136, 2012; Chapuis *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 5:174ra127, 2013; Chapuis *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 109:4592, 2012),²⁻⁴ изменчивость avidности ЦТЛ, выделенных у каждого пациента или донора, ограничивает противоопухолевую эффективность в клинических испытаниях (Chapuis *et al.*, 2013). Поскольку аффинность к TCR является важной детерминантой avidности ЦТЛ (Zoete *et al.*, *Frontiers Immunol.* 4:268, 2013), были разработаны стратегии для перенаправления антиген-специфичности Т-клеток доноров и пациентов с использованием генов TCR α/β с высокой аффинностью, выделенных из хорошо изученного клона Т-клеток, специфичного для опухолеспецифичного антигена (Stromnes *et al.* *Immunol. Rev.* 257:145, 2014; Robbins *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 29:917, 2011). Такие высокоаффинные самореактивные/опухолерективные Т-клетки встречаются редко, поскольку Т-клетки, которые экспрессируют самореактивные/ опухолерективные TCR, подвержены центральной и периферической толерантности (Stone and Kranz, *Frontiers Immunol.* 4:244, 2013), причем относительные аффинности TCR сильно варьируют между донорами. Следовательно, многие подходящие доноры должны быть подвергнуты скринингу для выявления достаточно высокоаффинного опухолеспецифического клона Т-клеток, из которого можно получить конструкт генной терапии TCR α/β . Например, для выделения естественным образом выявленного TCR, специфичного к антигену опухоли Вильмса 1 (WT1), с высокой функциональной avidностью к одному аллелю HLA требовался скрининг сотен линий WT-специфичных Т-клеток, представляющих тысячи отдельных клонов Т-клеток из периферических репертуаров более 75 нормальных доноров, что является чрезвычайно долгим и трудоемким процессом (Chapuis *et al.*, 2013; Schmitt *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 20:1240, 2009; Ho *et al.*, *J. Immunol. Methods* 310:40, 2006).

Существует потребность в альтернативных антигенспецифичных иммунотерапиях TCR, направленных против различных видов рака, таких как лейкоз и опухоли. Раскрытые в данном документе варианты осуществления удовлетворяют эти потребности и предоставляют другие связанные преимущества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигурах 1А и 1В показаны репрезентативные данные, иллюстрирующие, что Т-клетки с высокой аффинностью к вирусным антигенам обнаруживаются с более высокой частотой (А), чем Т-клетки с высокой аффинностью к аутоантигенам, частота обнаружения которых очень низкая (В).

На фигурах 2А и 2В показаны, соответственно, (А) схема анализа обогащения Т-клеток, выполненного авторами настоящего изобретения, (В) данные проточной цитометрии из серии экспериментов по сортировке, использованных для обогащения антиген-специфичных CD8⁺ Т-клеток.

На фигуре 3 показаны примерные данные схемы обогащения TCR β CDR3 по настоящему изобретению с использованием тетрамеров MAGE-A1:HLA.

На фигурах 4А и 4В показаны, соответственно, (А) специфическое связывание тетрамеров MAGE-A1:HLA с TCR, идентифицированных с использованием способов настоящего изобретения, и (В) обогащение MAGE-A1-специфичных TCR.

На фигурах 5А–5С представлены, соответственно, (А) данные проточной цитометрии, показывающие специфичные к MAGE-A1 CD8⁺ Т-клетки по настоящему изобретению, связывающие MAGE-A1:HLA-тетрамеры, (В) продуцирование цитокинов с помощью MAGE-A1-специфичных CD8⁺ Т-клеток в отсутствие (слева) или в присутствии (справа) антиген-экспрессирующих клеток миеломы U266 и (С) данные специфического лизиса, показывающие, что высокоаффинные MAGE-A1 TCR-трансдуцированные CD8⁺ Т-клетки по настоящему изобретению связывают тетрамеры ГКГС:антиген и вызывают гибель клеток, презентирующих MAGE-A1: ГКГС (A*0201). Данные в (С) получены из стандартного анализа высвобождения Cr⁵¹, в котором CD8⁺ Т-клетки культивировали совместно только с клетками U266, с экзогенным интерфероном-гамма (IFN γ) или с экзогенным пептидом MAGE-A1.

Фигура 6А иллюстрирует иммунотерапевтический подход в соответствии с настоящим изобретением, в котором CD4⁺ Т-клетки трансдуцированы для экспрессии TCR и корецептора CD8, оба из CD8⁺ Т-клетки, специфичный для пептидного антигена. Активация трансдуцированных CD4⁺ Т-клеток может усиливать или улучшать антигенный ответ CD8⁺ Т-клеток, таких как введенные ЦТЛ в условиях иммунотерапии. На фигуре 6В показана схема эксперимента, проведенного авторами настоящего изобретения, в котором Т-клетка CD4⁺ была трансдуцирована для экспрессии CD8-независимого рестриктированного по ГКГС класса I TCR, не являющегося корецептором CD8.

На фигуре 7А показаны данные проточной цитометрии из эксперимента, в котором Т-клетки (CD8⁺ и CD4⁺), экспрессирующие высокоаффинные CD8 анти-MAGE-A1 TCR, анализировали на связывание с тетрамерами MAGE-A1:ГКГС. На фигуре 7В показано специфическое связывание MAGE-A1-специфичных Т-клеток с тетрамерами MAGE-A1:ГКГС. На фигуре 7С показан лизис клеток-мишеней (высвобождение Cr⁵¹) CD8⁺ Т-клетками, экспрессирующими специфичный к MAGE-A1 TCR по данному раскрытию, и отсутствие уничтожения клеток сравнимыми CD4⁺ Т-клетками.

На фигуре 8А показана схема, иллюстрирующая эксперимент, проведенный авторами настоящего изобретения, в котором CD4⁺ Т-клетки были трансдуцированы для экспрессии высокоаффинного TCR MAGE A1 класса I, а также корецептора CD8 $\alpha\beta$, и исследованы для оценки функциональности в присутствии клеток, экспрессирующий пептид:ГКГС. На фигуре 8В показано, что более высокая доля CD4⁺ Т-клеток, трансдуцированных TCR MAGE-A1 и корецептором CD8, продуцировала цитокины по сравнению с CD4⁺ Т-клетками, экспрессирующими только TCR MAGE-A1. На фигуре 8С показан специфичный лизис антигенпрезентирующих клеток-мишеней меланомы MEL526 указанными Т-клетками. На фигуре 8D показана экспансия двух групп трансдуцированных CD4⁺ Т-клеток после стимуляции антигеном.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В определенных аспектах настоящее раскрытие относится к композициям, содержащим связывающие белки, специфичные к пептидным антигенам MAGE-A1, связанным с главным комплексом гистосовместимости (ГКГС) (*например*, антиген лейкоцитов человека, HLA), которые могут быть применены, например, для лечения заболеваний или расстройств, связанных с экспрессией MAGE-A1 (*например*, онкологические заболевания) или адоптивной иммунотерапии для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим такие специфичные к MAGE-A1 связывающие белки, а также к клеткам-хозяевам, модифицированным для экспрессии специфичных к MAGE-A1 связывающих белков (*например*, TCR).

В других аспектах настоящее раскрытие относится к модифицированным CD4⁺ Т-клеткам, содержащим гетерологичный полинуклеотид, кодирующий TCR из CD8⁺ Т-клеток, который способен специфично связываться с пептидным антигеном (*например*, MAGE-A1) и необязательно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий по крайней мере внеклеточную часть молекулы корцептора CD8.

Для пояснения: большинство опухолевых мишеней для иммунотерапии, основанной на Т-клетках являются аутоантигенами, поскольку опухоли возникают из ранее нормальной ткани. Например, высокие уровни таких ассоциированных с опухолью антигенов (ТАА) могут экспрессироваться в раковой клетке, но могут не экспрессироваться или минимально экспрессироваться в других клетках. Во время развития Т-клеток в тимусе, слабо связывающиеся с аутоантигенами Т-клетки получают возможность выживать в тимусе и могут подвергаться дальнейшему развитию и созреванию, тогда как Т-клетки, которые сильно связываются с аутоантигенами, удаляются иммунной системой, поскольку такие клетки будут вызывать нежелательный аутоиммунный ответ. Следовательно, Т-клетки сортируются по их относительной способности связываться с антигенами, чтобы подготовить иммунную систему к ответу на появление чужеродного захватчика (*т. е.*, распознаванию не-аутоантигена), в то же время предотвращая аутоиммунный ответ (*т. е.*, распознавание аутоантигена). Данный механизм толерантности ограничивает встречающиеся в природе Т-клетки, способные распознавать опухолевые (ауто)антигены с высокой аффинностью, и, следовательно, устраняет Т-клетки, которые эффективно удаляют опухолевые клетки. Следовательно, выделение Т-клеток, содержащих TCR с высокой аффинностью, специфичные к опухолевым антигенам, затруднено, поскольку большинство таких клеток по существу уничтожается иммунной системой.

В настоящем раскрытии представлены TCR, специфичные для пептидов MAGE-A1 (также называемых MAGE-1, членами семейства MAGE A1, СТ 1.1 и ассоциированный с меланомой антиген 1), такие как высокоаффинные TCR, специфичные к пептидам MAGE-A1, где клетка, экспрессирующая такой TCR, способна связываться с комплексом MAGE-A1:HLA независимо от CD8. Кроме того, такие TCR необязательно могут быть способны более эффективно ассоциироваться с белком CD3 по сравнению с эндогенными TCR.

Был разработан способ быстрого и одновременного скрининга и ранжирования клонотипов Т-клеток (на основе аффинности) от большой когорты доноров, совпадающих по HLA, за короткое время (приблизительно 6–8 недель). В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предоставляет способы обогащения клеток с высокоаффинными TCR путем использования ограничивающих концентраций антигенспецифичных мультимеров пГКГС в присутствии иммунных клеток субъекта (*например*, МКПК). Репертуар TCRβ и частотный анализ в сочетании с биоинформатикой

использовали для точной идентификации пар цепей: TCR α -цепи и β -цепи. Преимущество этих способов состоит в том, что они позволяют быстро сравнивать аффинность TCR тысяч клонов от нескольких доноров, в отличие от клонирования отдельных TCR.

Композиции и способы, описанные в настоящем документе, будут в некоторых вариантах осуществления иметь терапевтическое применение для лечения заболеваний и состояний, связанных с экспрессией MAGE-A1. Такие заболевания включают различные формы гиперпролиферативных нарушений, такие как гематологические злокачественные новообразования и солидные раки. Неограничивающие примеры таких и связанных с ними применений описаны в настоящем документе и включают стимуляцию антиген-специфичных Т-клеточных ответов MAGE-A1 *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, например, путем использования рекомбинантных Т-клеток, экспрессирующих TCR с повышенной или высокой аффинностью, специфичные к пептиду MAGE-A1.

Перед более подробным изложением данного раскрытия будет полезным представить определения определенных терминов, которые будут использованы в данном документе, для лучшего его понимания. Дополнительные определения изложены в этом раскрытии.

В настоящем описании любой диапазон концентрации, процентный диапазон, диапазон отношения или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, части целого числа (например, одна десятая и одна сотая часть целого числа), если не указано иное. Кроме того, любой диапазон чисел, приведенный в данном документе в отношении любого физического признака, такого как полимерные субъединицы, размер или толщина, следует понимать как включающий любое целое число в указанном диапазоне, если не указано иное. Используемый в данном документе термин «приблизительно» означает $\pm 20\%$ указанного диапазона, значения или структуры, если не указано иное. Следует понимать, что термины в единственном числе, используемые в данном документе, относятся к «одному или нескольким» из перечисленных компонентов. Использование альтернативы (*например*, «или») следует понимать как означающее один из вариантов, оба варианта или любую из комбинаций в качестве альтернативы. Используемые здесь термины «включать», «иметь» и «содержать» используются как синонимы, и эти термины и их варианты следует понимать как неограничивающие.

Кроме того, следует понимать, что описанные в данном документе отдельные соединения или группы соединений, полученные из различных комбинаций структур и заместителей, раскрыты в настоящей заявке в той же степени, как если бы каждое соединение или группа соединений были предложены индивидуально. Таким образом, выбор конкретных структур или конкретных заместителей входит в объем настоящего раскрытия.

Термин «состоящий по существу из» не эквивалентен «включающему» и относится к указанным материалам или этапам формулы изобретения или к тем, которые не оказывают существенного влияния на основные характеристики заявленного объекта. Например, белковый домен, область или модуль (*например*, связывающий домен, шарнирная область, линкерный модуль) или белок (который может иметь один или несколько доменов, областей или модулей) «состоит по существу из» конкретной аминокислотной последовательности, где аминокислотная последовательность домена, области, модуля или белка включает в себя удлинения, делеции, мутации или их комбинацию (*например*, аминокислоты на amino- или карбокси-конце или между доменами), которые в комбинации представляют собой 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 доменов, областей, модулей или белка (*например*, аффинность связывания с мишенью связывающего белка).

Используемый в настоящем описании термин «клетка иммунной системы» означает любую клетку иммунной системы, которая происходит из гемопоэтической стволовой клетки в костном мозге, из которой происходят две основные линии: миелоидные клетки-предшественники (от которых происходят миелоидные клетки, такие как моноциты, макрофаги, дендритные клетки, мегакарициты и гранулоциты) и лимфоидные клетки-предшественники (от которых происходят лимфоидные клетки, такие как Т-клетки, В-клетки и естественные клетки-киллеры (NK)). Типичные клетки иммунной системы включают CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, CD4-CD8-двойные негативные Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки, регуляторные Т-клетки, естественные клетки-киллеры и дендритные клетки. Макрофаги и дендритные клетки могут называться «антигенпрезентирующими клетками» или «АПК», они являются специализированными клетками, которые могут активировать Т-клетки, при взаимодействии рецептора главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) на поверхности APC в комплекс с пептидом, с TCR на поверхности Т-клетки.

«Главный комплекс гистосовместимости» (ГКГС) относится к гликопротеинам, которые доставляют пептидные антигены на клеточную поверхность. Молекулы ГКГС класса I представляют собой гетеродимеры, имеющие трансмембранную α -цепь (с тремя α -доменами) и нековалентно связанный β 2-микроглобулин. Молекулы ГКГС класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β , которые проходят через мембрану. Каждая цепочка имеет два домена. Молекулы ГКГС класса I доставляют пептиды, происходящие из цитозоля, на поверхность клетки, где комплекс пептид:ГКГС распознается CD8⁺ Т-клетками. Молекулы ГКГС класса II доставляют пептиды, происходящие из везикулярной системы, на клеточную поверхность, где они распознаются CD4⁺ Т-клетками. Человеческий ГКГС упоминается как человеческий лейкоцитарный антиген (HLA).

«Т-клетка» — это клетка иммунной системы, которая созревает в тимусе и продуцирует рецепторы Т-клеток (TCR). Т-клетки могут представлять собой наивные клетки (не подвергавшиеся воздействию антигена; у них наблюдается повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA и сниженная экспрессия CD45RO по сравнению с T_{CM}), Т-клетки памяти (T_M) (подвергавшиеся воздействию антигена и долгоживущие) и эффекторные клетки (подвергавшиеся воздействию антигена, цитотоксические). T_M могут быть далее разделены на подмножества Т-клеток центральной памяти (T_{CM}, повышенная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO и CD95 и пониженная экспрессия CD54RA по сравнению с наивными Т-клетками) и эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}, пониженная экспрессия CD62L, CCR7, CD28, CD45RA и повышенная экспрессия CD127 по сравнению с наивными Т-клетками или T_{CM}). Эффекторные Т-клетки (T_E) относятся к подвергавшимся воздействию антигена CD8⁺ цитотоксическим Т-лимфоцитам, которые имеют пониженную экспрессию CD62L, CCR7, CD28 и являются позитивными в отношении гранзима и перфорина по сравнению с T_{CM}. Другие типичные Т-клетки включают регуляторные Т-клетки, такие как CD4⁺ CD25⁺ (Foxp3⁺) регуляторные Т-клетки и Treg17-клетки, а также Tr1, Th3, CD8⁺ CD28⁻ и Qa-1-рестриктированные Т-клетки.

«Т-клеточный рецептор» (TCR) относится к члену суперсемейства иммуноглобулинов (имеющему переменный 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 специфично связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором ГКГС. TCR может быть обнаружен на поверхности клетки или в растворимой форме и обычно состоит из гетеродимера, имеющего α и β цепи (также известные как

TCR α и TCR β соответственно) или цепи γ и δ (также известные как TCR γ и TCR δ соответственно). Как и иммуноглобулины, внеклеточная часть цепей TCR (*например*, α -цепь, β -цепь) содержат два домена иммуноглобулина, переменный домен (*например*, переменный домен α -цепи или V $_{\alpha}$, переменный домен цепи β или V $_{\beta}$; как правило, аминокислоты от 1 до 116 в соответствии с нумерацией Kabat (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 $_{\alpha}$, как правило, аминокислоты от 117 до 259 в соответствии с нумерацией Kabat, константный домен цепи β или C $_{\beta}$, как правило, аминокислоты от 117 до 295 в соответствии с нумерацией Kabat), прилегающий к клеточной мембране. Также как и иммуноглобулины, переменные 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). V $_{\alpha}$ и V $_{\beta}$ нативного TCR обычно имеют сходные структуры, причем каждый переменный домен включает четыре консервативных FR и три CDR. Домен V $_{\alpha}$ кодируется двумя отдельными сегментами ДНК, генным сегментом variable и генным сегментом joining (V–J); домен V $_{\beta}$ кодируется тремя отдельными сегментами ДНК, генным сегментом variable, генным сегментом diversity и генным сегментом joining (V–D–J). Одного домена V $_{\alpha}$ или V $_{\beta}$ может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, TCR, которые связывают определенный антиген могут быть выделены с использованием домена V $_{\alpha}$ или V $_{\beta}$ TCR, который связывается с антигеном для скрининга библиотеки комплементарных доменов V $_{\alpha}$ или V $_{\beta}$ соответственно. В некоторых вариантах осуществления TCR обнаруживается на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов) и ассоциируется с комплексом CD3. Источник TCR, используемый в настоящем раскрытии, может происходить от различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса, кролик или другое млекопитающее.

Используемый в данном документе термин «корцептор CD8» или «CD8» означает гликопротеин клеточной поверхности CD8 в виде альфа-альфа-гомомера либо в виде альфа-бета гетеромера. Корцептор CD8 способствует функционированию цитотоксических Т-клеток (CD8⁺) и функционирует посредством передачи сигналов через его цитоплазматический путь фосфорилирования тирозина (Gao and Jakobsen, *Immunol. Today* 21:630-636, 2000; Cole and Gao, *Cell. Mol. Immunol.* 1:81-88, 2004). Существует пять (5) различных бета-цепей CD8 (*см.* идентификатор UniProtKB P10966) и одна альфа-цепь CD8 (*см.* идентификатор UniProtKB P01732). CD8 обычно связывает комплексы пГКГС класса I.

«Корцептор CD4» или «CD4» относится к гликопротеиновым корцепторам суперсемейства иммуноглобулинов, который способствует связи TCR с антиген-презентирующими клетками (*см.* Campbell & Reese, *Biology* 909 (Benjamin Cummings, Sixth Ed., 2002)). CD4 обнаруживается на поверхности иммунных клеток, таких как Т-хелперы, моноциты, макрофаги и дендритные клетки, и включает четыре домена иммуноглобулина (D1–D4), которые экспрессируются на поверхности клетки. Во время презентации антигена CD4 рекрутируется вместе с комплексом TCR для связывания с различными участками молекулы ГКГС класса II (CD4 связывает ГКГС II $\beta 2$, в то время как комплекс TCR связывает ГКГС II $\alpha 1/\beta 1$). Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что близость к комплексу TCR позволяет ассоциированным с CD4 молекулам киназы фосфорилировать иммунорецепторные мотивы активации тирозина (ITAM), присутствующие в цитоплазматических доменах CD3. Считается, что эта активность усиливает сигнал, генерируемый активированным TCR для продуцирования различных типов Т-хелперов. CD4, как правило, связывает комплексы пГКГС класса II.

«CD3» представляет собой мультибелковый комплекс из шести цепей (см. Abbas and Lichtman, 2003; Janeway *et al.*, P172 и 178, 1999). У млекопитающих комплекс включает цепь CD3 γ , цепь CD3 δ , две цепи CD3 ϵ и гомодимер цепей CD3 ζ . Цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ являются высокородственными белками клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащими один домен иммуноглобулина. Трансмембранные районы цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ заряжены отрицательно, что является характеристикой, позволяющей этим цепям связываться с положительно заряженными цепями рецепторов Т-клеток. Каждая из внутриклеточных хвостов цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ содержит один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина или ITAM, тогда как каждая цепь CD3 ζ содержит три. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что ITAM важны для пропускной сигнальной способности комплекса TCR. CD3, используемый в настоящем описании, может происходить от различных видов животных, включая человека, мышь, крысу или других млекопитающих.

Используемый в данном документе термин «комплекс TCR» относится к комплексу, образованному в результате ассоциации CD3 с TCR. Например, комплекс TCR может состоять из цепи CD3 γ , цепи CD3 δ , двух цепей CD3 ϵ , гомодимера цепей CD3 ζ , цепи TCR α и цепи TCR β . Альтернативно, комплекс TCR может состоять из цепи CD3 γ , цепи CD3 δ , двух цепей CD3 ϵ , гомодимера цепей CD3 ζ , цепи TCR γ и цепи TCR δ .

«Компонент комплекса TCR» при использовании в данном документе относится к цепи TCR (*m. e.*, TCR α , TCR β , TCR γ или TCR δ), цепи CD3 (*m. e.*, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 ζ) или комплексу, образованному из двух или более цепей TCR или цепей CD3 (*например*, комплекс TCR α и TCR β , комплекс TCR γ и TCR δ , комплекс CD3 ϵ и CD3 δ , комплекс CD3 γ и CD3 ϵ или суб-TCR комплекс, состоящий из TCR α , TCR β , CD3 γ , CD3 δ и двух цепей CD3 ϵ).

Термин «связывающий домен» (также называемый «связывающей областью» или «связывающим фрагментом»), используемый в данном документе, относится к молекуле или ее части (*например*, пептиду, олигопептиду, полипептиду, белку), которая обладает способностью специфично и нековалентно связываться, объединяться или соединяться с мишенью (*например*, MAGE-A1, комплекс пептида MAGE-A1: ГКГС). Связывающий домен включает в себя любого встречающегося в природе синтетического, полусинтетического или полученного рекомбинантным образом партнера по связыванию для биологической молекулы, молекулярного комплекса (*m. e.*, комплекса, включающего две или более биологических молекул) или другой представляющей интерес мишени. Типичные связывающие домены включают одноцепочечные варибельные области иммуноглобулина (*например*, scTCR, scFv), рецепторные эктодомены, лиганды (*например*, цитокины, хемокины) или синтетические полипептиды, выбранные за их специфическую способность связываться с биологической молекулой, молекулярным комплексом или другой представляющей интерес мишенью.

Используемый в данном документе термин «специфично связывается» или «специфичный к» относится к ассоциации или объединению связывающего белка (*например*, рецептора TCR) или связывающего домена (или его конденсированного белка) с молекулой-мишенью с аффинностью или K_a (*m. e.* константа равновесной ассоциации конкретного связывающего взаимодействия с единицами 1/M), равной или превышающей 10^5 M^{-1} (что равно отношению скорости ассоциации [k_{on}] к скорости диссоциации [k_{off}] для данной реакции ассоциации), и при этом незначительно ассоциируется или объединяется с любыми другими молекулами или компонентами в образце. Связывающие белки или связывающие домены (или их конденсированные белки) могут быть классифицированы как высокоаффинные связывающие белки или связывающие домены (или их конденсированные белки) или низкоаффинные связывающие белки или

связывающие домены (или их конденсированные белки). «Высокоаффинные» связывающие белки или связывающие домены относятся к связывающим белкам или связывающим доменам, которые имеют 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, которые имеют K_a до $10^7 M^{-1}$, до $10^6 M^{-1}$, до $10^5 M^{-1}$. Альтернативно, аффинность может быть определена как равновесная константа диссоциации (K_d) конкретного связывающего взаимодействия с единицами M (например, от $10^{-5} M$ до $10^{-13} M$).

В некоторых вариантах осуществления рецептор или связывающий домен могут иметь «повышенную аффинность», что относится к выбранным или сконструированным рецепторам или связывающим доменам с более сильным связыванием с антигеном-мишенью по сравнению со связывающим доменом дикого типа (или родительским). Например, повышенная аффинность может быть обусловлена тем, что K_a (константа равновесной ассоциации) целевого антигена выше, чем у домена связывания дикого типа, тем, что K_d (константа диссоциации) целевого антигена меньше, чем у связывающего домена дикого типа, тем, что скорость диссоциации (k_{off}) целевого антигена меньше, чем у связывающего домена дикого типа, или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления TCR с повышенной аффинностью могут быть оптимизированы по кодонам для усиления экспрессии в конкретной клетке-хозяине, такой как Т-клетка (Scholten *et al.*, *Clin. Immunol.* 119:135, 2006).

Известно множество анализов для идентификации связывающих доменов по настоящему изобретению, которые специфично связывают конкретную мишень, а также для определения аффинности связывающего домена или конденсированного белка, таких как вестерн-блот, ИФА, 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 №№ 5,283,173, 5,468,614, или их эквиваленты).

Термин «специфичный к MAGE-A1 связывающий белок» относится к белку или полипептиду, который специфично связывается с MAGE-A1 или его пептидом или фрагментом. В некоторых вариантах осуществления специфичный к MAGE-A1 связывающий белок или полипептид связывается с MAGE-A1 или его пептидом, таким как пептид MAGE-A1, образующий комплекс с молекулой ГКГС или HLA, например, на поверхности клетки, с по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно определенной аффинностью. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок, специфичный к MAGE-A1, связывает комплекс пептид, полученный из MAGE-A1: HLA (или комплекс пептид, полученный из MAGE-A1: ГКГС), с K_d менее приблизительно $10^{-8} M$, менее чем приблизительно $10^{-9} M$, менее чем приблизительно $10^{-10} M$, менее чем приблизительно $10^{-11} M$, менее чем приблизительно $10^{-12} M$, или менее чем приблизительно $10^{-13} M$, или с аффинностью, приблизительно такой же или по меньшей мере приблизительно такой же, или превышающей, или приблизительно равной аффинности, демонстрируемой примерным специфичным к MAGE-A1 связывающим белком, представленным в настоящем документе, таким как любой из специфичных к MAGE-A1 TCR, представленных в настоящем документе, например, по данным измерения в ходе того же анализа. В некоторых вариантах осуществления специфичный к MAGE-A1 связывающий белок содержит специфичный к MAGE-A1 связывающий белок суперсемейства иммуноглобулинов или его связывающую часть.

Анализы для оценки аффинности или кажущейся аффинности или относительной аффинности включают, например, измерение кажущейся аффинности для TCR (или для связывающего белка,

содержащего связывающий домен, полученный из TCR) путем оценки связывания с различными концентрациями тетрамеров, например, с помощью проточной цитометрии с использованием меченых тетрамеров. В некоторых примерах кажущийся K_D TCR измеряется с использованием 2-кратных разведений меченых тетрамеров в диапазоне концентраций с последующим определением кривых связывания с помощью нелинейной регрессии, при этом кажущийся K_D определяется как концентрация лиганда, которая дала полумаксимальное связывание.

Термин «связывающий домен MAGE-A1» или «связывающий фрагмент MAGE-A1» относится к домену или части специфичного к MAGE-A1 связывающего белка, ответственного за специфичное связывание MAGE-A1. Специфичный к MAGE-A1 связывающий домен сам по себе (*m.e.*, без какой-либо другой части специфичного к MAGE-A1 связывающего белка) может быть растворимым и может связываться с MAGE-A1 с K_d менее чем приблизительно 10^{-8} М, менее чем приблизительно 10^{-9} М, менее чем приблизительно 10^{-10} М, менее чем приблизительно 10^{-11} М, менее чем приблизительно 10^{-12} М или менее чем приблизительно 10^{-13} М. Типичные специфичные к MAGE-A1 связывающие домены включают специфичный к MAGE-A1 scTCR (*например*, одноцепочечный $\alpha\beta$ TCR белки, такие как $V\alpha$ -LV β , V β -L-V α , $V\alpha$ -C α -L-V α или $V\alpha$ -L-V β -C β , где V α и V β представляют собой переменные домены TCR α и β соответственно, C α и C β представляют собой константные домены TCR α и β соответственно, и L представляет собой линкер) и фрагменты scFv в соответствии с описанным в данном документе, которые могут быть получены из анти-- MAGE-A1 TCR или антитела.

Принципы процессинга антигена антигенпрезентирующими клетками (APC) (такими как дендритные клетки, макрофаги, лимфоциты или клетки других типов) и презентации антигена APC T-клеткам, включая ограниченную презентацию только главному комплексу гистосовместимости (ГКГС) между иммуносовместимыми (*например*, разделяющими по крайней мере одну аллельную форму гена ГКГС, имеющую отношение к презентации антигена) APC и T-клетками хорошо известны (см., например, Murphy, Janeway's Immunobiology (8th Ed.) 2011 Garland Science, NY; chapters 6, 9 and 16). Например, процессированные антигенные пептиды, происходящие из цитозоля (*например*, опухолевый антиген, внутриклеточный патоген), обычно имеют длину от приблизительно 7 аминокислот до приблизительно 11 аминокислот и будут ассоциироваться с молекулами ГКГС класса I, тогда как пептиды, процессированные в везикулярной системе (*например*, бактериальные, вирусные) будут варьироваться по длине от приблизительно 10 до приблизительно 25 аминокислот и ассоциироваться с молекулами ГКГС класса II.

«Антиген MAGE-A1» или «пептидный антиген MAGE-A1» относятся к естественно или синтетически полученной части белка MAGE-A1, имеющей длину от приблизительно 7 аминокислот до приблизительно 15 аминокислот, которая может образовывать комплекс с молекулой ГКГС (*например*, HLA), и такой комплекс может связываться с TCR, специфичным к комплексу пептид MAGE-A1:ГКГС (*например*, HLA).

«Линкер» относится к аминокислотной последовательности, которая связывает два белка, полипептида, пептида, домена, области или мотива и может обеспечивать функцию спейсера, совместимую с взаимодействием двух субсвязывающих доменов таким образом, 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.

«Соединительные аминокислоты» или «соединительные аминокислотные остатки» относятся к одному или нескольким (*например*, приблизительно 2–10) аминокислотным остаткам между двумя соседними мотивами, областями или доменами полипептида, например, между связывающим доменом и соседним константным доменом или между цепью TCR и соседним саморасщепляющимся пептидом. Соединительные аминокислоты могут быть получены в результате конструктивных особенностей конденсированного белка (*например*, аминокислотные остатки, полученные в результате использования сайта рестрикционного фермента при конструировании молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей конденсированный белок).

«Измененный домен» или «измененный белок» относится к мотиву, области, домену, пептиду, полипептиду или белку с неидентичной последовательностью, идентичной мотиву, области, домену, пептиду, полипептиду или белку дикого типа (*например*, цепь TCR α дикого типа, цепь TCR β , константный домен TCR α , константный домен TCR β) по меньшей мере на 85% (*например*, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%).

Используемый в данном документе термин «нуклеиновая кислота» или «молекула нуклеиновой кислоты» или «полинуклеотид» относится к любой из дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), рибонуклеиновой кислоты (РНК), олигонуклеотидов, фрагментов, полученных, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), или путем трансляции *in vitro* и фрагментов, генерируемых при лигировании, расщеплении, действии эндонуклеазы или действии экзонуклеазы. В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению получают с помощью ПЦР. Нуклеиновые кислоты 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 иметь модификации или замену сахарных фрагментов или пиримидиновых или пуриновых оснований. Момеры нуклеиновых кислот могут быть связаны фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфоранилидат, фосфорамидат и тому подобные. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными.

Термин «выделенный» означает, что материал извлечен из первоначальной среды (*например*, из естественной среды, если он встречается в природе). Например, встречающаяся в природе нуклеиновая кислота или полипептид, присутствующие в живом животном, не изолированы, но та же самая нуклеиновая кислота или полипептид, отделенные от некоторых или всех сосуществующих материалов в природной системе, являются изолированными. Такая нуклеиновая кислота может быть частью вектора, и/или такая нуклеиновая кислота или полипептид могут быть частью композиции (*например*, клеточного лизата) и при этом быть выделенными, так как такой вектор или композиция не является частью естественной среды для нуклеиновой кислоты или полипептида. Термин «ген» означает сегмент ДНК, участвующий в продуцировании полипептидной цепи; он включает области, предшествующие и следующие за областью кодирования «лидер и трейлер», а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными сегментами кодирования (экзонами).

Используемые в данном документе термины «модифицированный», «сконструированный» или «рекомбинантный» относятся к клетке, микроорганизму, молекуле нуклеиновой кислоты или вектору,

которые были генетически сконструированы при вмешательстве человека, т. е., модифицированы путем введения экзогенной или гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, или относятся к клетке или микроорганизму, которые были изменены таким образом, что экспрессия эндогенной молекулы нуклеиновой кислоты или гена является контролируемой, нерегулируемой или конститутивной. Генерируемые человеком генетические изменения могут включать, например, модификации, приводящие к получению молекул нуклеиновой кислоты (которая может включать элемент контроля экспрессии, такой как промотор), которые кодируют один или несколько белков или ферментов, или другие добавления, делеции, замены молекул нуклеиновой кислоты, или другое функциональное нарушение генетического материала клетки или его добавление к нему. Типичные модификации включают модификации в кодирующих областях или их функциональных фрагментах гетерологичных или гомологичных полипептидов из эталонной или исходной молекулы.

Используемый в данном документе термин «мутация» относится к изменению последовательности молекулы нуклеиновой кислоты или молекулы полипептида по сравнению с эталонной молекулой или молекулой нуклеиновой кислоты дикого типа или молекулой полипептида дикого типа, соответственно. Мутация может приводить к нескольким различным типам изменения последовательности, включая замену, вставку или делецию нуклеотидов или 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» в данной области техники известна как замена одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей сходные свойства. Примерные консервативные замены описаны, например, в: WO 97/09433 на странице 10; Lehninger, *Biochemistry*, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc. NY, NY, pp.71-77, 1975; and Lewin, *Genes IV*, Oxford University Press, NY and Cell Press, Cambridge, MA, p. 8, 1990. Консервативные замены аминокислот могут происходить естественным путем или могут быть введены при рекомбинантном образовании связывающего белка или TCR. Аминокислотные замены, делеции и добавления могут быть введены в белок с использованием методов мутагенеза, известных в данной области (см., например, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001). Процедуры олигонуклеотид-направленного сайт-специфического (или сегмент-специфического) мутагенеза могут быть использованы для получения измененного полинуклеотида, который имеет конкретные кодоны, измененные в соответствии с желаемой заменой, делецией или вставкой. Альтернативно, методики случайного или насыщенного мутагенеза, такие как мутагенез с аланиновым сканированием, мутагенез с цепной реакцией пониженной точности и олигонуклеотид-направленный мутагенез, могут быть использованы для получения вариантов полипептида иммуногена (см., например, Sambrook *et al.*, *supra*).

Термин «конструкция» относится к любому полинуклеотиду, который содержит рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты. Конструкция может присутствовать в векторе (например, в бактериальном векторе, вирусном векторе) или может быть интегрирована в геном.

«Вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая способна транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Векторы могут быть, например, плазмидами, космидами, вирусами, вектором РНК или молекулой линейной или кольцевой ДНК или РНК, которая может включать в себя молекулы хромосомной, нехромосомной, полусинтетической или синтетической нуклеиновой кислоты. Типичными векторами являются векторы, способные к автономной репликации (эписомальный вектор) или экспрессии молекул нуклеиновой кислоты, с которыми они связаны (векторы экспрессии).

Термин «функционально связанный» или «функциональным образом связанный» относится к ассоциации двух или более молекул нуклеиновой кислоты на одной молекуле или фрагменте нуклеиновой кислоты таким образом, что на функцию одной влияет другая. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, когда он способен влиять на экспрессию такой кодирующей последовательности (*m. e.*, кодирующая последовательность регулируется промотором на транскрипционном уровне). «Несвязанный» означает, что связанные генетические элементы не тесно связаны друг с другом, и функция одного не влияет на другой.

Используемый в данном документе термин «вектор экспрессии» относится к конструкции ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, которая функционально связана с подходящей контрольной последовательностью, способной влиять на экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине. Такие контрольные последовательности включают в себя промотор для осуществления транскрипции, необязательную функциональную последовательность контроля такой транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие сайты связывания мРНК рибосомы, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу, вирус или просто потенциальную геномную вставку. После трансформации в подходящего хозяина вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина или может, в некоторых случаях, интегрироваться в сам геном. В настоящем описании «плазида», «экспрессионная плазида», «вирус» и «вектор» часто используются взаимозаменяемо.

Используемый в данном документе термин «экспрессия» относится к процессу, с помощью которого получают полипептид на основе кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, такой как ген. Процесс может включать транскрипцию, посттранскрипционный контроль, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционный контроль, посттрансляционную модификацию или любую их комбинацию.

Термин «введенный» в контексте введения молекулы нуклеиновой кислоты в клетку означает «трансфекцию», или «трансформацию», или «трансдукцию» и включает ссылку на включение молекулы нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, где молекула нуклеиновой кислоты может быть включена в геном клетки (*например*, хромосома, плазида, плазмидная или митохондриальная ДНК), преобразована в автономный репликон или временно экспрессирована (*например*, трансфицированная мРНК).

Используемый в данном документе термин «гетерологичная» или «экзогенная» молекула, конструкция или последовательность нуклеиновой кислоты относится к полинуклеотиду или части полинуклеотида, которые не являются нативными для клетки-хозяина, но могут быть гомологичны полинуклеотиду или части полинуклеотида клетки-хозяина. Источник гетерологичного или экзогенного полинуклеотида, конструкции или последовательности может быть из другого рода или вида. В некоторых вариантах осуществления в клетку-хозяина или геном-хозяина добавляется гетерологичный или экзогенный полинуклеотид (*m. e.*, не эндогенный или нативный), например, путем конъюгации, трансформации, трансфекции, электропорации или тому подобного, где 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 в нескольких копиях. Кроме того, «гетерологичный» относится к ненативному ферменту, белку или другой активности, кодируемой экзогенным полинуклеотидом, введенным в клетку-хозяина, даже если клетка-хозяин кодирует гомологичный белок или активность.

Как описано в данном документе, в клетку-хозяина может быть введено более одной гетерологичной или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты в виде отдельных полинуклеотидов, в виде множества индивидуально контролируемых генов, в виде полисистронного полинуклеотида, в виде одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок слияния, или любая их комбинация. Например, в соответствии с описанным в данном документе, клетка-хозяин может быть модифицирована для экспрессии двух или более гетерологичных или экзогенных полинуклеотидов, кодирующих желаемый TCR, специфичный для пептида антигена MAGE-A1 (*например*, TCR α и TCR β). Когда две или более экзогенных молекул нуклеиновой кислоты вводятся в клетку-хозяина, понятно, что две или более экзогенных молекул нуклеиновой кислоты могут быть введены в виде одного полинуклеотида (*например*, на одном векторе), на отдельных векторах, интегрированных в хромосома хозяина на одном сайте или нескольких сайтах, или любая их комбинация. Число упоминаемых гетерологичных молекул нуклеиновой кислоты или активности белка относится к числу кодирующих молекул нуклеиновой кислоты или числу активностей белка, а не к числу отдельных полинуклеотидов, введенных в клетку-хозяина.

Используемый в данном документе термин «эндогенный» или «нативный» относится к гену, белку или активности, которая обычно присутствует в клетке-хозяине. Кроме того, ген, белок или активность, которые мутированы, сверхэкспрессированы, перемешаны, дублированы или иным образом изменены по сравнению с родительским геном, белком или активностью, все еще считаются эндогенными или нативными для данной конкретной клетки-хозяина. Например, эндогенная контрольная последовательность из первого гена (*например*, промотор, последовательности трансляционного затухания) может быть использована для изменения или регуляции экспрессии второго нативного гена или молекулы нуклеиновой кислоты, где 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, обнаруженной или полученной из клетки-, вида- или штамма-хозяина. Например, гетерологичная или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты может быть гомологичной нативному гену клетки-хозяина и может необязательно иметь измененный уровень экспрессии, другую последовательность, измененную активность или любую их комбинацию.

«Идентичность последовательности» в контексте настоящего описания относится к процентному содержанию в одной последовательности аминокислотных остатков, идентичных аминокислотным остаткам другой эталонной полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения пропусков, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и не рассматривая какие-либо консервативные замены как часть идентичности последовательности. Значения идентичности процентной последовательности могут быть получены с использованием 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 параметрами, установленными как значения по умолчанию.

Используемый в данном документе термин «гематопозитическая клетка-предшественник» представляет собой клетку, которая может быть получена из гемопоэтических стволовых клеток или ткани плода и способна к дальнейшей дифференцировке в зрелые типы клеток (*например*, клетки иммунной системы). Типичные гематопозитические клетки-предшественники включают клетки с фенотипом CD24^{Lo} Lin⁻ CD117⁺ или клетки, обнаруживаемые в тимусе (называемые тимоцитами-предшественниками).

Используемый в данном документе термин «хозяин» относится к клетке (*например*, Т-клетке) или микроорганизму, выбранному для генетической модификации гетерологичной или экзогенной молекулой нуклеиновой кислоты для получения представляющего интерес полипептида (*например*, анти-MAGE-A1 TCR с высокой или повышенной аффинностью). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может необязательно уже обладать другими генетическими модификациями или быть модифицированной 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 усеченный эндогенный TCR, повышенная экспрессия костимуляторного фактора). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой гематопозитическую клетку-предшественника человека, трансдуцированную молекулой гетерологичной или экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей цепь TCR α , специфичную к пептиду антигена MAGE-A1.

Используемый в данном документе термин «гиперпролиферативное расстройство» относится к чрезмерному росту или пролиферации по сравнению с нормальной или здоровой клеткой. Типичные гиперпролиферативные расстройства включают опухоли, рак, ткани новообразований, карциному, саркому, злокачественные клетки, предшественники злокачественных клеток, а также неопухолевые или не злокачественные гиперпролиферативные нарушения (*например*, аденома, фиброма, липома, лейомиома, гемангиома, фиброз, рестеноз, а также аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, остеоартрит, псориаз, воспалительные заболевания кишечника или т. п.).

Связывающие белки, специфичные к пептидам антигена MAGE-A1

В определенных аспектах настоящее раскрытие относится к модифицированной клетке, содержащей гетерологичный полинуклеотид, который кодирует связывающий белок (*например*, TCR, одноцепочечный TCR (scTCR) или CAR), который специфично связывается с MAGE-A1 или пептидным антигеном MAGE-A1, таким как пептид MAGE-A1 в комплексе с молекулой HLA.

Для справки, идеальными мишенями для иммунотерапии являются иммуногенные белки с высокой экспрессией в злокачественных тканях и с ограниченной или отсутствующей экспрессией в нормальных тканях. Уникальная группа белков, известная как раково-тестикулярные антигены (СТА), была идентифицирована в качестве перспективных иммунотерапевтических мишеней из-за их экспрессии в различных злокачественных тканях, но низкого уровня экспрессии в здоровой ткани взрослого человека, за исключением половых клеток яичка (Ademuyiwa *et al.* *PLoS One*, 7(6):e38783 (2012); Badovinac Crnjevic *et al.*, *Med Oncol.*, 29(3):1586-91 (2012); Curigliano, G. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 22(1):98-103 (2011). Кроме того, СТА особенно выражены в поражениях более высокого уровня и агрессивных злокачественных новообразованиях и связаны с более плохими клиническими исходами (Barrow *et al.*, *Clin Cancer Res.*, 12(3 Pt 1):764-71 (2006); Gure, *et al.* *Clin Cancer Res.*, 11(22):8055-62 (2005); Velazquez *et al.*, *Cancer Immun.*, 7: 11 (2007)). Белки семейства MAGE представляют собой СТА, которые широко экспрессируются во многих типах опухолей, таких как меланома, легкие, яичники, множественная миелома, а также ТНPMЖ. Simpson, A.J., *et al.*, Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 2005. 5(8):615-25; Weon, J.L. and P.R. Potts, *Curr Opin Cell Biol*, 2015. 37: 1-8; Park, T.S., *et al.*, *J Immunother*, 2016. 39(1): 1-7; Li, X., S.C. Hughes, and R. Wevrick, *Cancer Genet*, 2015. 208(1-2):25-34; Kerkar, S.P., *et al.*, *J Immunother*, 2016. 39(4):181-7. В частности, MAGE-A1 экспрессируется в 69,1% случаев ТНPMЖ в целом (n = 81) и в 85,7% случаев III степени. Mrklic, I., *et al.*, *Acta Histochem*, 2014. 116(5): 740-6. Кроме того, данные, полученные из клеточных линий меланомы, позволяют предположить, что MAGE-A1 непосредственно управляет появлением опухолей. Wang, D., *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. 473(4): 959-65.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок по настоящему изобретению содержит (а) переменный домен (V_α) α -цепи Т-клеточного рецептора (TCR), имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 26, 32, 38, 44, 50 или 51 и переменный домен (V_β) β -цепи TCR; (б) домен V_β , имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 23, 29, 35, 41 или 47, и домен V_α ; или (с) домен V_α , имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 26, 32, 38, 44, 50 или 51, и домен V_β , имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 23, 29, 35, 41 или 47.

Комплексы пептид-ГКГС, такие как комплексы пептид MAGE-A1:ГКГС распознаются и связываются через домены TCR V_α и TCR V_β . Во время развития лимфоцитов экзоны V_α собираются из различных генных сегментов *variable* и *joining* (V - J), а экзоны V_β собираются из различных генных сегментов *variable*, *diversity* и *joining* (V - D - J). Хромосомный локус TCR α имеет 70–80 генных сегментов *variable* и 61 генный сегмент *joining*. Хромосомный локус TCR β имеет 52 генных сегмента *variable* и два отдельных кластера, каждый из которых содержит один генный сегмент *diversity* вместе с шестью или семью генными сегментами *joining*. Функциональные гены экзонов V_α и V_β генерируются путем рекомбинации генного сегмента *variable* с генным сегментом *joining* для V_α и генного сегмента *variable* с генным сегментом *diversity* и генным сегментом *joining* для V_β .

Каждый из доменов TCR V_α и V_β содержит три гипервариабельные петли, также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые связываются с комплексом пептид-ГКГС. CDR1 и CDR2 кодируются в пределах сегмента переменного гена, тогда как CDR3 кодируется областью, охватывающей сегменты *variable* и *joining* для V_α , или областью, охватывающей сегменты *variable*, *diversity* и *joining* для V_β . Таким образом, если идентичность генного сегмента *variable* V_α или V_β известна (*например*, по известным аллелям TRAV или TRVB), можно определить последовательности их соответствующих CDR1 и CDR2. Кроме того, некоторые из раскрытых в настоящее время переменных областей TCR с высокой аффинностью, специфичных к MAGE-A1 (*например*, идентифицированных с помощью последовательностей CDR3 с высокой аффинностью), кодируются выбранным аллелем TCR α или аллелем TCR β . В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий домен содержит домен V_β , который получен из аллеля TRBV30, аллеля TRBV29 или аллеля TRBV9. В некоторых вариантах осуществления, кодируемый связывающий домен содержит домен V_α , который получен из аллеля TRAV38-1, аллеля TRAV34, аллеля TRAV16 или аллеля TRAV5.

Последовательности переменных доменов TCR могут быть приведены в соответствие с системами нумерации (Международная иммуногенетическая информационная система, International Immunogenetics Information System (IMGT) и Aho), что позволяет аннотировать эквивалентные положения остатков и сравнивать разные молекулы с помощью программного средства нумерации антигенных рецепторов и классификации рецепторов, Antigen receptor Numbering And Receptor Classification (ANARCI) (2016, *Bioinformatics* 15:298-300). Схема нумерации обеспечивает стандартизированное разграничение каркасных областей и CDR в переменных доменах TCR.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит функциональный вариант аминокислотной последовательности по сравнению с контрольной аминокислотной последовательностью, раскрытой в данном описании, в котором закодированы связывающий белок сохраняет характеристики связывания, по сравнению с связывающим белком, содержащим контрольную аминокислотную последовательность. Например, в некоторых вариантах осуществления, кодируемый домен V_α содержит

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90% идентична (например, по меньшей мере приблизительно на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или на 100% идентична) аминокислотной последовательности в соответствии с любым из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15 и 19, и кодируемый домен V_β содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с любым из SEQ ID NO.:1, 5, 9, 13, 17, при условии, что (а) по меньшей мере три или четыре CDR не имеют изменений в последовательности, где CDR, которые действительно имеют изменения последовательности, имеют только до двух аминокислотных замен, только до пяти смежных аминокислотных делеций или их комбинации, и (b) кодируемый связывающий белок остается способным специфично связываться с комплексом пептид MAGE-A1:клеточная поверхность HLA независимо от CD8 или в отсутствие CD8.

В конкретных вариантах осуществления (а) домен V_α содержит (i) аминокислотную последовательность CDR1 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 24, 30, 36, 42 и 48 и/или (ii) аминокислотную последовательность CDR2 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 25, 31, 37, 43 и 49; и/или (b) кодируемый домен V_β содержит (iii) аминокислотную последовательность CDR1 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 21, 27, 33, 39 и 45 и/или (iv) аминокислотную последовательность CDR2 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 22, 28, 34, 40 и 46. В дополнительных вариантах кодируемый связывающий белок содержит: (а) аминокислотные последовательности V_α CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 24–26 соответственно, и аминокислотные последовательности V_β CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 21–23 соответственно; (b) аминокислотные последовательности V_α CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 30–32, соответственно, и аминокислотные последовательности V_β CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 27–29 соответственно; (c) аминокислотные последовательности V_α CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 36–38, соответственно, и аминокислотные последовательности V_β CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 33–35 соответственно; (d) аминокислотные последовательности V_α CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 42–44, соответственно, и аминокислотные последовательности V_β CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 39–41 соответственно; или (e) аминокислотные последовательности V_α CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 48–50, соответственно, и аминокислотные последовательности V_β CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 45–47 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления домен V_α содержит или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO.:3, 7, 11, 15 или 19. В других вариантах осуществления кодируемый домен V_β содержит или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO.:1, 5, 9, 13 или 17.

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок содержит константный домен α-цепи TCR, константный домен β-цепи TCR или оба. В некоторых вариантах осуществления константный домен α-цепи (C_α) TCR имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любого из SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16 или 20. В других вариантах осуществления константный домен β-цепи (C_β) TCR имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14 или 18.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, связывание настоящего изобретения включает в себя домен V_α, домен V_β; домен C_α и домен C_β. В других вариантах осуществления связывающий белок содержит домен V_α, содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:3, домен V_β,

содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:1, домен C α , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:4, и домен C β , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:2. В других вариантах осуществления связывающий белок содержит домен V α , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:7, домен V β , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:5, домен C α , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:8, и C β , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:6. В еще других вариантах осуществления связывающий белок содержит домен V α , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:11, домен V β , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:9, домен C α , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:12 и домен C β , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:10. В других вариантах осуществления связывающий белок содержит домен V α , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:15, домен V β , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.: 13, C α , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.: 16, и домен C β , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:14. В еще других вариантах осуществления связывающий белок содержит домен V α , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.: 19, домен V β , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:17, домен C α , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.:20, и домен C β , содержащий или состоящий из SEQ ID NO.: 18.

В любом из раскрытых здесь вариантов осуществления связывающий белок (*например*, в растворимой форме или экспрессируемый на клеточной поверхности модифицированной клетки по настоящему изобретению) способен связываться с комплексом MAGE-A1:HLA-A*201 (*например*, комплексом KVLEYVIKV (SEQ ID NO.:123):HLA-A*201) на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8.

В некоторых вариантах осуществления любой из вышеупомянутых специфичных к MAGE-A1 связывающих белков представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR), химерный антигенный рецептор или антигенсвязывающий фрагмент TCR, любой из которых может быть химерным, гуманизированным или человеческим. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит одноцепочечный TCR (scTCR) или химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления специфичный к MAGE-A1 связывающий белок представляет собой TCR, необязательно scTCR. Способы получения сконструированных TCR описаны, например, в Bowerman *et al.*, *Mol. Immunol.*, 46(15):3000 (2009), технологии которых включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления специфичный к MAGE-A1 связывающий домен представляет собой CAR, содержащий специфичный к MAGE-A1 связывающий TCR домен (*см.*, *например*, Walseng *et al.*, *Scientific Reports* 7: 10713 (2017), конструкции TCR CAR из которых настоящим включены в качестве ссылки во всей их полноте). Способы изготовления CAR также описаны, например, в патенте США № 6410319; патенте США № 7,446,191; патентной публикации США № 2010/065818; патенте США № 8,822,647; публикации PCT № WO 2014/031687; патенте США № 7514537; и Brentjens *et al.*, 2007, *Clin. Cancer Res.* 13:5426, технологии которых включены в данный документ посредством ссылки.

Способы, применимые для выделения и очистки полученного рекомбинантным способом растворимого TCR, в качестве примера, могут включать получение супернатантов из подходящих систем клеток-хозяев/векторов, которые секретируют рекомбинантный растворимый TCR в культуральную среду, и затем концентрирование среды с использованием коммерчески доступного фильтра. После концентрирования концентрат может быть нанесен на одну подходящую матрицу очистки или на ряд подходящих матриц, таких как аффинная матрица или ионообменная смола. Для дополнительной очистки рекомбинантного полипептида могут быть использованы одна или несколько стадий обращенно-фазовой ВЭЖХ. Эти способы очистки могут также применяться при выделении иммуногена из его естественной среды. Способы крупномасштабного получения одного или нескольких изолированных/рекомбинантных

растворимых TCR, описанных в настоящем документе, включают партию культуры клеток, за которой наблюдают и которую контролируют для поддержания соответствующих условий культивирования. Очистка растворимого TCR может быть проведена в соответствии со способами, описанными в данном документе и известными в данной области техники, которые соответствуют законам и руководящим принципам отечественных и зарубежных регулирующих органов.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающий белок или TCR с высокой аффинностью, специфичные к MAGE-A1, используются для трансфекции/транскрипции клетки-хозяина (*например*, Т-клетки) для применения в адоптивной трансферной терапии. Успехи в секвенировании TCR были описаны (*например*, Robins *et al.*, *Blood* 114: 4099, 2009; Robins *et al.*, *Sci. Translat. Med.* 2:47ra64, 2010; Robins *et al.*, (Sept. 10) *J. Imm. Meth.* Epub ahead of print, 2011; Warren *et al.*, *Genome Res.* 21:790, 2011) и может использоваться в ходе практического осуществления вариантов осуществления согласно настоящему раскрытию. Подобным образом были описаны способы трансфекции/транскрипции Т-клеток желаемыми нуклеиновыми кислотами (*например*, публикация заявки на патент США № US 2004/0087025), которые имеют процедуры адоптивного переноса с использованием Т-клеток желаемой антигенспецифичности (*например*, Schmitt *et al.*, *Hum. Gen.* 20:1240, 2009; Dosssett *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), так что предполагается адаптация данных методологий к раскрытым в настоящее время вариантам осуществления на основе представленных здесь идей, включая те, которые направлены на TCR с высокой аффинностью, специфичные к пептидным антигенам MAGE-A1, находящимся в комплексе с рецептором HLA.

Специфичные к MAGE-A1 связывающие белки или домены, как описано в настоящем документе, могут быть функционально охарактеризованы в соответствии с любой из большого числа принятых методологий в данной области для анализа активности Т-клеток, включая определение связывания, активации или индукции Т-клеток, а также включая определение ответов Т-клеток, являющихся антигенспецифичными. Примеры включают определение пролиферации Т-клеток, высвобождения цитокинов Т-клетками, антигенспецифической стимуляции Т-клеток, ограниченной ГКГС стимуляции Т-клеток, активности ЦТЛ (*например*, путем обнаружения высвобождения ⁵¹Cr из предварительно нагруженных клеток-мишеней), изменения в экспрессии фенотипических маркеров Т-клетками и других показателей функций Т-клеток. Процедуры для выполнения этих и подобных анализов можно найти, *например*, в (*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 процитированные там ссылки.

«Окрашивание ГКГС-пептид тетрамерами» относится к анализу, используемому для обнаружения антиген-специфичных Т-клеток, который включает тетрамер молекул ГКГС, каждый из которых содержит идентичный пептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая является когнатной (*например*, идентичной или связанной с) по меньшей мере одному антигену (*например*, MAGE-A1), где комплекс способен связывать Т-клеточные рецепторы, специфичные к распознанному антигену. Каждая из молекул ГКГС может быть мечена молекулой биотина. Бiotинилированные ГКГС/пептиды тетрамеризуются путем добавления стрептавидина, который может быть флуоресцентно меченным. Тетрамер может быть обнаружен с помощью проточной цитометрии посредством флуоресцентной метки. В

некоторых вариантах осуществления анализ с использованием ГКГС-пептид тетрамеров используется для обнаружения или отбора TCR с повышенной аффинностью согласно настоящему изобретению.

Уровни цитокинов могут быть определены в соответствии со способами, описанными в данном документе и применяемыми в данной области, включая, например, ИФА, метод иммуноферментных пятен, внутриклеточное окрашивание цитокинов и проточную цитометрию и их комбинации (*например*, внутриклеточное окрашивание цитокинов и проточную цитометрию). Пролиферацию и размножение иммунных клеток в результате антигенспецифической индукции или стимуляции иммунного ответа можно определить путем выделения лимфоцитов, таких как циркулирующие лимфоциты в образцах клеток периферической крови или клетки из лимфатических узлов, стимуляции клеток антигеном и измерения производства цитокинов, пролиферации клеток и/или жизнеспособности клеток, например, путем включения тритированного тимидина или нерадиоактивных анализов, таких как МТТ-анализы и тому подобное. Описанное в данном документе влияние иммуногена на баланс между иммунным ответом Th1 и иммунным ответом Th2 можно исследовать, например, путем определения уровней цитокинов Th1, таких как IFN- γ , IL-12, IL-2 и TNF- β и цитокинов типа 2, такие как IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 и IL-13.

Полинуклеотиды и векторы

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются выделенные или рекомбинантные полинуклеотиды, где полинуклеотид кодирует связывающий белок по настоящему изобретению (*например*, связывающий белок суперсемейства иммуноглобулинов, такой как TCR, scTCR или CAR), специфичный к 5T4, и где полинуклеотид представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке-хозяине (*например*, в иммунной клетке по настоящему изобретению). Также предоставлены векторы (*например*, векторы экспрессии), которые содержат полинуклеотид по настоящему изобретению, где полинуклеотид функционально соединен или функционально связан с регулирующей экспрессию последовательностью (*например*, промотором). Конструирование вектора экспрессии для продуцирования связывающего белка, специфичного к пептиду MAGE-A1 по настоящему изобретению, может быть осуществлено с использованием расщепления рестрикционной эндонуклеазой, лигирования, трансформации, очистки плазмиды, секвенирования ДНК или их комбинации, как описано, например, в Sambrook *et al.* (1989 and 2001 editions; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) and Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, 2003). Для эффективной транскрипции и трансляции полинуклеотид, содержащийся в экспрессионной конструкции, включает по меньшей мере одну подходящую регулируемую экспрессию последовательность (также называемую регуляторной последовательностью), такую как лидерная последовательность и, в частности, промотор, функционально (*т. е.*, функциональным образом) связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей связывающий белок по данному раскрытию.

Нуклеиновая кислота может представлять собой одноцепочечную или двухцепочечную ДНК, кДНК или РНК в любой форме и может включать в себя положительную и отрицательную цепи нуклеиновой кислоты, которые дополняют друг друга, включая антисмысловые ДНК, кДНК и РНК. Также включены миРНК, микроРНК, гибриды РНК–ДНК, рибозимы и другие различные встречающиеся в природе или синтетические формы ДНК или РНК.

Изолированные или рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающий белок (*например*, связывающий белок суперсемейства иммуноглобулина) или рекомбинантный Т-клеточный рецептор с высокой аффинностью (TCR), специфичный к MAGE-A1, как описано в настоящем документе,

могут быть получены и изготовлены в соответствии с различными способами и методами области молекулярной биологии очистки полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления предоставляется выделенный полинуклеотид, который кодирует связывающий белок, имеющий домен $V\alpha$ TCR и домен $V\beta$ TCR, где кодируемый связывающий белок способен специфично связываться с комплексом пептид MAGE-A1:HLA на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8, выделенный полинуклеотид содержит: (a) $V\alpha$ CDR3-кодирующий полинуклеотид в соответствии с SEQ ID NO: 97, 103, 109, 115 или 121 и $V\beta$ -кодирующий полинуклеотид; (b) $V\beta$ CDR3-кодирующий полинуклеотид в соответствии с SEQ ID NO: 94, 100, 106, 112 или 118 и $V\alpha$ -кодирующий полинуклеотид; или (c) $V\alpha$ CDR3-кодирующий полинуклеотид в соответствии с SEQ ID NO: 97, 103, 109, 115 или 121 и $V\beta$ CDR3-кодирующий полинуклеотид в соответствии с SEQ ID NO: 94, 100, 106, 112 или 118. В других вариантах осуществления $V\beta$ -кодирующий полинуклеотид получен из аллеля TRBV30, аллеля TRBV29 или аллеля TRBV9. В некоторых вариантах осуществления $V\alpha$ -кодирующий полинуклеотид получен из аллеля TRAV38-1, аллеля TRAV34, аллеля TRAV16 или аллеля TRAV5.

Раскрытые в настоящее время полинуклеотиды, кодирующие связывающие белки, в некоторых вариантах осуществления могут включать: (a) полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 97, и полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 94; (b) полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 103 и полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 100; (c) полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 109, и полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 106; (d) полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 115 и полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 112; или (e) полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 121 и полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 118. В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, дополнительно содержит (a) полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 95, 101, 107, 113 или 119; (b) полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 96, 102, 108, 114 или 120; (c) полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 92, 98, 104, 110 или 116; и/или (d) полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 93, 99, 105, 111 или 117.

В конкретных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок по настоящему изобретению, содержит (a) полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 95, полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 96, полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 97, полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 92, полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 93, и полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 94; (b) полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 101, полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 102, полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 103, полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 98, полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 99, и полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 100; (c) полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 107, полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 108, полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 109, полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 104, полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 105, и полинуклеотид, кодирующий $V\beta$ CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 106; (d) полинуклеотид, кодирующий $V\alpha$ CDR1 согласно SEQ ID NO: 113,

полинуклеотид, кодирующий V α CDR2 согласно SEQ ID NO: 114, полинуклеотид, кодирующий V α CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 115, полинуклеотид, кодирующий V β CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 110, полинуклеотид, кодирующий V β CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 111 и полинуклеотид, кодирующий V β CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 112; или (е) полинуклеотид, кодирующий V α CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 119, полинуклеотид, кодирующий V α CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 120, полинуклеотид, кодирующий V α CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 121, полинуклеотид, кодирующий V β CDR1 в соответствии с SEQ ID NO: 116, полинуклеотид, кодирующий V β CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 117 и полинуклеотид, кодирующий V β CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 118.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему связывающий белок, где полинуклеотид, кодирующий V α , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности (*например*, по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или 100% идентичности) с SEQ ID NO: 58, 66, 74, 82 или 90, и полинуклеотид, кодирующий V β , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 56, 64, 72, 80 или 88. В дополнительных вариантах осуществления: (а) V α -кодирующий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 58, и V β -кодирующий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 56; (b) V α -кодирующий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 66, и V β -кодирующий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 64; (c) V α -кодирующий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 74, и V β -кодирующий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 72; (d) V α -кодирующий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 82, и V β -кодирующий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 80; или (е) V α -кодирующий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 90, и V β -кодирующий полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 88.

В конкретных вариантах осуществления (а) V α -кодирующий полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 58, а V β -кодирующий полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 56; (b) V α -кодирующий полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 66, а V β -кодирующий полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 64; (c) V α -кодирующий полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 74, и V β -кодирующий полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 72; (d) V α -кодирующий полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 82, а V β -кодирующий полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 80; или (е) V α -кодирующий полинуклеотид содержит или

состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 90, а V β -кодирующий полинуклеотид содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 88.

Полинуклеотиды, кодирующие связывающий белок по настоящему изобретению, могут, в определенных вариантах осуществления, дополнительно включать полинуклеотид, который кодирует константный домен α -цепи TCR, полинуклеотид, который кодирует константный домен β -цепи TCR, или оба. В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок по настоящему изобретению, дополнительно содержит: (a) полинуклеотид, кодирующий домен C α , имеющий по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 59, 67, 75, 83 или 91; и/или (b) полинуклеотид, кодирующий домен C β , имеющий по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 57, 65, 73, 81 или 89. В дополнительных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий домен C α , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 59, 67, 75, 83 или 91, и полинуклеотид, кодирующий домен C β , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 57, 65, 73, 81 или 89.

В конкретных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок по настоящему изобретению, содержит: (a) полинуклеотид, кодирующий V α в соответствии с SEQ ID NO:58, полинуклеотид, кодирующий V β в соответствии с SEQ ID NO:56, полинуклеотид, кодирующий домен C α в соответствии с SEQ ID NO:59, и полинуклеотид, кодирующий домен C β в соответствии с SEQ ID NO:57; (b) полинуклеотид, кодирующий V α в соответствии с SEQ ID NO:66, полинуклеотид, кодирующий V β в соответствии с SEQ ID NO:64, полинуклеотид, кодирующий домен C α в соответствии с SEQ ID NO:67, и полинуклеотид, кодирующий домен C β в соответствии с SEQ ID NO:65; (c) полинуклеотид, кодирующий V α в соответствии с SEQ ID NO:74, полинуклеотид, кодирующий V β в соответствии с SEQ ID NO:72, полинуклеотид, кодирующий домен C α в соответствии с SEQ ID NO:75, и полинуклеотид, кодирующий домен C β в соответствии с SEQ ID NO:73; (d) полинуклеотид, кодирующий V α в соответствии с SEQ ID NO:82, полинуклеотид, кодирующий V β в соответствии с SEQ ID NO:80, полинуклеотид, кодирующий домен C α в соответствии с SEQ ID NO:83, и полинуклеотид, кодирующий домен C β в соответствии с SEQ ID NO:81; или (e) полинуклеотид, кодирующий V α в соответствии с SEQ ID NO:90, полинуклеотид, кодирующий V β в соответствии с SEQ ID NO:88, полинуклеотид, кодирующий домен C α в соответствии с SEQ ID NO:91, и полинуклеотид, кодирующий домен C β в соответствии с SEQ ID NO:89.

В дополнительных вариантах осуществления два или более заместителя генных продуктов связывающего белка по настоящему изобретению экспрессируются в виде одного пептида с частями, разделенными расщепляемым или удаляемым сегментом. Например, в данной области известны саморасщепляющиеся пептиды, полезные для экспрессии разделимых полипептидов, кодируемых одним полинуклеотидом или вектором, и они включают, например, пептид свиного тешовируса-1 2A (P2A), такой как пептид, кодируемый полинуклеотидом, с нуклеотидной последовательностью, показанной в любом из SEQ ID NO: 128 или 129, пептид вируса *Thossea asigna* 2A (T2A), такой как пептид, кодируемый полинуклеотидом, с нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 132, пептид вируса лошадиного ринита A (ERAV) 2A (E2A), такой как пептид, кодируемый полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 131, и пептид вируса ящура 2A (F2A), такой как пептид, кодируемый полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 130.

Соответственно, в определенных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок по настоящему изобретению, дополнительно содержит полинуклеотид,

кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом, кодирующим α -цепь TCR и полинуклеотидом, кодирующим β -цепь TCR, или расположенный между полинуклеотидом, кодирующим домен V β TCR, и полинуклеотидом, кодирующим V α TCR, или расположенный между полинуклеотидом, кодирующим переменный домен TCR, и полинуклеотидом, кодирующим константный домен TCR, или любой их комбинацией. В конкретных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с любым из SEQ ID NO: 128–132. В дополнительных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует саморасщепляющийся пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с любым из SEQ ID NO: 124–127.

Здесь также представлены векторы, содержащие полинуклеотиды по настоящему изобретению. Конструирование экспрессирующего вектора, который используется для рекомбинантного получения связывающего белка или высокоаффинного сконструированного TCR, специфичного к представляющему интерес пептиду MAGE-A1, может быть осуществлено с использованием любых подходящих методов конструирования в рамках молекулярной биологии, включая использование расщепления рестрикционной эндонуклеазой, лигирование, трансформацию, очистку плазмиды и секвенирование ДНК, как описано, например, в Sambrook *et al.* (1989 and 2001 editions; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) and Ausubel *et al.* (*Current Protocols in Molecular Biology*, 2003). Для получения эффективной транскрипции и трансляции, полинуклеотид в каждой рекомбинантной экспрессионной конструкции включает по меньшей мере одну подходящую регулируемую экспрессию последовательность, такую как промотор, функционально (*m.e.*, функциональным образом) связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей связывающий белок. Кроме того, полинуклеотид, кодирующий связывающий белок по настоящему изобретению, также может включать последовательность, кодирующую лидерную последовательность на N-конце связывающего белка (также называемого предварительно связывающим белком), лидерная последовательность которого может быть удалена клеткой для получения зрелого связывающего белка.

Типичный вектор может содержать молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты, с которой она связана, или которая способна 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 или способствовать интеграции полинуклеотидной вставки при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геномом-хозяином (*например*, лентивирусный вектор). Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны (эти векторы могут упоминаться как «векторы экспрессии»). В соответствии со связанными вариантами осуществления также следует понимать, что если один или несколько агентов (*например*, полинуклеотиды, кодирующие связывающие белки или рекомбинантные TCR с высокой аффинностью, специфичные к MAGE-A1, или их варианты, как описано в настоящем документе) вводятся субъекту совместно, каждый агент может находиться в отдельных векторах или в одном же векторе, и множество векторов (каждый из которых содержит различный агент, один и тот же агент) может быть введено в клетку или популяцию клеток или введено субъекту.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий связывающие белки или рекомбинантные TCR с высокой аффинностью, специфичные к MAGE-A1, может быть функционально связан с некоторыми элементами вектора. Например, полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы, могут быть функционально связаны. Регулирующие экспрессию последовательности могут включать соответствующие последовательности инициации, терминации, промотора и энхансера транскрипции; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (*т. е.*, консенсусные последовательности Козак); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, возможно, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Регулирующие экспрессию последовательности могут быть функционально связаны, если они смежны с представляющим интерес геном и регулирующей экспрессию последовательностью действуют в *транс*-позиции или на расстоянии, управляя вызывающим интерес геном. В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие связывающие белки по настоящему изобретению, содержатся в векторе экспрессии, который представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор или γ -ретровирусный вектор.

Вирусные векторы включают ретровирус, аденовирус, парвовирус (*например*, аденоассоциированные вирусы), коронавирусы, РНК-вирусы с отрицательной цепью, такие как ортомиксовирус (*например*, вирус гриппа), рабдовирус (*например*, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (*например*, корь и Сендай), РНК-вирусы с положительной цепью, такие как пикорнавирус и альфа-вирус, и двухцепочечные ДНК-вирусы, включая аденовирус, вирус герпеса (*например*, вирусы простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и поксивирус (*например*, вирусы коровьей оспы, оспы птиц и оспы канареек). Другие вирусы включают, например, вирус Норуолка, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают лейкоз-саркому птиц, вирусы млекопитающих типа С, типа В, вирусы типа D, вирусы группы человеческого Т-клеточного лейкоза и коровьего лейкоза, 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» при использовании в данном документе означает лентивирусные векторы на основе ВИЧ для доставки генов, которые могут быть интегрирующими или неинтегрирующими, иметь относительно большую упаковочную способность и могут трансдуцировать ряд различных типов клеток. Лентивирусные векторы обычно генерируются после временной трансфекции трех (упаковка, оболочка и перенос) или более плазмид в клетки-продуценты. Как и ВИЧ, лентивирусные векторы проникают в клетку-мишень посредством взаимодействия гликопротеинов вирусной поверхности с рецепторами на поверхности клетки. После проникновения вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, которая опосредуется комплексом вирусной обратной транскриптазы. Продукт обратной транскрипции представляет собой двухцепочечную линейную вирусную ДНК, которая является субстратом для вирусной интеграции в ДНК инфицированных клеток.

В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный или сконструированный вектор экспрессии доставляется в соответствующую клетку (*т. е.* способен доставлять полинуклеотид по настоящему изобретению, кодирующий связывающий белок, в клетку-хозяина) для примера, Т-клетку или антигенпрезентирующую клетку, *т. е.* клетку, демонстрирующую комплекс пептид/ГКГС на клеточной

поверхности (*например*, дендритную клетку) и не содержит CD8. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой гематопозитическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека. Например, клетка иммунной системы может представлять собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4-CD8-двойную отрицательную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, естественную клетку-киллер, дендритную клетку или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления, в котором хозяином является Т-клетка, Т-клетка может быть наивной, Т-клеткой центральной памяти, Т-клеткой эффекторной памяти или любой их комбинацией. Поэтому рекомбинантные векторы экспрессии по настоящему изобретению могут также включать, например, специфичные к лимфоидной ткани транскрипционные регуляторные элементы (TRE), такие как В-лимфоциты, Т-лимфоциты или специфичные к дендритным клеткам TRE. Специфичные к лимфоидной ткани TRE известны в данной области (*см.*, *например*, Thompson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 12:1043, 1992); Todd *et al.*, *J. Exp. Med.* 177:1663, 1993); Penix *et al.*, *J. Exp. Med.* 178:1483, 1993).

В дополнение к векторам, некоторые варианты осуществления относятся к клеткам-хозяевам, которые содержат векторы, которые раскрыты в настоящее время. Специалист в данной области легко понимает, что в данной области доступно много подходящих клеток-хозяев. Клетка-хозяин может включать любую отдельную клетку или клеточную культуру, в которую может быть введен вектор или включение нуклеиновых кислот и/или белков, а также любые клетки-потомки. Термин также охватывает потомство клетки-хозяина, генетически или фенотипически одинаковое или разное. Подходящие клетки-хозяева могут зависеть от вектора и могут включать клетки млекопитающих, клетки животных, клетки человека, клетки обезьян, клетки насекомых, клетки дрожжей и бактериальные клетки. Эти клетки могут быть индуцированы для включения вектора или другого материала путем использования вирусного вектора, трансформации посредством осаждения фосфатом кальция, DEAE-декстраном, электропорации, микроинъекции или другими методами. *См.*, например, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Host Cells

Также предоставлены клетки-хозяева (*т.е.*, модифицированные клетки), которые включают гетерологичный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит иммунную клетку человека, такую как, например, Т-клетка, НК-клетка или НК-Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку или обе. Описаны способы трансфекции/трансдукции Т-клеток желаемыми нуклеиновыми кислотами (*например*, публикация заявки на патент США. № US 2004/0087025), в которых применяются процедуры адоптивного переноса с использованием Т-клеток желаемой специфичности к мишени (*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), так что предусматривается адаптация данных методологий к раскрытым в данном документе вариантам осуществления на основе представленных здесь идей.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, где кодируемый связывающий белок содержит: (а) переменный домен (V_{α}) α -цепи Т-клеточного рецептора (TCR), имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 26, 32, 38, 44, 50 или 51 и переменный домен (V_{β}) β -цепи TCR; (б) домен V_{β} , имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии

с любым из SEQ ID NO: 23, 29, 35, 41 или 47, и домен V_{α} ; или (с) домен V_{α} , имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 26, 32, 38, 44, 50 или 51, и домен V_{β} , имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии с любым один из SEQ ID NO: 23, 29, 35, 41 или 47; и где связывающий белок способен специфично связываться с комплексом пептид MAGE-A1:HLA на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8. В некоторых вариантах осуществления кодируемый связывающий белок способен специфично связываться с комплексом KVLEYVIKV (SEQ ID NO.:123):антиген человеческого лейкоцита (HLA) с K_d , меньшим или равным приблизительно 10^{-8} M.

Любой подходящий метод может быть использован для трансфекции или трансдукции клеток, например, Т-клеток, или для введения полинуклеотидов или композиций по настоящим способам. Известные способы доставки полинуклеотидов в клетки-хозяева включают, например, использование катионных полимеров, липидоподобных молекул и определенных коммерческих продуктов, таких как, например, IN-VIVO-JET PEI. Другие способы включают *ex vivo* трансдукцию, инъекцию, электропорацию, DEAE-декстран, обработку ультразвуком, липосом-опосредованную трансфекцию, рецептор-опосредованную трансдукцию, бомбардировку микрочастицами, транспозон-опосредованный перенос и тому подобное. В еще одних дополнительных способах трансфекции или трансдукции клеток-хозяев используются векторы, более подробно описанные в данном документе.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления клетка-хозяин (*например*, иммунная клетка) может представлять собой «универсальную донорскую» клетку, которая модифицирована для уменьшения или устранения экспрессии одного или нескольких эндогенных генов, кодирующих полипептид, вовлеченный в иммунную передачу сигналов или другие подобные активности. Типичные нокауты генов включают кодирующие PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3, молекулу HLA, молекулу TCR или тому подобное. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что некоторые эндогенно экспрессируемые белки иммунных клеток могут быть распознаны как чужеродные аллогенным хозяином, получающим иммунные клетки хозяина, что может привести к уничтожению иммунных клеток хозяина (*например*, аллеля HLA) или может негативно регулировать иммунную активность модифицированной клетки (*например*, PD-1, LAG-3, CTLA4) или может влиять на активность связывания гетерологически экспрессируемого связывающего белка по настоящему изобретению (*например*, эндогенного TCR, который связывает антиген к MAGE-A1 и тем самым интерферирует с модифицированной клеткой, связывающей клетку, экспрессирующую антиген MAGE-A1). Соответственно, уменьшение или устранение экспрессии или активности таких эндогенных генов или белков может улучшить активность, толерантность и устойчивость модифицированных клеток в аллогенном хозяине и позволяет использовать доступные на рынке готовые клетки для введения (*например*, любому реципиенту, независимо от типа HLA).

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин (*например*, модифицированная иммунная клетка) по настоящему изобретению содержит нокаут хромосомного гена одного или нескольких генов, которые кодируют PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3, компонент HLA (*например*, ген, который кодирует макроглобулин $\alpha 1$, макроглобулин $\alpha 2$, макроглобулин $\alpha 3$, микроглобулин $\beta 1$ или микроглобулин $\beta 2$) или компонент TCR (*например*, ген, кодирующий переменную 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); and Torikai *et al.*, *Blood* 122(8):1341 (2013), методики и композиции редактирования генов из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки во всей их полноте). Используемый в данном документе термин «нокаут хромосомного гена» относится к генетическому изменению в модифицированной клетке, которое

предотвращает продуцирование модифицированной клеткой функционально активного эндогенного полипептидного продукта. Изменения, приводящие к нокауту хромосомных генов, могут включать, например, внесенные нонсенс-мутации (включая образование преждевременных стоп-кодона), миссенс-мутации, делецию генов и разрывы цепей, а также гетерологичную экспрессию ингибирующих молекул нуклеиновых кислот, которые ингибируют эндогенную экспрессию генов в модифицированной клетке.

Нокаут хромосомного гена может быть введен путем хромосомного редактирования иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения нокаут хромосомного гена осуществляется путем хромосомного редактирования иммунной клетки. Хромосомное редактирование может быть выполнено с использованием, например, эндонуклеаз. Используемый в данном документе термин «эндонуклеаза» относится к ферменту, способному катализировать расщепление фосфодиэфирной связи в полинуклеотидной цепи. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза способна расщеплять ген-мишень, инактивируя или «нокаутируя» ген-мишень. Эндонуклеаза может быть естественного происхождения, рекомбинантной, генетически модифицированной или гибридной эндонуклеазой. Разрывы цепей нуклеиновых кислот, вызванные эндонуклеазой, обычно восстанавливаются с помощью различных механизмов гомологичной рекомбинации или негомологичного соединения концов (NHEJ). Во время гомологичной рекомбинации молекула донорной нуклеиновой кислоты может быть использована для «нокина» гена для инактивации гена-мишени. NHEJ представляет собой процесс восстановления с внесением ошибок, который часто приводит к изменениям последовательности ДНК на сайте расщепления, *например* замене, делеции или добавлению по меньшей мере одного нуклеотида. NHEJ может быть использовано для «нокаута» целевого гена. Способы разрушения или нокаутирования генов или экспрессии генов в иммунных клетках с использованием эндонуклеаз известны в данной области и описаны, например, в способах, описанных в публикациях PCT №№ WO 2015/066262; WO 2013/074916; и WO 2014/059173; каждый из которых включен в качестве ссылки. Примеры эндонуклеаз включают нуклеазы цинковых пальцев, нуклеазы TALE, нуклеазы CRISPR-Cas и мегануклеазы.

Используемый в данном документе термин «нуклеаза цинкового пальца» (ZFN) относится к конденсированному белку, содержащему ДНК-связывающий домен цинкового пальца, конденсированный с неспецифичным доменом расщепления ДНК, таким как эндонуклеаза FokI. Каждый мотив цинкового пальца из приблизительно 30 аминокислот связывается с приблизительно 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*). Множество мотивов цинковых пальцев могут быть связаны в тандеме для создания специфичности связывания с желаемыми последовательностями ДНК, такими как области, имеющие длину в диапазоне от приблизительно 9 до приблизительно 18 пар оснований. Для справки, ZFN опосредуют редактирование генома, катализируя образование сайт-специфического двухцепочечного разрыва ДНК (DSB) в геноме, и целевая интеграция трансгена, содержащего фланкирующие последовательности, гомологичные геному в сайте DSB, облегчена репарацией, направляемой гомологией. Альтернативно, DSB, генерируемый ZFN, может приводить к нокауту гена-мишени посредством репарации путем негомологичного соединения концов (NHEJ), который является путем клеточного восстановления с внесением ошибок, который приводит к вставке или удалению нуклеотидов на сайте расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения нокаут гена включает вставку, делецию, мутацию или их комбинацию, выполненные с использованием молекулы ZFN.

Используемый в данном документе термин «эффекторная нуклеаза, подобная активатору транскрипции» (TALEN) относится к конденсированному белку, содержащему ДНК-связывающий домен TALE и домен расщепления ДНК, такой как эндонуклеаза FokI. «ДНК-связывающий домен TALE» или «TALE» состоит из одного или нескольких повторяющихся доменов/единиц TALE, каждый из которых обычно имеет высококонсервативную аминокислотную последовательность из 33–35 аминокислот с расходящимися 12^й и 13^й аминокислотами. Повторяющиеся домены TALE участвуют в связывании TALE с целевой последовательностью ДНК. Расходящиеся аминокислотные остатки, называемые парами переменных аминокислотных остатков (RVD), коррелируют с распознаванием специфичных нуклеотидов. Естественный (канонический) код для распознавания ДНК данных TALE определен таким образом, что последовательность HD в положениях 12 и 13 приводит к связыванию с цитозином (C), NG связывается с T, NI с A, NN связывается с G или A и NG связывается с T, а также известны неканонические (нетипичные) RVD (см., например, патентную публикацию США № US 2011/0301073, нетипичные RVD из которой включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). TALEN могут быть использованы для направления сайт-специфичных двухцепочечных разрывов (DSB) в геноме T-клеток. Негомологичное соединение концов (NHEJ) лигирует ДНК с обеих сторон двухцепочечного разрыва, и при этом практически отсутствует или отсутствует перекрытие последовательности для возможности ренатурации, что приводит к ошибкам, нокаутирующим экспрессию гена. Альтернативно, гомологически направленная репарация может вводить трансген в сайт DSB при условии что в трансгене присутствуют гомологичные фланкирующие последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения нокаут гена включает вставку, делецию, мутацию или их комбинацию, выполненные с использованием молекулы TALEN.

При использовании в данном документе неклеазная система «короткие полиндромные повторы, регулярно расположенные группами/Cas» (CRISPR/Cas) относится к системе, которая использует управляемую CRISPR РНК (crRNA) Cas-нуклеазу для распознавания сайтов-мишеней в геноме (известных как протоспейсеры) посредством комплементарности спаривания оснований, а затем для расщепления ДНК, если короткий, консервативный мотив, связанный с протоспейсером (PAM), следует сразу за 3' комплементарной последовательности-мишени. Системы CRISPR/Cas делятся на три типа (*т.е.* тип I, тип II и тип III) в зависимости от последовательности и структуры нуклеаз Cas. Направленные crRNA комплексы отслеживания в типах I и III, нуждаются в нескольких субъединицах Cas. Система II типа, наиболее изученная, включает по меньшей мере три компонента: направляемую РНК нуклеазу Cas9, crRNA и *транс-*действующую crRNA (tracrRNA). tracrRNA содержит дуплексообразующую область. crRNA и tracrRNA образуют дуплекс, который способен взаимодействовать с нуклеазой Cas9 и направлять комплекс Cas9/crRNA: tracrRNA на специфичный сайт ДНК-мишени посредством спаривания оснований Уотсона-Крика между спейсером на кРНК и протоспейсером на целевой ДНК выше по ходу транскрипции от PAM. Нуклеаза Cas9 расщепляет двухцепочечный разрыв в области, определяемой спейсером crRNA. Репарация NHEJ приводит к вставкам и/или удалениям, которые нарушают экспрессию целевого локуса. Альтернативно, трансген с гомологичными фланкирующими последовательностями может быть введен в сайт DSB посредством гомологичной репарации. crRNA и tracrRNA могут быть сконструированы в виде единственной направляющей РНК (sgRNA или gRNA) (см., например, Jinek *et al.*, *Science* 337:816-21, 2012). Кроме того, область направляющей РНК, комплементарной сайту-мишени, может быть изменена или запрограммирована для нацеливания на желаемую последовательность (Xie *et al.*, *PLOS One* 9:e100448, 2014; заявка на патентную публикацию США № US 2014/0068797, заявка на патентную публикацию США

№ US 2014/0186843; патент США № 8 697 359 и публикация PCT № WO 2015/071474; методики и композиции по каждому из которых включены в качестве ссылки). В некоторых вариантах осуществления изобретения нокаут гена включает инсерцию, делецию, мутацию или их комбинацию и производится с использованием нуклеазной системы CRISPR/Cas.

Используемый в данном документе термин «мегануклеаза», также называемая «хоуминг-эндонуклеаза», 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, GIY-YIG, HNH, His-Cys box и PD-(D/E)XK. Типичные 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 №№ 5,420,032 и 6,833,252; 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 природные мегануклеазы могут быть использованы для стимулирования сайт-специфической модификации генома мишени, выбранной из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA4, HLA-кодирующего гена или гена, кодирующего компонент TCR. В других вариантах осуществления сконструированная мегануклеаза, обладающая новой специфичностью связывания с геном-мишенью, используется 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; патентные публикации США №№ US 2007/0117128; US 2006/0206949; US 2006/0153826; US 2006/0078552 и US 2004/0002092).

В некоторых вариантах осуществления изобретения нокаут хромосомного гена содержит ингибирующую молекулу нуклеиновой кислоты, которая вводится в модифицированную клетку, содержащую гетерологичный полинуклеотид, кодирующий антигенспецифичный рецептор, который специфично связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью, где ингибирующая молекула нуклеиновой кислоты кодирует мишеньспецифичный ингибитор и где кодируемый мишеньспецифичный ингибитор ингибирует экспрессию эндогенного гена (*m. e.* PD-1, TIM3, LAG3, CTLA4, HLA-компонента, TCR-компонента или любой их комбинации) в модифицированной клетке.

Нокаут хромосомного гена может быть подтвержден непосредственно секвенированием ДНК модифицированной клетки после использования процедуры или агента нокаута. Нокауты хромосомных генов также могут быть получены вследствие отсутствия экспрессии генов (*например*, отсутствия кодируемого геном полипептидного продукта или мРНК) после нокаута.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку, которая содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий связывающий белок по настоящему изобретению (*например*, специфичный к MAGE-A1 TCR из CD8⁺ Т-клетки, который способен специфично связываться с пептидным антигеном). В некоторых вариантах осуществления гетерологически кодируемый TCR модифицированной CD4⁺ Т-клетки представляет собой высокоаффинный TCR. В конкретных вариантах осуществления гетерологически кодируемый TCR модифицированной CD4⁺ Т-клетки способен специфично связываться с комплексом пептид:антиген HLA на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8.

В дополнительных вариантах осуществления модифицированная CD4⁺ Т-клетка дополнительно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере внеклеточную часть корцептора CD8. Как показано в примерах, коэкспрессия специфичного к MAGE-A1 связывающего белка по настоящему изобретению и по меньшей мере внеклеточной части корцептора CD8 CD4⁺ Т-клеткой может придавать новую или улучшенную функциональность (*например*, улучшенное высвобождение цитокинов, ответ ЦТЛ при связывании с клеткой-мишенью, экспрессирующей MAGE-A1:HLA) на CD4⁺ Т-клетке. Аминокислотная последовательность α -цепи корцептора CD8 представлена в SEQ ID NO: 143. Аминокислотные последовательности пяти различных изоформ β -цепи корцептора CD8 представлены в SEQ ID NO: 144–148 соответственно. В некоторых вариантах осуществления модифицированная CD4⁺ Т-клетка по настоящему изобретению дополнительно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полноразмерную β -цепь рецептора корцептора CD8, гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полноразмерную α -цепь корцептора CD8, или обе. Полинуклеотид, кодирующий CD8, в некоторых вариантах может быть

В настоящем документе также предлагаются способы изготовления модифицированной CD4⁺ Т-клетки, где способы включают трансдукцию CD4⁺ Т-клетки гетерологичным полинуклеотидом, кодирующим TCR, из CD8⁺ Т-клетки, способным специфично связывать пептидный антиген. В некоторых вариантах осуществления TCR-кодирующий полинуклеотид, используемый для модификации CD4⁺ Т-клетки, происходит из встречающейся в природе CD8⁺ Т-клетки (*т. е.*, TCR представляет собой встречающийся в природе TCR). Дальнейшие варианты осуществления способов могут включать трансдукцию CD4⁺ Т-клетки гетерологичным полинуклеотидом, кодирующим по меньшей мере внеклеточную часть корцептора CD8, которая в некоторых вариантах осуществления может содержать CD8 α и CD8 β из CD8⁺ Т-клетки.

Композиции

В данном документе также представлены композиции (*например*, фармацевтические композиции), которые содержат модифицированную клетку в соответствии с описанием в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. Подходящие вспомогательные вещества включают воду, солевой раствор, декстрозу, глицерин или тому подобное и их комбинации. В вариантах осуществления композиции, содержащие конденсированные белки или клетки-хозяева в соответствии с описанием в настоящем документе, дополнительно содержат подходящую инфузионную среду. Подходящей инфузионной средой может быть любой состав изотонической среды, обычно нормальный солевой раствор, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), 5% декстроза в воде, можно использовать лактат Рингера. Инфузионная среда может быть дополнена человеческим сывороточным альбумином или другими человеческими сывороточными компонентами. Композиции, описанные в настоящем документе, могут быть представлены в контейнерах с единичной дозой или с несколькими дозами, таких как герметичные ампулы или флаконы. Такие контейнеры могут быть заморожены для сохранения стабильности состава до введения пациенту.

«Эффективное количество» композиции относится к количеству, достаточному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемых клинических результатов или полезного лечения, в соответствии с описанным в данном документе. Эффективное количество может быть доставлено в одном или нескольких введениях. Если введение назначено субъекту, у которого уже известно или подтверждено наличие заболевания или болезненного состояния, термин «терапевтическое количество»

может использоваться в отношении лечения, тогда как «профилактически эффективное количество» может использоваться для описания введения эффективного количества субъекту, который восприимчив или подвержен риску развития заболевания или болезненного состояния (*например*, рецидива) в качестве профилактического курса.

Композиции можно вводить способом, соответствующим заболеванию или состоянию, подлежащему лечению (или профилактике), как определено специалистами в данной области техники. Подходящая доза и подходящая продолжительность и частота введения композиций будут определяться такими факторами как состояние здоровья пациента, размер пациента (*т. е.*, вес, масса или площадь тела), тип и степень тяжести заболевания, состояние пациента, конкретная форма активного ингредиента и способ введения. Как правило, подходящая доза и режим лечения обеспечивают композиции в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического и/или профилактического эффекта (такого как описано в настоящем документе, включая улучшенный клинический результат, такой как более частые полные или частичные ремиссии или более долгая безрецидивная и/или общая выживаемость или уменьшение выраженности симптомов). Для профилактического применения доза должна быть достаточной для предотвращения, отсрочки начала или уменьшения тяжести заболевания, связанного с заболеванием или расстройством. Профилактическое преимущество композиций, вводимых в соответствии с описанными в данном документе способами, может быть определено путем проведения доклинических (в том числе исследований *in vitro* и *in vivo*) и клинических исследований и анализа данных, полученных с помощью соответствующих статистических, биологических и клинических способов и методик.

Терапевтически эффективная доза представляет собой количество клеток-хозяев (экспрессирующих связывающий белок или рекомбинантный TCR с высокой аффинностью, специфичный к человеческому MAGE-A1), используемых при адоптивном переносе, которое способно давать клинически желаемый результат (*т. е.*, достаточное количество для вызова или усиления специфичного Т-клеточного иммунного ответа против клеток, сверхэкспрессирующих MAGE-A1 (*например*, цитотоксического Т-клеточного ответа) статистически значимым образом) у подвергающегося лечению человека или млекопитающего, не являющегося человеком. Дозировка для любого пациента зависит от многих факторов, включая размер пациента, вес, площадь поверхности тела, возраст, конкретную терапию, которая должна быть введена, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья и другие препараты, которые вводят одновременно. Дозы будут варьироваться, но предпочтительная доза для введения клетки-хозяина, содержащей рекомбинантный вектор экспрессии в соответствии с описанным в данном документе, составляет приблизительно 10^7 клеток/ m^2 , приблизительно 5×10^7 клеток/ m^2 , приблизительно 10^8 клеток/ m^2 , приблизительно 5×10^8 клеток/ m^2 , приблизительно 10^9 клеток/ m^2 , приблизительно 5×10^9 клеток/ m^2 , приблизительно 10^{10} клеток/ m^2 , приблизительно 5×10^{10} клеток/ m^2 или приблизительно 10^{11} клеток/ m^2 . В определенных вариантах осуществления единичная доза содержит модифицированную клетку в соответствии с описанием в данном документе, в дозе от приблизительно 10^7 клеток/ m^2 до приблизительно 10^{11} клеток/ m^2 .

В определенных вариантах осуществления единичная доза включает (i) композицию, включающую 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% сконструированных CD4⁺ Т-клеток, в сочетании 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% сконструированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1. В других вариантах осуществления единичная доза содержит уменьшенное количество или практически не содержит наивных Т-клеток (*m. e.*, имеет менее чем приблизительно 50%, менее чем приблизительно 40%, менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 5% или менее чем приблизительно 1% популяции наивных Т-клеток, присутствующих в стандартной дозе, по сравнению с образцом пациента, имеющим сопоставимое количество МКПК).

В некоторых вариантах осуществления единичная доза включает (i) композицию, содержащую, по меньшей мере приблизительно 50% сконструированных CD4⁺ Т-клеток, в сочетании с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 50% сконструированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, при котором единичная доза содержит уменьшенное количество или практически не содержит наивных Т-клеток. В дальнейших вариантах осуществления единичная доза включает (i) композицию, содержащую, по меньшей мере приблизительно 60% модифицированных CD4⁺ Т-клеток, в сочетании с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 60% модифицированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, при котором единичная доза содержит уменьшенное количество или практически не содержит наивных Т-клеток. В еще дальнейших вариантах осуществления единичная доза включает (i) композицию, содержащую, по меньшей мере приблизительно 70% модифицированных CD4⁺ Т-клеток, в сочетании с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 70% модифицированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, при котором единичная доза содержит уменьшенное количество или практически не содержит наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления единичная доза включает (i) композицию, содержащую, по меньшей мере приблизительно 80% модифицированных CD4⁺ Т-клеток, в сочетании с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 80% модифицированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, при котором единичная доза содержит уменьшенное количество или практически не содержит наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления единичная доза включает (i) композицию, содержащую, по меньшей мере приблизительно 85% модифицированных CD4⁺ Т-клеток, в сочетании с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 85% модифицированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, при котором единичная доза содержит уменьшенное количество или практически не содержит наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления единичная доза включает (i) композицию, содержащую, по меньшей мере приблизительно 90% модифицированных CD4⁺ Т-клеток, в сочетании с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 90% модифицированных CD8⁺ Т-клеток в соотношении приблизительно 1:1, при котором единичная доза содержит уменьшенное количество или практически не содержит наивных Т-клеток.

В любом из описанных в данном документе вариантов осуществления единичная доза содержит равное или приблизительно равное число модифицированных CD45RA⁻CD3⁺CD8⁺ и модифицированных CD45RA⁻CD3⁺CD4⁺ T_M-клеток.

Разработка подходящих режимов дозирования и лечения для использования конкретных композиций описана в данном документе для различных схем лечения, включая, *например*, парентеральное или внутривенное введение или состав. Если рассматриваемая композиция вводится парентерально, композиция может также включать стерильный водный или масляный раствор или суспензию. Подходящие

нетоксичные парентерально приемлемые разбавители или растворители включают воду, раствор Рингера, изотонический раствор соли, 1,3-бутандиол, этанол, пропиленгликоль или политетилеиленгликоли в смесях с водой. Водные растворы или суспензии могут дополнительно содержать один или несколько буферных агентов, таких как ацетат натрия, цитрат натрия, борат натрия или тартрат натрия. Разумеется, любой материал, используемый при приготовлении единичной дозированной формы состава, должен быть фармацевтически чистым и по сути нетоксичным в используемых количествах. Кроме того, активные соединения могут быть включены в препарат и составы с замедленным высвобождением. Используемый в данном документе термин «единичная дозированная форма» относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица может содержать заранее определенное количество модифицированных клеток или активного соединения, рассчитанное для получения желаемого эффекта, в сочетании с подходящим фармацевтическим носителем.

Используемый в данном документе термин «введение композиции» относится к доставке ее субъекту независимо от пути или способа доставки. Введение может осуществляться непрерывно или периодически, и парентерально. Введение может предназначаться для лечения субъекта, у которого уже подтверждено наличие распознаваемого состояния, заболевание или болезненного состояния, или для лечения субъекта, 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 в любом режиме дозирования (*например*, модифицированные клетки с одним или несколькими цитокинами; иммуносупрессивная терапия, такая как ингибиторы кальциневрина, кортикостероиды, ингибиторы микротрубочек, низкие дозы пролекарства микофеноловой кислоты, ингибиторы HDAC, агенты гипометилирования ДНК или любая их комбинация).

В определенных вариантах осуществления субъекту вводят множество доз модифицированных клеток, описанных в настоящем документе, которые можно вводить с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель.

Способы лечения

В определенных аспектах настоящее раскрытие относится к способам лечения гиперпролиферативного расстройства или состояния, характеризующегося экспрессией MAGE-A1 (*например*, aberrантной экспрессией MAGE-A1), путем введения человеку, нуждающемуся в этом, модифицированной клетки, композиции или единичной дозы в соответствии с описанным в данном документе (или любой их комбинации).

Состояние, связанное с экспрессией MAGE-A1, включает любое расстройство или состояние, при котором присутствует недостаточная активность, чрезмерная активность или ненадлежащая активность клеточного или молекулярного события MAGE-A1, и оно может быть результатом необычно высоких (со статистической значимостью) уровней экспрессии MAGE-A1 или несоответствующей (*т.е.* не встречающейся в здоровых клетках данного типа) экспрессии в пораженных клетках (*например*, клетках миеломы) по сравнению с нормальными клетками. Субъект, имеющий такое расстройство или состояние, получит преимущество от лечения композицией или способом, которые описаны в данных вариантах осуществления. Таким образом, некоторые состояния, связанные с aberrантной экспрессией MAGE-A1, могут включать как острые, так и хронические расстройства и заболевания, такие как патологические состояния, которые предрасполагают субъекта к определенному расстройству.

Некоторые примеры состояний, связанных с экспрессией MAGE-A1, включают пролиферативные расстройства или гиперпролиферативные расстройства, которые относятся к состояниям активированных и/или пролиферирующих клеток (которые также могут быть транскрипционно гиперактивными) у субъекта, включая опухоли, новообразования, рак, злокачественные образования и т. д. В дополнение к активированным или пролиферирующим клеткам, гиперпролиферативное расстройство может также включать в себя аберрацию или нарушение регуляции процессов гибели клеток, будь то путем некроза или апоптоза. Такая аберрация процессов гибели клеток может быть связана с множеством состояний, включая рак (включая первичные, вторичные злокачественные новообразования, а также метастазирование) или другие состояния.

Наличие гиперпролиферативного расстройства или злокачественного состояния у субъекта относится к наличию у субъекта диспластических, раковых и/или трансформированных клеток, включая, например, клетки новообразований, опухолевые, бесконтактно ингибированные или онкогенно трансформированные клетки или тому подобное (*например*, солидный рак, гематологический рак, 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, *Cell* 144:646, 2011; Hanahan and Weinberg, *Cell* 100:57, 2000; Cavallo *et al.*, *Canc. Immunol. Immunother.* 60:319, 2011; Kyrigideis *et al.*, *J. Carcinog.* 9:3, 2010). В некоторых вариантах осуществления такими раковыми клетками могут быть клетки острого миелоидного лейкоза, В-клеточного лимфобластного лейкоза, Т-клеточного лимфобластного лейкоза или миеломы, включая раковые стволовые клетки, которые способны инициировать и серийно трансплантировать любой из этих типов рака (*см. например*, Park *et al.*, *Molec. Therap.* 17:219, 2009).

В определенных вариантах осуществления предоставлены способы лечения гиперпролиферативного расстройства, такого как гематологическое злокачественное образование или солидный рак, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, модифицированной клетки, композиции или единичной дозы по настоящему изобретению. Типичные гематологические злокачественные новообразования включают острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический эозинофильный лейкоз (ХЭЛ), миелодиспластический синдром (МДС), неходжкинскую лимфому (НХЛ) или множественную миелому.

В других вариантах осуществления предоставлены способы лечения гиперпролиферативного расстройства, такого как солидный рак, выбранный из немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), тройного негативного рака молочной железы (ТНРМЖ), рака яичника, злокачественной меланомы, рака толстой кишки, колоректальной аденокарциномы, колоректального рака, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, рака костей и мягких тканей, опухоли головного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, десмоидной опухоли, эмбрионального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, гинекологической опухоли, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака печени, рака легких, мезотелиомы, остеосаркомы, рака поджелудочной железы, аденокарциномы протоков поджелудочной железы, первичной астроцитарной опухоли, первичного рака щитовидной железы, рака простаты, рака почек, почечноклеточного рака, рабдомиосаркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, опухоли зародышевой клетки яичка, рака уротелия, саркомы матки или рака матки.

Как понятно специалисту в области медицины, термины «лечить» и «лечение» относятся к медицинскому лечению заболевания, расстройства или состояния субъекта (*т. е.* пациента, хозяина, который может быть человеком или животным, которое не является человеком) (*см.*, *например*, словарь

Stedman's Medical Dictionary). В общем, подходящая доза и схема лечения обеспечивают один или несколько из связывающего белка или рекомбинантного TCR с высокой аффинностью, специфичного к человеческому MAGE-A1 или клетке-хозяину, экспрессирующей его, и, необязательно, дополнительную терапию (*например*, цитокин, такой как IL-2, IL-15, IL-21 или любую их комбинацию) в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического или профилактического эффекта. Терапевтическая или профилактическая польза, возникающая в результате терапевтического лечения или профилактических способов, включает, например, улучшенный клинический результат, в котором целью является предотвращение или замедление или иное ослабление (*например*, уменьшение статистически значимым образом по сравнению с необработанным контролем) нежелательного физиологического изменения или расстройства, или предотвращение, замедления или иное ослабление распространения или серьезности такого заболевания или расстройства. Полезные или желательные клинические результаты лечения субъекта включают ослабление, уменьшение или облегчение симптомов, которые являются результатом или связаны с заболеванием или расстройством, подлежащим лечению; уменьшение появления симптомов; улучшение качества жизни; более длительный статус отсутствия заболевания (*т. е.*, уменьшение вероятности или склонности субъекта к появлению симптомов, на основании которых ставится диагноз заболевания); уменьшение степени заболеваемости; стабилизированное (*т. е.*, не ухудшающееся) состояние заболевания; задержка или замедление прогрессирования заболевания; улучшение или смягчение болезненного состояния; и ремиссия (частичная или полная), обнаруживаемая или не обнаруживаемая; или общее выживание.

«Лечение» может также означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью субъекта, который не получал лечения. Субъекты, нуждающиеся в способах и композициях, описанных в настоящем документе, включают тех, у кого уже есть заболевание или расстройство, а также субъектов, склонных к риску развития заболевания или расстройства или подверженных этому риску. Субъектами, нуждающимися в профилактическом лечении, являются субъекты, у которых необходимо предотвратить заболевание, состояние или расстройство (*т. е.*, уменьшить вероятность возникновения или рецидива заболевания или расстройства). Клиническое преимущество, обеспечиваемое композициями (и препаратами, включающими композиции) и способами, описанными в данном документе, может быть оценено путем разработки и проведения анализов *in vitro*, доклинических исследований и клинических исследований у субъектов, для которых назначение композиций предназначено для пользы, как описано в примерах.

В некоторых вариантах осуществления раскрытых в настоящее время способов модифицированная клетка способна стимулировать антиген-специфичный Т-клеточный ответ на MAGE-A1 способом, ограниченным HLA класса I. В некоторых вариантах осуществления ответ, ограниченный HLA класса I, является независимым от транспортеров, связанных с процессингом антигена (TAP). В некоторых вариантах осуществления антигенспецифичный Т-клеточный ответ, стимулируемый модифицированной клеткой, вводимой в соответствии с раскрытыми в данном документе способами, включает по меньшей мере один из ответа CD4⁺ хелперного Т-лимфоцита (Th) и ответа CD8⁺ цитотоксического Т-лимфоцита (ЦТЛ). В конкретных вариантах осуществления ответ ЦТЛ, вызванный в соответствии с раскрытыми способами, направлен против клетки, имеющей aberrантную экспрессию MAGE-A1 (*например*, опухолевая клетка MAGE-A1⁺). Уровень иммунного ответа ЦТЛ может быть определен любым из многочисленных иммунологических методов, описанных в данном документе и обычно применяемых в данной области. Уровень иммунного ответа ЦТЛ может быть определен до и после введения любого из описанных в данном

документе специфичных к MAGE-A1 связывающих белков, экспрессируемых, например, Т-клеткой. Анализ цитотоксичности для определения активности ЦТЛ может быть выполнен с использованием любого из нескольких техник и способов, обычно применяемых в данной области (*см., например, Henkart et al., "Cytotoxic T-Lymphocytes" in Fundamental Immunology, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), стр. 1127-50, и ссылки, цитируемые в них*).

Антиген-специфичные Т-клеточные ответы обычно определяют путем сравнения наблюдаемых Т-клеточных ответов в соответствии с любым из описанных в данном документе функциональных параметров Т-клеток (*например, пролиферация, высвобождение цитокинов, активность ЦТЛ, измененный фенотип маркера клеточной поверхности и т. д.*) Т-клеток, которые подвергаются воздействию распознанного антигена в соответствующем контексте (*например, антигена, используемого для праймирования или активации Т-клеток при презентировании иммуносовместимым антиген-презентирующим клеткам*) и Т-клеток из той же исходной популяции, которая подвергается вместо этого воздействию структурно отличного или нерелевантного контрольного антигена. Ответ на распознанный антиген, который является более статистически значимым, чем ответ на контрольный антиген, означает антиген-специфичность.

Биологический образец может быть взят у субъекта для определения наличия и уровня иммунного ответа на антигенный пептид, полученный из MAGE-A1, в соответствии с описанным в данном документе. Используемый в данном документе «биологический образец» может представлять собой образец крови (из которого может быть приготовлена сыворотка или плазма), биоптат, биологические жидкости (*например, легочный лаваж, асцит, смывки слизистой оболочки, синовиальная жидкость*), костный мозг, лимфатические узлы, эксплантат ткани, культура органов или любой другой препарат ткани или клеток от субъекта или биологического источника. Биологические образцы также могут быть взяты у субъекта до получения какой-либо иммуногенной композиции, причем этот биологический образец полезен в качестве контроля для установления исходных (*т.е., доиммунизационных*) данных.

Модифицированные клетки этого раскрытия полезны, в некоторых вариантах осуществления, в адоптивных клеточных способах лечения. Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка модифицируется (*например, трансдуцируется рекомбинантным вектором экспрессии или полинуклеотидом по настоящему изобретению*) *ex vivo*, а затем вводится субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка представляет собой аллогенную клетку, сингенную клетку или аутологичную клетку (*т.е., по отношению к субъекту, которому вводят модифицированную клетку*). В любом из раскрытых в настоящее время способов модифицированная клетка содержит модифицированную иммунную клетку человека, выбранную из CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, CD4-CD8- дважды отрицательной Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки, естественной клетки-киллера, дендритной клетки или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка представляет собой Т-клетку, *например, представляет собой наивную Т-клетку, Т-клетку центральной памяти, Т-клетку эффекторной памяти или любую их комбинацию*.

В конкретных вариантах осуществления модифицированная клетка, используемая в раскрытых в настоящее время способах, представляет собой CD4+ Т-клетку. В некоторых таких вариантах осуществления модифицированная CD4+ Т-клетка дополнительно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере внеклеточную часть корцептора CD8, и, необязательно, кодирует полную α -цепь CD8, полную β -цепь CD8 или обе. Такие способы могут, в некоторых вариантах осуществления, дополнительно включать введение субъекту CD8+ Т-клетки, которая способна специфично

связываться с комплексом пептид MAGE-A1:HLA на поверхности клетки, такой как модифицированная CD8+ Т-клетка по настоящему изобретению.

Раскрытые в данном документе способы лечения или профилактики могут включать любой подходящий способ введения или дозирования модифицированной клетки, или комбинированную терапию. Например, в определенных вариантах осуществления субъекту вводят множество доз модифицированных клеток, описанных в настоящем документе, которые можно вводить с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель. Кроме того, способы лечения или профилактики по данному раскрытию могут вводиться субъекту как часть курса лечения или схемы лечения, которая может включать дополнительные виды лечения до или после введения раскрытых в данном документе единичных доз, клеток или композиций. В других вариантах осуществления цитокин вводят последовательно при условии, что субъекту вводили рекомбинантную клетку-хозяина по меньшей мере три или четыре раза перед введением цитокина. В определенных вариантах осуществления цитокин вводят подкожно (*например*, IL-2, IL-15, IL-21). В еще одних вариантах осуществления субъект, подвергаемый лечению, дополнительно получает иммуносупрессивную терапию, такую как ингибиторы кальциневрина, кортикостероиды, ингибиторы микротрубочек, низкие дозы пролекарства микофеноловой кислоты или любую их комбинацию. В еще одних вариантах осуществления субъект, подвергаемый лечению, получил немиелоаблативный или миелоаблативный трансплантат гемопоэтических клеток, причем лечение можно вводить через от по меньшей мере двух до через по меньшей мере трех месяцев после трансплантации немиелоаблативных гемопоэтических клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводили один или несколько агентов гипометилирования ДНК и ингибитор HDAC, один или оба из которых могут усиливать экспрессию MAGE-A1 (*см.* Weon, J.L. и P.R. Potts, *Curr Opin Cell Biol*, 2015. 37: p. 1-8) и тем самым усилить адоптивную клеточную терапию, нацеленную на MAGE-A1.

Способы согласно настоящему изобретению могут, в определенных вариантах осуществления, дополнительно включать введение одного или нескольких дополнительных агентов для лечения заболевания или расстройства в комбинированной терапии. Например, в некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение модифицированной клетки с (одновременно, одновременно или последовательно) ингибитором контрольных точек иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение модифицированной клетки с агонистом стимулирующего агента контрольных точек иммунного ответа. В других вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение модифицированной клетки со вторичной терапией, такой как химиотерапевтический агент, лучевая терапия, хирургическое вмешательство, антитело или любая их комбинация.

Используемый в данном документе термин «иммуносупрессивный агент» или «агент иммуносупрессии» относится к одной или нескольким клеткам, белкам, молекулам, соединениям или комплексам, обеспечивающим ингибирующие сигналы для помощи в контроле или подавлении иммунного ответа. Например, средства подавления иммунитета включают те молекулы, которые частично или полностью блокируют иммуностимуляцию; уменьшают, предотвращают или позволяют отсрочить иммунную активацию; или увеличивают, активируют или повышают иммуносупрессию. Типичные иммуносупрессивные агенты-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 иммуносупрессивного агента (также называемый ингибитором иммунной контрольной точки) может представлять собой соединение, антитело, фрагмент антитела или конденсированный полипептид (*например*, Fc-слияние, такое как CTLA4-Fc или LAG3-Fc), бессмысловую молекулу, молекулу рибозима или РНКи или низкомолекулярную органическую молекулу. В любом из раскрытых в данном документе вариантов осуществления способ может содержать модифицированную клетку с одним или несколькими ингибиторами любого из следующих компонентов иммуносупрессии, по отдельности или в любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные клеточные клетки используются в комбинации с ингибитором PD-1, например, специфичным к PD-1 антителом или его связывающим фрагментом, таким как пидилизумаб, ниволумаб, пембролизумаб, MEDI0680 (ранее AMP-514), AMP-224, BMS-936558 или любая их комбинация. В других вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению используется в сочетании со специфичным антителом к PD-L1 или его связывающим фрагментом, таким как BMS-936559, дурвалумаб (MEDI4736), атезолизумаб (RG7446), авелумаб (MSB0010718C), MPDL3280A, или любая их комбинация.

В определенных вариантах осуществления модифицированная клетка по настоящему изобретению используется в комбинации с ингибитором LAG3, таким как LAG525, IMP321, IMP701, 9H12, BMS-986016 или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором CTLA4. В конкретных вариантах осуществления модифицированную клетку используют в комбинации со специфичным антителом к CTLA4 или его связывающим фрагментом, таким как ипилимумаб, тремелимумаб, конденсированные белки CTLA4-Ig (*например*, абатацепт, белатацепт) или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления модифицированную клетку используют в комбинации со специфичным антителом B7-H3 или его связывающим фрагментом, таким как эноблитузумаб (MGA271), 376.96 или оба. Фрагмент, связывающий антитело B7-H4, может представлять собой scFv или его конденсированный белок, как описано, *например*, в *Dangaj et al., Cancer Res. 73 : 4820, 2013*, а также описано в патенте США № 9,574,000 и патентных публикациях PCT № WO /201640724A1 и WO 2013/025779A1.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором CD244.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором BLTA, HVEM, CD160 или любой их комбинацией. Антитела к CD-160 описаны, *например*, в публикации PCT № WO 2010/084158.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором TIM3.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором Gal9.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором передачи сигналов аденозина, таким как аденозиновый рецептор-ловушка.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором A2aR.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором KIR, таким как лирилумаб (BMS-986015).

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором ингибирующего цитокина (обычно цитокина, отличного от TGF β) или развития или активности Treg.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором IDO, таким как лево-1-метил-триптофан, эпакадостат (INCB024360; Liu *et al.*, *Blood* 115:3520-30, 2010), ebselen (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-метил-триптофан (1-МТ) -тирапазамин или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором аргиназы, таким как сложный метиловый эфир N(омега)-нитро-L-аргинина (L-NAME), N-омега-гидрокси-нор-1-аргинин (нор-NOHA), L-NOHA, 2(S)-амино-6-борогексановая кислота (ABH), S-(2-бороэтил)-L-цистеин (BEC) или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором VISTA, таким как CA-170 (Curis, Lexington, Mass.).

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором TIGIT, таким как, например, COM902 (Compugen, Toronto, Ontario Canada), ингибитором CD155, таким как, например, COM701 (Compugen), или обоими.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором PVRIG, PVRL2 или обоими. Антитела к PVRIG описаны, например, в публикации PCT № WO 2016/134333. Антитела к PVRL2 описаны, например, в публикации PCT № WO 2017/021526.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором LAIR1.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с ингибитором CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5 или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка используется в комбинации с агентом, который увеличивает активность (*m. e.*, является агонистом) стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки. Например, модифицированную клетку можно использовать в комбинации с агонистом CD137 (4-1BB) (таким как, например, урелумаб), агонистом CD134 (OX-40) (таким как, например, MEDI6469, MEDI6383 или MEDI0562), леналидомид, помалидомид, 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 патентной публикации PCT № WO 2016/054638), агонистом ICOS (CD278) (таким как, например, GSK3359609, MAT 88.2, JTX-2011, Icos 145-1, Icos 314-8 или любая их комбинация). В любом из раскрытых в данном документе вариантов осуществления способ может включать введение модифицированной клетки с одним или несколькими агонистами стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки, включая любой из вышеупомянутых, отдельно или в любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает модифицированную клетку и вторичную терапию, содержащую одно или несколько из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфичен к раковому антигену, экспрессируемому невоспаленной солидной опухоли, лучевой терапии, хирургии, химиотерапевтического агента, цитокина, РНКи или любой их комбинации.

В определенных вариантах осуществления способ комбинированной терапии включает введение модифицированной клетки и дополнительное введение лучевой терапии или хирургического вмешательства. Лучевая терапия хорошо известна в данной области и включает в себя рентгеновскую терапию, такую как гамма-облучение, и радиофармацевтическую терапию. Операции и хирургические методы, подходящие для лечения данного рака у субъекта, хорошо известны специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления способ комбинированной терапии включает введение модифицированной клетки и дополнительное введение химиотерапевтического агента.

Химиотерапевтический агент включает, но не ограничивается ими, ингибитор функции хроматина, ингибитор топоизомеразы, лекарственное средство, ингибирующее микротрубочки, агент, повреждающий ДНК, антиметаболит (такой как антагонисты фолата, аналоги пиримидина, аналоги пурина и аналоги, модифицированные сахаром), ингибитор синтеза ДНК, интерактивный агент ДНК (такой как интеркалирующий агент) и ингибитор репарации ДНК. Иллюстративные химиотерапевтические агенты включают, без ограничения, следующие группы: антиметаболитные/противораковые агенты, такие как аналоги пиримидина (5-фторурацил, флоксурин, капецитабин, гемцитабин и цитарабин) и аналоги пурина, антагонисты фолата и родственные ингибиторы (меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и 2-хлордезоксиаденозин (кладрибин)); антипролиферативные/антимитотические агенты, включающие природные 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), ДНК-повреждающие агенты (актиномицин, амсакрин, антрациклины, блеомицин, бусульфид, камптотецин, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид, цитоксан, дактиномицин, даунорубин, доксорубин, эпирубин, гексаметилмеламиноксалиплатин, ифосфамид, мелфалан, мерхлорэтамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевину, пликамицин, прокарбазин, таксол, таксотер, темозоламид, тенипозид, триэтилтиофосфорамид и этопозид (VP 16)); антибиотики, такие как дактиномицин (актиномицин D), даунорубин, доксорубин (адриамицин), идарубин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин) и митомицин; ферменты (L-аспарагиназа, которая системно метаболизирует L-аспарагин и лишает клетки, которые не способны синтезировать свой собственный аспарагин); антиагреганты; антипролиферативные/антимитотические алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (мехлорэтамин, циклофосфамид и аналоги, мелфалан, хлорамбуцил), этиленимины и метилмеламины (гексаметилмеламин и тиотепа), алкилсульфонаты -бусульфид, нитрозомочевины (аналоги кармустиозина) (BC) и другие соединения (кармустиозин) (аналоги кармустиозина) (BC) и другие соединения (кармустиозин) (BC) и другие аналоги, тразены — дакарбазинин (DTIC); антипролиферативные / антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат); координационные комплексы платины (цисплатин, карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевину, митотан, аминоклутетимид, гормоны, аналоги гормонов (эстроген, тамоксифен, гoserelin, бикалутамид, нилутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол, анастрозол); антикоагулянты (гепарин, синтетические соли гепарина и другие ингибиторы тромбина); фибринолитические агенты (такие как тканевый активатор плазминогена,

стрептокиназа и урокиназа), аспирин, дипиридамол, тиклопидин, клопидогрел, абциксимаб; антимиграционные агенты; антисекреторные агенты (бравелдин); 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 ангиотензиновых рецепторов; доноры оксида азота; антисмысловые олигонуклеотиды; антитела (трастузумаб, ритуксимаб); рецепторы химерных антигенов; ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки (третиноин); ингибиторы mTOR, ингибиторы топоизомеразы (доксорубин (адриамицин), амсакрин, камптотецин, даунорубин, дактиномицин, энипозид, эпирубин, этопозид, идарубин, иринотекан (CPT-11) и митоксантрон, топотекан, иринотекан), кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и пренизолон); ингибиторы киназы сигнальной трансдукции фактора роста; индукторы митохондриальной дисфункции, токсины, такие как токсин холеры, рицин, экзотоксин *Pseudomonas*, токсин аденилатциклазы *Bordetella pertussis* или токсин дифтерии и активаторы каспазы; и разрушители хроматина.

Цитокины все чаще используются для манипулирования иммунным ответом хозяина на противораковую активность. См., например, Floros & Tarhini, *Semin. Oncol.* 42(4):539-548, 2015. Цитокины, подходящие для стимуляции 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 GM-CSF, отдельно или в любой комбинации с модифицированной клеткой по данному раскрытию.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАФФИННЫХ TCR, СПЕЦИФИЧНЫХ К РАКОВЫМ ЭПИТОПАМ

Создание высокоаффинных TCR для использования в адоптивных клеточных терапиях затруднено из-за селекции тимуса, при которой TCR с высокой аффинностью к аутоантигенам (например, MART1 и MAGE-A1) удаляются и, следовательно, относительно редки по сравнению с TCR, специфичных к чужеродным антигенам (см., например, фигуры 1А и 1В). Как показано на фигурах 2А и 2В, был разработан новый процесс скрининга и обогащения для идентификации высокоаффинных TCR, специфичных к MAGE-A1. Вкратце, CD8⁺ Т-клетки из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) 12 здоровых доноров стимулировали один раз с помощью активированных пептидами аутологичных DC и дважды с помощью активированных пептидами аутологичных МКПК в присутствии IL-2, IL-7, IL-15 и IL-21 для получения поликлональных специфичных к MAGE-A1 CD8⁺ Т-клеточных линий. Стимулированные клеточные линии от всех доноров объединяли и сортировали несколько раз с использованием ограниченных концентраций мультимеров пептид MAGE-A1:ГКГС, которые продуцировали обогащенные популяции клонов Т-клеток с высокой аффинностью. Гены TCR β из популяций были секвенированы по частоте TCR в пуле и отдельных типах пГКГС.

На фигуре 3 показаны типичные данные из серии типов пГКГС, обогащенных Т-клетками, экспрессирующими TCR β CDR3, специфичные к антигену MAGE-A1. Высокоаффинные клоны,

идентифицированные в пуле, сильно связывали MAGE-A1:ГКГС, коррелируя с более низким EC₅₀ (фигуры 4А, 4В).

ПРИМЕР 2

ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ *IN VITRO* СПЕЦИФИЧНОГО К MAGE-A1 TCR

Высокоаффинный специфичный к MAGE-A1 клон CD8⁺ Т-клетки «МА2», полученный с использованием способа из примера 1 (фиг. 5А), был выбран для дальнейшего тестирования. Как показано на фигуре 5В, МА2⁺CD8⁺ Т-клетки селективно продуцировали цитокины при совместном культивировании с MAGE-A1-экспрессирующими клетками множественной миеломы HAL-A*0201⁺ U266 (отношение эффектор к мишени (Е:Т) 10:1, 4 часа). В стандартном четырехчасовом анализе высвобождения Cr⁵¹, МА2⁺ Т-клетки были способны вызывать гибель клетки-мишени в присутствии или в отсутствие экзогенного пептида MAGE-A1 и IFN-γ (фиг. 5С).

ПРИМЕР 3

СПЕЦИФИЧНЫЙ К MAGE-A1 CD8TCR СВЯЗЫВАЕТ ТЕТРАМЕР НЕЗАВИСИМО ОТ CD8

CD8⁺ TCR распознают антигены, презентированные молекулами HLA класса I, а TCR CD4⁺ распознают антигены, презентированные в контексте HLA класса II. Чтобы проверить, может ли высокоаффинный МА2 TCR связывать MAGE-A1:HLA I независимо от CD8, CD4⁺ Т-клетки трансдуцировали с помощью МА2 TCR (см., например, схематические диаграммы на фиг. 6А и 6В). Как показано на фигурах 7А и 7В, CD4⁺ Т-клетки, трансдуцированные связанными МА2 TCR тетрамерами MAGE-A1:HLA, с аффинностью, сопоставимой (~5-кратное различие В_{max}) с МА2 CD8⁺ Т-клетками. Однако, как показано на фигуре 7С, трансформированные CD4⁺ Т-клетки не вызывали гибель клетки-мишени *in vitro*.

ПРИМЕР 4

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ СКОНСТРУИРОВАННОЙ CD4⁺ Т-КЛЕТКИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ СПЕЦИФИЧНЫЙ К MAGE-A1 CD8 TCR И КОРЕЦЕПТОР CD8

Затем была исследована способность корецептора CD8⁺ улучшать функциональность CD4⁺ Т-клеток с высокой аффинностью, экспрессирующих CD8⁺ TCR, (см., например, фиг. 6А). Как показано на диаграмме на фигуре 8А, CD4⁺ Т-клетки трансдуцировали как высокоаффинным MAGE-A1-специфичным TCR, ограниченным классом I, так и корецептором CD8. На фигуре 8В показано, что большая доля CD4⁺ Т-клеток, трансдуцированных как экзогенным CD8 TCR, так и корецептором CD8, продуцировала цитокины в ответ на антиген, по сравнению с CD4⁺ Т-клетками, трансдуцированными только экзогенным CD8 TCR. На фигуре 8С показано, что дважды трансдуцированные CD4⁺ Т-клетки неожиданно проявляли цитолитическую активность в отношении клеток-мишеней MEL526 со скоростями, сравнимыми с CD8⁺ Т-клетками, экспрессирующими тот же высокоаффинный TCR. Как показано на фигуре 8D, дважды трансдуцированные CD4⁺ Т-клетки также пролиферировали более устойчиво после стимуляции антигеном, по сравнению с клетками МА2⁺ CD4⁺ без CD8.

Эти данные показывают, что высокоаффинные специфичные к MAGE-A1 TCR по настоящему изобретению и CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие их, полезны для нацеливания и уничтожения MAGE-A1-экспрессирующих раковых клеток и используются в клеточной иммунотерапии против заболеваний, связанных с экспрессией MAGE-A1.

Различные варианты осуществления, описанные выше, могут быть объединены для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. Все патенты США, публикации патентных заявок США, патентные заявки США, иностранные патенты, зарубежные патентные заявки и непатентные публикации, упомянутые в данном описании и/или перечисленные в Листе данных заявки, если таковые имеются, включая предварительную заявку на патент США № 62/471,956, поданную 15 марта 2017 г., полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Аспекты вариантов осуществления при необходимости могут быть модифицированы для возможности использования концепций различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения еще дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения могут быть сделаны в вариантах осуществления в свете вышеприведенного подробного описания. В целом, в следующей формуле изобретения используемые термины не должны толковаться как ограничивающие требования к конкретным вариантам осуществления, раскрытым в описании и формуле изобретения, но должны толковаться как включающие все возможные варианты осуществления вместе со всеми эквивалентами, на которые распространяется такая формула изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничивается раскрытием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

(a) вариабельный домен (V_{α}) α -цепи Т-клеточного рецептора (TCR), имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 26, 32, 38, 44, 50 или 51 и вариабельный домен (V_{β}) β -цепи TCR;

(b) домен V_{β} , имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 23, 29, 35, 41 или 47, и домен V_{α} ; или

(c) домен V_{α} , имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 26, 32, 38, 44, 50 или 51, и домен V_{β} , имеющий аминокислотную последовательность CDR3 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 23, 29, 35, 41 или 47; и

причем связывающий белок способен специфично связываться с комплексом пептид MAGE-A1:HLA на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8.

2. Модифицированная клетка в соответствии с п. 1, отличающаяся тем, что кодируемый связывающий белок способен специфично связываться с комплексом KVLEYVIKV (SEQ ID NO.:123):антиген человеческого лейкоцита (HLA) с K_d , меньшим или равным приблизительно 10^{-8} М.

3. Модифицированная клетка по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что домен V_{β} (a) получают из аллеля TRBV30, аллеля TRBV29 или аллеля TRBV9.

4. Модифицированная клетка по п. 1 или 2, отличающийся тем, что домен V_{α} (b) получают из аллеля TRAV38-1, аллеля TRAV34, аллеля TRAV16 или аллеля TRAV5.

5. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–4, отличающаяся тем, что кодируемый домен V_{α} содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с любым из SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15 и 19, и кодируемый домен V_{β} содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 90% идентична аминокислотной последовательности в соответствии с любым из SEQ ID NO.:1, 5, 9, 13, 17, при условии, что (a) по меньшей мере три или четыре CDR не имеют изменений в последовательности, причем CDR, которые действительно имеют изменения последовательности, имеют только до двух аминокислотных замен, только до пяти смежных аминокислотных делеций или их комбинации, и (b) кодируемый связывающий белок остается способным специфично связываться с комплексом пептид MAGE-A1:HLA на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8.

6. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–5, отличающаяся тем, что (a) кодируемый домен V_{α} содержит (i) аминокислотную последовательность CDR1 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 24, 30, 36, 42 и 48 и/или (ii) аминокислотную последовательность CDR2 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 25, 31, 37, 43 и 49; и/или

(b) кодируемый домен V_{β} содержит (iii) аминокислотную последовательность CDR1 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 21, 27, 33, 39 и 45 и/или (iv) аминокислотную последовательность CDR2 в соответствии с любым из SEQ ID NO: 22, 28, 34, 40 и 46.

7. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–6, отличающаяся тем, что кодируемый связывающий белок содержит:

(a) аминокислотные последовательности V_{α} CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 24–26, соответственно, и аминокислотные последовательности V_{β} CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 21–23, соответственно;

(b) аминокислотные последовательности V_{α} CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 30–32, соответственно, и аминокислотные последовательности V_{β} CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 27–29, соответственно;

(c) аминокислотные последовательности V_{α} CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 36–38, соответственно, и аминокислотные последовательности V_{β} CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 33–35, соответственно;

(d) аминокислотные последовательности V_{α} CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 42–44, соответственно, и аминокислотные последовательности V_{β} CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 39–41, соответственно; или же

(e) аминокислотные последовательности V_{α} CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 48–50, соответственно, и аминокислотные последовательности V_{β} CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 45–47, соответственно.

8. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–7, отличающаяся тем, что кодируемый связывающий белок специфично связывается с комплексом KVLEYVIKV (SEQ ID NO.:123):HLA-A*201.

9. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–8, отличающаяся тем, что кодируемый домен V_{α} содержит или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3, 7, 11, 15 или 19.

10. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–9, отличающаяся тем, что кодируемый домен V_{β} содержит или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13 или 17.

11. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–10, дополнительно содержащая гетерологичный полинуклеотид, кодирующий константный домен (C_{α}) α -цепи TCR, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16 или 20.

12. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–11, дополнительно содержащая гетерологичный полинуклеотид, кодирующий константный домен (C_{β}) β -цепи TCR, содержащий

аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14 или 18.

13. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–12, отличающийся тем, что кодируемый связывающий белок содержит домен V_{α} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 3, домен V_{β} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 1, домен C_{α} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 4 и домен C_{β} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 2.

14. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–12, отличающийся тем, что кодируемый связывающий белок содержит домен V_{α} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 7, домен V_{β} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 5, домен C_{α} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 8, и C_{β} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 6.

15. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–14, отличающийся тем, что кодируемый связывающий белок содержит домен V_{α} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 11, домен V_{β} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 9, домен C_{α} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 12 и домен C_{β} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 10.

16. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–12, отличающийся тем, что кодируемый связывающий белок содержит домен V_{α} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 15, домен V_{β} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 13, C_{α} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 16 и домен C_{β} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 14.

17. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–12, отличающийся тем, что кодируемый связывающий белок содержит домен V_{α} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 19, домен V_{β} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 17, домен C_{α} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 20 и домен C_{β} , содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 18.

18. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–17, отличающаяся тем, что связывающий белок представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR), антигенсвязывающий фрагмент TCR или химерный антигенный рецептор.

19. Модифицированная клетка в соответствии с п. 18, отличающаяся тем, что TCR, химерный антигенный рецептор или антигенсвязывающий фрагмент TCR является химерным, гуманизированным или человеческим.

20. Модифицированная клетка в соответствии с п. 18 или 19, отличающаяся тем, что антигенсвязывающий фрагмент TCR включает одноцепочечный TCR (scTCR).

21. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 18–20, отличающаяся тем, что связывающий белок представляет собой химерный антигенный рецептор, необязательно TCR-CAR.
22. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 18–20, отличающаяся тем, что связывающий белок представляет собой TCR.
23. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 1–22, отличающаяся тем, что модифицированная клетка представляет собой иммунную клетку человека.
24. Модифицированная клетка в соответствии с п. 23, отличающаяся тем, что иммунной клеткой является Т-клетка, NK-клетка или NK-Т-клетка.
25. Модифицированная клетка в соответствии с п. 24, отличающаяся тем, что иммунная клетка представляет собой CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или обе.
26. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 23–25, отличающаяся тем, что модифицированная клетка содержит нокаут хромосомного гена PD-1; гена LAG3; гена TIM3; гена CTLA4; гена компонента HLA; гена компонента TCR или любую их комбинацию.
27. Модифицированная клетка в соответствии с п. 26, отличающаяся тем, что нокаут хромосомного гена включает нокаут гена компонента HLA, выбранного из гена макроглобулина $\alpha 1$, гена макроглобулина $\alpha 2$, гена макроглобулина $\alpha 3$, гена микроглобулина $\beta 1$ или гена микроглобулина $\beta 2$.
28. Модифицированная клетка в соответствии с п. 26, отличающаяся тем, что нокаут хромосомного гена включает нокаут гена компонента TCR, выбранного из гена варибельной области α TCR, гена варибельной области β TCR, гена константной области TCR или их комбинации.
29. Модифицированная клетка в соответствии с любым из пп. 25–28, отличающаяся тем, что модифицированная клетка представляет собой CD4+ Т-клетку и дополнительно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере внеклеточную часть корцептора CD8.
30. Модифицированная клетка в соответствии с п. 29, отличающаяся тем, что полинуклеотид, кодирующий связывающий белок и/или полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере внеклеточную часть корцептора CD8, оптимизирован по кодонам для экспрессии модифицированной клеткой.
31. Композиция, содержащая модифицированную клетку в соответствии с любым из пп. 1–30 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

32. Единичная доза, содержащая эффективное количество (i) модифицированной клетки в соответствии с любым из пп. 1–30 или (ii) композиции в соответствии с п. 31.

33. Единичная доза в соответствии с п. 32, включающая, по меньшей мере приблизительно 30% модифицированных CD4+ Т-клеток в сочетании с (ii) композицией, содержащей, по меньшей мере приблизительно 30% модифицированных CD8+ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1.

34. Единичная доза в соответствии с п. 33, отличающаяся тем, что единичная доза по существу не содержит наивных Т-клеток.

35. Выделенный полинуклеотид, который кодирует связывающий белок, имеющий домен V_{α} TCR и домен V_{β} TCR, где кодируемый связывающий белок способен специфично связываться с комплексом пептид MAGE-A1:HLA на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8, при этом выделенный полинуклеотид содержит:

- (a) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 97, 103, 109, 115 или 121 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} ;
- (b) полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 94, 100, 106, 112 или 118 и полинуклеотид, кодирующий V_{α} ; или
- (c) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 97, 103, 109, 115 или 121 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 94, 100, 106, 112 или 118.

36. Выделенный полинуклеотид в соответствии с п. 35, отличающийся тем, что полинуклеотид, кодирующий V_{β} , из (a) получен из аллеля TRBV30, аллеля TRBV29 или аллеля TRBV9.

37. Выделенный полинуклеотид в соответствии с п. 35, отличающийся тем, что полинуклеотид, кодирующий V_{α} , из (b) получен из аллеля TRAV38-1, аллеля TRAV34, аллеля TRAV16 или аллеля TRAV5.

38. Выделенный полинуклеотид в соответствии с любым из пп. 35–37, содержащий:

- (a) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 97 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 94;
- (b) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 103 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 100;
- (c) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 109 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 106;
- (d) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 115 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 112;
- (e) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 121 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 118.

39. Выделенный полинуклеотид в соответствии с любым из пп. 35–38, дополнительно содержащий:

- (a) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 95, 101, 107, 113 или 119;
- (b) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 96, 102, 108, 114 или 120;
- (c) полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 92, 98, 104, 110 или 116; и/или
- (d) полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 93, 99, 105, 111 или 117.

40. Выделенный полинуклеотид в соответствии с любым из пп. 35–39, содержащий:

- (a) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 95, полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 96, полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 97, полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 92, полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 93 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 94;
- (b) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 101, полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 102, полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 103, полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 98, полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 99 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 100;
- (c) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 107, полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 108, полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 109, полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 104, полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 105 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 106;
- (d) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 113, полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 114, полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 115, полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 110, полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 111 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 112; или
- (e) полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 119, полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 120, полинуклеотид, кодирующий V_{α} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 121, полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR1, в соответствии с SEQ ID NO: 116, полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR2, в соответствии с SEQ ID NO: 117 и полинуклеотид, кодирующий V_{β} CDR3, в соответствии с SEQ ID NO: 118.

41. Выделенный полинуклеотид в соответствии с любым из пп. 35–40, в котором полинуклеотид, кодирующий V_{α} , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с SEQ ID NO: 58, 66, 74, 82 или 90, и полинуклеотид, кодирующий V_{β} , содержит нуклеотидную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 56, 64, 72, 80 или 88.

42. Выделенный полинуклеотид в соответствии с любым из пп. 35–41, отличающийся тем, что:
- (a) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 58, и полинуклеотид, кодирующий V_{β} , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 56;
 - (b) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 66, и полинуклеотид, кодирующий V_{β} , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 64;
 - (c) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 74, и полинуклеотид, кодирующий V_{β} , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 72;
 - (d) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 82, и полинуклеотид, кодирующий V_{β} , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 80;
 - (e) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 90, и полинуклеотид, кодирующий V_{β} , содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 88.
43. Выделенный полинуклеотид в соответствии с п. 42, отличающийся тем, что:
- (a) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 58, и полинуклеотид, кодирующий V_{β} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 56;
 - (b) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 66, и полинуклеотид, кодирующий V_{β} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 64;
 - (c) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 74, и полинуклеотид, кодирующий V_{β} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 72;
 - (d) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 82, и полинуклеотид, кодирующий V_{β} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 80;
 - (e) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 90, и полинуклеотид, кодирующий V_{β} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 88.
44. Выделенный полинуклеотид в соответствии с любым из пп. 35–43, дополнительно содержащий:
- (a) полинуклеотид, кодирующий домен C_{α} , имеющий по меньшей мере 80% идентичность с SEQ ID NO: 59, 67, 75, 83 или 91; и/или
 - (b) полинуклеотид, кодирующий домен C_{β} , имеющий по меньшей мере 80% идентичность с SEQ ID NO: 57, 65, 73, 81 или 89.

45. Выделенный полинуклеотид в соответствии с п. 44, причем полинуклеотид, кодирующий домен C_{α} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 59, 67, 75, 83 или 91 и полинуклеотид, кодирующий домен C_{β} , содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 57, 65, 73, 81 или 89.

46. Выделенный полинуклеотид в соответствии с п. 45, содержащий:

(а) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , в соответствии с SEQ ID NO: 58, полинуклеотид, кодирующий V_{β} , в соответствии с SEQ ID NO: 56, полинуклеотид, кодирующий домен C_{α} , в соответствии с SEQ ID NO: 59 и полинуклеотид, кодирующий домен C_{β} , в соответствии с SEQ ID NO: 57;

(b) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , в соответствии с SEQ ID NO: 66, полинуклеотид, кодирующий V_{β} , в соответствии с SEQ ID NO: 64, полинуклеотид, кодирующий домен C_{α} , в соответствии с SEQ ID NO: 67 и полинуклеотид, кодирующий домен C_{β} , в соответствии с SEQ ID NO: 65;

(c) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , в соответствии с SEQ ID NO: 74, полинуклеотид, кодирующий V_{β} , в соответствии с SEQ ID NO: 72, полинуклеотид, кодирующий домен C_{α} , в соответствии с SEQ ID NO: 75 и полинуклеотид, кодирующий домен C_{β} , в соответствии с SEQ ID NO: 73;

(d) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , в соответствии с SEQ ID NO: 82, полинуклеотид, кодирующий V_{β} , в соответствии с SEQ ID NO: 80, полинуклеотид, кодирующий домен C_{α} , в соответствии с SEQ ID NO: 83 и полинуклеотид, кодирующий домен C_{β} , в соответствии с SEQ ID NO: 81;

(e) полинуклеотид, кодирующий V_{α} , в соответствии с SEQ ID NO: 90, полинуклеотид, кодирующий V_{β} , в соответствии с SEQ ID NO: 88, полинуклеотид, кодирующий домен C_{α} , в соответствии с SEQ ID NO: 91 и полинуклеотид, кодирующий домен C_{β} , в соответствии с SEQ ID NO: 89.

47. Выделенный полинуклеотид в соответствии с любым из пп. 44–46, дополнительно включающий полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом, кодирующим α -цепь TCR и полинуклеотидом, кодирующим β -цепь TCR.

48. Выделенный полинуклеотид в соответствии с п. 47, отличающийся тем, что полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, содержит или состоит из нуклеотидной последовательности в соответствии с любым из SEQ ID NO: 128–132.

49. Выделенный полинуклеотид в соответствии с п. 47, отличающийся тем, что полинуклеотид кодирует саморасщепляющийся пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с любым из SEQ ID NO: 124–127.

50. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид в соответствии с любым из пп. 35–49, функционально связанный с последовательностью, контролирующей экспрессию.

51. Вектор экспрессии в соответствии с п. 50, отличающийся тем, что вектор способен доставлять полинуклеотид в клетку-хозяина.

52. Вектор экспрессии в соответствии с п. 51, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой гематopoэтическую клетку-предшественника или клетку иммунной системы человека.
53. Вектор экспрессии в соответствии с п. 52, отличающийся тем, что клетка иммунной системы человека представляет собой CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку, CD4-CD8-двойную отрицательную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, естественную киллерную клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию.
54. Вектор экспрессии в соответствии с п. 53, отличающийся тем, что Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, Т-клетку центральной памяти, Т-клетку эффекторной памяти или любую их комбинацию.
55. Вектор экспрессии в соответствии с любым из пп. 50–54, отличающийся тем, что вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор.
56. Вектор экспрессии в соответствии с п. 55, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор или γ -ретровирусный вектор.
57. Способ лечения гиперпролиферативного расстройства, связанного с экспрессией MAGE-A1, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, модифицированной клетки в соответствии с любым из пп. 1–30, композиции в соответствии с п. 31 или единичной дозы по любому пункту из пп. 3–34.
58. Способ в соответствии с п. 57, отличающийся тем, что гиперпролиферативное расстройство представляет собой гематологическое злокачественное заболевание или солидный рак.
59. Способ в соответствии с п. 60, в котором гематологическое злокачественное новообразование выбрано из острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), хронического эозинофильного лейкоза (ХЭЛ), миелодиспластического синдрома (МДС), неходжкинской лимфомы (НХЛ) или множественной миеломы.
60. Способ в соответствии с п. 58, отличающийся тем, что солидный рак выбран из немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), тройного негативного рака молочной железы (ТНРМЖ), рака яичника, злокачественной меланомы, рака толстой кишки, колоректальной аденокарциномы, колоректального рака, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, рака костей и мягких тканей, опухоли головного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, десмоидной опухоли, эмбрионального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, гинекологической опухоли, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака печени, рака легких, мезотелиомы, остеосаркомы, рака поджелудочной железы, аденокарциномы протоков поджелудочной железы, первичной астроцитарной опухоли, первичного рака щитовидной железы, рака простаты, рака почек, почечноклеточного рака, рабдомиосаркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, опухоли зародышевой клетки яичка, рака уротелия, саркомы матки или рака матки.

61. Способ в соответствии с любым из пп. 57–60, отличающийся тем, что модифицированная клетка способна стимулировать антиген-специфичный Т-клеточный ответ на MAGE-A1 способом, ограниченным по HLA класса I.
62. Способ в соответствии с п. 61, отличающийся тем, что ответ, ограниченный HLA класса I, является независимым от транспортеров, связанных с процессингом антигена (TAP).
63. Способ в соответствии с п. 61 или 62, отличающийся тем, что антиген-специфичный Т-клеточный ответ включает по меньшей мере один из ответа CD4+ хелперного Т-лимфоцита (Th) и ответа CD8+ цитотоксического Т-лимфоцита (ЦТЛ).
64. Способ в соответствии с п. 63, отличающийся тем, что ответ ЦТЛ направлен против клетки, имеющей aberrantную экспрессию MAGE-A1.
65. Способ в соответствии с любым из пп. 57–64, отличающийся тем, что модифицированная клетка модифицирована *ex vivo*.
66. Способ в соответствии с п. 65, отличающийся тем, что модифицированная клетка представляет собой аллогенную клетку, сингенную клетку или аутологичную клетку.
67. Способ в соответствии с любым из пп. 57–66, отличающийся тем, что модифицированная клетка представляет собой модифицированную иммунную клетку человека, причем иммунная клетка выбрана из CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, CD4-CD8-дважды отрицательной Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки, естественной киллерной клетки, дендритной клетки или любой их комбинации.
68. Способ в соответствии с п. 67, отличающийся тем, что Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, Т-клетку центральной памяти, Т-клетку эффекторной памяти или любую их комбинацию.
69. Способ в соответствии с п. 67 или 68, отличающийся тем, что Т-клетка представляет собой CD4+ Т-клетку.
70. Способ в соответствии с п. 69, отличающийся тем, что CD4+ Т-клетка дополнительно содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере внеклеточную часть корцептора CD8.
71. Способ в соответствии с п. 69 или 70, дополнительно включающий введение субъекту CD8+ Т-клетки, которая способна специфично связываться с комплексом пептид MAGE-A1:HLA на клеточной поверхности.

72. Способ в соответствии с п. 71, отличающийся тем, что CD8+ Т-клетка содержит модифицированную клетку в соответствии с любым из пп. 1–30.
73. Способ в соответствии с любым из пп. 57–72, отличающийся тем, что модифицированная клетка вводится парентерально.
74. Способ в соответствии с любым из пп. 57–73, отличающийся тем, что способ включает введение субъекту множества доз модифицированной клетки.
75. Способ по п. 74, отличающийся тем, что множество доз вводят с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель.
76. Способ в соответствии с любым из пп. 57–75, отличающийся тем, что модифицированную клетку вводят субъекту в дозе от приблизительно 10^7 клеток/м² до приблизительно 10^{11} клеток/м².
77. Способ в соответствии с любым из пп. 57–76, отличающийся тем, что способ дополнительно содержит введение цитокина.
78. Способ в соответствии с п. 77, отличающийся тем, что цитокин представляет собой IL-2, IL-15, IL-21 или любую их комбинацию.
79. Способ в соответствии с п. 78, отличающийся тем, что цитокин представляет собой IL-2 и вводится одновременно или последовательно с модифицированной клеткой.
80. Способ в соответствии с п. 79, отличающийся тем, что цитокин вводят последовательно при условии, что субъекту вводили модифицированную клетку по меньшей мере три или четыре раза перед введением цитокина.
81. Способ в соответствии с любым из пп. 78-80, отличающийся тем, что цитокин представляет собой IL-2 и вводится подкожно.
82. Способ в соответствии с любым из пп. 57–81, отличающийся тем, что субъект дополнительно получает иммуносупрессивную терапию.
83. Способ в соответствии с п. 82, отличающийся тем, что иммуносупрессивную терапию выбирают из ингибиторов кальциневрина, кортикостероидов, ингибиторов микротрубочек, низкой дозы пролекарства микофеноловой кислоты, ингибитора иммунной контрольной точки или любой их комбинации.

84. Способ в соответствии с любым из пп. 57–83, отличающийся тем, что субъекту дополнительно вводят эффективное количество стимулирующей молекулы иммунной контрольной точки.
85. Способ в соответствии с любым из пп. 57–84, отличающийся тем, что субъект получил немиелоаблативный или миелоаблативный трансплантат гемопоэтических клеток.
86. Способ в соответствии с п. 85, отличающийся тем, что субъекту вводят модифицированную клетку по меньшей мере через три месяца после пересадки немиелоаблативной гемопоэтической клетки.
87. Способ в соответствии с п. 86, отличающийся тем, что субъекту вводят модифицированную клетку по меньшей мере через два месяца после трансплантации миелоаблативной гемопоэтической клетки.
88. Способ в соответствии с любым из пп. 57–87, отличающийся тем, что субъекту вводили один или несколько из агентов гипометилирования ДНК и ингибитор HDAC.
89. Модифицированная CD4+ Т-клетка, содержащая гетерологичный полинуклеотид, кодирующий TCR из CD8+ Т-клетки, способный специфично связываться с пептидным антигеном.
90. Модифицированная CD4+ Т-клетка в соответствии с п. 89, отличающаяся тем, что TCR представляет собой высокоаффинный TCR.
91. Модифицированная CD4+ Т-клетка в соответствии с п. 89 или 90, отличающаяся тем, что TCR способен специфично связываться с комплексом пептид:антиген HLA на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8.
92. Модифицированная CD4+ Т-клетка в соответствии с любым из пп. 89–91, дополнительно содержащая гетерологичный полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере внеклеточную часть молекулы корецептора CD8.
93. Модифицированная CD4+ Т-клетка в соответствии с п. 92, отличающаяся тем, что гетерологичный полинуклеотид кодирует CD8 α и CD8 β из CD8+ Т-клетки.
94. Модифицированная CD4+ Т-клетка в соответствии с п. 92 или 93, отличающаяся тем, что модифицированная CD4+ Т-клетка способна вызывать ответ ЦТЛ при связывании с комплексом пептид:антиген HLA.
95. Модифицированная CD4+ Т-клетка в соответствии с любым из пп. 89–94, отличающаяся тем, что пептидный антиген происходит от MAGE-A1.

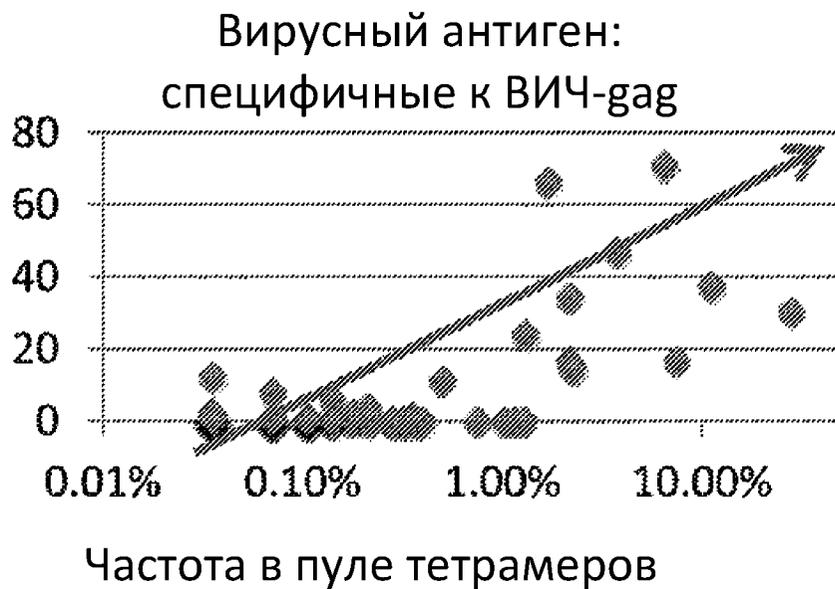
96. Способ получения модифицированной CD4+ Т-клетки, включающий трансдукцию CD4+ Т-клетки гетерологичным полинуклеотидом, кодирующим TCR из CD8+ Т-клетки, способным специфично связывать пептидный антиген.

97. Способ в соответствии с п. 96, отличающийся тем, что TCR представляет собой встречающийся в природе TCR.

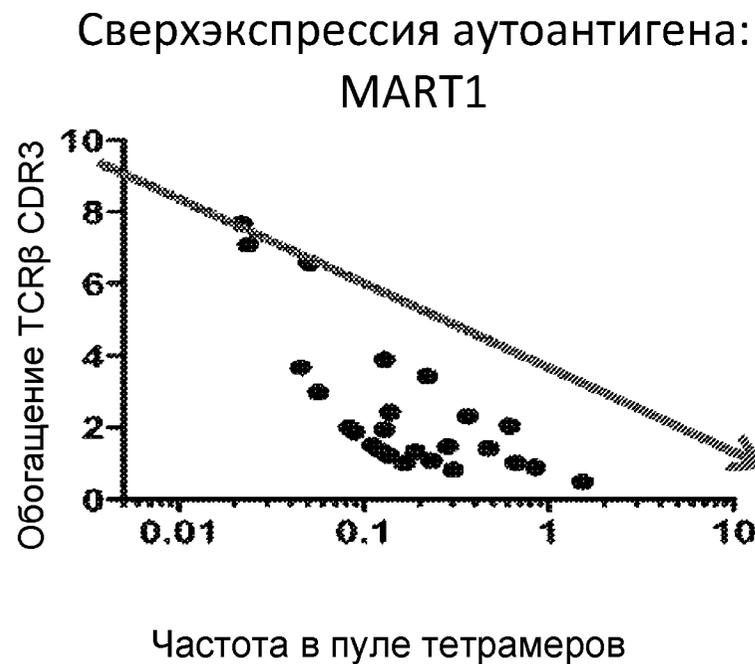
98. Способ в соответствии с п. 96 или 97, дополнительно включающий трансдукцию CD4+ Т-клетки гетерологичным полинуклеотидом, кодирующим по меньшей мере внеклеточную часть корцептора CD8.

99. Способ в соответствии с п. 98, отличающийся тем, что корцептор CD8 включает CD8 α и CD8 β из CD8+ Т-клетки.

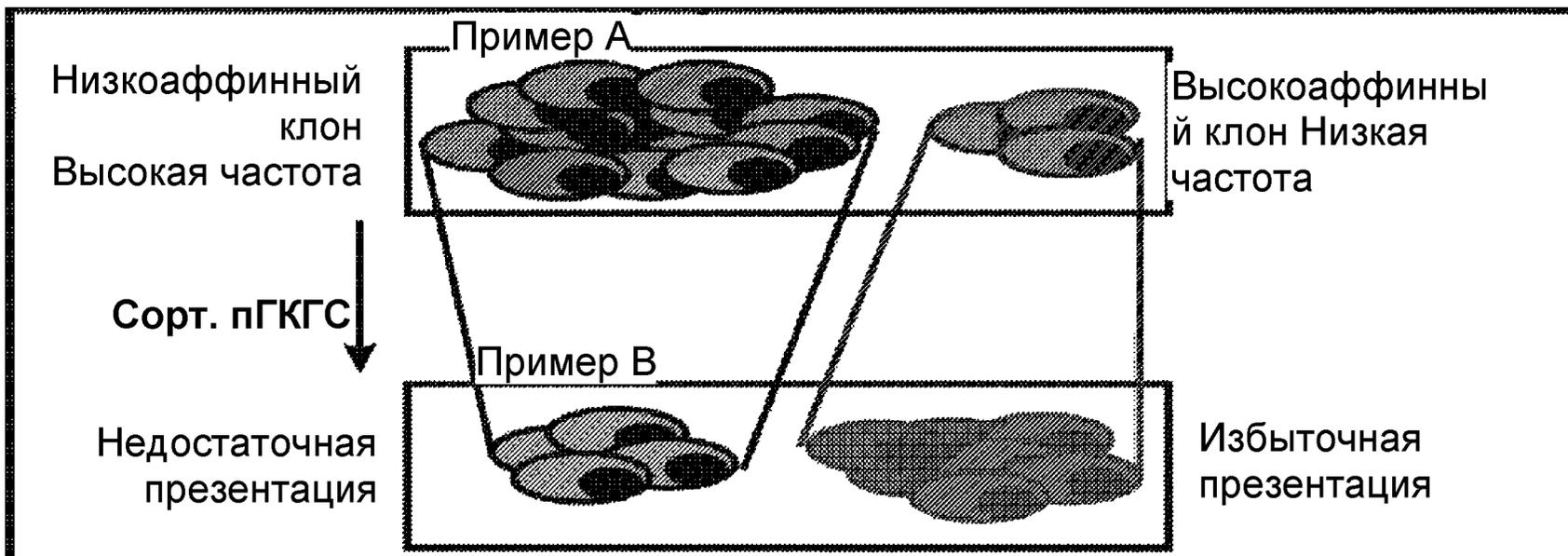
Обогащение TCRβ CDR3



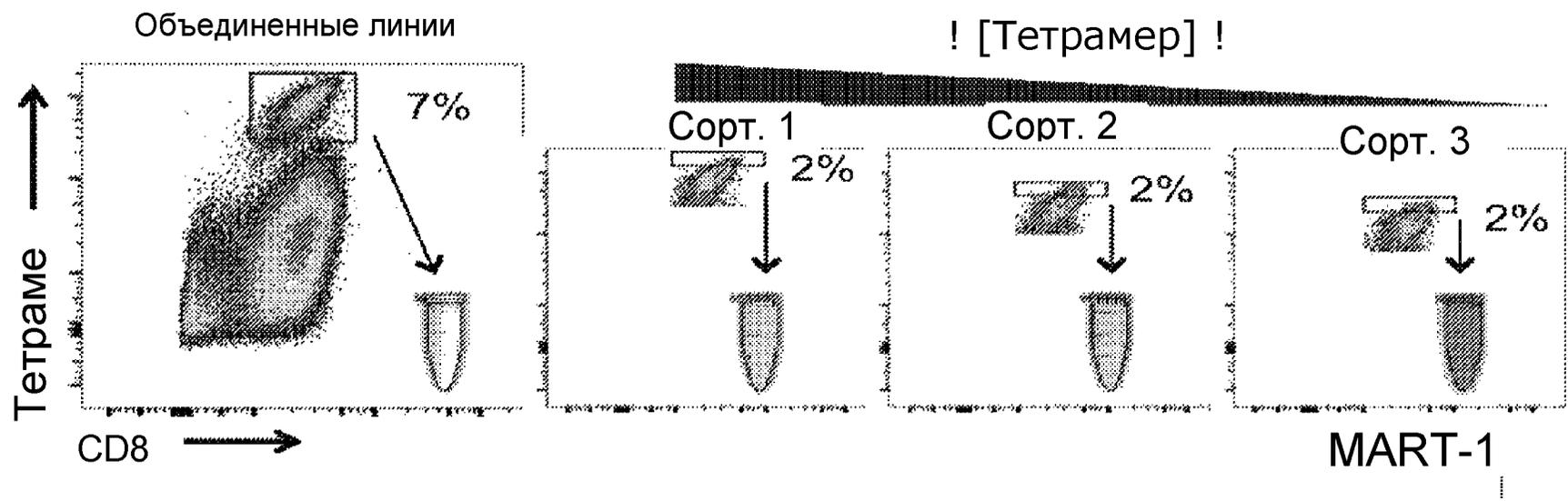
ФИГ. 1А



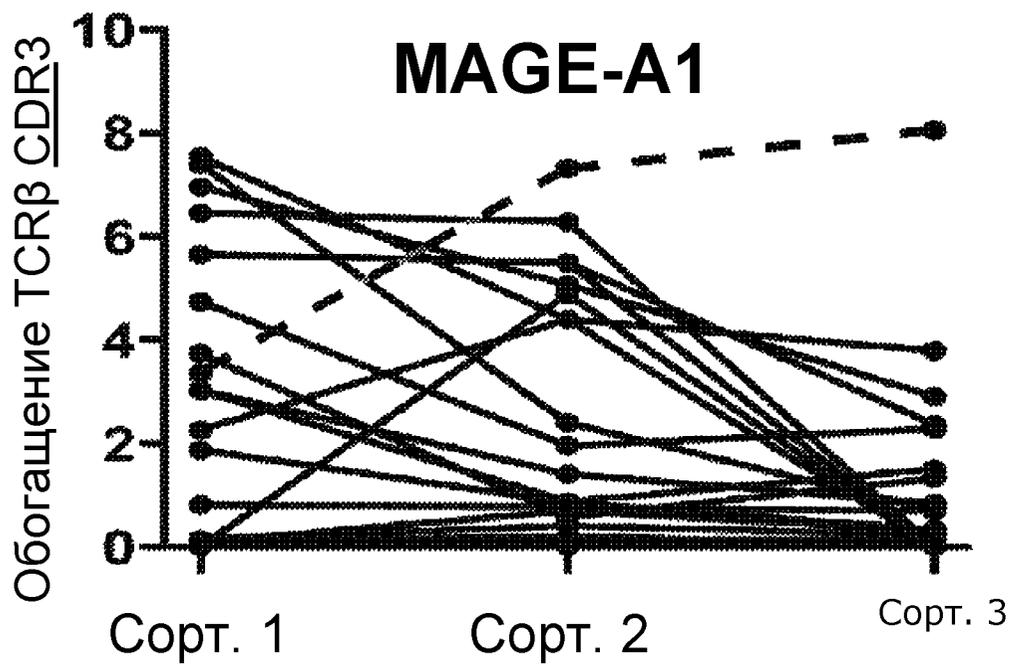
ФИГ. 1В



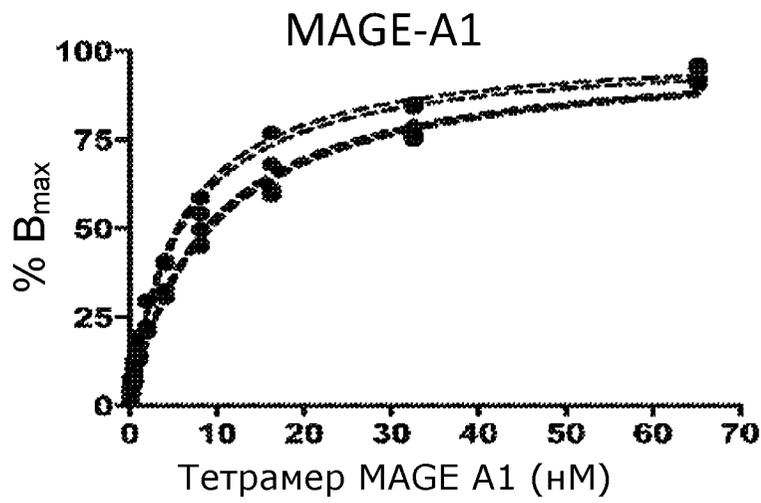
ФИГ. 2А



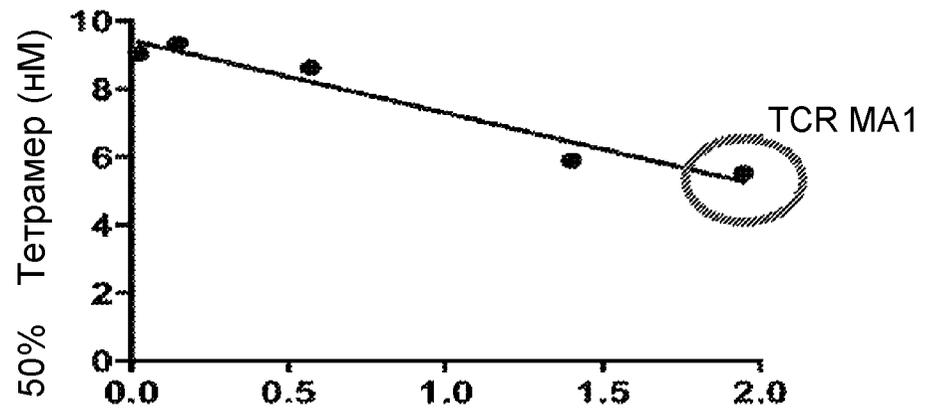
ФИГ. 2В



ФИГ. 3

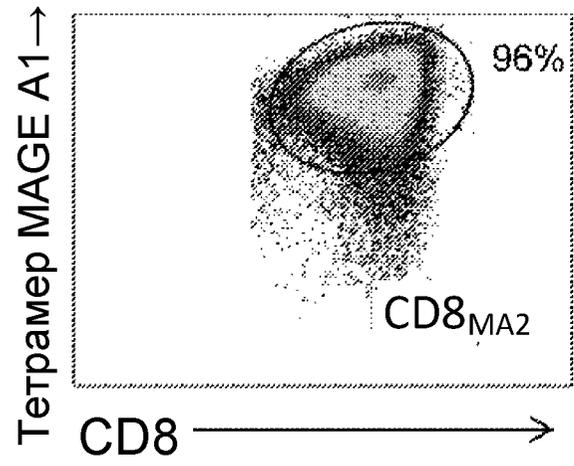


ФИГ. 4А

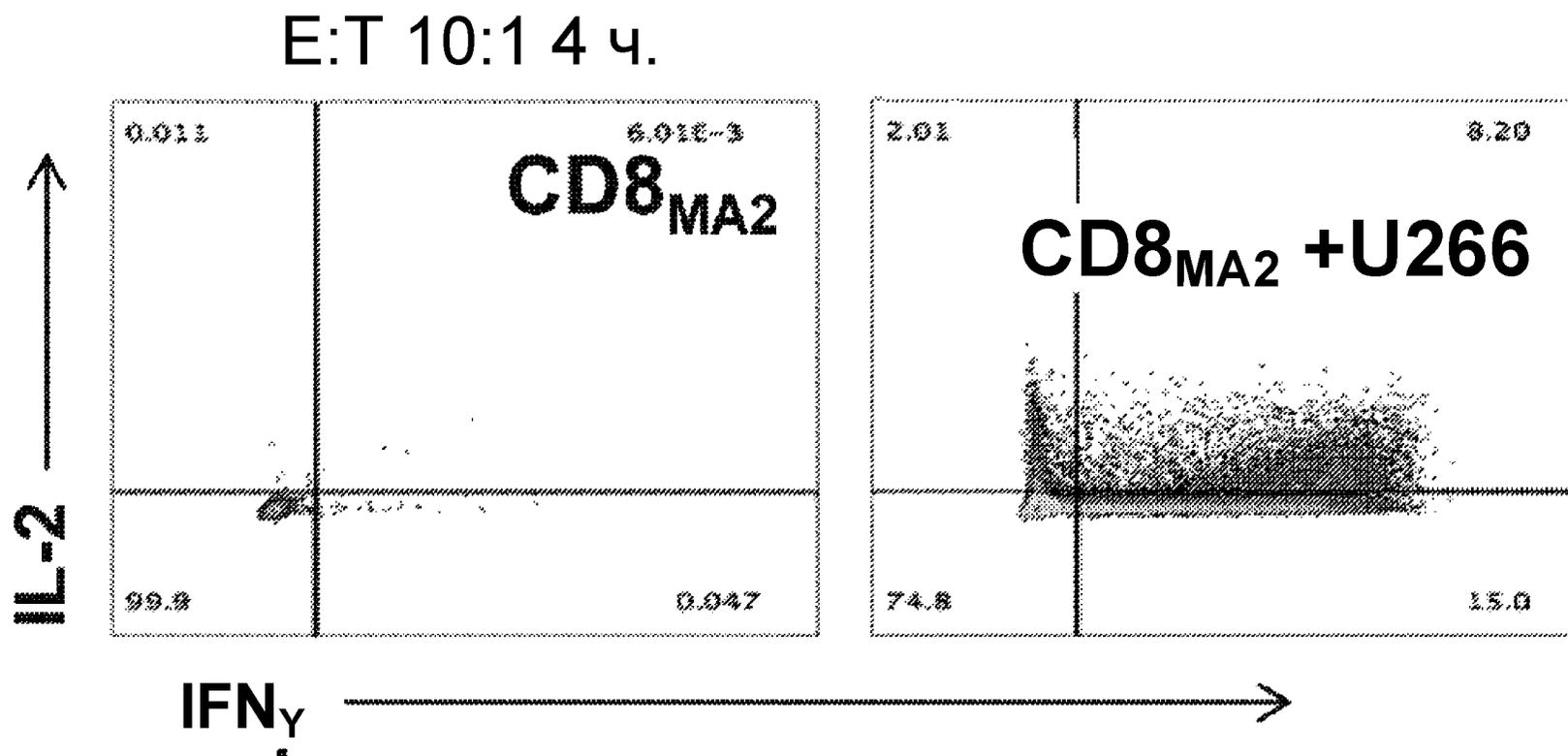


Данные обогащения

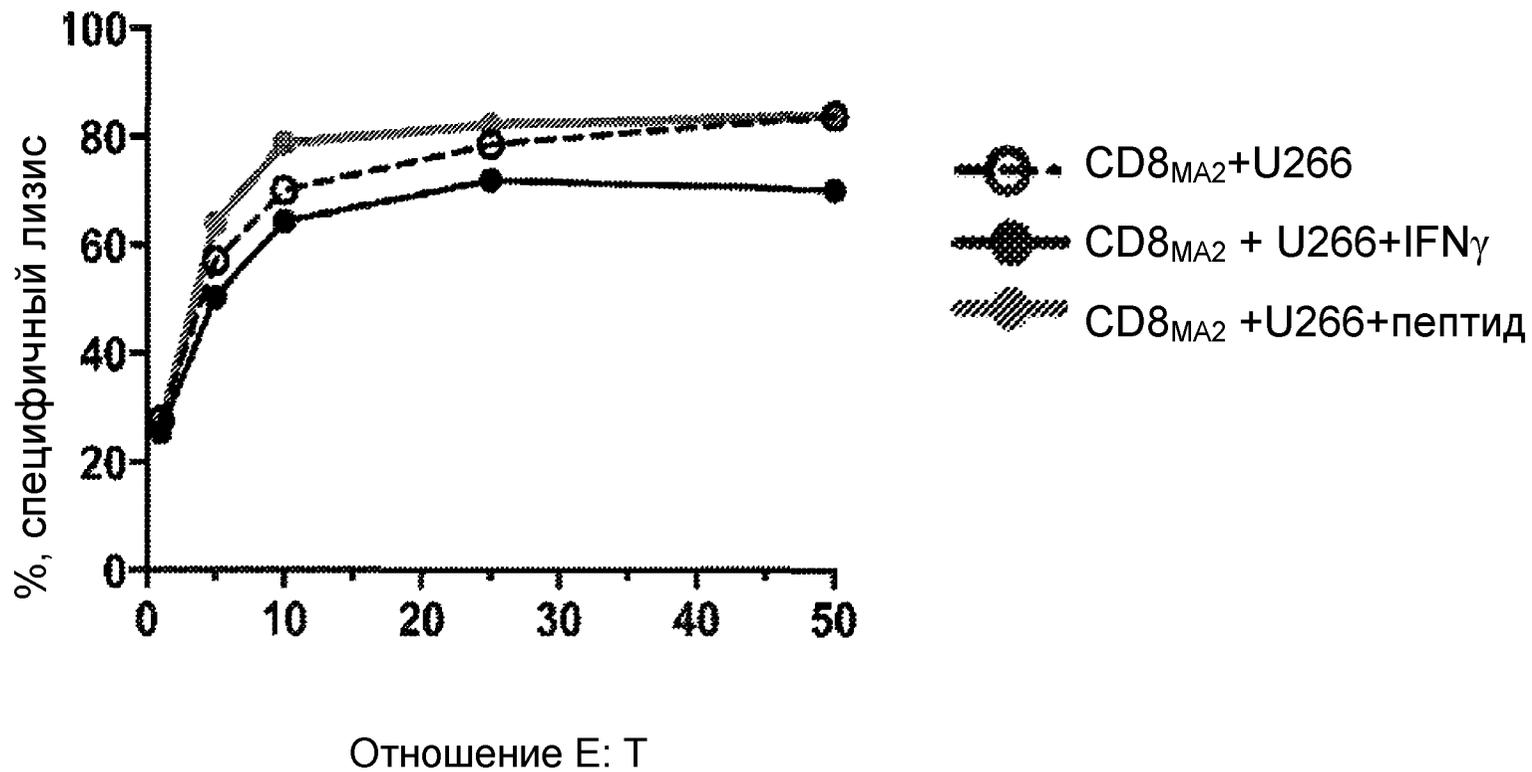
ФИГ. 4В



ФИГ. 5А



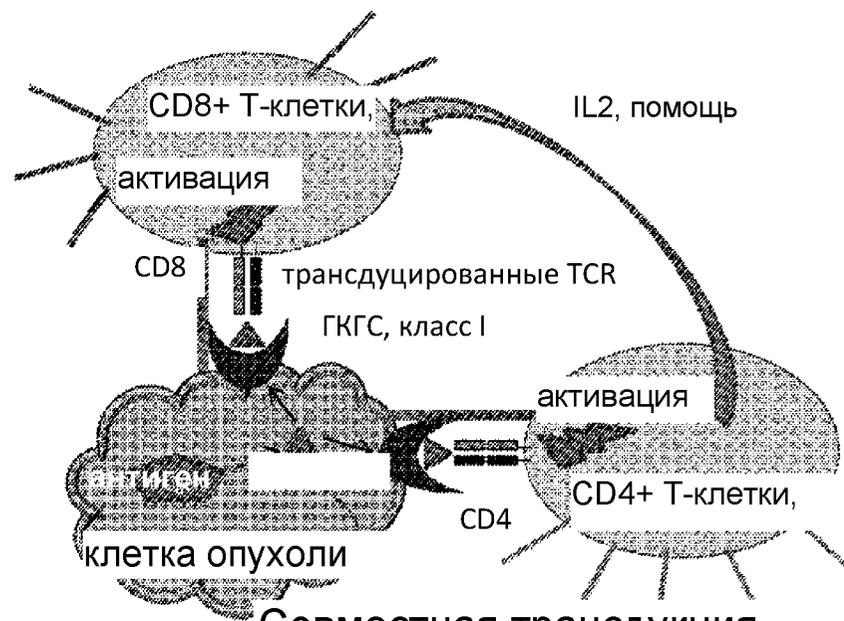
ФИГ. 5В



ФИГ. 5С

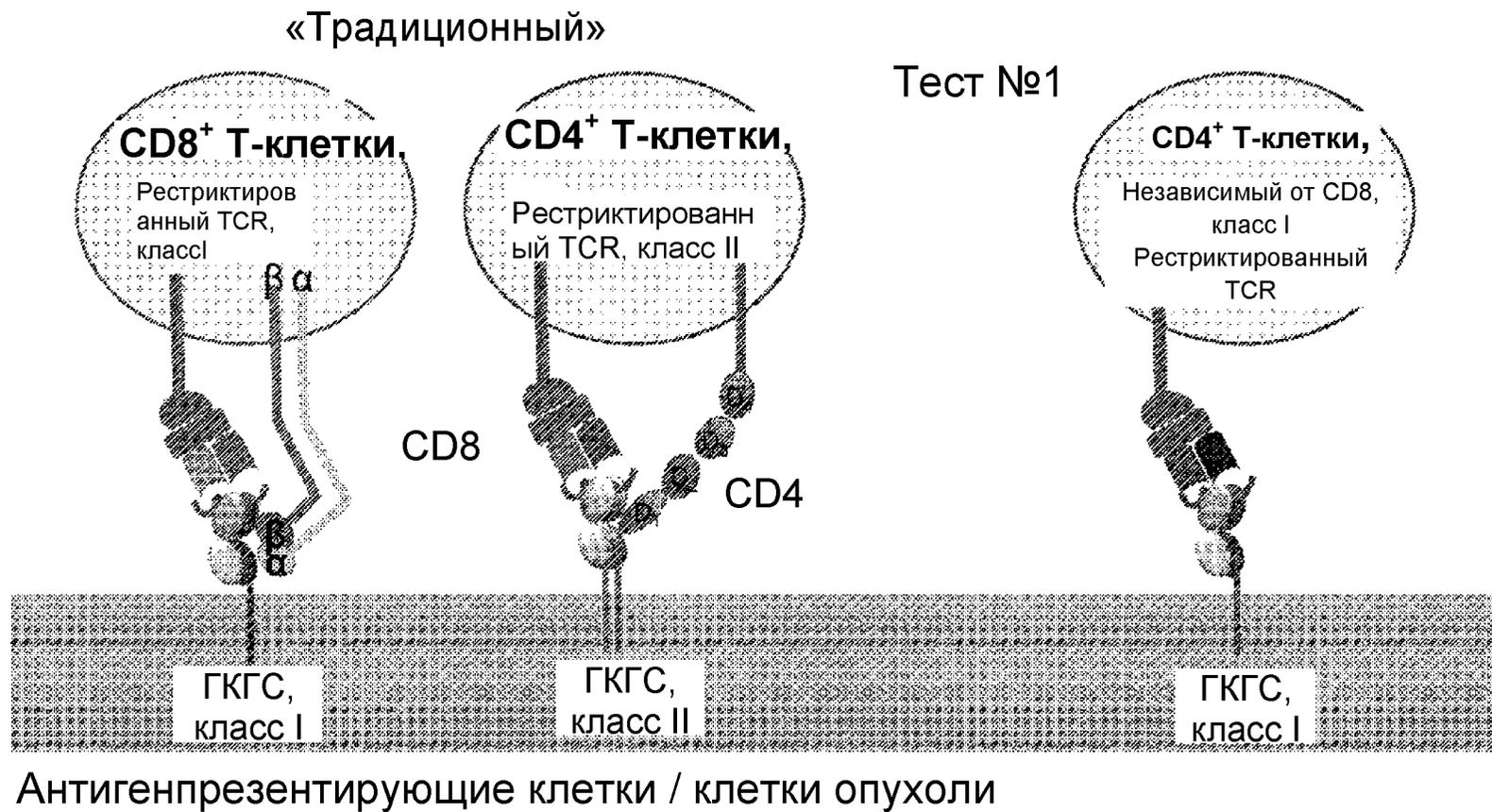
Трансдуцирование
CD8⁺ Т-клеток
специфичным к
антигену TCR.

Усиление
антигенспецифичной
гибели клеток

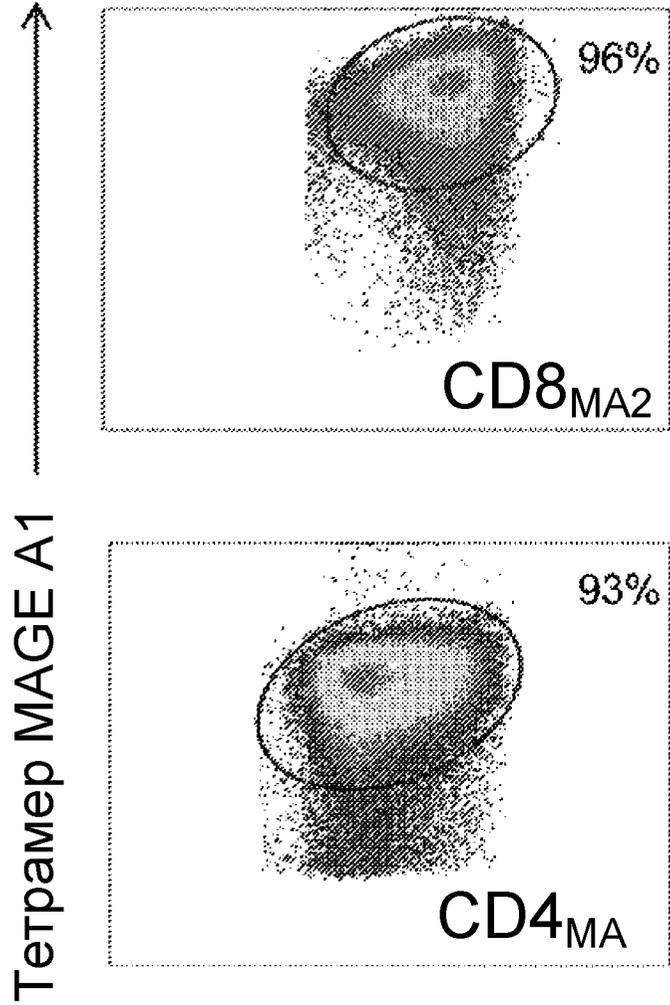


Совместная трансдукция
CD4+ Т-клеток с
антигенспецифичным TCR и
корцептором CD8.

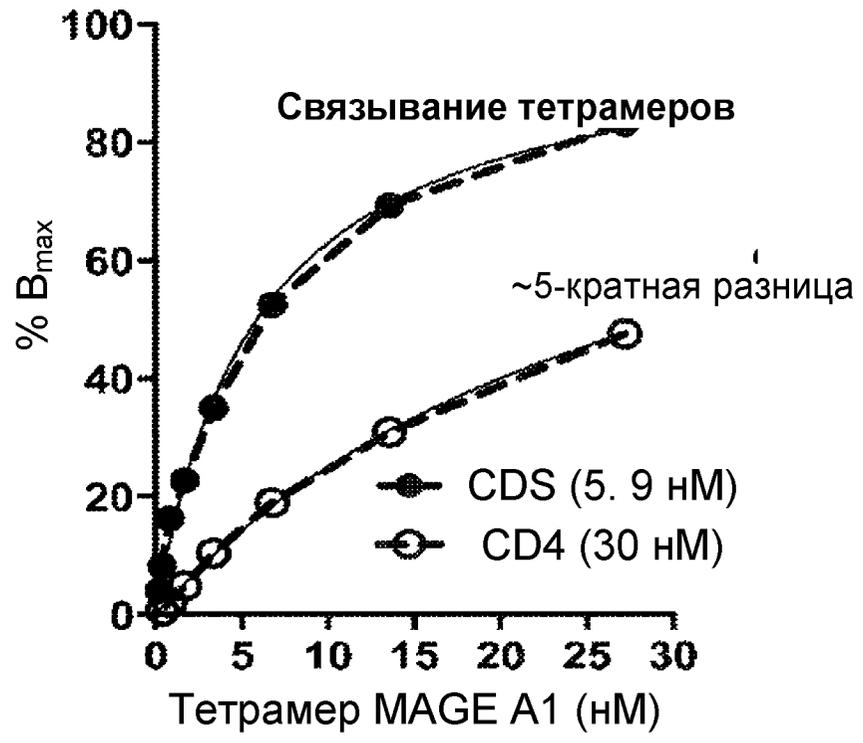
ФИГ. 6А



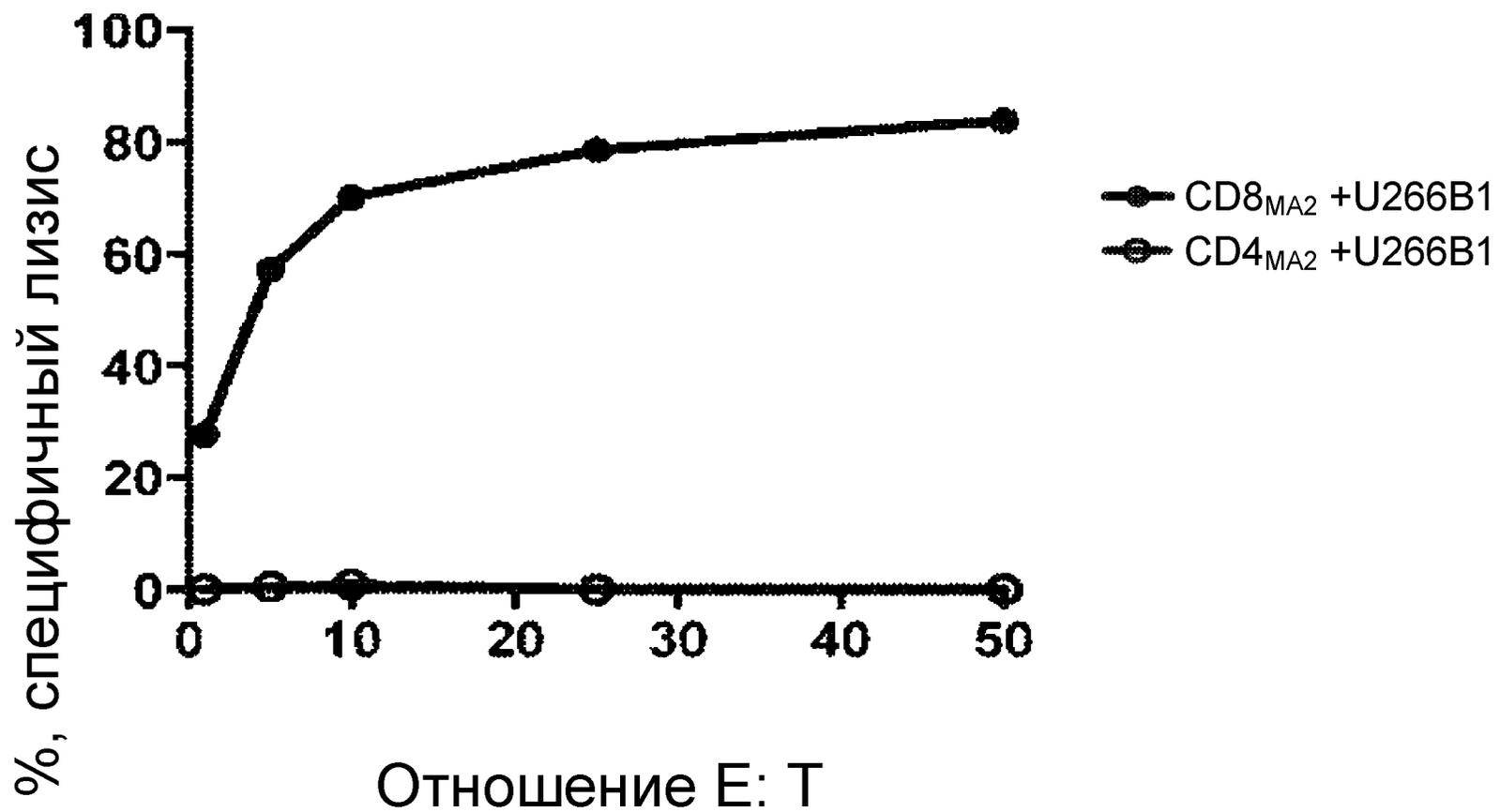
ФИГ. 6В



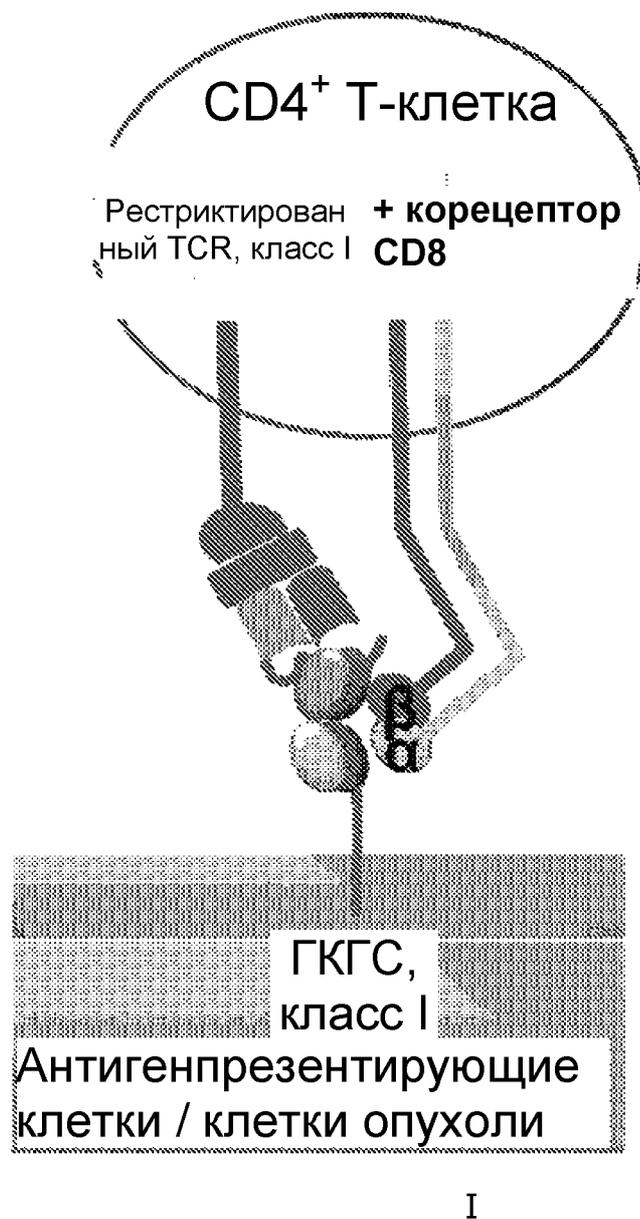
ФИГ. 7А



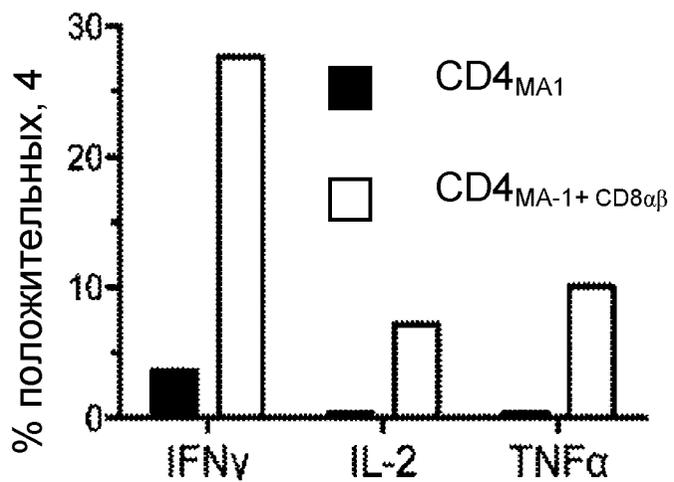
ФИГ. 7В



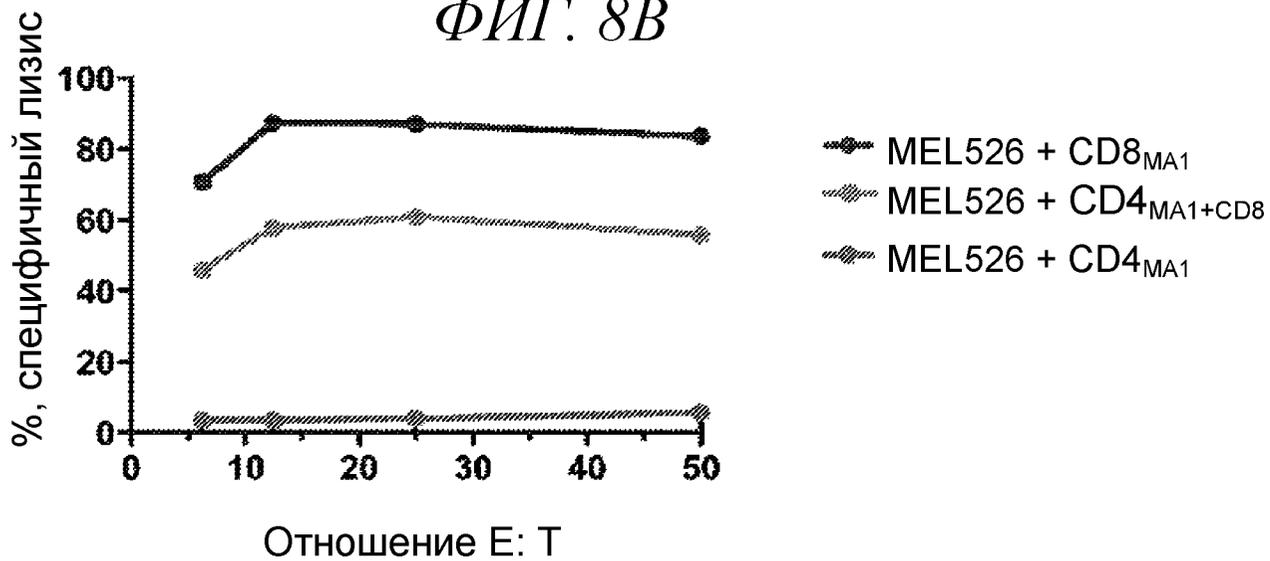
ФИГ. 7С



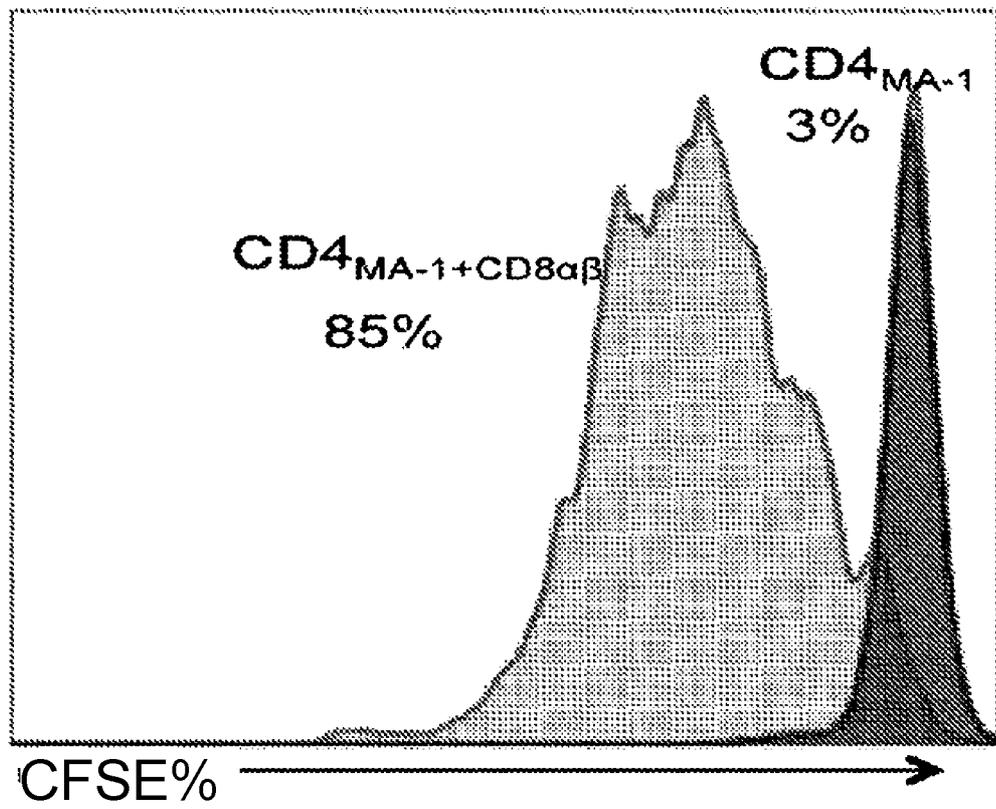
ФИГ. 8А



ФИГ. 8B



ФИГ. 8C



ФИГ. 8D