

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090712** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.24

(51) Int. Cl. *C07K 14/725* (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.05

**(54) НОВЫЕ ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДАМИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ Т-КЛЕТОЧНЫЕ
РЕЦЕПТОРЫ И ИММУННАЯ ТЕРАПИЯ С ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ**

(31) 10 2017 125 888.4; 62/582,202

(32) 2017.11.06

(33) DE; US

(86) PCT/EP2018/080176

(87) WO 2019/086665 2019.05.09

(71) Заявитель:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Ундердорбен Феликс, Бунк Себастиан,
Хофманн Мартин, Хутт Майке,
Маурер Доминик, Алтен Леони,
Вагнер Клаудиа (DE)**

(74) Представитель:
**Глухарёва А.О., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к антигенраспознающим структурам к антигенам COL6A3. В частности, в изобретении предложены новые полученные методами генной инженерии молекулы на основе Т-клеточного рецептора (ТКР), являющиеся селективными и специфическими для экспрессируемого опухолью антигена COL6A3. ТКР по изобретению и фрагменты, связывающиеся с антигеном COL6A3, образованные из этого ТКР, полезны для диагностики, лечения и профилактики раковых заболеваний, при которых экспрессируется COL6A3. Предложены также нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенраспознающие структуры по изобретению, векторы, включающие данные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные клетки, экспрессирующие эти антигенраспознающие структуры, и фармацевтические композиции, включающие соединения по изобретению.

A1

202090712

202090712

A1

НОВЫЕ ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДАМИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ Т- КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ИММУННАЯ ТЕРАПИЯ С ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антигенраспознающим структурам к антигенам COL6A3. В частности, в изобретении предложены новые полученные методами генной инженерии молекулы на основе Т-клеточного рецептора (ТКР), являющиеся селективными и специфическими для экспрессируемого опухолью антигена COL6A3. ТКР по изобретению и фрагменты, связывающиеся с антигеном COL6A3, образованные из этого ТКР, полезны для диагностики, лечения и профилактики раковых заболеваний, при которых экспрессируется COL6A3. Предложены также нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенраспознающие структуры по изобретению, векторы, включающие данные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные клетки, экспрессирующие эти антигенраспознающие структуры, и фармацевтические композиции, включающие соединения по изобретению.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Коллагены являются надсемейством белков, которые играют роль в сохранении целостности различных тканей. Коллагены являются белками внеклеточного матрикса и имеют домен с тройными спиралями в качестве их общего структурного элемента. Коллаген VI является основным структурным компонентом микрофибрилл. Основной структурной единицей коллагена VI является гетеротример альфа 1(VI), альфа 2(VI) и альфа 3(VI) цепей коллагена. Альфа 1(VI)- и альфа 2(VI)-цепи кодируют гены COL6A1 и COL6A2, соответственно. Белок, кодируемый геном COL6A3, – это субъединица альфа-3 коллагена VI типа (альфа-цепь коллагена 3(VI)) (Bertini et al., 2002 Eur. J. Paediatr. Neurol 6:193-8). Как было продемонстрировано ранее, экспрессия гена COL6A3 ассоциируется с прогрессированием рака молочной железы, и ее уровень был повышен при раке толстой кишки (Smith MJ, et al. “Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification” British journal of cancer. 2009;100:1452–1464; Tilman G et al “Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and

melanoma cells” *Mol Cancer*. 2007;6:80), а также выступает в роли прогностического маркера колоректальной карциномы (Qiao J et al. “Stroma derived COL6A3 is a potential prognosis marker of colorectal carcinoma revealed by quantitative proteomics” *Oncotarget*. 2015 Oct 6; 6(30): 29929–29946). COL6A3 локализован на хромосоме 2q37 человеческого генома и содержит 44 экзона. Белок COL6A3 состоит из 3177 аминокислот и содержит 12 доменов типа А фактора фон Виллебранда (vWA), один домен фибронектина 3 типа и один домен ингибиторов сериновых протеаз (KU) семейства BPTI/Кунитца.

Мишени иммунотерапии, основанной на Т-клетках, представлены пептидными эпитопами, полученными из опухолеассоциированных или опухолеспецифических белков, которые презентуются молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Данные опухолеассоциированные антигены (ТАА) могут быть пептидами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т. д., которые экспрессируются и обычно имеют, по сравнению с неизмененными клетками того же происхождения, повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к селективному распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение Т-клеток, специфических к опухолевым антигенам, из популяций опухоль-инфильтрирующих клеток или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют важную роль в естественной иммунной защите против рака. В частности, CD8-положительные Т-клетки, которые распознают пептиды, связанные с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса, играют важную роль в этом ответе. Эти пептиды обычно состоят из 8-10 аминокислотных остатков, полученных из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRiP), находящихся в цитозоле. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

ТКР – это гетеродимерный белок клеточной поверхности надсемейства иммуноглобулинов, которое ассоциируется с инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в опосредовании передачи сигналов. ТКР существуют в виде $\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ -гетеродимеров, которые сходны по структуре, однако имеют весьма различное анатомическое расположение и, вероятно, функции. Внеклеточная часть встречающегося в природе гетеродимерного $\alpha\beta$ ТКР состоит из двух полипептидных

цепей, каждая из которых имеет расположенный ближе к мембране константный домен и расположенный дальше от мембраны переменный домен. Каждый из константных и переменных доменов включает дисульфидную связь внутри цепи. Переменные домены содержат высоко полиморфные петли, аналогичные участкам, определяющим комплементарность (CDR) антител. Применение генной терапии на основе ТКР позволяет преодолеть многие из имеющихся преград. Она позволяет снабдить собственные Т-клетки пациента желаемой специфичностью и вырабатывать достаточное число Т-клеток в короткий период времени без их истощения. ТКР трансдуцируют в центральные Т-клетки памяти или Т-клетки с характеристиками стволовых клеток, что может обеспечить лучшую устойчивость и сохранение функциональности при переносе. Пациентам, больным раком, с лимфопенией, вызванной химиотерапией или лучевой терапией, с помощью инфузии вводят Т-клетки с встроенными ТКР, что позволяет провести успешное приживление, но при этом ингибирует иммуносупрессию.

Несмотря на достижения в разработке молекулярно-таргетных препаратов для противораковой терапии, в этой области остается потребность в развитии новых противораковых препаратов, мишенями которых были бы молекулы, высоко специфические для раковых клеток. Настоящее описание направлено на удовлетворение этой потребности, предлагая новые модифицированные COL6A3-специфичные ТКР, соответствующие рекомбинантные ТКР-структуры, нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева, которые специфически связываются с предложенными в изобретении эпитопами COL6A3; и способы применения таких молекул в лечении рака.

В первом аспекте задача изобретения решена с помощью антигенраспознающей структуры, включающей первый домен, включающий три комплементарных детерминантных участка (CDR) в соответствии с SEQ ID NO: 5 (CDRa1), 6 (CDRa2) и 7 (CDRa3), и второй домен, включающий три комплементарных детерминантных участка (CDR) в соответствии с SEQ ID NO: 13 (CDRb1), 14 (CDRb2) и 15 (CDRb3), где по меньшей мере один из указанных комплементарных детерминантных участков заменен на по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы: а) SEQ ID NO: 26 (CDRa1-mut1) и SEQ ID NO: 37 – 49 (CDRb1-mut1 по CDRb1-mut13), предпочтительно, SEQ ID NO: 40 и б) последовательности с мутациями SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 37 – 49, предпочтительно, SEQ ID NO: 40, включающую консервативные аминокислотные замены.

50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% идентичен аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 13.

В другом аспекте CDRb2 антигенраспознающей структуры может быть по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% идентичен аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 14.

В другом аспекте CDRb3 антигенраспознающей структуры может быть по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 65%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% идентичен аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 15.

В контексте настоящего изобретения авторы изобретения идентифицировали усовершенствованные генетически сконструированные варианты ТКР R4P3F9 к COL6A3, включающие последовательности CDR1 с мутациями в альфа- и бета-цепи(ях), которые улучшают стабильность, способность к распознаванию и селективность исходного R4P3F9. Выбор этих зрелых вариантов ТКР проводили с помощью двухэтапного способа, в котором на первом этапе происходит выбор вариантов по стабильности, а на втором – по аффинности (см. примеры). Поскольку ТКР по

изобретению включают участки CDR1 с мутациями, скорее всего, CDR2 и или CDR3 может также иметь мутацию в целях увеличения аффинности специфичности и/или селективности связывания, и такие мутированные CDR могли бы быть в идеальном случае включены в существующие структуры.

За счет аффинной зрелости были идентифицированы варианты со значительно более сильной активностью связывания по отношению к HLA-A*02/COL6A3-пептид при сохранении или даже улучшении специфичности. По сравнению с исходным ТКР C-1 (ТКР R4P3F9, включающий CDR дикого типа, см. Таблицу 5) у всех вариантов по изобретению улучшилось высвобождение IFN-гамма с достижением более высоких уровней уже при более низких концентрациях нагружаемого пептида.

Внутри вариабельного домена CDR1 и CDR2 расположены в вариабельном домене (V) полипептидной цепи, и CDR3 включает некоторые из V-доменов, все сегменты разнообразия (D) и соединительные сегменты (J). Предполагается, что CDR3 является наиболее вариабельным и основным CDR, отвечающим за специфическое и селективное распознавание антигена. Как ни удивительно, в случае некоторых CDR1 рецепторов ТКР, по-видимому, также контактирует пептид, и, таким образом, также отвечает за селективное распознавание. В данном случае, без привязки к какой-либо конкретной теории, мутированный CDR1b, по-видимому, взаимодействует с позицией 8 комплекса COL6A3-пептид.

Встречающиеся в природе альфа-бета гетеродимерные TCR имеют альфа-цепь и бета-цепь. Каждая альфа-цепь включает вариабельные, соединительные и константные сегменты, а бета-цепь обычно также включает между вариабельными и соединительными сегментами короткий сегмент разнообразия, однако этот сегмент разнообразия часто рассматривается как часть соединительного сегмента. Каждая вариабельная область включает три участка CDR (*Complementarity Determining Regions*, участки, определяющие комплементарность), внедренных в каркасную последовательность, один из них является гипервариабельным участком, называемым CDR3. Имеется несколько видов вариабельных областей ($V\alpha$) альфа-цепи и несколько видов вариабельных областей ($V\beta$) бета-цепи, различаемых по их каркасным областям, последовательностям CDR1 и CDR2, и по – отчасти определенной – последовательности CDR3. В номенклатуре IMGT (международная иммуногенетическая информационная

система) виды $V\alpha$ обладают уникальным номером TRAV, виды $V\beta$ – уникальным номером TRBV.

Предпочтительно, если антигенраспознающая структура согласно изобретению включает соответствующие последовательности с CDR1 по CDR3 одной отдельной раскрытой в данном документе модифицированной вариабельной области ТКР согласно изобретению. Предпочтительными являются антигенраспознающие структуры (например, $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ ТКР) по изобретению, которые включают по меньшей мере одну, предпочтительно, две последовательности CDR1 с созревшей аффинностью.

Варианты CDR, раскрываемые в данном описании, – в частности варианты CDR1 – могут быть модифицированы путем замены одного или нескольких остатков в различных, возможно селективных, участках пептидной цепи, если не заявлено иное. Такие замены носят консервативный характер, когда одна аминокислота заменяется аминокислотой с похожей структурой и характеристиками, как это происходит при замене гидрофобной аминокислоты на другую гидрофобную аминокислоту. Еще более консервативной будет замена аминокислот одинакового или похожего размера и химического характера, как, например, при замене лейцина на изолейцин. В исследованиях вариаций последовательностей внутри семейств встречающихся в природе гомологичных белков определенные замены аминокислот допускаются чаще, чем другие, и они часто связаны со сходствами по размеру, заряду, полярности и гидрофобности между исходной аминокислотой и ее заменой; и это является основой определения «консервативных замен». Предпочтительные консервативные замены определены в контексте настоящего описания как обмены внутри одной из последующих пяти групп: группа 1 – малые, алифатические, неполярные или слабо полярные остатки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); группа 2 – полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды (Asp, Asn, Glu, Gln); группа 3 – полярные, положительно заряженные остатки (His, Arg, Lys); группа 4 – крупные, алифатические, неполярные остатки (Met, Leu, Ile, Val, Cys); и группа 5 – крупные, ароматические остатки (Phe, Tyr, Trp).

Менее консервативные замены могут охватывать замену одной аминокислоты другой, имеющей похожие характеристики, но отличающейся в какой-то степени по размеру, как в случае замены аланина остатком изолейцина.

Понятия «специфичность» или «специфичность к антигену» или «специфичный к» данному антигену, используемые в настоящем контексте, означают, что антигенраспознающая структура может специфически связываться с указанным антигеном, предпочтительно антигеном COL6A3, более предпочтительно, с высокой авидностью, когда указанный антиген представляется в комплексе с HLA, предпочтительно, с HLA A2. Например, можно считать, что ТКР, представленный в качестве антигенраспознающей структуры, имеет «антигенную специфичность» к антигенам COL6A3, если Т-клетки, экспрессирующие ТКР в ответ на HLA, презентировавший COL6A3, секретируют по меньшей мере 200 пг/мл или более (например, 250 пг/мл или более, 300 пг/мл или более, 400 пг/мл или более, 500 пг/мл или более, 600 пг/мл или более, 700 пг/мл или более, 1000 пг/мл или более, 2000 пг/мл или более, 2500 пг/мл или более, 5000 пг/мл или более) интерферона γ (IFN- γ) при совместном культивировании с клетками-мишенями HLA A2, нагруженными низкой концентрацией антигена COL6A3, такого как эпитопы COL6A3 и антигены, предложенной в настоящем контексте (например, около 10^{-11} моль/л, 10^{-10} моль/л, 10^{-9} моль/л, 10^{-8} моль/л, 10^{-7} моль/л, 10^{-6} моль/л, 10^{-5} моль/л). Альтернативно или дополнительно можно считать, что ТКР имеет «антигенную специфичность» к COL6A3, если Т-клетки, экспрессирующие ТКР, секретируют по меньшей мере в два раза больше IFN- γ по сравнению с фоновым уровнем IFN- γ в нетрансдуцированных клетках при совместном культивировании с клетками-мишенями, нагруженными низкой концентрацией антигена COL6A3. Анализ такой «специфичности», описанной выше, можно провести, например, с помощью метода ELISA.

В одном альтернативном или дополнительном варианте осуществления изобретения антигенраспознающая структура является стабильной и способной специфически и/или селективно связываться с антигеном COL6A3; предпочтительно, если антиген COL6A3 является эпитопом или пептидом белка с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1, или ее вариантом, где вариант содержит делецию, добавление, вставку или замену аминокислоты не более чем в трех, предпочтительно – двух и, наиболее предпочтительно – не более чем в одной аминокислотной позиции.

Под термином «селективность» или «селективное распознавание/связывание» понимается свойство антигенраспознающей структуры, такой как ТКР или антитело, селективно распознавать или связываться, предпочтительно, только с одним

специфическим эпитопом и, предпочтительно не проявлять, или по существу не проявлять перекрестного взаимодействия с другим эпитопом. Предпочтительно, «селективность» или «селективное распознавание/связывание» означает, что антигенраспознающая структура (например, ТКР) селективно распознает или связывается с предпочтительно, только с одним специфическим эпитопом и, предпочтительно, не проявляет, или по существу не проявляет перекрестного взаимодействия с другим эпитопом, где указанный эпитоп является уникальным для одного белка, так что антигенраспознающая структура не проявляет или, по существу, не проявляет перекрестного взаимодействия с другим эпитопом и другим белком.

Антигенраспознающая структура в соответствии с изобретением предпочтительно выбрана из антитела или его производного или его фрагмента, биспецифической молекулы или Т-клеточного рецептора (ТКР) или его производного или его фрагмента. Производное или его фрагмент антитела или ТКР по изобретению предпочтительно сохраняет способность связываться/распознавать антиген, свойственную родительской молекуле, в частности, ее специфичность и/или селективность, как поясняется выше.

В одном из вариантов осуществления изобретения полученные методом генной инженерии ТКР по изобретению способны распознавать антигены COL6A3 за счет главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса. Понятие «за счет главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса» в контексте настоящего изобретения обозначает, что ТКР вызывает иммунный ответ при связывании с пептидными антигенами COL6A3 в контексте молекулы МНС I класса. Молекула МНС I класса может быть любой молекулой МНС I класса, известной в этой области техники, например, молекулами HLA-A. В предпочтительном варианте осуществления изобретения молекула МНС I класса является молекулой HLA-A2.

В изобретении предложены как одноцепочечная антигенраспознающая структура, так и двухцепочечные распознающие структуры, а также другие варианты молекул. В изобретении, в частности, в качестве антигенраспознающей структуры предложен сконструированный ТКР или его фрагмент или его производное. Предпочтительно, если это сконструированный ТКР человеческого происхождения, что подразумевает, что он получен из локуса человеческого ТКР и, таким образом, включает последовательности человеческого ТКР. Кроме того, ТКР по изобретению характеризуется как ТКР,

обладающий зрелой аффинностью, который способен специфически и селективно распознавать пептидный антиген COL6A3.

В другом варианте осуществления изобретения дополнительно или в качестве альтернативы предложена антигенраспознающая структура, описанная выше, которая вызывает иммунный ответ, предпочтительно, где иммунный ответ характеризуется увеличением уровней интерферона (ИФН)-гамма.

ТКР по изобретению могут быть предложены в виде одноцепочечных α или β , или γ или δ , молекул или, в качестве альтернативы, в виде двухцепочечной структуры, состоящей из обеих цепей, α - и β -цепи, или γ - и δ -цепи.

Наиболее предпочтительно, в некоторых дополнительных вариантах осуществления, в которых изобретение относится к антигенраспознающим структурам, включающим любую одну, две или все области CDR1 по CDR3 раскрытых в настоящем описании сконструированных цепей ТКР (см. Таблицу 1). Предпочтительными антигенраспознающими структурами могут быть такие, что включают природную или сконструированную последовательность CDR, имеющую три, два и, предпочтительно, только один модифицированный аминокислотный остаток. Модифицированный аминокислотный остаток может быть выбран из вставки, делеции или замены аминокислоты. Наиболее предпочтительно, когда все три, два, предпочтительно один модифицированный аминокислотный остаток является первым или последним аминокислотным остатком соответствующей последовательности CDR. Если модификация является заменой, тогда в некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы замена была консервативной заменой аминокислоты.

ТКР согласно изобретению могут дополнительно включать константную область, полученную от любых подходящих видов, таких как любое млекопитающее, например, человек, крыса, обезьяна, кролик, осел или мышь. В одном варианте осуществления изобретения ТКР согласно изобретению дополнительно включают константную область человека. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления константная область ТКР по изобретению может быть незначительно модифицирована, например, за счет введения гетерологичных последовательностей, предпочтительно, последовательностей мыши, что может повышать экспрессию и стабильность ТКР.

Также могут быть внедрены и другие стабилизирующие мутации, известные из уровня техники (например, DE 10 2016 123 893.7), например, замена неблагоприятных аминокислот в V-сегментах и/или введение дисульфидного мостика между C-доменами ТКР и удаление неспаренных цистеинов.

В контексте настоящего описания понятия «мышиный» или «человеческий», когда они относятся к антигенраспознающей структуре или к ТКР, или к любому из компонентов ТКР, описанных в настоящем контексте (например, участок, определяющий комплементарность (CDR), переменная область, константная область, α -цепь и/или β -цепь), обозначают ТКР (или его компонент), который получен из локуса мышинного или человеческого ТКР без перегруппировок, соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения предложены химерные ТКР, где цепи ТКР включают последовательности нескольких биологических видов. Предпочтительно, когда ТКР согласно изобретению может включать α -цепь, включающую человеческую переменную область α -цепи и, например, мышиную константную область α -цепи ТКР мыши.

В одном варианте осуществления ТКР по изобретению является человеческим ТКР, включающим человеческие переменные области в соответствии с представленными выше вариантами осуществления и человеческие константные области.

ТКР по изобретению может быть предложен в виде одноцепочечного ТКР. Одноцепочечный ТКР может включать полипептид переменной области первой цепи ТКР (например, альфа-цепи) и полипептид всей (полной длины) второй цепи ТКР целиком (например, бета-цепи), или наоборот. Более того, одноцепочечный ТКР может, необязательно, включать один или несколько линкеров, которые соединяют два или более полипептидов друг с другом. Линкер может быть, например, пептидом, который соединяет вместе две одиночные цепи согласно описанию в данном документе. Также предложен такой одноцепочечный ТКР по изобретению, который слит с человеческим цитокином, таким как ИЛ-2, ИЛ-7 или ИЛ-15.

Антигенраспознающая структура в соответствии с изобретением может быть также предложена в форме мультимерного комплекса, включающего по меньшей мере две

молекулы одноцепочечных ТКР, где каждая из указанных молекул одноцепочечных ТКР слита по меньшей мере с одним биотиновым компонентом, и где указанные одноцепочечные ТКР соединены между собой за счет взаимодействия биотин-стрептавидина, позволяя образовываться указанному мультимерному комплексу. Возможными являются также похожие подходы для получения мультимерных ТКР, и они включены в настоящее изобретение. Также предложены мультимерные комплексы более высокого порядка, включающие более чем два двухцепочечных ТКР по изобретению.

В целях настоящего изобретения ТКР является компонентом, имеющим по меньшей мере один переменный домен альфа- или гамма-цепи ТКР и/или переменный домен бета- или дельта-цепи ТКР. В основном, они включают как альфа-переменный домен ТКР, так и бета-переменный домен ТКР. Они могут быть гетеродимерами $\alpha\beta$ или могут быть в форме отдельной цепи. Для применения в рамках адаптивной терапии $\alpha\beta$ -гетеродимерные ТКР могут быть, например, трансфицированы как цепи полной длины, имеющие как цитоплазматические, так и трансмембранные домены. По желанию может присутствовать введенная дисульфидная связь между остатками соответствующих константных доменов.

В предпочтительном варианте осуществления антигенраспознающая структура является ТКР человека или его фрагментом или его производным. ТКР человека или его фрагмент или его производное является ТКР, который включает свыше 50% соответствующей последовательности ТКР человека. Предпочтительно, если только малая часть последовательности ТКР искусственного происхождения или получена от других видов. Тем не менее, известно, что преимущества имеют химерные ТКР, например, человеческого происхождения с мышиными последовательностями в константных доменах. Поэтому особенно предпочтительным является ТКР в соответствии с настоящим изобретением, который содержит мышиные последовательности во внеклеточной части их константных доменов.

Таким образом, также предпочтительным является то, что антигенраспознающая структура по изобретению способна распознавать свой пептидный антиген по зависимому от человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) механизму, предпочтительно по HLA-A02-зависимому механизму. Понятие «по HLA-зависимому

механизму» в контексте настоящего описания означает, что антигенраспознающая структура связывается с антигеном только в том случае, если антигенный пептид презентруется указанным HLA.

Антигенраспознающая структура в соответствии с изобретением в одном варианте осуществления предпочтительно индуцирует иммунный ответ, предпочтительно где иммунный ответ характеризуется повышением уровней интерферона (ИФН)-гамма.

Понятие «полипептид» в контексте настоящего описания включает олигопептиды и относится к одиночной цепи аминокислот, связанных одной или несколькими пептидными связями. В отношении полипептидов по изобретению функциональный участок может быть любым участком, включающим смежные аминокислоты ТКР (или его функционального варианта), частью которого он является, при условии, что функциональный участок специфически связывается с антигеном COL6A3, предпочтительно, как раскрыто в настоящем описании в Таблице 1. Понятие «функциональный участок», когда оно используется в отношении ТКР (или его функционального варианта), относится к любой части или фрагменту ТКР (или его функционального варианта) по изобретению, часть или фрагмент которого сохраняет биологическую активность ТКР (или его функционального варианта), частью которого он является (исходный ТКР или его исходный функциональный вариант). Функциональные участки охватывают, например, те части ТКР (или его функционального варианта), которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном COL6A3 (по HLA-A2-зависимому механизму) или выявлять, лечить или предотвращать рак в подобной степени, в равной степени или в большей степени, чем исходный ТКР (или его функциональный вариант).

Функциональный участок может включать дополнительные аминокислоты на аминном или карбоксильном конце участка или на обоих концах, на которых дополнительные аминокислоты не обнаруживаются в аминокислотной последовательности исходного ТКР или его функционального варианта. Желательно, чтобы дополнительные аминокислоты не мешали осуществлению биологической функции функционального участка, например, специфическому связыванию с антигенами COL6A3; и/или имеющейся способности выявлять рак, лечить или предотвращать рак и т. д. Более желательно, чтобы дополнительные аминокислоты усиливали биологическую

активность по сравнению с биологической активностью исходного ТКР или его функционального варианта.

Как уже упоминалось выше, функциональность по связыванию ТКР по изобретению может быть обеспечена за счет каркаса антитела. Понятие «антитело» в своих различных грамматических формах используется в настоящем контексте для обозначения молекул иммуноглобулина и иммунологически активных участков молекул иммуноглобулина, т. е. молекул, которые содержат антиген-связывающий центр или паратоп. Такие молекулы называются также «антиген-связывающие фрагменты» молекул иммуноглобулина. В изобретении далее предложено антитело или его антиген-связывающий участок, который специфически связывается с антигенами, описанными в настоящем документе. Антитело может быть иммуноглобулином любого вида, известного из уровня техники. Например, антитело может быть любого изотипа, например, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM и т. д. Антитело может быть моноклональным или поликлональным. Антитело может быть встречающимся в природе антителом, например, антителом, выделенным и/или очищенным из клеток млекопитающего, например, мыши, кролика, козы, лошади, курицы, хомяка, человека и т. д. В качестве альтернативы антитело может быть получено методами генной инженерии, например, гуманизированным антителом или химерным антителом. Антитело может быть в форме мономера или полимера.

В изобретении также предложены антигенсвязывающие участки любого из антител, описанных в данном контексте. Антигенсвязывающий участок может быть любым участком, который имеет по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, такой как Fab, F(ab')₂, dsFv, scFv, диатела и триатела. Одноцепочечный фрагмент переменной области (scFv) антитела, который состоит из усеченного фрагмента Fab, включающего переменный домен (V) тяжелой цепи антитела, связанного с V-доменом легкой цепи антитела с помощью синтетического пептида, может быть получен с помощью стандартных методик рекомбинантных ДНК. Подобным образом стабилизированные дисульфидной связью фрагменты переменной области (dsFv) могут быть получены по технологии рекомбинантных ДНК, фрагменты антител по изобретению, тем не менее, не ограничены этими отдельными типами фрагментов антител. Также антитело или его антиген-связывающий участок могут быть модифицированы таким образом, чтобы включать поддающуюся обнаружению метку, такую как, например, радиоизотоп,

флуорофор (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE)), фермент (например, щелочную фосфатазу, пероксидазу хрена) и частицы элементов (например, частицы золота).

Подходящие способы получения антител известны из уровня техники. Например, стандартные гибридомные технологии описаны, например, в работе Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988) и C.A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 8 Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). В качестве альтернативы, другие способы, такие как технологии гибридомы EBV (Haskard and Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2), 361-67 (1984) и Roder et al, *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), и векторные системы экспрессии на основе бактериофагов (см., например, Huse et al., *Science*, 246, 1275-81 (1989)) известны из уровня техники. Кроме того, способы получения антител у животных нечеловеческого происхождения описаны, например, в патентах США 5 545 806, 5 569 825 и 5 714 352 и патентной заявке США № 2002/0197266.

Некоторые варианты осуществления изобретения также относятся к ТКР или их функциональным фрагментам и их полипептидам, которые являются растворимыми ТКР. В контексте настоящего описания понятие «растворимый Т-клеточный рецептор» относится к одноцепочечным или гетеродимерным усеченным вариантам природных ТКР, которые включают по меньшей мере переменные домены α -цепи и β -цепи ТКР, связанные полипептидным линкером (SEQ ID NO: 22, 24, 25 и 27). У растворимых вариантов ТКР, как правило, отсутствуют, по меньшей мере, трансмембранные и цитозольные домены природного белка; иногда такие растворимые структуры – предпочтительно – не содержат никакие последовательности константных доменов. Структуры растворимого Т-клеточного рецептора по изобретению в предпочтительных вариантах осуществления включают структуры, состоящие из последовательностей переменных доменов α - и β -цепи, предложенных в настоящем контексте, соединенных с помощью подходящей линкерной последовательности. Последовательность переменного домена (аминокислот или нуклеиновых кислот) α -цепи и β -цепи растворимого ТКР может быть идентичной соответствующим последовательностям природного ТКР или могут включать варианты последовательностей α -цепи и β -цепи переменного домена растворимого ТКР по сравнению с соответствующими последовательностями природного ТКР. Понятие «растворимый Т-клеточный

рецептор», используемое в настоящем контексте, включает растворимые ТКР с вариантными или невариантными последовательностями α -цепи и β -цепи варибельного домена растворимого ТКР. Вариации могут быть в каркасных и/или CDR-областях последовательностей варибельных доменов α -цепи и β -цепи растворимого ТКР и могут включать, но без ограничения, мутации аминокислотной делеции, вставки, замены, а также изменения в последовательности нуклеиновой кислоты, которые не изменяют аминокислотную последовательность. Растворимый ТКР по изобретению в любом случае сохраняет или преимущественно улучшает функциональность своих исходных молекул ТКР по связыванию.

Обозначенная выше проблема решена также с помощью нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенраспознающую структуру по изобретению или любую из упомянутых ранее белковых или полипептидных структур. Нуклеиновая кислота предпочтительно (а) имеет нить, кодирующую антигенраспознающую структуру в соответствии с изобретением; (б) имеет нить, комплементарную по отношению к нити из (а); или (в) имеет нить, которая при жестких условиях гибридизируется с молекулой, описанной в (а) или (б). Жесткие условия известны специалисту данной области, в частности, из работы Sambrook и соавт., «Molecular Cloning». Кроме того, нуклеиновая кислота необязательно имеет дополнительные последовательности, которые необходимы для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, соответствующей белку, в особенности для экспрессии в клетке млекопитающего/человека. Используемая нуклеиновая кислота может быть включена в вектор, пригодный для осуществления экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, соответствующей полипептиду, в клетке. Тем не менее, нуклеиновые кислоты могут также использоваться для трансформации антигенпрезентирующей клетки, которые не ограничиваются классическими антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки, таким образом, что они сами образуют соответствующие белки на их клеточной поверхности.

Понятия «нуклеиновая кислота» в настоящем контексте включает «полинуклеотид», «олигонуклеотид» и «молекулу нуклеиновой кислоты» и в общем обозначает полимер ДНК или РНК, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным, синтезированным или полученным (например, выделенным и/или очищенным) из природных источников, который может содержать встречающиеся в природе, не

встречающиеся в природе или измененные нуклеотиды и может содержать встречающуюся в природе, не встречающуюся в природе или измененную межнуклеотидную связь, такую как фосфоамидатную связь или фосфотриоатную связь вместо фосфодиэфирной, существующей между нуклеотидами немодифицированного олигонуклеотида.

Предпочтительно, если нуклеиновые кислоты по изобретению являются рекомбинантными. В настоящем контексте понятие «рекомбинантный» означает (i) молекулы, конструкции которых получены вне живых клеток за счет соединения фрагментов встречающихся в природе или синтетических нуклеиновых кислот с молекулами нуклеиновых кислот, которые могут реплицироваться в живой клетке, или (ii) молекул, полученных в результате репликации тех, что описаны выше в (i). В целях настоящего изобретения репликация может быть репликацией *in vitro* или репликацией *in vivo*. Нуклеиновая кислота может включать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует любой из ТКР, полипептидов или белков или их функциональных фрагментов или функциональных вариантов, описанных в настоящем контексте.

Кроме того, в изобретении предложен вектор, включающий нуклеиновую кислоту в соответствии с изобретением, как описано выше. Желательно, чтобы вектор являлся вектором экспрессии или рекомбинантным вектором экспрессии. Понятие «рекомбинантный вектор экспрессии» в контексте настоящего изобретения относится к нуклеиновокислотной конструкции, которая делает возможной экспрессию мРНК, белка или полипептида в подходящей клетке-хозяине. Рекомбинантный вектор экспрессии по изобретению может быть любым подходящим рекомбинантным вектором экспрессии и может быть использован для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают такие векторы, которые сконструированы для распространения и размножения или для экспрессии или того и другого, такие как плазмиды и вирусы. Примеры векторов экспрессии животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo. Предпочтительно, когда рекомбинантный вектор экспрессии является вирусным вектором, например, ретровирусным вектором. Рекомбинантный вектор экспрессии включает регуляторные последовательности, такие как инициации транскрипции и трансляции и терминирующие кодоны, которые являются специфическими для вида клетки-хозяина (например, бактериальная, грибная,

растительная или животная), в которую необходимо ввести вектор и в которой может быть осуществлена экспрессия нуклеиновой кислоты по изобретению. Кроме того, вектор согласно изобретению может включать один или более маркерный ген, который позволяет производить выбор трансформированных или трансфицированных хозяев. Рекомбинантный вектор экспрессии может включать нативный или нормальный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей структуры по изобретению, или с нуклеотидной последовательностью, которая является комплементарной по отношению к или которая гибридизируется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей структуры по изобретению. Выбор промоторов включает, например, сильные, слабые, индуцируемые, специфические для тканей и органов промоторы. Промотор может быть вирусного или невирусного происхождения. Рекомбинантные векторы экспрессии по изобретению могут быть сконструированы для кратковременной или устойчивой экспрессии или обоих видов. Также рекомбинантные векторы экспрессии могут быть сконструированы для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии.

Изобретение также относится к клетке-хозяину, включающей антигенраспознающую структуру в соответствии с изобретением. В частности, клетка-хозяин по изобретению содержит нуклеиновую кислоту или вектор, как описано в данном контексте выше. Клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой, например, клеткой растения, животного, грибов или водорослей, или может быть прокариотической клеткой, например, клеткой бактерий или простейших. Клетка-хозяин может быть клеткой из культуры или первичной клеткой, т. е. выделенной непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может быть прилипающей клеткой или суспендированной клеткой, т. е. клеткой, выращиваемой в суспензии. В целях получения рекомбинантного ТКР, полипептида или белка клетка-хозяин предпочтительно является клеткой млекопитающего, например, клеткой яичника китайского хомяка (СНО). Наиболее предпочтительно, чтобы клетка-хозяин являлась клеткой человека. Хотя клетка-хозяин может быть клеткой любого вида, может быть получена из любого вида ткани и может находиться на любой стадии развития, предпочтительно, чтобы клетка-хозяин являлась лейкоцитом периферической крови (ЛПК) или моноклеарной клеткой периферической крови (МКПК). Более предпочтительно, если клетка-хозяин является Т-клеткой. Т-клетка может быть любой Т-клеткой, такой как Т-клетка из культуры клеток, например, первичной Т-клеткой, или Т-клеткой из культуры линии Т-клеток, например,

Jurkat, SupT1 и т. д., или Т-клеткой, полученной из организма млекопитающего, предпочтительно, Т-клеткой или предшественником Т-клетки организма пациента-человека. Если Т-клетка получена из организма млекопитающего, то она может быть получена из многочисленных источников, включая кровь, костный мозг, лимфатический узел, вилочковую железу или другие ткани или жидкости, но без ограничения перечисленным. Т-клетки также могут быть обогащены или очищены. Предпочтительно, если Т-клетка является Т-клеткой человеческого происхождения. Более предпочтительно, если Т-клетка является Т-клеткой, выделенной из человеческого организма. Т-клетка может быть Т-клеткой любого вида и любой стадии развития, включая CD4-положительные и/или CD8-положительные, CD4-положительные хелперные Т-клетки, например, клетки Th1 и Th2, CD8-положительные Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), инфильтрующие опухоль клетки (TIL), Т-клетки памяти, наивные Т-клетки и тому подобное, но без ограничения перечисленным. Предпочтительно, если Т-клетка является CD8-положительной Т-клеткой или CD4-положительной Т-клеткой.

Предпочтительно, если клетка-хозяин по изобретению является лимфоцитом, предпочтительно, Т-лимфоцитом, таким как CD4-положительная или CD8-положительная Т-клетка. Клетка-хозяин, кроме того, предпочтительно, является опухолерективной Т-клеткой, специфической для опухолевых клеток, экспрессирующих COL6A3.

В еще одном другом аспекте настоящее изобретение относится к предложенным в настоящем контексте антигенраспознающим структурам, нуклеиновым кислотам, векторам, фармацевтическим композициям и/или клетке-хозяину для применения в медицине. Применение в медицине в одном предпочтительном варианте осуществления включает применение в диагностике, предупреждении и/или лечении опухолевого заболевания, такого как злокачественное или доброкачественное опухолевое заболевание. Опухолевое заболевание является, например, опухолевым заболеванием, характеризующимся экспрессией COL6A3 в раковой или опухолевой клетке указанного опухолевого заболевания.

В отношении у упомянутого медицинского применения антигенраспознающих структур и других материалов, полученных из них, подлежащее лечению и/или диагностике

раковое заболевание может быть любым видом рака, включая любое из заболеваний: острый лимфоцитарный рак, острый миелолейкоз, альвеолярная рабдомиосаркома, рак кости, рак головного мозга, рак молочной железы, рак анального отверстия, анального канала или аноректальной области, рак глаза, рак внутривенных желчных протоков, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, полости носа или среднего уха, рак полости рта, рак влагалища, рак вульвы, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный рак, рак толстой кишки, рак пищевода, рак шейки матки, гастроинтестинальная карциноидная опухоль, глиома, ходжкинская лимфома, рак гортаноглотки, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легких, злокачественная мезотелиома, меланома, множественная миелома, рак носоглотки, неходжкинская лимфома, рак ротоглотки, рак яичника, рак пениса, рак поджелудочной железы, брюшины, сальника и рак брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечный рак, рак кожи, рак тонкой кишки, рак мягких тканей, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы, рак матки, рак мочеочника и рак мочевого пузыря. Предпочтительным видом рака является рак шейки матки, ротоглотки, анального отверстия, анального канала, аноректальной области, влагалища, вульвы или пениса. Особенно предпочтительным видом рака является COL6A3-положительный рак, включая гастроинтестинальный рак и рак желудка.

Структуры, белки, антитела к ТКР, полипептиды и нуклеиновые кислоты по изобретению предназначены, в частности, для применения в иммунной терапии, предпочтительно, в адоптивной Т-клеточной терапии. Введение соединений по изобретению может, например, включать инфузию Т-клеток по изобретению указанному пациенту. Предпочтительно, если такие Т-клетки являются аутологичными клетками пациента, трансдуцированными *in vitro* нуклеиновой кислотой или антигенраспознающей структурой согласно настоящему изобретению.

В заявке WO 2016/011210 предложены клетки, сконструированные для адоптивной терапии, в том числе НК-клетки и Т-клетки, и композиции, содержащие эти клетки, а также способы их введения субъектам. Эти клетки могут содержать полученные методами генной инженерии антигенные рецепторы, которые специфически связываются с антигенами, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR) и костимулирующие рецепторы.

Задача изобретения также решена за счет предложения способа получения линии клеток, экспрессирующей COL6A3-специфичную антигенраспознающую структуру, включающего

- а. обеспечение подходящей клетки-хозяина,
- б. обеспечение генетической конструкции, включающей кодирующую последовательность, кодирующую антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп. 1–4,
- в. внесение указанной генетической конструкции в указанную подходящую клетку-хозяина, и
- г. экспрессию указанной генетической конструкции указанной подходящей клеткой-хозяином.

Способ может далее включать этап презентации указанной антигенраспознающей структуры на поверхности указанной подходящей клетки-хозяина.

В других предпочтительных вариантах осуществления генетическая конструкция является экспрессионной конструкцией, включающей промоторную последовательность, функционально связанную с указанной кодирующей последовательностью.

Предпочтительно, если указанная антигенраспознающая структура происходит от млекопитающего, предпочтительно от человека. Предпочтительная подходящая клетка-хозяин для применения в способе по изобретению является клеткой млекопитающего, такой как клетка человека, в частности, Т-лимфоцит человека. Т-клетки для применения в изобретении описаны в настоящем контексте выше.

Изобретение включает также варианты осуществления, где указанная антигенраспознающая структура является модифицированным ТКР, где указанная модификация представляет собой добавление функциональных доменов, таких как метка или терапевтически активная субстанция. Кроме того, предложены ТКР с альтернативными доменами, такими как альтернативный мембранный якорный домен вместо эндогенной трансмембранной области.

Желательно, если система трансфекции для введения генетической конструкции в указанную подходящую клетку-хозяина является ретровирусной векторной системой. Такие системы хорошо известны для опытного специалиста.

В настоящее изобретение также включен в одном варианте осуществления дополнительный этап способа – выделения и очистки антигенраспознающей структуры из клетки и, необязательно, восстановления транслированных фрагментов антигенраспознающей структуры в Т-клетке.

В альтернативном аспекте изобретения предложена Т-клетка, полученная или которую можно получить способом получения Т-клеточного рецептора (ТКР), который специфичен для опухолевых клеток и обладает высокой авидностью, как это описывалось ранее в настоящем контексте. Такая Т-клетка зависит от клетки-хозяина, используемой в способе по изобретению, например, Т-клетка человеческого или нечеловеческого происхождения, предпочтительно, ТКР человеческого происхождения.

ТКР, полипептиды, белки, (в том числе их функциональные варианты), нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева (в том числе их популяции) и антитела (в том числе их антигенсвязывающие фрагменты) по изобретению могут быть выделены и/или очищены. Понятие «выделенный», используемое в настоящем контексте, означает удаление из естественного окружения. Понятие «очищенный», используемое в настоящем контексте, означает увеличение степени чистоты, причем «чистота» является относительным понятием и не должно обязательно истолковываться как абсолютная чистота. Например, чистота может быть по меньшей мере около 50%, может быть более 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или может быть 100%.

Антигенраспознающие структуры, ТКР, полипептиды, белки (в том числе их функциональные варианты), нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева (в том числе их популяции) и антитела (в том числе их антигенсвязывающие фрагменты) по изобретению, все из которых далее именуются совместно «ТКР-материалы по изобретению», могут быть в составе композиции, такой как фармацевтическая композиция. В этом отношении в изобретении также предложена фармацевтическая композиция, включающая любые из антигенраспознающих структур,

ТКР, полипептидов, белков, функциональных фрагментов, функциональных вариантов, нуклеиновых кислот, векторов экспрессии, клеток-хозяев (в том числе их популяции) и антител (в том числе их антигенсвязывающие фрагменты), описанных в настоящем контексте, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или стабилизатор. Фармацевтические композиции по изобретению, содержащие любой из ТКР-материалов по изобретению, могут включать более чем один ТКР-материал по изобретению, например, полипептид и нуклеиновую кислоту или два или более различных ТКР (в том числе их функциональные фрагменты и функциональные варианты). Альтернативно фармацевтические композиции могут включать ТКР-материал по изобретению в комбинации с другим(и) фармацевтически активным(и) веществом(ами) или лекарственным(и) средством(ами), таким как химиотерапевтические средства, например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фтороурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкрестин, и т. д. Предпочтительно, если носитель является фармацевтически приемлемым носителем. В отношении фармацевтических композиций носитель может быть любым из обычно используемых для конкретного рассматриваемого ТКР-материала по изобретению. Такие фармацевтически приемлемые носители хорошо известны специалистам данной области и являются общедоступными. Предпочтительно, чтобы фармацевтически приемлемый носитель был таким, который в условиях применения не имеет негативных побочных эффектов или токсичности.

Таким образом, также предложена фармацевтическая композиция, включающая любой из описанных в контексте продуктов по изобретению и ТКР-материалов по изобретению, в особенности любые белки, нуклеиновые кислоты или клетки-хозяева. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для иммунной терапии, предпочтительно для адоптивной клеточной терапии.

Предпочтительно, чтобы ТКР-материал по изобретению вводился с помощью инъекции, например, внутривенно. Если ТКР-материал по изобретению является клеткой-хозяином, экспрессирующей ТКР по изобретению (или его функциональный вариант), фармацевтически приемлемый носитель для клеток для инъекции может включать любой изотонный носитель, такой как, например, нормальный физиологический раствор

(около 0,90% мас./об. NaCl в воде, около 300 мОсм/л NaCl в воде или около 9,0 г NaCl на литр воды), электролитный раствор NORMOSOL R (Abbott, Чикаго, Иллинойс, США), PLASMA-LYTE A (Baxter, Дирфилд, Иллинойс, США), около 5% декстрозы в воде или Рингера лактат. В одном варианте осуществления в фармацевтически приемлемый носитель добавлен сывороточный альбумин человека.

В целях настоящего изобретения количество или доза (например, количество клеток, когда ТКР-материал по изобретению является одной или несколькими клетками) вводимого ТКР-материала по изобретению может быть достаточным для оказания влияния, например, вызвать терапевтический или профилактический ответ, у субъекта или животного в течение приемлемого промежутка времени. Например, доза ТКР-материала по изобретению должно быть достаточной для связывания с раковым антигеном или для выявления, лечения или предупреждения рака в течение периода времени от около 2 часов или дольше, например, 12–24 или более часов, начиная с момента введения. В определенных вариантах осуществления период времени может быть даже длиннее. Дозу определяют по эффективности конкретного ТКР-материала по изобретению и состоянию животного (например, человека), а также по весу тела животного (например, человека), подлежащего лечению.

Во внимание принимается тот факт, что фармацевтические композиции по изобретению, ТКР (в том числе их функциональные варианты), полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева или популяции клеток могут применяться в способах лечения или предупреждения рака или COL6A3-положительного предопухолевого состояния. ТКР по изобретению (и их функциональные варианты), как считается, специфически связываются с антигеном COL6A3, так что ТКР (или родственный полипептид или белок по изобретению и их функциональные варианты), когда он экспрессируется клеткой, способен опосредовать иммунный ответ по отношению к клетке-мишени, экспрессирующей антигены COL6A3 по изобретению. В этом отношении в изобретении предложен способ лечения или предупреждения состояния, в частности, рака, у млекопитающего, включающий введение млекопитающему любых из фармацевтических композиций, антигенраспознающих структур, в частности, ТКР (и их функциональных вариантов), полипептидов или белков, описанных в настоящем контексте, любой нуклеиновой кислоты или рекомбинантного вектора экспрессии, включающего нуклеотидную

последовательность, кодирующую любой из ТКР (и их функциональных вариантов), полипептидов, белков, описанных в настоящем контексте, или любой клетки-хозяина или популяции клеток, включающей рекомбинантный вектор, который кодирует любую из структур по изобретению (и их функциональные варианты), полипептиды или белки, описанные в настоящем контексте, в количестве, эффективном для лечения или предупреждения состояния у млекопитающего, где состояние является раком, предпочтительно, COL6A3-положительным раком.

Примеры фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей, применимых в рамках настоящего изобретения, включают стабилизаторы, такие как СФГА, углеводы (например, сорбит, маннит, крахмал, сахароза, глюкоза, декстран), белки, такие как альбумин или казеин, содержащие белок продукты, такие как бычья сыворотка или обезжиренное молоко, и буферы (например, фосфатный буфер).

Понятия «лечить» и «предупреждать», а также образованные от них слова в контексте настоящего описания не обязательно подразумевают 100%-ное или полное излечение или предупреждение. Скорее, это разные степени излечения или предупреждения, которые средний специалист данной области определяет как имеющие потенциальную пользу или терапевтический эффект. В этом отношении способы по изобретению могут обеспечить любую степень любого уровня излечения или предупреждения патологического состояния у млекопитающего. Кроме того, лечение или предупреждение, обеспечиваемые способом по изобретению, могут включать лечение или предупреждение одного или нескольких патологических состояний или симптомов этих состояний, например, рака, подвергающихся лечению или предупреждению. Например, лечение или предупреждение может включать стимуляцию регрессии опухоли. Также в целях настоящего изобретения «предупреждение» может охватывать замедление развития патологического состояния или его симптома или состояния.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака, включающему введение ТКР, нуклеиновой кислоты или клетки-хозяина согласно настоящему описанию в комбинации с по меньшей мере одним химиотерапевтическим препаратом и/или лучевой терапией.

Также предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающемуся в нем, включающий:

- а) выделение клетки из организма указанного субъекта;
- б) трансформацию клетки по меньшей мере одним вектором, кодирующим антигенраспознающую структуру согласно настоящему изобретению, для получения трансформированной клетки;
- в) культивирование трансформированной клетки для получения множества трансформированных клеток; и
- г) введение множества трансформированных клеток указанному субъекту.

Также предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающемуся в нем, включающий:

- а) выделение клетки из организма здорового донора;
- б) трансформацию клетки вектором, кодирующим антигенраспознающую структуру согласно настоящему изобретению, для получения трансформированной клетки;
- в) культивирование трансформированной клетки для получения множества трансформированных клеток; и
- г) введение множества трансформированных клеток указанному субъекту.

Также предложен способ выявления рака в биологическом образце, включающий:

- а) контактирование биологического образца с антигенраспознающей структурой согласно настоящему описанию;
- б) выявление связывания антигенраспознающей структуры с биологическим образцом.

В некоторых вариантах осуществления способ выявления рака осуществляется *in vitro*, *in vivo* или *in situ*.

Также предложен способ выявления патологического состояния у млекопитающего. Способ включает (i) контактирование образца, включающего одну или более клеток млекопитающего, с любыми из ТКР (и их функциональными вариантами), полипептидов, белков, нуклеиновых кислот, рекомбинантных векторов экспрессии, клеток-хозяев, популяций клеток, антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, или фармацевтическими композициями, описываемыми в настоящем контексте, что ведет к образованию комплекса, и (ii) выявление этого комплекса, причем выявление этого комплекса является индикатором наличия патологического состояния у

млекопитающего, где состояние является раковым заболеванием, таким как COL6A3-положительное злокачественное заболевание.

В отношении способа выявления патологического состояния у млекопитающего, образцом клеток может быть образец, содержащий цельные клетки, их лизаты или фракцию лизата цельных клеток, например, ядерную или цитоплазматическую фракцию, фракцию цельных белков или фракцию нуклеиновых кислот.

В целях способа выявления по изобретению контактирование по отношению к млекопитающему может проходить *in vitro* или *in vivo*. Предпочтительно, если контактирование проходит *in vitro*.

Выявление комплекса может также осуществляться с помощью любого количества способов, известных из уровня техники. Например, антигенраспознающие структуры (и их функциональные варианты), полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева, популяции клеток или антитела или ТКР или их антигенсвязывающие фрагменты, описываемые в настоящем контексте, могут быть помечены поддающейся обнаружению меткой, такой как, например, радиоизотоп, флуорофор (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE)), фермент (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена) и частицы элементов (например, частицы золота).

В целях способов по изобретению, когда вводятся клетки-хозяева или популяции клеток, клетки могут быть клетками, которые являются аллогенными или аутологичными по отношению к млекопитающему. Предпочтительно, если клетки являются аутологичными по отношению к млекопитающему.

В отношении упомянутых ранее видов медицинского применения ТКР-материала согласно изобретению, требующее лечения и/или диагностики раковое заболевание может быть любым раковым заболеванием, включая острый лимфоцитарный рак, острый миелолейкоз, альвеолярная рабдомиосаркома, рак кости, рак головного мозга, рак молочной железы, рак анального отверстия, анального канала или аноректальной области, рак глаза, рак внутрипеченочных желчных протоков, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, полости носа или среднего уха, рак полости рта,

рак влагалища, рак вульвы, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный рак, рак толстой кишки, рак пищевода, рак шейки матки, гастроинтестинальная карциноидная опухоль, глиома, ходжкинская лимфома, рак гортаноглотки, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легких, злокачественная мезотелиома, меланома, множественная миелома, рак носоглотки, неходжкинская лимфома, рак ротоглотки, рак яичника, рак пениса, рак поджелудочной железы, брюшины, сальника и рак брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечный рак, рак кожи, рак тонкой кишки, рак мягких тканей, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы, рак матки, рак мочеочника и рак мочевого пузыря. Предпочтительным видом рака является рак шейки матки, ротоглотки, анального отверстия, анального канала, аноректальной области, влагалища, вульвы или пениса. Особенно предпочтительным видом рака является COL6A3-положительный рак, такой как гастроинтестинальный рак и рак желудка.

В целом, в изобретении предложен способ лечения субъекта, страдающего от опухоли или опухолевого заболевания, который включает введение антигенраспознающих структур, нуклеиновых кислот, векторов, фармацевтических композиций и/или клетки-хозяина, как раскрыто в настоящем изобретении. Предпочтительно, если субъект является субъектом, которому необходимо такое лечение. Субъект в предпочтительных вариантах осуществления является млекопитающим субъектом, предпочтительно пациентом человеческого происхождения, страдающим от опухоли или опухолевого заболевания, являющегося COL6A3-положительным.

Настоящее изобретение будет далее описано с помощью последующих примеров со ссылкой на сопровождающие фигуры и последовательности, тем не менее, не ограничивая ими изобретение. В соответствии с целями настоящего изобретения все цитируемые источники включены в данное описание во всей полноте путем ссылки. На фигурах и в последовательностях:

На Фигуре 1 представлено превращение ТКР в стабилизированный $V\alpha/V\beta$ одноцепочечный ТКР (scTv) за счет поверхностного дисплея на основе дрожжей. Молекулы ScTv, представленные на поверхности трансформированных клеток *Saccharomyces cerevisiae* EBY100, окрашивали антителом к Vbeta1, меченым FITC, и тетрамером HLA-A*02/COL6A3-002, меченым PE. Немодифицированный scTv R4P3F9

(левая секция, SEQ ID NO: 22) сравнивается с клоном scTv с одноточечными мутациями в целях стабилизации каркаса scTv (правая секция), который был получен с помощью отбора из библиотеки случайных мутаций scTv.

На Фигуре 2 представлено созревание аффинности scTv с помощью поверхностного дисплея на основе дрожжей. Для стабилизированных молекул scTvб содержащих или не содержащих бета-цепь CDR1 с несозревшей аффинностью, производили окрашивание тетрамерами HLA-A*02, содержащими COL6A3-002 (SEQ ID NO: 1), и доокрашивание смесью тетрамеров HLA-A*02, содержащей 9 пептидов (SEQ ID NO: 28 по 36) с высоким сходством последовательностей с COL6A3-002. Стабилизированный scTv (SEQ ID NO 27) с последовательностью бета-цепи CDR1, с не созревшей аффинностью, RSGDLS (SEQ ID NO: 13) сравнивается с клонами scTv, имеющими последовательности бета-цепи CDR1 с созревшей аффинностью, AMDHPY (SEQ ID NO: 40) и ARWHRN (SEQ ID NO: 39).

На Фигуре 3 представлены профили элюции, полученные методом эксклюзионной хроматографии для гибридных вариантов анти-CD3 Fab-scTv R4P3F9S с 75-1 по 75-25.

На Фигуре 4 представлена кинетика связывания HLA-A*02/COL6A3-002 с анти-CD3 Fab-scTv R4P3F9S в гибридных вариантах с 75-1 по 75-25, измеренная с помощью биослойной интерферометрии. Указаны проанализированные концентрации HLA-A*02/COL6A3-002.

На Фигуре 5 показан анализ связывания анти-CD3 Fab-scTv R4P3F9S в гибридных вариантах с 75-1 по 75-25 по измерениям с помощью биослойной интерферометрии (BLI). Анализировали 1 мкМ HLA-A*02 в комплексе с указанными сходными пептидами.

На Фигуре 6 представлено сравнение кинетики связывания HLA-A*02/COL6A3-002 и HLA-A*02/COL6A1-001 (SEQ ID NO: 30) с анти-CD3 Fab-scTv R4P3F9S в различных гибридных вариантах. Указаны проанализированные концентрации молекул Fab-scTv.

На Фигуре 7 показано окрашивание мечеными ФЭ тетрамерами HLA-A*02/COL6A3-002 Т-клеток человека, экспрессирующих вариант ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью.

Отсутствие ТКР (имитация) или экспрессию ТКР 1G4, специфичного к NYESO1-001, и окрашивание мечеными ФЭ тетрамерами HLA-A*02/NYESO1-001 использовали в целях контроля.

На Фигуре 8 показано высвобождение IFN-гамма у варианта ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью, экспрессируемого CD8⁺ Т-клетками человека в ответ на COL6A3-002. В целях контроля ТКР не экспрессировали (имитация) или экспрессировали ТКР 1G4, специфичный к NYESO1-001. Высвобождение IFN-гамма определяли методом ELISA после совместного культивирования электропорированных CD8⁺ Т-клеток с клетками T2, нагруженными серийными разведениями COL6A3-002.

На Фигуре 9 показано высвобождение IFN-гамма у варианта ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью, экспрессируемого CD8⁺ Т-клетками человека в ответ на COL6A3-002 и различные сходные пептиды. В целях контроля ТКР не экспрессировали (имитация) или экспрессировали ТКР 1G4, специфичный к NYESO1-001. Высвобождение IFN-гамма определяли методом ELISA после совместного культивирования электропорированных CD8⁺ Т-клеток с клетками T2, нагруженными 10 мкМ COL6A3-002 или сходных пептидов.

На Фигуре 10 показано окрашивание мечеными ФЭ тетрамерами пептид-HLA-A*02 Т-клеток человека, экспрессирующих вариант ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью. В целях контроля ТКР не экспрессировали (имитация) или экспрессировали ТКР 1G4, специфичный к NYESO1-001, и проводили окрашивание мечеными ФЭ тетрамерами HLA-A*02/NYESO1-001.

На Фигуре 11 показано высвобождение IFN-гамма у варианта ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью, экспрессируемого CD8⁺ Т-клетками человека в ответ на COL6A3-002 или COL6A1-001. В целях контроля ТКР не экспрессировали (имитация) или экспрессировали ТКР 1G4, специфичный к NYESO1-001. Высвобождение IFN-гамма определяли методом ELISA после совместного культивирования электропорированных CD8⁺ Т-клеток с клетками T2, нагруженными серийными разведениями COL6A3-002 или COL6A1-001.

На Фигуре 12 показано высвобождение IFN-гамма первичными CD8⁺ Т-клетками человека, экспрессирующими варианты ТКР R4P3F9, после совместного культивирования с различными линиями опухолевых клеток. Т-клетки линий SF539, SW982 и Hs840 презентуют пептид-мишень на различных уровнях. Клетки MCF-7 не презентуют пептид-мишень. В качестве контролей анализировали эффекторные клетки без экзогенного ТКР вместе с клетками с исследуемым ТКР. Высвобождение IFN-гамма определяли методом ELISA. * отмечена точка вне масштаба.

Таблица 1: Последовательности пептида по изобретению (положения согласно нумерации IMGT):

(François Ehrenmann, Patrice Duroux, Chantal Ginestoux; Protein displays: human (Homo sapiens) TRAV; IMGT Repertoire. IMGT®, the international ImMunoGenetics information system® <http://www.imgt.org>.; Создан: 16/03/2011. Версия: 03/06/2016; François Ehrenmann, Patrice Duroux, Chantal Ginestoux; Protein displays: human (Homo sapiens) TRBV; IMGT Repertoire. IMGT®, the international ImMunoGenetics information system® <http://www.imgt.org>.; Создан: 16/03/2011. Версия: 03/06/2016.

SEQ ID NO	Название	Описание	Последовательность
1	COL6A3-002		FLLDGSANV
2	R4P3F9 альфа	ТКР R4P3F9, альфа-цепь – полной длины	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSSQFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSVLLIRDSQPSDSATYLC AAYS GAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVA WSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
3	R4P3F9, альфа, лидерный	ТКР R4P3F9, альфа-цепь – лидерный пептид	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ
4	R4P3F9, альфа, переменный	ТКР R4P3F9, альфа-цепь – переменный домен	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSSQFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSVLLIRDSQPSDSATYLC AAYS GAGSYQLTFGKGTKLSVIP
5	R4P3F9, CDRa1	ТКР R4P3F9, альфа-цепь – CDR1	DRGSQS
6	R4P3F9, CDRa2	ТКР R4P3F9, альфа-цепь – CDR2	IYSNGD
7	R4P3F9, CDRa3	ТКР R4P3F9, альфа-цепь – CDR3	CAAYSGAGSYQLT
8	R4P3F9 – альфа, константный	ТКР R4P3F9, альфа-цепь – константный домен	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVA WSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
9	R4P3F9 – альфа, константный, начало	ТКР R4P3F9, альфа-цепь – константный	NIQN

		домен, начало	
10	R4P3F9, бета	TKP R4P3F9, бета-цепь – полной длины	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLR CSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILER FSAQQFPDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYGYTFG SGTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKA TLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
11	R4P3F9, бета, лидерный	TKP R4P3F9, бета-цепь – лидерный пептид	MGFRLLCCVAFCLLGAGPV
12	R4P3F9, бета, вариабель ный	TKP R4P3F9, бета-цепь – вариабельны й домен	DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWYQQSLDQ GLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLE LGDSALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLTVV
13	R4P3F9, CDRb1	TKP R4P3F9, бета-цепь – CDR1	RSGDLS
14	R4P3F9, CDRb2	TKP R4P3F9, бета-цепь – CDR2	YYNGEE
15	R4P3F9, CDRb3	TKP R4P3F9, бета-цепь – CDR3	CASSVESSYGYT
16	R4P3F9, бета, константн ый	TKP R4P3F9, бета-цепь – константный домен	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHV ELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVVTQIVSA EAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKRKDF
17	R4P3F9, бета, константн ый, начало 1	TKP R4P3F9, бета-цепь – константный домен, начало 1	EDLNK
18	R4P3F9, бета, константн ый, начало 2	TKP R4P3F9, бета-цепь – константный домен, начало 2	EDLKN
19	Aga2p – R4P3F9	Слитый белок Aga2p с scTv R4P3F9 и метками	MQLLRCSFISFVIASVLAQELTTICEQIPSPITLESTPYSL TTTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPSTTSKGSPI NQYVFGGGGSDYKDDDDKGGGASQKEVEQNSGPLSVPEGAI ASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDG RFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQL TFGKGTKLSVIPNIQNGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGVTQT PKHLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQ YYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLELGDSALY FCASSVESSYGYTFGSGTRLTVVEDLNKAAAGGSGGEQKLI SEEDL
20	Aga2p	Лидерная последовате льность и Aga2p	MQLLRCSFISFVIASVLAQELTTICEQIPSPITLESTPYSL TTTILANGKAMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPSTTSKGSPI NQYVF
21	Метка FLAG	Метка FLAG плюс линкеры	GGGGSDYKDDDDKGGGAS
22	scTv R4P3F9	Одноцепочеч ные вариабель–	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPS DSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGSGG

		ные домены R4P3F9 с линкером; aF55S в вариационном домене альфа-цепи	GGSGGGSGGGSGVTQTTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDL SVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERSAQQFPD LHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLTVV EDLNK
23	Метка Мус	Линкер и метка Мус	AAAGGSGGEQKLISEEDL
24	scTv R4P3F9 - bQ43K	scTv R4P3F9 со стабилизирующей мутацией bQ43K в вариационном домене бета-цепи	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPS DSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGSGG GSGGGGSGGGSGVTQTTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDL SVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERSAQQFPD LHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLTVV EDLNK
25	scTv R4P3F9 - bL72S	scTv R4P3F9 со стабилизирующей мутацией bL72S в вариационном домене бета-цепи	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPS DSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGSGG GSGGGGSGGGSGVTQTTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDL SVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERSAQQFPD LHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLTVV EDLNK
26	CDRa1 мутант1	Мутация aG29R	DRRSQS
27	scTv R4P3F9S	Стабилизованная версия scTv R4P3F9	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRRSQSFFWYRQYSG KSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPS DSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPGGGGSGGGSGG GGGSGGGGSGGGSGVTQTTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGD LSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERSAQQFP DLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLTVV
28	AGRN-001	Сходные пептиды	ALLDGRVQL
29	CLASP1-001	Сходные пептиды	RLLDGAFKL
30	COL6A1-001	Сходные пептиды	IILLDGSASV
31	COL6A2-001	Сходные пептиды	FLLDGSERL
32	COL6A3-006	Сходные пептиды	FLFDGSANLV
33	COL6A3-008	Сходные пептиды	FLFDGSANL
34	COL6A3-014	Сходные пептиды	FLLDGSEGV
35	VWA2-001	Сходные пептиды	FLLDGNSV
36	VWF-001	Сходные пептиды	FLLDGSSRL
37	CDRb1, мутант 1	Бета-цепь - CDR1, вариант 1	ARWHNN
38	CDRb1, мутант 2	Бета-цепь - CDR1, вариант 2	AKDHLN

39	CDRb1, мутант 3	Бета-цепь - CDR1, вариант 3	ARWHRN
40	CDRb1, мутант 4	Бета-цепь - CDR1 вариант 4	AMDHPY
41	CDRb1, мутант 5	Бета-цепь - CDR1 вариант 5	ATDHYN
42	CDRb1, мутант 6	Бета-цепь - CDR1 вариант 6	ARYHTN
43	CDRb1, мутант 7	Бета-цепь - CDR1 вариант 7	APYHLN
44	CDRb1, мутант 8	Бета-цепь - CDR1 вариант 8	AKDHTN
45	CDRb1, мутант 9	Бета-цепь - CDR1 вариант 9	ARYHRN
46	CDRb1, мутант 10	Бета-цепь - CDR1 вариант 10	ARWHSN
47	CDRb1, мутант 11	Бета-цепь - CDR1 вариант 11	ATDHYN
48	CDRb1, мутант 12	Бета-цепь - CDR1 вариант 12	RWGDIN
49	CDRb1, мутант 13	Бета-цепь - CDR1 вариант 13	ARDHLN
50	75-1	Тяжелая цепь Fab со стабилизиро ванным scTv R4P3F9S	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKF KDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYGDS DWYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTSPSPAPPVAGQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSR GSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKAS QYVSLIIRDSQPSDSATYLCAAYSAGASYQLTFGKGTKLSV IPNIQNGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGVTPKHLI TATGQRVTLRCSPRSGDLVYWKQSLDQGLQFLIQYNGE ERAKGNISERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDALYFCASS VESSYGYTFGSGTRLTVVEDLKN
51	75- Fab тяжелая цепь	Тяжелая цепь Fab	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKF KDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYGDS DWYFDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTSPSPAPPVAG
52	75- Fab легкая цепь	Легкая цепь Fab	MKWVTFISLLFLFSSAYSIDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSG SGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
53	1G4, альфа	TKP 1G4, альфа-цепь	METLLGLLILWLQQLQWVSSKQEVTPQIPAAHSVPEGENLVLN CSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLN ASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTF

		- полной длины	GRGTS LIVHPYIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQ NLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
54	1G4, альфа, лидерный	TKP 1G4, альфа-цепь - лидерный пептид	METLLGLLILWLQLQWVSSK
55	1G4, альфа, вариабель ный	TKP 1G4, альфа-цепь - вариабель- ный домен	QEV TQIP AALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGK GLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSSGRSTLYIAASQPG DSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHP
56	1G4, альфа, константн ый	TKP 1G4, альфа-цепь - константный домен	YIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSD VYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIP EDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRIL LLKVAGFNLLMTLRLWSS
57	1G4, бета	TKP 1G4, бета-цепь - полной длины	MSIGLLCCAALSLLWAGFPV NAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQ CAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNG YNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFF GEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRV SATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDQDRA KPV TQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGK ATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
58	1G4, бета, лидерный	TKP 1G4, бета-цепь - лидерный пептид	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNA
59	1G4, бета, вариабель ный	TKP 1G4, бета-цепь - вариабель- ный домен	GVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGL RLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPS QTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVL
60	1G4, бета, константн ый	Бета-цепь - константный домен	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHV ELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDQDRAKPV TQIVSA EAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
61	NYES01- 001	Контрольный пептид	SLLMWITQV
62	C-14, бета; C- 5, бета	Бета-цепь полной длины TKP C-14; C-5 с CDRb1, мутант 4	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQTPKHLITATGQRVTLR CSPAMDHPIVYVYQQSLDQGLQFLIQYNGEERAKGNILER FSAQQFPDLHSELNLSSELGDSALYFCASSVESSYGYTFG SGTRLTVVEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRV SATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTDQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKA TLYAVLV SALVLMAMVKRKDF
63	C-14, альфа	C-14; TKP бета-цепь полной длины с CDRa1 мутант 1	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRRSQSFFWYRQYSGKSP ELIMFIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYS GAGSYQLTF GKGTKLSVIPNIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQ NLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
64	75-5	Тяжелая цепь Fab со стабилизиро ванным scTv R4P3F9S и	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKF KDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT

		CDRb1 мутант 4	HTSPSPAPPVAGQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSR GSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKAS QYVSLIIRDSQPSDSATYLCAYSGAGSYQLTFGKGTKLSV IPNIQNGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVTQTPKHLI TATGQRVTLRCS PAMDHPYVYWKQSLDQGLQFLIQYYNGE ERAKGNISERFSAQQFPDLHSELNLSSLELGDALYFCASS VESSYGYTFGSGTRLTVVEDLKN
65	75-14	Тяжелая цепь Fab со стабилизиро ванным scTv R4P3F9S, CDRa1, мутант 1, и CDRb1, мутант 4	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKF KDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTSPSPAPPVAGQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSR RSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKAS QYVSLIIRDSQPSDSATYLCAYSGAGSYQLTFGKGTKLSV IPNIQNGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVTQTPKHLI TATGQRVTLRCS PAMDHPYVYWKQSLDQGLQFLIQYYNGE ERAKGNISERFSAQQFPDLHSELNLSSLELGDALYFCASS VESSYGYTFGSGTRLTVVEDLKN
66	75-25	Тяжелая цепь Fab со стабилизиро ванным scTv R4P3F9S в бета/альфа- ориентации, CDRa1, мутант 1	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKF KDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTSPSPAPPVAGGVTVTPKHLITATGQRVTLRCS PRSGDL SVYWKQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQQFPD LHSELNLSSLELGDALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLTVV EDLKNGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQKEVEQNSGPL SVPEGAIASLNCTYSRDRRSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYS NGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIIRDSQPSDSATYLCAYSG AGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQN

ПРИМЕРЫ

Встречающиеся в природе Т-клеточные рецепторы (ТКР) к раковым антигенам зачастую обладают более низкой аффинностью по сравнению с ТКР, направленными на вирусные антигены, и это может быть одним из возможных объяснений ускользания опухолевых клеток от иммунного надзора (Aleksic et al. 2012). Таким образом, желательно иметь варианты ТКР с более высокой аффинностью, разработанные для использования в качестве антигенраспознающих структур в адоптивной клеточной терапии, или же в качестве модуля распознавания в подходе на основе растворимых схем, например, с использованием биспецифических молекул (Hickman et al. 2016). Настоящее изобретение, таким образом, относится к модификации и оптимизации встречающегося в природе Т-клеточного рецептора R4P3F9 (SEQ ID NO: 2 и 10), мишенью которого является опухолеассоциированный пептид COL6A3-002 (SEQ ID NO: 1) с аффинностью около 60 мкМ (DE102016115246).

Пример 1: Получение стабильных scTv

Для целей настоящего изобретения ранее исследованный ТКР R4P3F9 (SEQ ID NO: 2 и 10) был преобразован в одноцепочечную ТКР-структуру (scTv, SEQ ID NO: 22) для созревания по технологии поверхностного дисплея на основе дрожжей при помощи комбинации вариабельного альфа- (SEQ ID NO: 4) и бета- (SEQ ID NO: 12) домена с дополнениями в виде соответствующих константных доменов (SEQ ID NOs: 9 и 17) и подходящей глицин-сериновой линкерной последовательности. ДНК соответствующей последовательности была синтезирована и трансформирована в *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 (MATa AGA1::GAL1AGA1::URA3 ura352 trp1 leu2delta200 his3delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL) (ATCC® MYA 4941™) вместе с вектором дрожжевого дисплея, содержащим лидерную последовательность и белок Aga2p, определяющий тип спаривания у дрожжей (SEQ ID NO: 20), на основе pCT302 (Boder et al. 2000). Полученный в результате слитый белок после гомологичной рекомбинации в дрожжевых клетках (SEQ ID NO: 19) содержит лидерный пептид на N-конце белка Aga2p, отвечающего за экспонирование исследуемого белка (Boder et al. 1997), короткие пептидные метки, включающие линкерные последовательности (SEQ ID NO: 21 и 23) в целях экспрессии контролей и исследуемого белка, а именно scTv R4P3F9 (SEQ ID NO: 22) или его варианты. Трансформацию производили согласно описанию в заявке DE102016121899 с получением в результате вплоть до 10^9 дрожжевых клонов на библиотеку. Библиотеки были получены за счет случайного мутагенеза при ПЦР, охватывая целиком последовательность генов scTv R4P3F9.

Процесс отбора дрожжевых клонов с лучшим экспрессирующимся scTv, который селективно связывается с COL6A3-002 при участии HLA-A*02, производили в сущности согласно описанию в работе Smith et al 2015. В целях подтверждения высокого уровня экспрессии и правильной конформации варианта scTv R4P3F9, экспонированного на поверхности дрожжей, использовали антитело к Vbeta1 (Beckman Coulter, клон BL37.2) вместе с тетрамером HLA-A*02/COL6A3-002 (Фигура 1). Преобразование scTv с помощью поверхностного дисплея на основе дрожжей обнаружило две ключевые стабилизирующие мутации в каркасном участке, необходимом вместе с исходными последовательностями CDR для надлежащей презентации scTv на клеточной поверхности, а именно bQ43K (SEQ ID NO: 24) и bL72S (SEQ ID NO: 25), обе из которых расположены на бета-цепи. Кроме того, во время созревания стабильности в положении 29 в CDR1 альфа-цепи (SEQ ID NO: 5) было сделано преобразование: глицин в аргинин

(мутант 1 CDRa1, SEQ ID NO: 26), что привело к улучшенному связыванию с тетрамером.

Пример 2: Созревание аффинности стабилизированных scTv

В целях получения молекул scTv с более высокой аффинностью связывания по отношению к HLA-A*02/COL6A3-002, производили вырождение CDRb1 (SEQ ID NO: 13) с использованием предварительно идентифицированного стабилизированного каркаса scTv R4P3F9S (SEQ ID NO: 27), экспрессирующего стабилизирующие мутации aG29R, bQ43K и bL72S. Остатки CDRb1 рандомизировали с помощью вырожденных олигонуклеотидных праймеров ДНК, по существу, как было описано ранее (Smith et al. 2015). Полученную в результате ДНК-библиотеку трансформировали согласно описанию Примера 1. Чтобы сохранить селективность связывания scTv, негативный отбор использовали против тетрамеров HLA-A*02, включающих пептиды, полученные из нормальных тканей (SEQ ID NO: 28–36), которые обладают высоким сходством последовательности с пептидом COL6A3-002.

Чтобы произвести отбор вариантов scTv R4P3F9S с увеличенной аффинностью и селективностью, использовали тетрамер HLA-A*02/COL6A3-002 со снижением концентраций для каждого этапа сортировки. После трех этапов отбора выделяли и секвенировали отдельные клоны scTv, получая в результате ряд последовательностей CDRb1 с созревшей аффинностью (SEQ ID NO: 37 по 49). Для scTv с последовательностями CDRb1 с созревшей аффинностью, могло быть продемонстрировано сильное улучшение способности связывания с COL6A3-002, тогда как селективность связывания с COL6A3-002 сохранялась, поскольку связывания для 9 сходных пептидов не наблюдалось (Фигура 2).

Пример 3: Производство слитых белков «биспецифическое антитело-scTv»

Стабилизированный scTv с созревшей аффинностью к HLA-A*02/COL6A3-002 может быть экспрессирован в слитой форме с фрагментом антитела к CD3, делая возможным опухолеспецифическое перенаправление на мишень и активацию Т-клеток вне зависимости от их природной специфичности. Авторы изобретения получили слитые белки «биспецифическое антитело-ТКР», включающие тяжелую цепь антитела с анти-CD3 Fab-фрагментом (UCHT1) (SEQ ID NO: 51), слитую с вариантами scTv R4P3F9S (SEQ ID NO: 50, 64, 65 и 66) и легкую цепь антитела с анти-CD3 Fab-фрагментом

(UCHT1) (SEQ ID NO: 52). Полученные в результате слитые белки Fab-scTv обладают молекулярной массой приблизительно 75 кДа. На основании различных CDR1-последовательностей scTv R4P3F9S альфа- (SEQ ID NO: 5 и 26) и бета-цепи (SEQ ID NO: 13 и 37 по 49) различные варианты слияния Fab-scTv (75-1 по 75-25, Таблица 2) были экспрессированы в транзитрно трансфицированные клетки ExpiCHO согласно рекомендациям производителя. Белки были очищены с помощью хроматографии с белком L и эксклюзионной хроматографии. Все варианты слияния могли быть получены с выходом в диапазоне от 80 мкг вплоть до 1 мг (Таблица 2) и гетеродимерами однородной формы ожидаемого размера согласно результатам анализа с помощью эксклюзионной хроматографии (Фигура 3).

Таблица 2: Номенклатура и выход слитых белков «биспецифический Fab-scTv». В основе молекулы лежат последовательности SEQ ID NO 50 и 52 и указанные варианты CDRa1 и CDRb1.

Вариант	CDRa1/SEQ	CDRb1/SEQ	Выход [мг]
75-1	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)	267,9
75-2	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARWHNN (SEQ ID NO. 37)	78,4
75-3	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AKDHLN (SEQ ID NO. 38)	646,7
75-4	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARWHRN (SEQ ID NO. 39)	704,3
75-5	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AMDHPY (SEQ ID NO. 40)	397,2
75-6	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ATDHYN (SEQ ID NO. 41)	268,1
75-7	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARYHTN (SEQ ID NO. 42)	83,2
75-8	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	APYHLN (SEQ ID NO. 43)	765,7
75-9	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AKDHTN (SEQ ID NO. 44)	1067,2
75-10	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)	389,6
75-11	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARWHNN (SEQ ID NO. 37)	270,4
75-12	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AKDHLN (SEQ ID NO. 38)	943,6
75-13	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARWHRN (SEQ ID NO. 39)	560,3
75-14	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AMDHPY (SEQ ID NO. 40)	360,7
75-15	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ATDHYN (SEQ ID NO. 41)	541,5
75-16	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARYHTN (SEQ ID NO. 42)	403,6
75-17	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	APYHLN (SEQ ID NO. 43)	195,5
75-18	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AKDHTN (SEQ ID NO. 44)	731,3
75-19	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARYHRN (SEQ ID NO. 45)	794
75-20	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARWHSN (SEQ ID NO. 46)	85,5
75-21	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ATDHYN (SEQ ID NO. 47)	276
75-22	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	RWGD LN (SEQ ID NO. 48)	255
75-23	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARDHLN (SEQ ID NO. 49)	217
75-24 ^a	DRGSQS (SEQ ID NO: 5)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)	166,6
75-25 ^a	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)	267

^a бета-альфа-ориентация scTv

Пример 4: Связывание слитых белков Fab-scTv с COL6A3-002 и сходными пептидами

Аффинность связывания слитых белков анти-CD3-scTv R4P3F9S по отношению к мономерам HLA-A*02 с пептидом COL6A3-002 или различными сходными пептидами измеряли с помощью биослойной интерферометрии. Измерения проводили на системе Octet RED384 с использованием настроек, рекомендованных производителем. Вкратце, очищенные молекулы Fab-scTv загружали на биосенсоры (FAB2G) до проведения анализа серийных разведений HLA-A*02/COL6A3-002. В сравнении с вариантами 75-1 и 75-24, включающими CDRa1 дикого типа и CDRb1 дикого типа, для вариантов Fab-scTv с последовательностями CDRa1 и/или CDRb1 с созревшей аффинностью наблюдалось повышение уровня аффинности связывания вплоть до 40 раз (Таблица 3, Фигура 4). В целях оценки селективности связывания с HLA-A*02/COL6A3-002 проводили скрининг очищенных молекул Fab-scTv, нагруженных на биосенсоры FAB2G, относительно связывания с 1 мкМ сходных пептидов (SEQ ID NO: 28–36), каждый из которых был в комплексе с HLA-A*02. За исключением HLA-A*02/COL6A1-001 (SEQ ID NO: 30), с которым связывалось большинство вариантов Fab-scTv, содержащих зрелый CDRa1 с созревшей аффинностью (SEQ ID NO: 26), варианты Fab-scTv не продемонстрировали связывания со сходными пептидами (Фигура 5), что свидетельствует о высокой селективности связывания. Для некоторых вариантов Fab-scTv проводили исследование терапевтического окна между связыванием с HLA-A*02/COL6A3-002 и HLA-A*02/COL6A1-001, нагружая биотинилированные комплексы пептид-HLA на биосенсоры (SA) и анализируя серийные разведения вариантов Fab-scTv. Тогда как аффинность связывания варианта 75-10, включающего последовательность CDRa1 (SEQ ID NO: 26) с созревшей аффинностью и последовательность дикого типа CDRb1 (SEQ ID NO: 13), была в 8 раз выше с HLA-A*02/COL6A3-002, чем с HLA-A*02/COL6A1-001, аффинность связывания, выявленная для варианта 75-13 Fab-scTv, включающего CDRb1 (SEQ ID NO: 39), обладающий зрелостью, была вплоть до 57 раз выше, что подтверждает улучшение терапевтического окна (Таблица 4, Фигура 6).

Таблица 3: Аффинность связывания слитых белков Fab-scTv с HLA-A*02/COL6A3-002

Вариант	KD (M)	kon (1/Mc)	koff (1/c)
75-1	8,06E-06	1,01E+05	8,17E-01
75-2	3,69E-06	1,59E+05	5,86E-01
75-3	4,92E-06	9,71E+04	4,78E-01
75-4	5,76E-06	9,78E+04	5,63E-01
75-5	4,32E-04	2,21E+03	9,55E-01
75-6	1,13E-06	2,06E+05	2,32E-01
75-7	1,79E-06	1,93E+05	3,44E-01
75-8	3,45E-06	1,36E+05	4,69E-01
75-9	1,41E-05	6,02E+04	8,51E-01
75-10	1,78E-06	1,69E+05	3,01E-01
75-11	2,82E-07	4,16E+05	1,18E-01
75-12	3,74E-07	2,67E+05	1,00E-01
75-13	4,05E-07	3,28E+05	1,33E-01
75-14	3,10E-06	8,41E+04	2,61E-01
75-15	7,78E-07	2,33E+05	1,81E-01
75-16	5,87E-07	3,37E+05	1,98E-01
75-17	2,27E-07	3,62E+05	8,20E-02
75-18	1,93E-06	1,51E+05	2,91E-01
75-19	6,00E-07	2,96E+05	1,78E-01
75-20	5,31E-07	6,08E+05	3,23E-01
75-21	5,52E-07	2,72E+05	1,50E-01
75-22	8,22E-07	2,48E+05	2,04E-01
75-23	3,24E-07	3,18E+05	1,03E-01
75-24	5,20E-06	1,08E+05	5,62E-01
75-25	8,33E-06	6,23E+04	5,19E-01

Таблица 4: Сравнительные аффинности связывания слитых белков Fab-scTv с HLA-A*02/COL6A3-002 и HLA-A*02/COL6A1-001

Вариант	pHLA-A*02	KD (M)	KDCOL6A1-001/KDCOL6A3-002
75-10	COL6A3-002	1,37E-05	8
	COL6A1-001	1,08E-04	
75-11	COL6A3-002	8,50E-07	8
	COL6A1-001	6,46E-06	
75-12	COL6A3-002	7,24E-07	12
	COL6A1-001	8,98E-06	
75-13	COL6A3-002	7,39E-07	57
	COL6A1-001	4,23E-05	
75-17	COL6A3-002	8,25E-07	9
	COL6A1-001	7,10E-06	
75-23	COL6A3-002	1,15E-06	22
	COL6A1-001	2,55E-05	

Пример 5: Применение ТКР, обладающих созревшей аффинностью, для клеточной экспрессии

Модификация Т-клеток в целях экспрессии ТКР, распознающих комплекс опухолеспецифический пептид-HLA, является многообещающей альтернативой для перенаправления Т-клеток на раковые клетки. Поскольку использование последовательностей CDR1 с созревшей аффинностью могло улучшить связанные с клетками ТКР к HLA-A*02/COL6A3-002, идентифицированные последовательности CDRa1 и CDRb1 с мутациями вводили в исходный ТКР R4P3F9 (SEQ ID NO: 2 и 10). Полученные варианты ТКР с мутациями (с С-1 по С-18, Таблица 5) экспрессировали в CD8⁺ Т-клетках человека после электропорации соответствующей мРНК, полученной за счет транскрипции *in vitro* амплифицированных путем ПЦР конструкций ДНК. В целях контроля производили экспрессию ТКР 1G4 (SEQ ID NO: 53 и 57) к пептиду NYESO1-001 (SEQ ID NO: 61). После инкубации в течение ночи РНК-электропорированных CD8⁺ Т-клеток экспрессию введенных вариантов ТКР анализировали с помощью окрашивания ФЭ-мечеными тетрамерами HLA-A*02/COL6A3-002 или тетрамерами HLA-A*02/NYESO1-001. Тогда как исходный ТКР R4P3F9, вариант С-1 демонстрировал только минимальное окрашивание тетрамерами HLA-A*02/COL6A3-002, варианты ТКР R4P3F9 с С-2 по С-18 с CDRa1 и/или CDRb1 с созревшей аффинностью демонстрировали повышенное тетрамерное окрашивание (Фигура 7). Функциональную активацию CD8⁺ Т-клеток (20 000 клеток/лунка), экспрессирующих различные варианты ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью исследовали путем определения уровней высвобождаемого IFN-гамма после совместной культивации с Т2 клетками (20 000 клеток/лунка), нагруженных либо серийными разведениями COL6A3-002 (SEQ ID NO: 1), либо 10 мкМ COL6A3-002 и сходных пептидов (SEQ ID NO: 28 по 36). По сравнению с исходным ТКР R4P3F9, вариантом С-1, ТКР-варианты с С-2 по С-18 с созревшей аффинностью демонстрировали повышенное высвобождение IFN-гамма с достижением максимальных уровней уже при более низких концентрациях пептида (Фигура 8). Как и ожидалось, высвобождения IFN-гамма не наблюдалось в случае Т-клеток, не экспрессирующих ТКР, или экспрессирующих контрольный ТКР 1G4, специфичный к NYESO1-001. Чтобы проанализировать селективность распознавания COL6A3-002 вариантами ТКР R4P3F9 с созревшей аффинностью, проводили анализ высвобождения IFN-гамма в ответ на Т2-клетки, нагруженные различными сходными пептидами (SEQ ID NO: 28–36), выявив различные профили селективности для вариантов ТКР R4P3F9 с созревшей

аффинностью. Наиболее интересно отметить, что ТКР-варианты C-5 (SEQ ID NO: 62 и 2) и C-14 (SEQ ID NO: 62 и 63), включающие одинаковые CDRb1 (SEQ ID NO: 40) с созревшей аффинностью, не продемонстрировали никакого перекрестного взаимодействия с COL6A1-001 или другими сходными пептидами (Фигура 9), делая ТКР R4P3F9 варианты с созревшей аффинностью C-5 и C14 наиболее многообещающими кандидатами для адресного внутриклеточного нацеливания на опухоли на основе ТКР.

Таблица 5: Номенклатура клеточных вариантов ТКР В основе молекулы лежат последовательности SEQ ID NO 2 и 10 и указанные варианты CDRa1 и CDRb1.

Вариант	CDRa1	CDRb1
C-1	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)
C-2	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARWHNN (SEQ ID NO. 37)
C-3	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AKDHLN (SEQ ID NO. 38)
C-4	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARWHRN (SEQ ID NO. 39)
C-5	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AMDHPY (SEQ ID NO. 40)
C-6	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ATDHYN (SEQ ID NO. 41)
C-7	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	ARYHTN (SEQ ID NO. 42)
C-8	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	APYHLN (SEQ ID NO. 43)
C-9	DRGSQS (SEQ ID NO. 5)	AKDHTN (SEQ ID NO. 44)
C-10	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	RSGDLS (SEQ ID NO. 13)
C-11	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARWHNN (SEQ ID NO. 37)
C-12	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AKDHLN (SEQ ID NO. 38)
C-13	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARWHRN (SEQ ID NO. 39)
C-14	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AMDHPY (SEQ ID NO. 40)
C-15	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ATDHYN (SEQ ID NO. 41)
C-16	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	ARYHTN (SEQ ID NO. 42)
C-17	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	APYHLN (SEQ ID NO. 43)
C-18	DRRSQS (SEQ ID NO. 26)	AKDHTN (SEQ ID NO. 44)

Пример 6: Окно распознавания COL6A3-002 и COL6A1-001 вариантами клеточных ТКР

Клеточную экспрессию и анализ вариантов R4P3F9 производили, как описано выше. В соответствии с предшествующими экспериментами (Фигура 7) уровень окрашивания Т-клеток, экспрессирующих ТКР R4P3F9 варианты с C-2 по C-18, мечеными ФЭ тетрамерами HLA-A*02/COL6A3-002, был выше в сравнении с исходным ТКР C-1. Кроме того, ТКР-варианты C-12 и C-17 демонстрировали связывание с HLA-A*02/COL6A1-001 (Фигура 10). Экспрессия всех вариантов R4P3F9 с созревшей аффинностью улучшила функциональную активацию CD8⁺ Т-клеток в ответ на Т2-клетки, нагруженные серийными разведениями COL6A3-002 (SEQ ID NO: 1), с

достижением значений EC_{50} в 5-90 раз ниже, чем в случае исходного ТКР С-1 (Фигура 11, Таблица 6). Наиболее низкий уровень EC_{50} был зафиксирован для варианта С-14. Опять же, ТКР-варианты С-5 (SEQ ID NO: 62 и 2) и С-14 (SEQ ID NO: 62 и 63), включающие тот же самый CDRb1 (SEQ ID NO: 40) с созревшей аффинностью, не продемонстрировали никакого перекрестного взаимодействия по отношению к COL6A1-001, тогда как другие варианты демонстрировали сильное распознавание с окнами EC_{50} (COL6A3-002 в сравнении с COL6A1-001) на таком низком уровне, который соответствует множителю 5.

Таблица 6: Значения EC_{50} [нМ] высвобождения IFN- γ Т-клетками, экспрессирующими варианты R4P3F9, после совместного культивирования с Т2-клетками, нагруженными COL6A3-002 или COL6A1-001.

Вариант	EC_{50} для COL6A3-002 [нМ]	EC_{50} для COL6A1-001 [нМ]
С-1	2,51	-
С-2	0,16	-
С-3	0,14	871 ^a
С-4	0,13	-
С-5	0,15	-
С-6	0,48	-
С-7	0,29	-
С-8	0,20	350
С-9	0,55	-
С-10	0,32	1.5
С-11	0,32	8.2
С-12	0,20	1.9
С-13	0,23	9.7
С-14	0,03	-
С-15	0,31	69
С-16	0,34	78
С-17	0,33	4.1
С-18	0,14	280089 ^a

^a уровень плато не достигнут

Пример 7: Эффективность вариантов R4P3F9 С-5 и С-14 с созревшей аффинностью на линиях опухолевых клеток

Клеточную экспрессию и анализ вариантов R4P3F9 производили, как описано выше. Экспрессия вариантов R4P3F9C-5 (SEQ ID NO: 62 и 2) и С-14 (SEQ ID NO: 62 и 63) с созревшей аффинностью улучшала функциональную активацию CD8⁺ Т-клеток в ответ на линии опухолевых клеток, презентующие COL6A3-002 (SEQ ID NO: 1), в сравнении с исходным ТКР С-1 (Фигура 12). Линии опухолевых клеток, использованных во время

этого исследования, презентируют различные количества пептида-мишени. Клетки SF539 имеют ~4000 копий HLA-A*02/COL6A3-002 на клетку и клетки SW982 имеют ~460 копий на клетку. Тогда как исходный ТКР С-1 не опосредовал сильной активации Т-клеток после совместного культивирования с мишень-положительными клеточными линиями, вариант ТКР С-14 демонстрировал еще более сильное улучшение функциональной активации, чем вариант ТКР С-5. Эти данные сопоставимы с улучшением EC_{50} , от ТКР С-1 к С-5 и к С-14 (Таблица 6). Мишень-отрицательная клеточная линия MCF-7 не распознавалась ни одним из данных ТКР.

Литература:

- Aleksic et al. 2012: Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors – implications for therapeutic strategies, *Eur J Immunol.* 2012 Dec;42(12):3174-9;
- Hickman et al. 2016: Antigen Selection for Enhanced Affinity T-Cell Receptor–Based Cancer Therapies, *J Biomol Screen.* 2016 Sep;21(8):769-85;
- Boder and Wittrup 2000: Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, *Methods Enzymol.* 2000;328:430-44;
- Boder and Wittrup 1997: Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, *Nat Biotechnol.* 1997 Jun;15(6):553-7;
- Smith et al. 2015: T Cell Receptor Engineering and Analysis Using the Yeast Display Platform, *Methods Mol Biol.* 2015;1319:95-141;
- DE102016121899.5
- DE102016115246

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенраспознающая структура, включающая первый домен, включающий три комплементарных детерминантных участка (CDR), включающие аминокислотные последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 5 (CDRa1), 6 (CDRa2) и 7 (CDRa3), и второй домен, включающий три комплементарных детерминантных участка (CDR), включающие аминокислотные последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 13 (CDRb1), 14 (CDRb2) и 15 (CDRb3), причем по меньшей мере один из указанных комплементарных детерминантных участков заменен на по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы:
 - а) SEQ ID NO: 26 (CDRa1-мутант 1) и SEQ ID NO: 37–49 (с CDRb1-мут1 по CDRb1-мут13), и
 - б) последовательность с мутацией, включающая по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 37 по 49, где по меньшей мере одна аминокислотная последовательность содержит одну, две или три аминокислотные замены.
2. Антигенраспознающая структура в соответствии с п. 1, где указанная антигенраспознающая структура является стабильной и способна специфически и/или селективно связываться с антигенным пептидом COL6A3, включающим аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, в частности при участии молекулы МНС.
3. Антигенраспознающая структура в соответствии с п. 1 или 2, где антигенраспознающая структура является антителом, или его производным, таким как биспецифическая молекула или ее фрагмент, или Т-клеточным рецептором (ТКР), или его производным, таким как биспецифическая молекула или ее фрагмент.
4. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп. 1–3, где указанный первый домен является частью α - или γ -цепи ТКР; и/или где указанный второй домен является частью β - или δ -цепи ТКР.

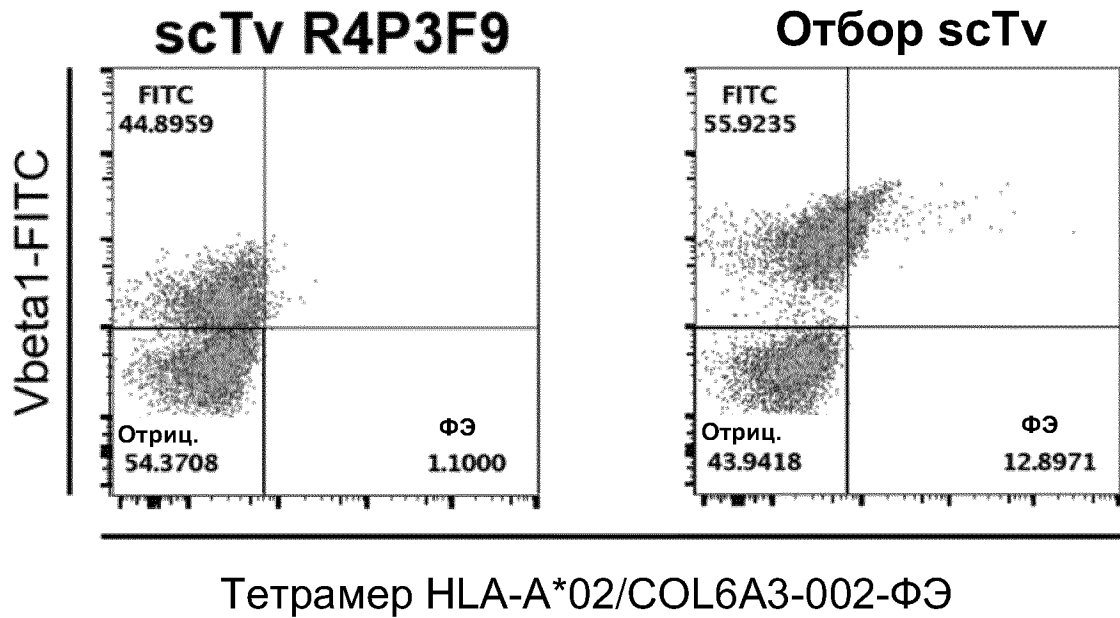
5. Нуклеиновая кислота, кодирующая антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп. 1–4, или вектор нуклеиновой кислоты, включающий указанную нуклеиновую кислоту.
6. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп. 1–4, или нуклеиновую кислоту или вектор в соответствии с п. 5, где указанная клетка-хозяин предпочтительно является а) лимфоцитом, таким как Т-лимфоцит или клеткой-предшественником Т-лимфоцита, например, CD4 или CD8-положительной Т-клеткой, или б) не лимфоцитом, такой как клетка яичника китайского хомяка (CHO).
7. Фармацевтическая композиция, включающая антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп. 1–4, или нуклеиновую кислоту или вектор в соответствии с п. 5, или клетку-хозяина в соответствии с п. 6, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель стабилизатор и/или вспомогательное вещество.
8. Способ получения COL6A3-специфической антигенраспознающей структуры в соответствии с любым из пп. 1–4, включающий:
 - а. обеспечение подходящей клетки-хозяина,
 - б. обеспечение генетической конструкции, включающей кодирующую последовательность, кодирующую антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп. 1–4,
 - в. внесение указанной генетической конструкции в указанную подходящую клетку-хозяина, и
 - г. экспрессию указанной генетической конструкции указанной подходящей клеткой-хозяином.
9. Способ в соответствии с п. 8, дополнительно включающий выделение и очистку антигенраспознающей структуры из подходящей клетки-хозяина и, необязательно, восстановление антигенраспознающей структуры в Т-клетке.
10. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп. 1–4, нуклеиновая кислота или вектор в соответствии с п. 5, или клетка-хозяин в

соответствии с п. 6, или фармацевтическая композиция в соответствии с п. 7 для применения в медицине.

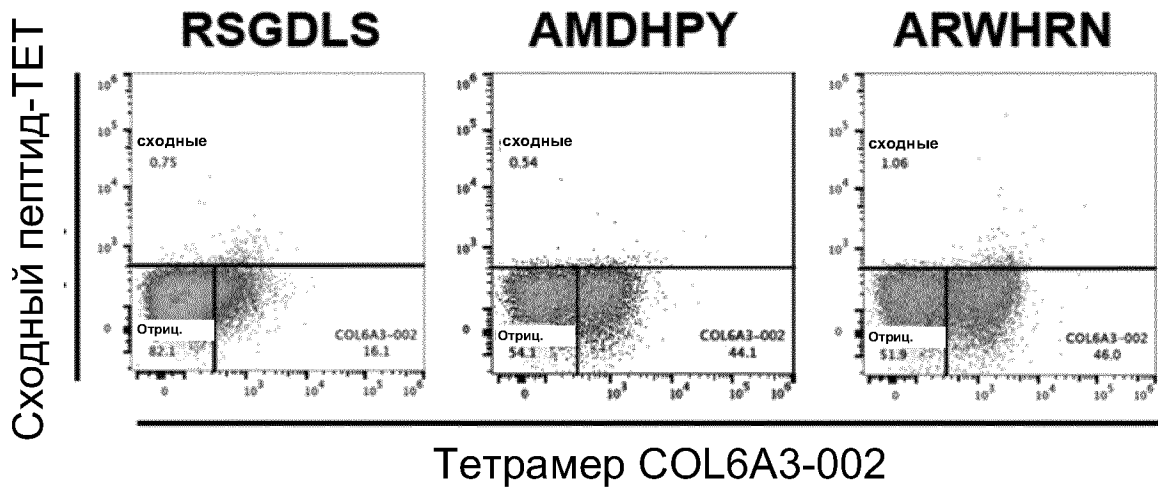
11. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп. 1–4, нуклеиновая кислота или вектор в соответствии с п. 5, клетка-хозяин в соответствии с п. 6, или фармацевтическая композиция в соответствии с п. 7 для применения в диагностике, предупреждении и/или лечении пролиферативного заболевания, такого как рак.
12. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп. 1–4, нуклеиновая кислота или вектор в соответствии с п. 5, клетка-хозяин в соответствии с п. 6, или фармацевтическая композиция в соответствии с п. 7 для применения в соответствии с п. 11, где указанный рак выбран из раковых заболеваний, в которых имеется избыточная экспрессия или мутации COL6A3, и/или презентруется полученный из COL6A3 опухолеассоциированный антиген, например, таких как колоректальный рак, рак толстой кишки, рак печени, рак яичника и рак желудка.
13. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп. 1–4, где последовательность с мутацией является комбинацией первой и второй аминокислотной последовательности, таким образом, что последовательность с мутацией получена за счет замены одной, двух или трех аминокислот в первой последовательности на соответствующую одну, две или три аминокислоты второй последовательности.
14. Антигенраспознающая структура в соответствии с п. 13, где последовательность с мутацией является комбинацией первой и второй аминокислотной последовательности, таким образом, что последовательность с мутацией получена за счет замены одной, двух или трех следующих друг за другом аминокислот в первой последовательности на соответствующую одну, две или три следующие друг за другом аминокислоты второй последовательности.
15. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп. 1–4 и 13–14, где последовательность с мутацией из (б) содержит по меньшей мере одну консервативную аминокислотную замену в сравнении с по меньшей мере одной аминокислотной последовательностью из (а).

16. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп. 1–4, где указанный по меньшей мере один из указанных комплементарных детерминантных участков заменен на SEQ ID NO: 40, и где SEQ ID NO: 40 содержит одну, две или три аминокислотные замены.
17. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп. 1–4, где указанный по меньшей мере один из указанных комплементарных детерминантных участков заменен на SEQ ID NO: 40.
18. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп. 1–4, включающая вариант, выбранный из группы, состоящей из 75-1 – 75-25 Таблицы 2 и С-1 – С-18 Таблицы 5.

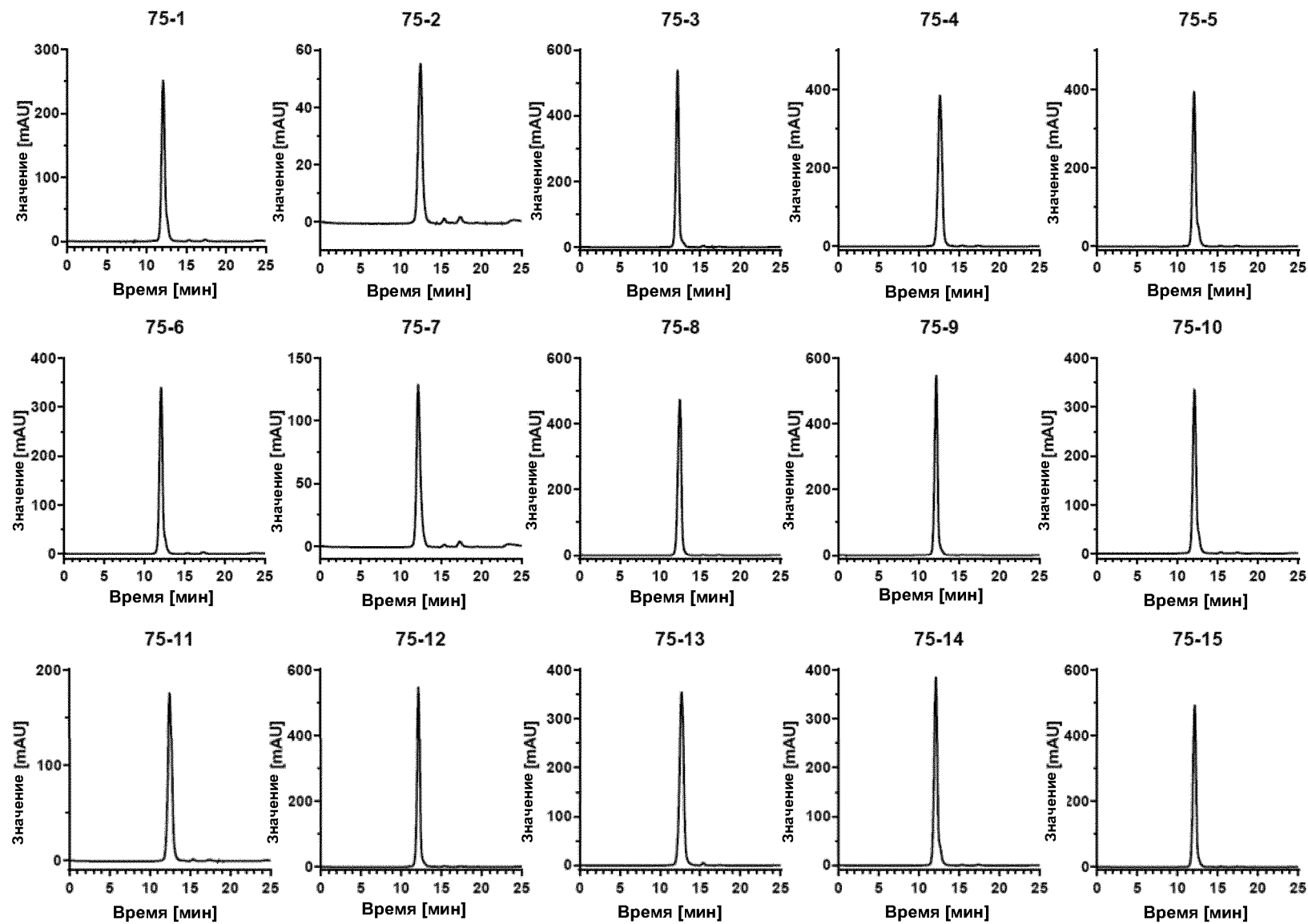
Фигура 1:



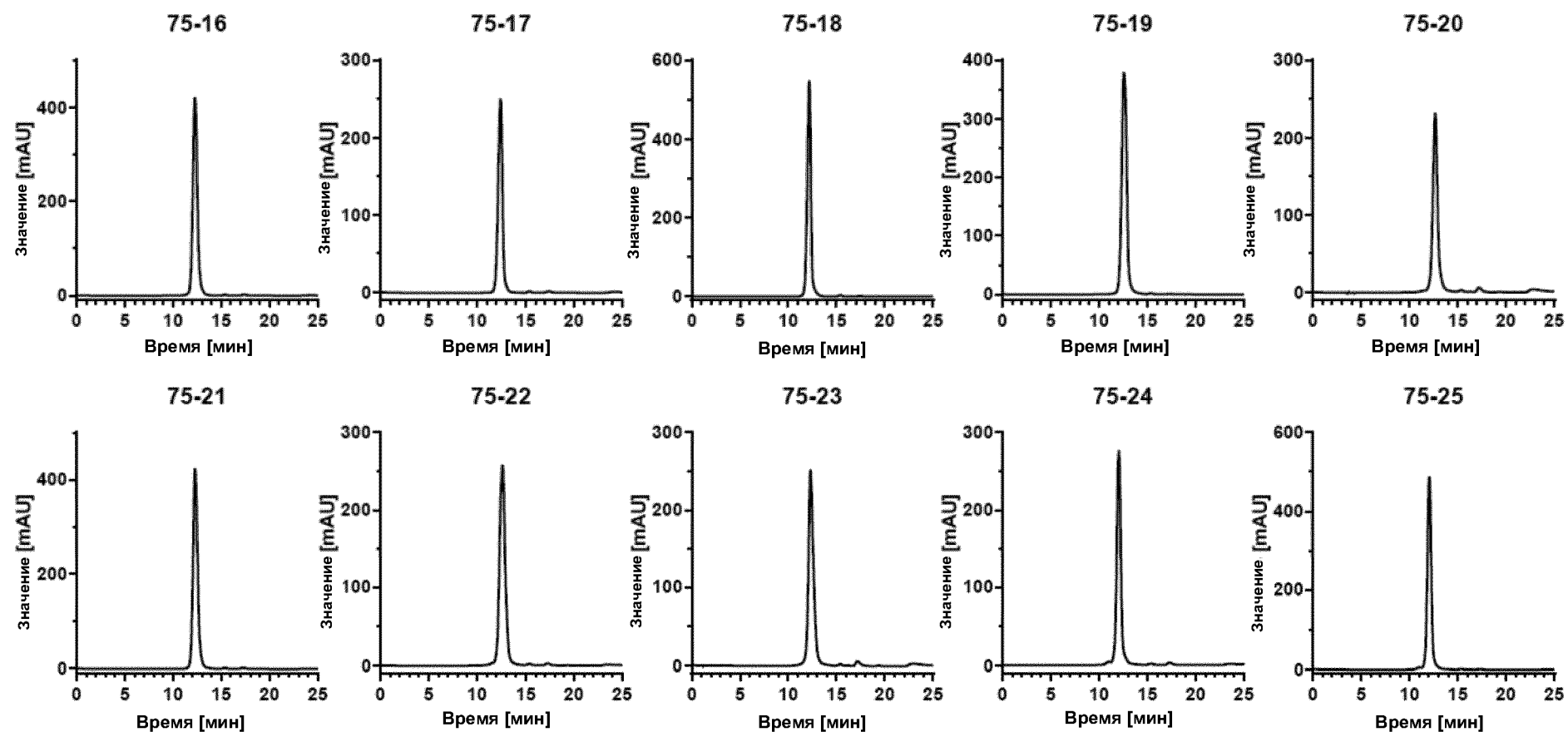
Фигура 2:



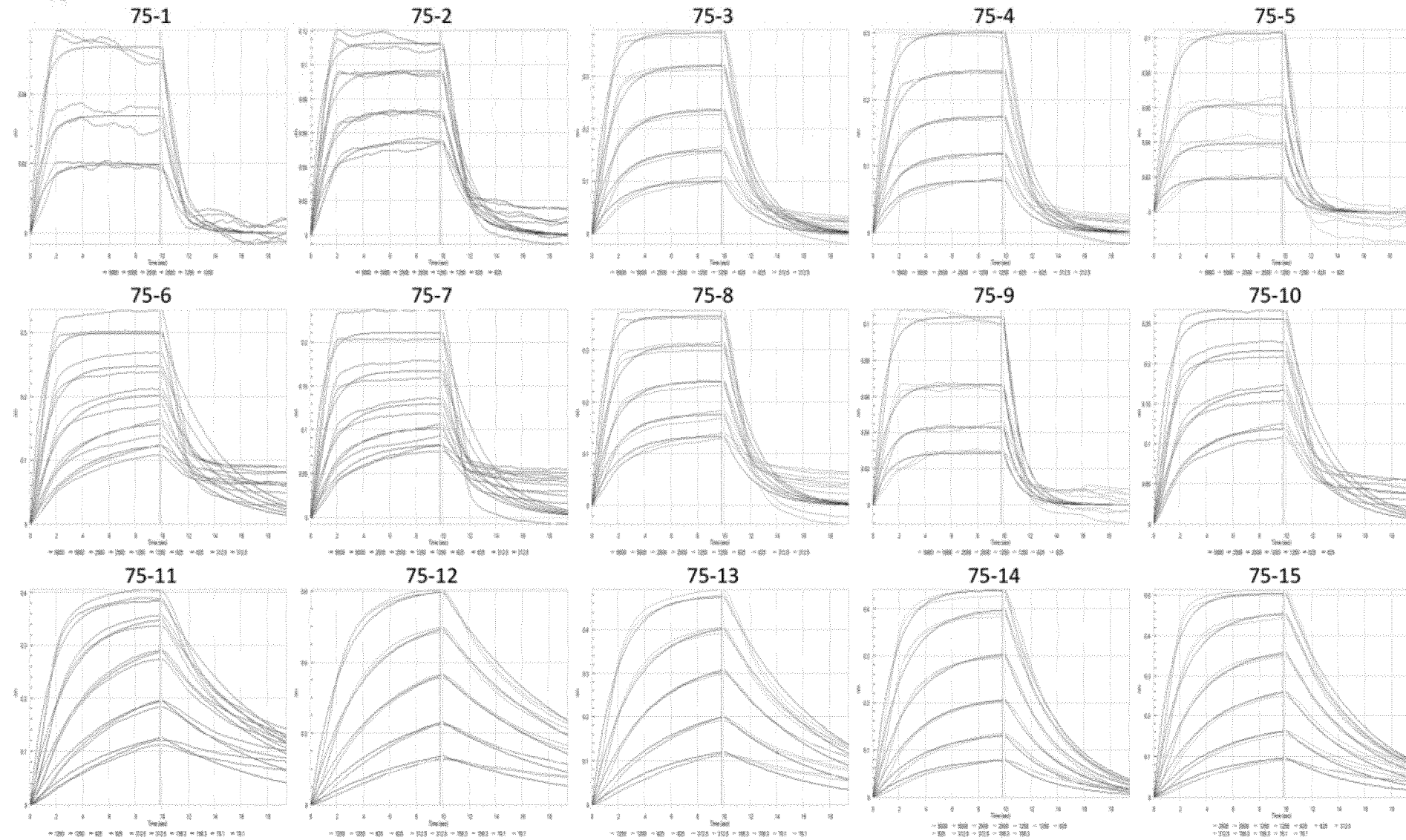
Фигура 3:



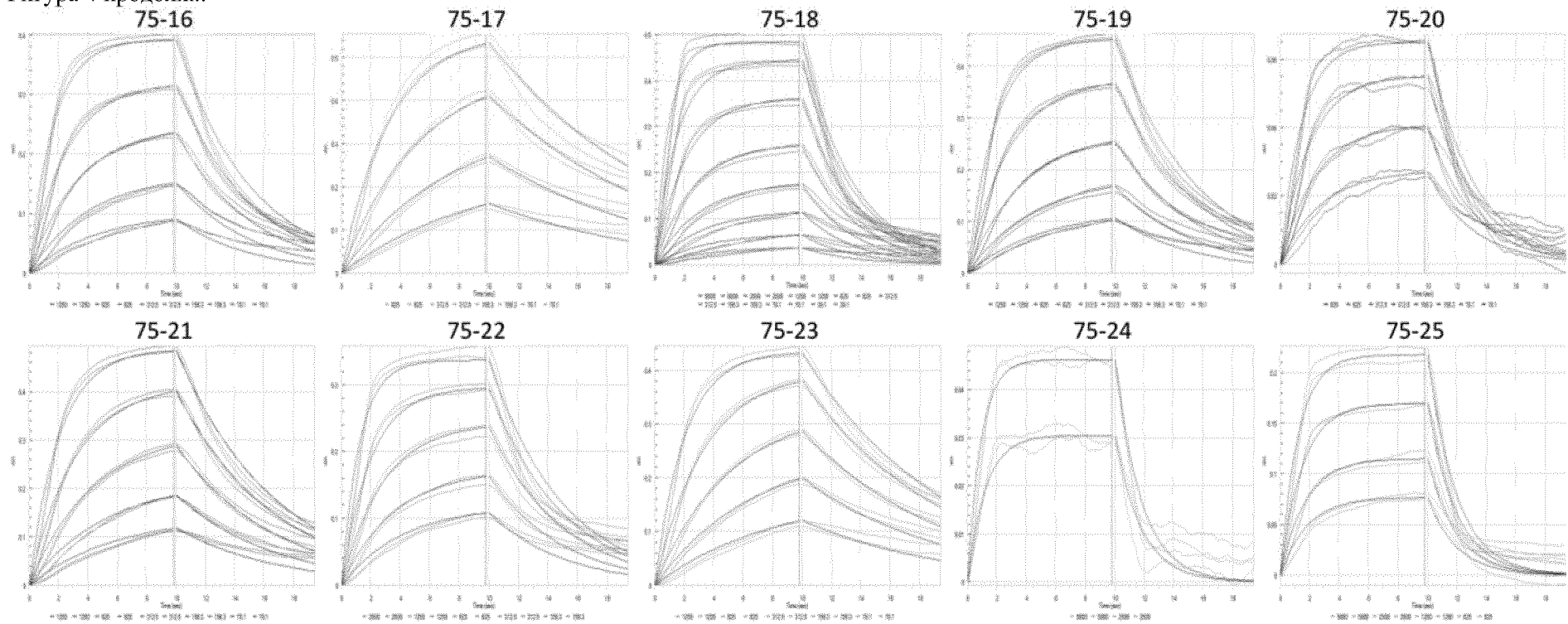
Фигура 3 продолж.:



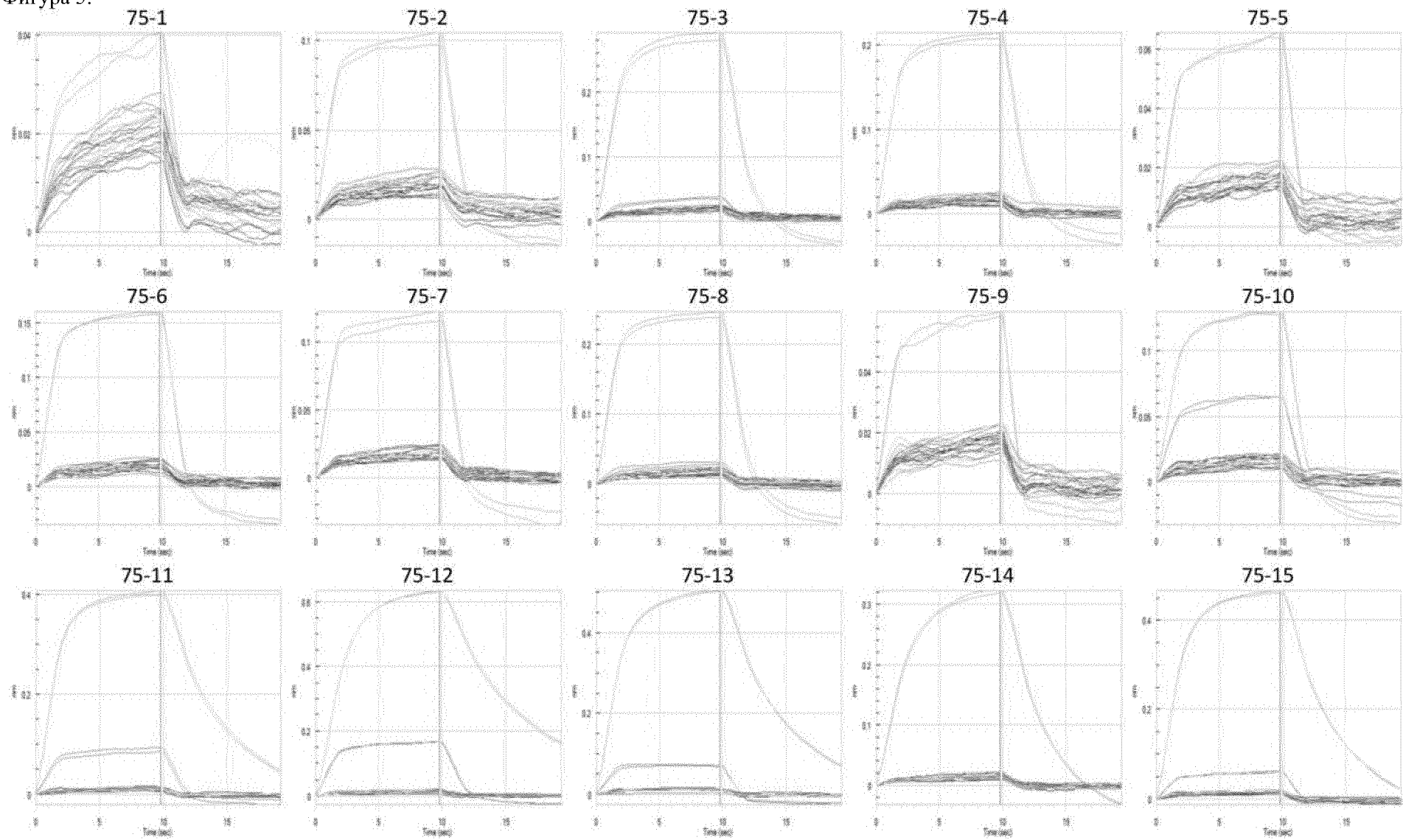
Фигура 4:



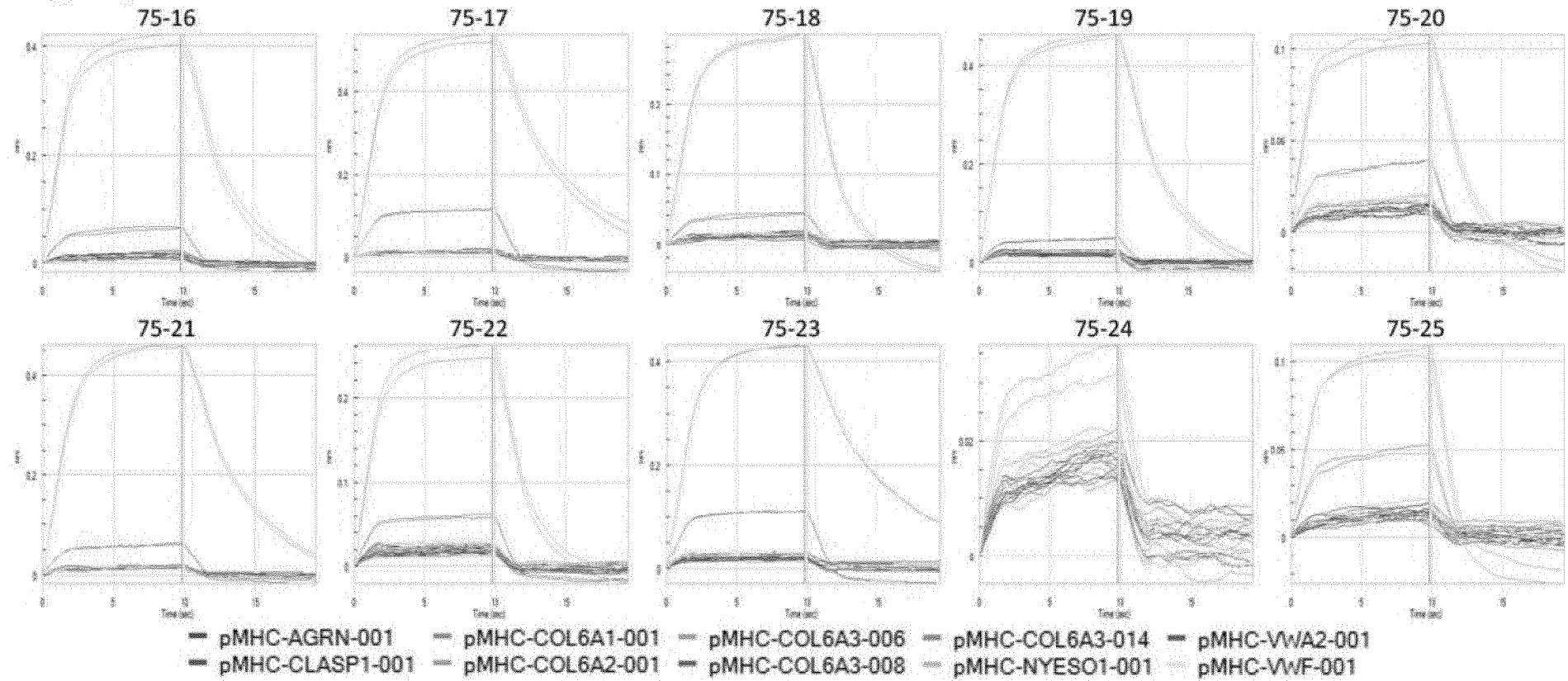
Фигура 4 продолж.:



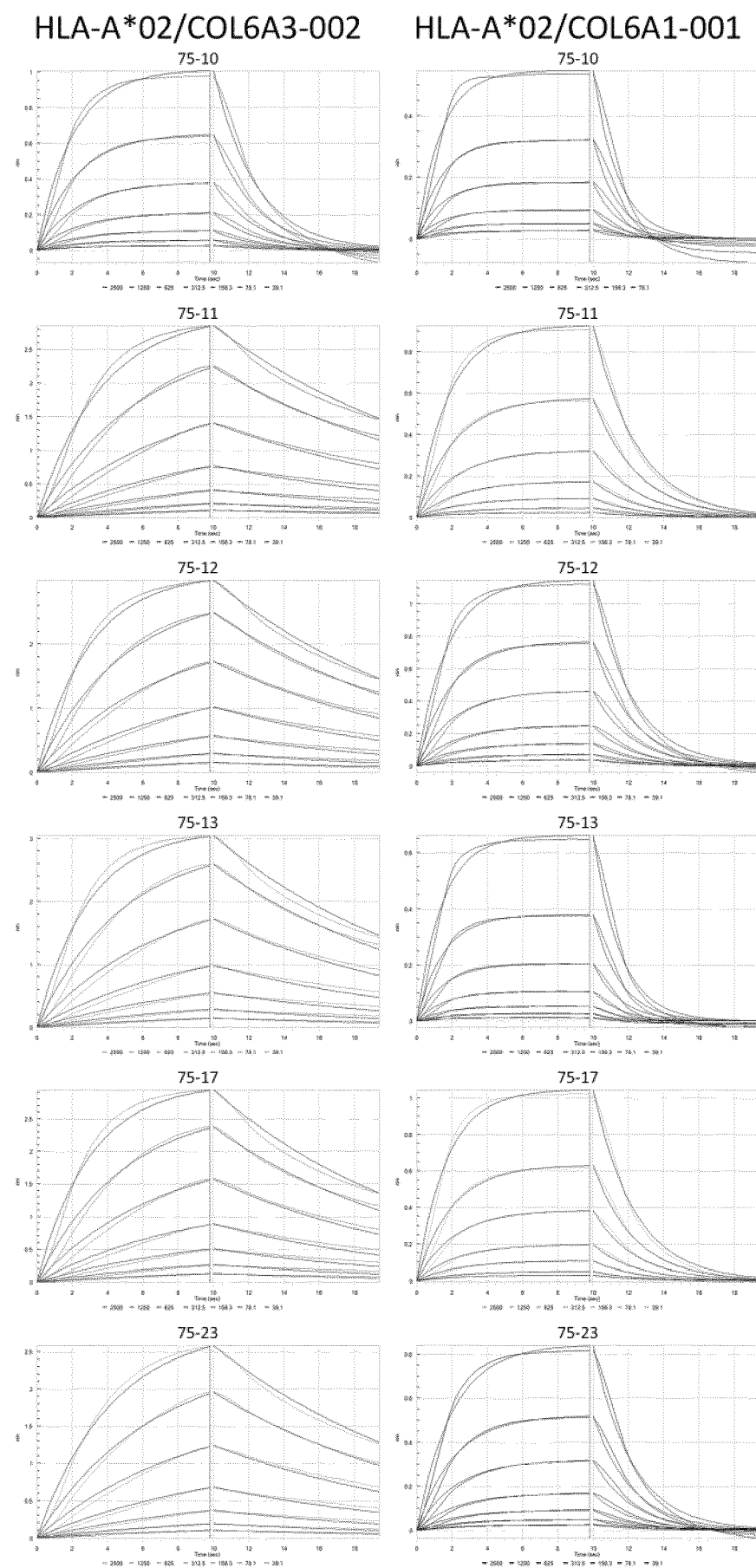
Фигура 5:



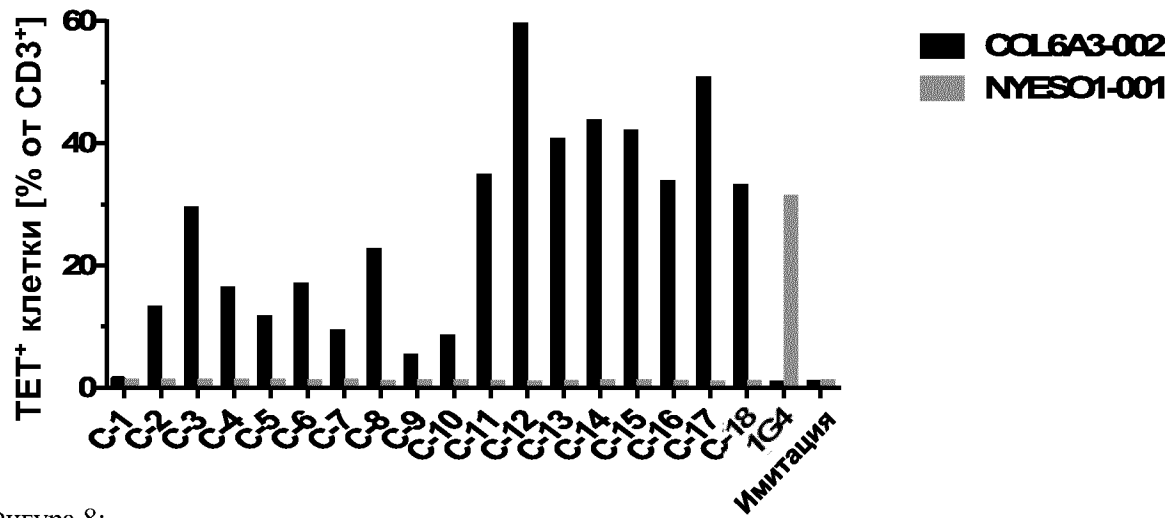
Фигура 5 продолж.:



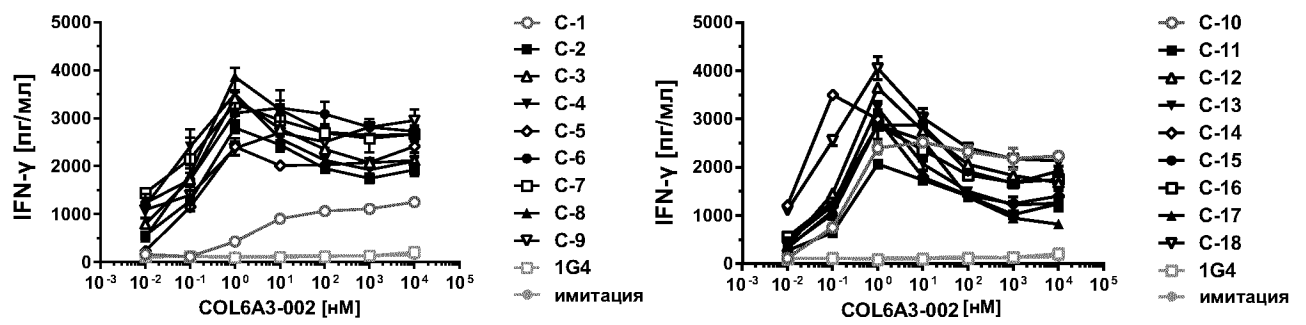
Фигура 6:



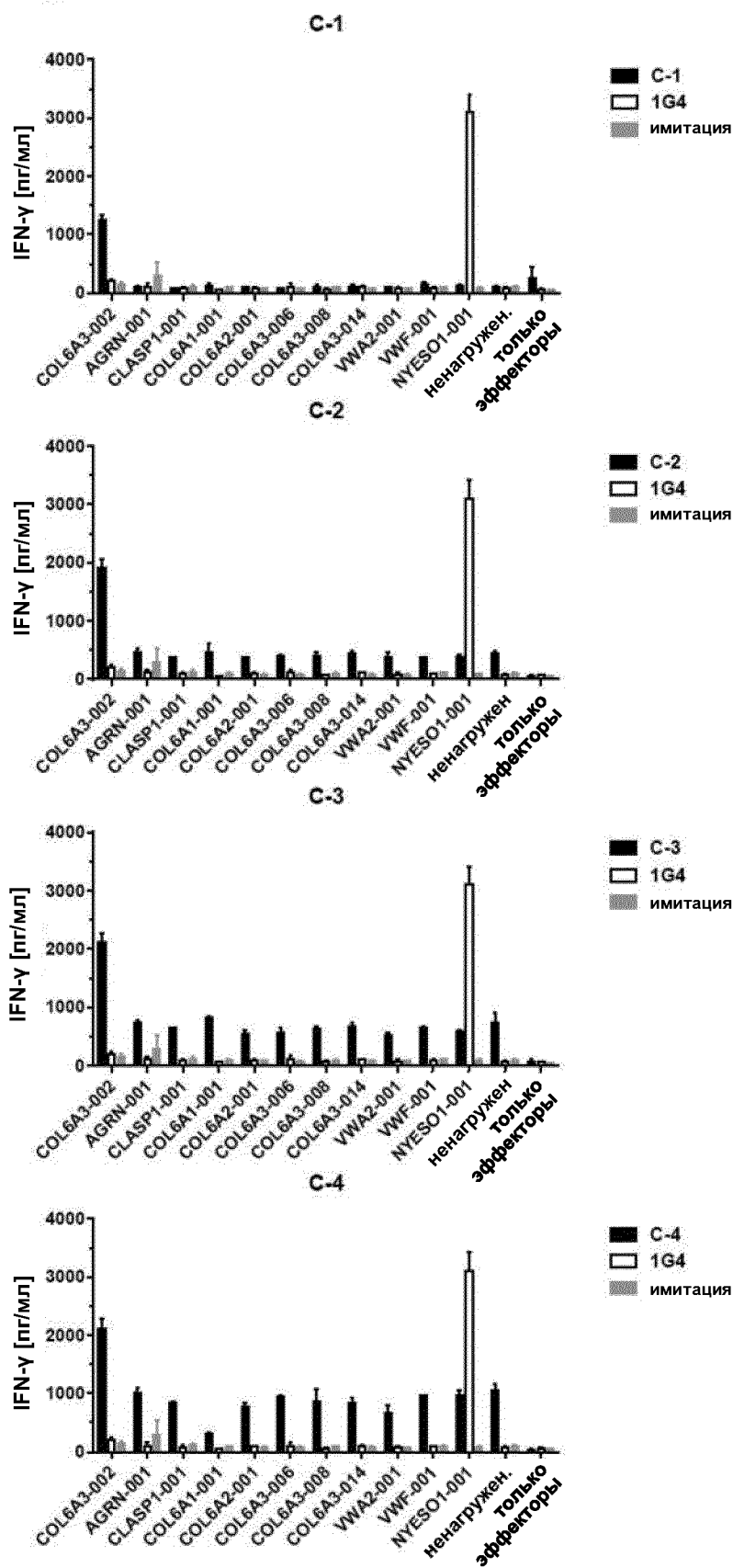
Фигура 7:



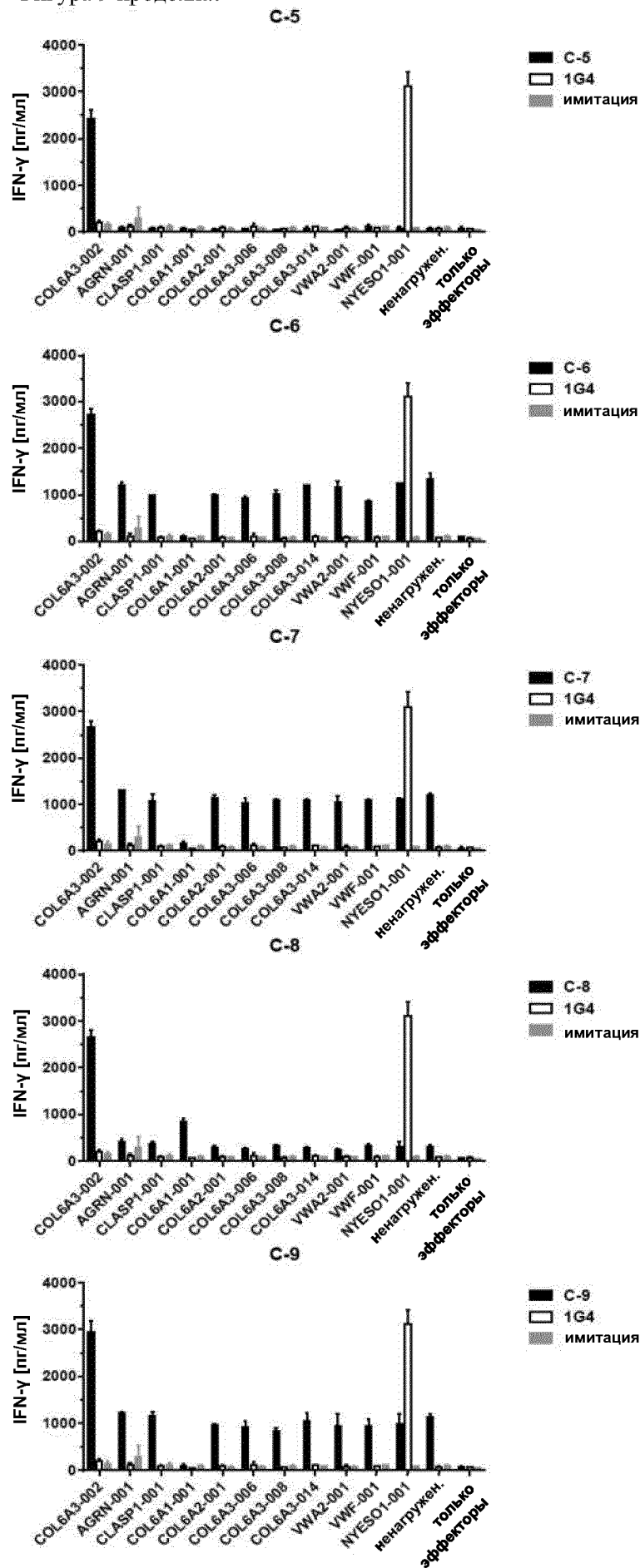
Фигура 8:



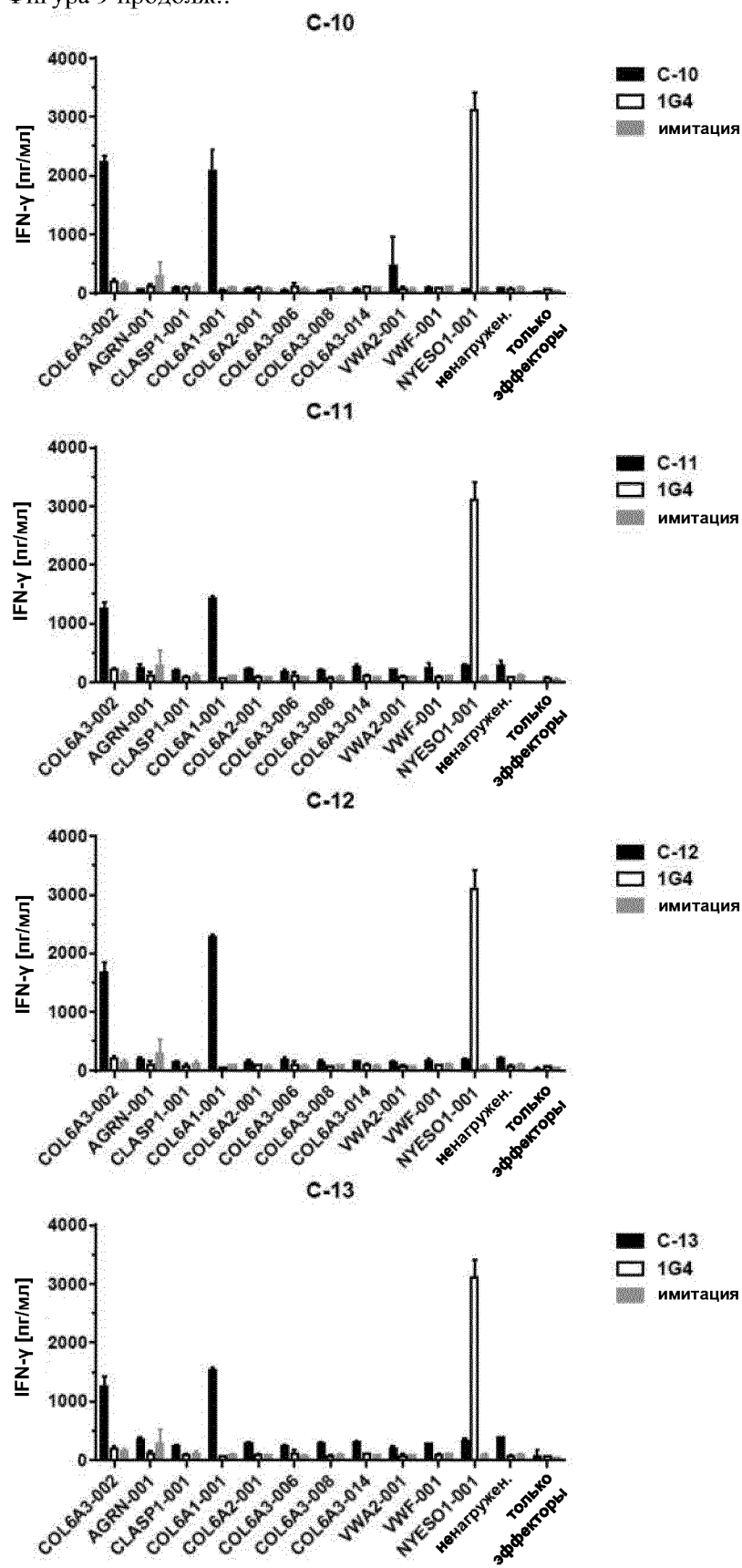
Фигура 9:



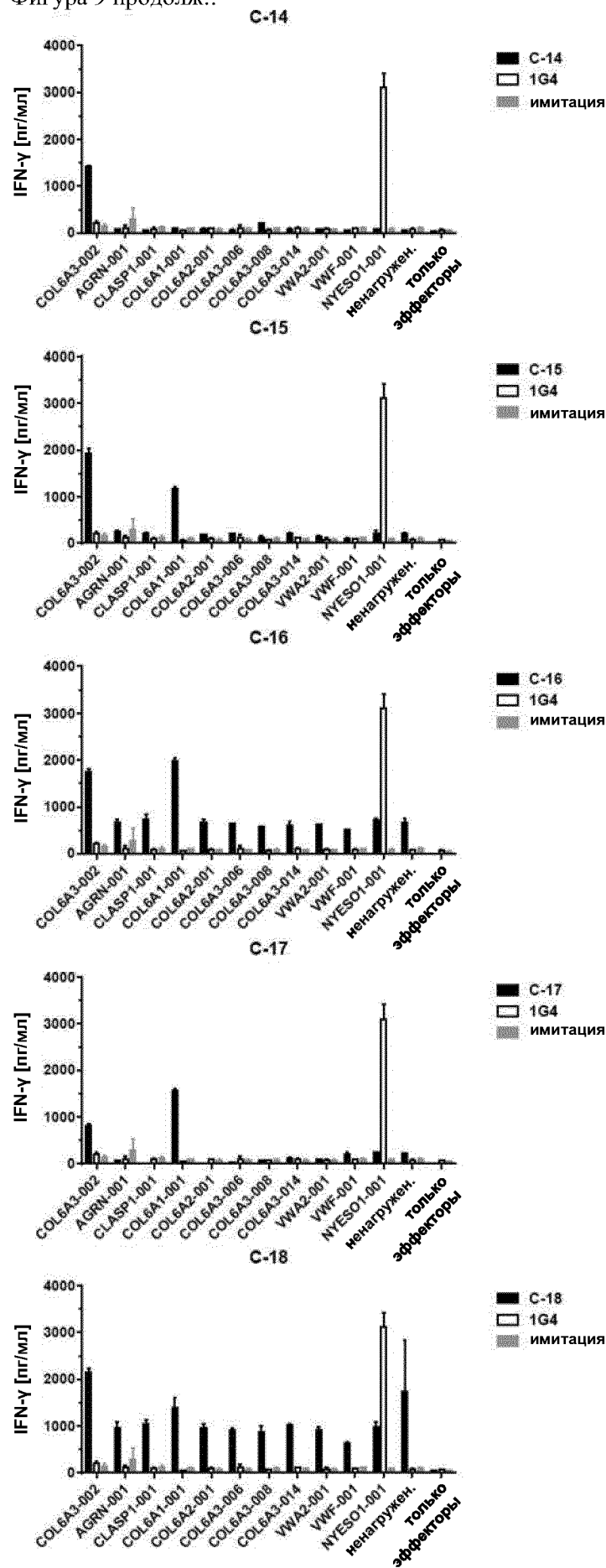
Фигура 9 продолж.:



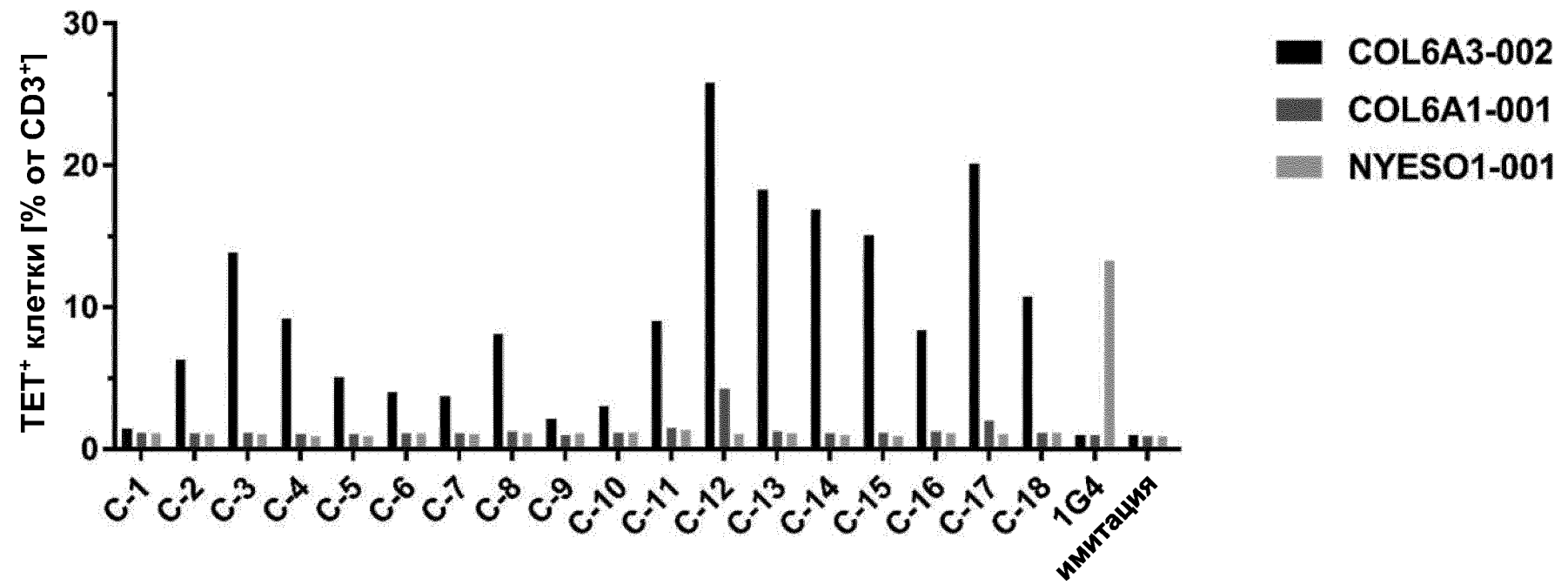
Фигура 9 продолж.:



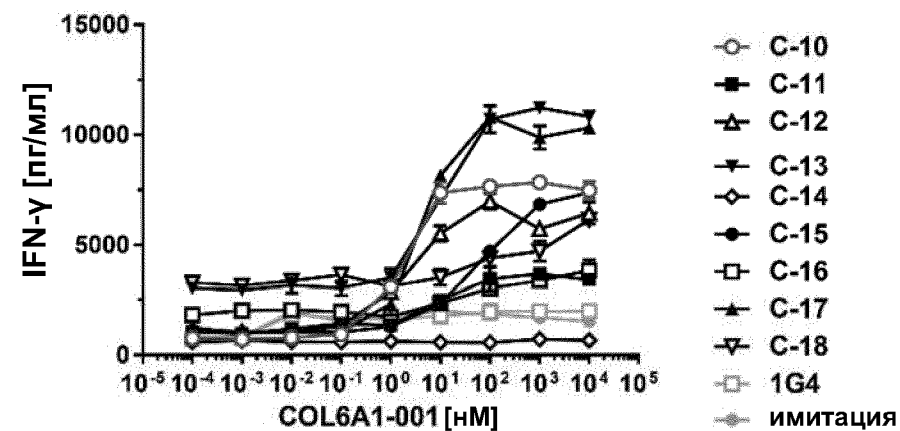
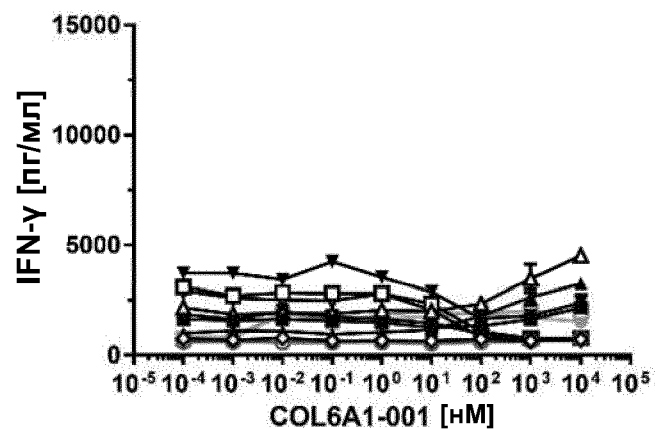
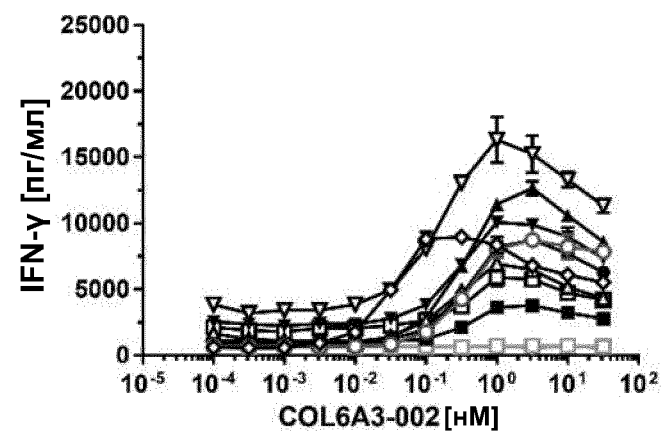
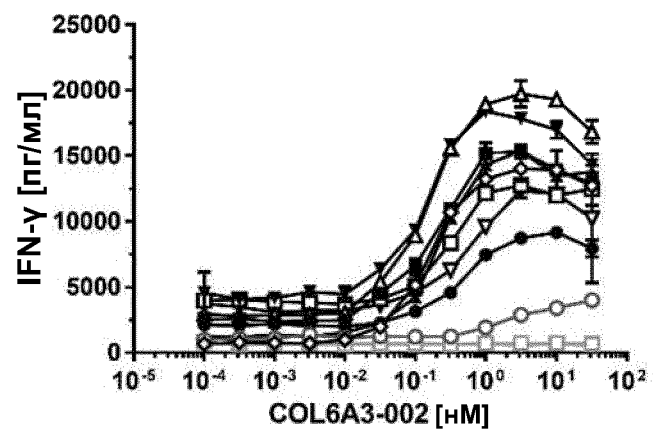
Фигура 9 продолж.:



Фигура 10:



Фигура 11:



Фигура 12:

