

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092032** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.04.06

(51) Int. Cl. *C07K 14/725* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.01.28

(54) **Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР, СПЕЦИФИЧНЫЙ В ОТНОШЕНИИ NY-ESO-1/LAGE-1, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **LU100715**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.02.26**

Венер Карина, Вайс Манон (DE)

(33) **LU**

(74) Представитель:

(86) **PCT/EP2019/051963**

Медведев В.Н. (RU)

(87) **WO 2019/162043 2019.08.29**

(71) Заявитель:

**МЕДИДЖИН ИММЬЮНОТЕРАПИЗ
ГМБХ (DE)**

(57) Настоящее изобретение относится к выделенному Т-клеточному рецептору (TCR), специфическому в отношении NY-ESO-1/LAGE-1, и полипептиду, содержащему функциональную часть TCR. Настоящее изобретение также относится к мультивалентному комплексу TCR, нуклеиновой кислоте, кодирующей TCR, клетке, экспрессирующей TCR, фармацевтической композиции, содержащей TCR. Настоящее изобретение также относится к TCR для применения в качестве лекарственного средства, в частности к TCR для применения в лечении злокачественного новообразования.

202092032

A1

A1

202092032

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564510EA/026

Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР, СПЕЦИФИЧНЫЙ В ОТНОШЕНИИ NY-ESO-1/LAGE-1, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к выделенному Т-клеточному рецептору (TCR), специфическому в отношении NY-ESO-1/LAGE-1, и полипептиду, содержащему функциональную часть TCR. Кроме того, настоящее изобретение относится к мультивалентному комплексу TCR, нуклеиновой кислоте, кодирующей TCR, клетке, экспрессирующей TCR, и фармацевтической композиции, содержащей TCR. Настоящее изобретение также относится к TCR для применения в качестве лекарственного средства, в частности, к TCR для применения в лечении злокачественных новообразований.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Т-лимфоциты (или Т-клетки), являющиеся частью клеточно-опосредованной иммунной системы, играют основную роль в эрадикации патогенов. Т-клетки развиваются в тимусе и экспрессируют на своей поверхности молекулы Т-клеточных рецепторов, позволяющие распознавать пептиды, презентруемые на молекулах главного комплекса гистосовместимости (МНС), экспрессирующихся на ядродержащих клетках (известных как антигенпрезентирующие). Антигены, образующиеся из патогенов, т.е. чужеродные антигены, презентруемые молекулами МНС, будут вызывать мощный Т-клеточный ответ, в то время как аутоантигены, как правило, не приводят к Т-клеточному ответу из-за отрицательной селекции аутоантиген-специфических Т-клеток в тимусе во время развития таких Т-клеток. Таким образом, иммунная система может различать ядродержащие клетки, презентрующие чужеродные антигены или аутоантигены, и специфически направленно воздействовать и устранять инфицированные клетки посредством мощного высвобождения цитокинов и механизмов клеточной цитотоксичности Т-клеток.

Активность иммунной системы считают многообещающим инструментом противоопухолевой терапии будущего. За последнее десятилетие в исследованиях начали выявлять уникальные свойства Т-клеток с использованием адаптивного переноса клеток (АСТ), включающего введение полученных из пациента лимфоцитов, выращенных *ex vivo*. АСТ является привлекательной концепцией для лечения злокачественных новообразований, т.к. для него не требуется иммунокомпетентность пациентов, и специфичность переносимых лимфоцитов можно направлять на немутантные и, таким образом, слабоиммуногенные опухолевые антигены, которые, как правило, не могут эффективно запускать ответы аутологических Т-клеток. Хотя показано, что АСТ является многообещающим способом лечения различных типов злокачественных новообразований, его широкому использованию в качестве клинического лечения препятствует необходимость специального выделения и характеристики опухолеспецифических Т-клеток из каждого пациента, что не только может быть затруднительным и длительным, но также может не приводить к получению Т-клеток с высокой авидностью (Xue et al.

Clin.Exp.Immunol. 2005 Feb; 139(2): 167-172; Schmitt et al., Hum. Gene Ther. 2009 Nov; 20(11): 1240-1248).

Генетический перенос специфических в отношении опухолевого антигена Т-клеточных рецепторов (TCR) в первичные Т-клетки может позволить преодолеть некоторые из существующих ограничений АСТ, т.к. он позволяет быстро получать опухоли-реактивные Т-лимфоциты с определенной антигенной специфичностью даже у пациентов с иммунной недостаточностью. Однако, идентификация подходящих клонов Т-клеток, несущих TCR, специфически распознающие опухолевые антигены и проявляющие желаемые противоопухолевые эффекты *in vivo*, по-прежнему является темой текущих исследований. Учитывая, что в 2012 году в мире выявлено приблизительно 14,1 миллионов новых случаев злокачественных новообразований, и что в настоящее время злокачественные новообразования являются причиной приблизительно 14,6% всех случаев смерти людей по всему миру, немедленно необходимы новые и эффективные варианты лечения. Целью настоящего изобретения является удовлетворение указанных выше потребностей.

NY-ESO-1 и LAGE-1 являются важными антигенами-мишенями для иммунотерапии, принадлежащими к семейству раково-тестикулярных антигенов. Раково-тестикулярные антигены экспрессируются на различных злокачественных опухолях и половых клетках яичка, но не на других тканях взрослого организма.

Таким образом, особенно желательно получить TCR или его производные, специфические в отношении NY-ESO-1/LAGE-1.

ЦЕЛИ И СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для удовлетворения этих потребностей целью изобретения является получение выделенного Т-клеточного рецептора (TCR), специфического в отношении NY-ESO-1/LAGE-1. В частности, TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент. Более конкретно, TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или ее фрагмент. Даже более конкретно, TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее фрагмент.

В частности, TCR по изобретению распознает антигенную мишень NY-ESO-1/LAGE-1 при презентировании на молекуле МНС клетки-мишени, в частности молекуле МНС-I, и в частности, молекуле HLA-A, предпочтительно - HLA-A*02, и в частности, молекулах HLA-A2, кодируемых аллелем HLA-A*02:01 (Т-клетку или TCR указывают как "рестриктивный" конкретной молекулой МНС). Также можно предположить, что TCR по изобретению распознает антигенную мишень, презентуемую другими аллелями HLA-A*02.

В конкретном варианте осуществления TCR распознает HLA-A*02-связанную форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3. В конкретных вариантах осуществления TCR специфически распознает HLA-A*02:01-связанную форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или

SEQ ID NO: 3. Этот TCR является высокоспецифическим для NY-ESO и демонстрирует низкую перекрестную реактивность к другим пептидам.

Настоящее изобретение, в частности, относится к TCR, содержащему α -цепь TCR, содержащую определяющую комплементарность область 3 (CDR3), где CDR3 содержит последовательность SEQ ID NO: 6. TCR может содержать β -цепь TCR, содержащую CDR3, где CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

Более конкретно, TCR по изобретению может содержать

- α -цепь TCR, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 6; и

- β -цепь TCR, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 9.

Даже более конкретно, изобретение относится к выделенному TCR, содержащему переменную область TCR α , имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 10, и переменную область TCR β , имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 11. В частности, TCR может содержать переменную область TCR α , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и переменную область TCR β , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

Выделенный TCR может содержать α -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 12, и β -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 13. Более конкретно, выделенный TCR может содержать α -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и β -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

Таким образом, TCR может содержать α -цепь TCR и β -цепь TCR, где

- переменная область TCR α имеет аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 10, и содержит область CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

- переменная область TCR β имеет аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 11, и содержит область CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9.

TCR по изобретению выделяют и/или очищают, и он может являться растворимым или мембраносвязанным.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность TCR

может содержать одну или более фенотипически "молчащих" замен. Кроме того, TCR по изобретению можно метить. В этой области известны полезные метки, и их можно присоединять к TCR или варианту TCR общепринятыми способами, необязательно, с помощью линкеров разной длины. Термин "метка" или "метящие группы" относится к любой детектируемой метке. Дополнительно или альтернативно, аминокислотную последовательность можно модифицировать так, чтобы она содержала терапевтическое средство или модифицирующий фармакокинетику остаток. Терапевтическое средство можно выбирать из группы, состоящей из иммунной эффекторной молекулы, цитотоксического средства и радионуклида. Иммунная эффекторная молекула, например, может являться цитокином. Модифицирующий фармакокинетику остаток может являться по меньшей мере одной повторяющейся единицей полиэтиленгликоля, по меньшей мере одной гликолевой группой, по меньшей мере одной сиалиновой группой или их комбинацией.

TCR, в частности растворимую форму TCR по изобретению, можно модифицировать посредством присоединения дополнительных функциональных остатков, например, для снижения иммуногенности, повышения гидродинамического размера (размера в растворе) растворимости и/или стабильности (например, посредством усиленной защиты от протеолитической деградации) и/или увеличения времени полужизни в сыворотке. Другие полезные функциональные остатки и модификации включают "суицидальные" остатки или остатки-"переключатели", которые можно использовать для выключения или включения эффекторных клеток-хозяев, несущих TCR по изобретению, в организме пациента.

Настоящее изобретение также относится к TCR с измененным профилем гликозилирования.

К TCR, в частности, к растворимой форме TCR по изобретению также можно добавлять лекарственное средство или терапевтическое вещество, такое как низкомолекулярное соединение.

TCR, в частности растворимую форму TCR по изобретению, можно дополнительно модифицировать для встраивания дополнительных доменов, облегчающих идентификацию, отслеживание, очистку и/или выделение соответствующей молекулы (меток).

В некоторых вариантах осуществления TCR содержит один тип цепи, где α -цепь TCR и β -цепь TCR соединяют линкерной последовательностью.

Другой аспект изобретения относится к полипептиду, содержащему функциональную часть TCR, представленного в настоящем описании, где функциональная часть содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6 и 9.

В конкретных вариантах осуществления функциональная часть содержит переменную цепь TCR α и/или переменную цепь TCR β .

Конкретные варианты осуществления относятся к мультивалентному комплексу TCR, содержащему по меньшей мере два TCR, представленных в настоящем описании. В

более конкретном варианте осуществления по меньшей мере один из указанных TCR связан с терапевтическим средством.

Некоторые варианты осуществления относятся к TCR по изобретению, экспрессирующимся на эффекторной клетке, в частности иммунной эффекторной клетке, в виде функционального полипептида или функционального мультивалентного полипептида, где секреция ИФН γ индуцируется в указанной выше эффекторной клетке, экспрессирующей TCR, после связывания с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3.

Секреция ИФН γ , индуцируемая после связывания TCR по изобретению, экспрессирующегося на эффекторной клетке, с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, может составлять более 3 нг/мл, например, более 4 нг/мл, более 5 нг/мл, более предпочтительно - более 6 нг/мл, наиболее предпочтительно - даже более 7 нг/мл. Секреция ИФН γ может являться по меньшей мере в 4 раза более высокой при связывании с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, по сравнению со связыванием с HLA-A*02-связанной формой неродственного пептида (например, SEQ ID NO: 15 или 16).

Некоторые варианты осуществления относятся к выделенному TCR, полипептиду или мультивалентному комплексу TCR по изобретению, где секреция MIP-1 α и MIP-1 β , индуцируемая связыванием TCR по изобретению, экспрессирующимся на эффекторной клетке, с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, является более низкой, чем заранее определенное пороговое значение.

Секреция MIP-1 α , индуцируемая связыванием TCR по изобретению, экспрессирующимся на эффекторной клетке, с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, может составлять менее 1 нг/мл, предпочтительно - менее 0,8 нг/мл, более предпочтительно - менее 0,7 нг/мл.

Секреция MIP-1 β , индуцируемая связыванием TCR по изобретению, экспрессирующимся на эффекторной клетке, с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, может составлять менее 3 нг/мл, предпочтительно - менее 2,8 нг/мл, более предпочтительно - менее 2,5 нг/мл.

Низкие уровни секреции MIP-1 α и MIP-1 β являются предпочтительными, т.к. известно, что хемокины, такие как MIP-1 α и MIP-1 β , также называемые CLL3 и CLL4, соответственно, в частности, MIP-1 α , способствуют прогрессированию опухоли (Liao et al. *Oncotarget*, 7(4): 4310-4325 (2015); Silva et al. *Oncotarget* 8 (11): 51024-51036 (2017)).

Высвобождение цитокинов и хемокинов, такое как секреция ИФН γ и секреция MIP-1 α и MIP-1 β , можно измерять с использованием магнитных частиц с иммобилизованными антителами против T-клеток посредством анализа *in vitro*, в котором клетки T2 (Greiner et

al. 2006, Blood. 2006 Dec 15;108(13):4109-17), трансфицированные с использованием *in vitro* РНК, кодирующей одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, предпочтительно - SEQ ID NO: 3, инкубируют с CD8⁺-обогащенными и/или не-CD8⁺-обогащенными РВМС, экспрессирующими TCR, подлежащий исследованию, или анализа *in vitro* с использованием клеток Т2, нагруженных пептидом NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ (SLL) (SEQ ID NO: 3) или неродственным пептидом, полученным из NY-ESO-1 (например, SEQ ID NO: 15 или 16).

Другой аспект изобретения относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей TCR, представленный в настоящем описании, или кодирующей полипептид, описанный выше.

Дополнительный аспект изобретения относится к плазмиде или вектору, содержащему нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, как описано выше. Предпочтительно, вектор является экспрессирующим вектором или вектором, подходящим для трансдукции или трансфекции клеток, в частности, эукариотических клеток. Вектор, например, может являться ретровирусным вектором, например, гамма-ретровирусным или лентивирусным вектором.

Другой аспект изобретения относится к клетке, экспрессирующей TCR, представленный в настоящем описании. Клетка может являться выделенной или неприродной.

Другой аспект изобретения относится к клетке, содержащей нуклеиновую кислоту, как описано выше, или плазмиду или вектор, как описано выше. Более конкретно, клетка может содержать:

а) экспрессирующий вектор, содержащий по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, как описано выше, или

б) первый экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа-цепь TCR, представленного в настоящем описании, и второй экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую бета-цепь TCR, представленного в настоящем описании.

Клетка может являться лимфоцитом периферической крови (PBL) или мононуклеарной клеткой периферической крови (PBMC). Как правило, клетка является иммунной эффекторной клеткой, в частности, Т-клеткой. Другие подходящие типы клеток включают гамма-дельта-Т-клетки и NK-подобные Т-клетки.

Другой аспект изобретения относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с частью TCR, представленного в настоящем описании, опосредующей специфичность в отношении NY-ESO-1/LAGE-1. В конкретном варианте осуществления часть TCR, опосредующая специфичность в отношении NY-ESO-1/Lage-1, содержит CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 6 и/или CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 9.

Другой аспект изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей TCR, представленный в настоящем описании, полипептид, представленный в настоящем описании, мультвалентный комплекс TCR, представленный в настоящем описании, нуклеиновую кислоту, представленную в настоящем описании, вектор,

представленный в настоящем описании, клетку, представленную в настоящем описании, или антитело, представленное в настоящем описании.

Как правило, фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Другой аспект изобретения относится к TCR, представленному в настоящем описании, полипептиду, представленному в настоящем описании, мультивалентному комплексу TCR, представленному в настоящем описании, нуклеиновой кислоте, представленной в настоящем описании, вектору, представленному в настоящем описании, клетке, представленной в настоящем описании, или антителу, представленному в настоящем описании, для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения в лечении злокачественного новообразования. Злокачественное новообразование может являться гемобластомом или солидной опухолью. Злокачественное новообразование может быть выбрано из группы, состоящей из саркомы, рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, немелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, печеночноклеточной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, колоректального рака, холангиокарциномы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, миелолейкоза и острого лимфобластного лейкоза. Предпочтительно, злокачественное новообразование является саркомой или остеосаркомой.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигуре 1 показана секреция ИФН γ NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅-специфическим клоном Т-клетки T11.8-10-17 после стимуляции STAG1B-*ivt-PHK*-трансфицированной линией опухолевых клеток K562-A2 (стабильной HLA-A*02:01-трансдуцированной линией клеток K562, K562_A2+NY-ESO), где STAG1B означает копию гена человека NY-ESO-1 (STAG1B-001, Gene ID ENST0000359887), или клетками T2, нагруженными 10⁻⁵ М пептида NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (T2+SLL), K562-A2, электропорированными водой (K562_A2+H₂O), или в качестве отрицательных контролей использовали клетки T2, нагруженные 10⁻⁵ М пептидов, полученных из NY-ESO-1 (RLLEFYLAM: T2+RLL и FTVSGNILT: T2+FTV). Высвобождение ИФН γ [пг/мл] определяли с использованием стандартного ELISA.

На фигуре 2a и 2b показано уничтожение HLA-A*02-положительных NY-ESO-1/LAGE-1-положительных линий опухолевых клеток Mel624.38 (фигура 2a) и MM415 (фигура 2b) CD8⁺-обогащенными PBMC, экспрессирующими NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфический TCR T11.8-10-17 (CD8-T11.8-10-17), по сравнению с Т-клетками, трансдуцированными с использованием референсного TCR (CD8_референс-TCR) (фигура 2a). В отрицательном контроле нетрансдуцированные CD8⁺-обогащенные PBMC использовали в качестве эффекторных клеток (CD8_UT) или HLA-A*02-положительную, NY-ESO-1/LAGE-1-отрицательную линию опухолевых клеток SK-Mel23 использовали в качестве линии клеток-мишеней. Повышение красной флуоресценции клеток-мишеней (общая интегральная интенсивность в GCU \times мкм²/изображение), свидетельствующее об

индуцировании апоптоза клеток-мишеней (аннексин V, красный), тестировали каждые четыре часа всего в течение 67 часов посредством визуализации живых клеток (IncuCyte® ZOOM).

На фигуре 3 показано специфическое высвобождение ИФН γ NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфическими CD8⁺-обогащенными PBMC, экспрессирующими NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфический TCR T11.8-10-17 (CD8_T11.8-10-17), в совместной культуре с HLA-A*02:01-положительными опухолевыми клетками, экспрессирующими NY-ESO-1/LAGE-1 (Mel624.38, FM6, FM3.29, MM415, SAOS2, U266), или нагруженными NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-пептидом клетками T2 (T2+SLL). Нетрансдуированные CD8⁺Т-клетки (CD8_ut) не демонстрировали высвобождение ИФН γ после совместного культивирования с любой линией опухолевых клеток или клетками T2. В качестве отрицательного контроля, T11.8-10-17-трансгенные CD8⁺ Т-клетки (CD8_T11.8-10-17) или нетрансдуированные CD8⁺ Т-клетки (CD8_ut) сокультивировали с HLA-A*02:01-положительными опухолевыми клетками, отрицательными по мПНК NY-ESO-1/LAGE-1 (SK-Mel23, SKM1), или с нагруженными FTVSGNILTI (неродственным пептидом) клетками T2 (T2+FTV), не демонстрирующими высвобождение ИФН γ . В качестве дополнительного контроля секрецию ИФН γ тестировали в случае антигенпрезентирующих клеток (APC), культивируемых без эффекторных Т-клеток. Активацию T11.8-10-17-трансгенных CD8⁺ Т-клеток измеряли с использованием стандартного ELISA, измеряя высвобождение ИФН γ [пг/мл].

На фигуре 4 показана секреция ИФН γ NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфическими референс- или T11.8-10-17-TCR-трансдуированными CD8⁺ Т-клетками после стимуляции нагруженными пептидом (10^{-5} М) клетками T2. Тестируемые пептиды идентифицировали посредством поискового анализа *in silico* Expitope® на пептиды (см. таблицу 1), являющиеся по меньшей мере на 56% гомологичными (до 4 неправильно спаренных оснований) в отношении последовательности пептида SLL. Что касается отрицательного контроля, нетрансдуированные CD8⁺-обогащенные PBMC использовали в качестве в качестве эффекторных клеток или TCR-трансгенные Т-клетки стимулировали клетками T2, нагруженными неродственным пептидом (irr.; FTVSGNILTI). Что касается положительного контроля, Т-клетки активировали нагруженными пептидом SLL клетками T2. Секрецию ИФН γ измеряли посредством стандартного ELISA.

На фигуре 5 показано специфическое высвобождение ИФН γ CD8⁺-обогащенными PBMC, экспрессирующими NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфический TCR T11.8-10-17 (CD8_T11.8-10-17) или NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфический референс-TCR (CD8_референс-TCR), в совместной культуре с нагруженными пептидом, HLA-A*02:01-трансгенными клетками K562 (K562-A2+irr, K562-A2+SLL) или трансфицированными с помощью целевой *ivt-PHK* HLA-A*02:01-трансгенными K562-A2 (K562-A2+NYESO, K562-A2+eGFP). В качестве положительного контроля, Т-клетки стимулировали HLA-A*02:01-трансгенными клетками K562, нагруженными SLL-пептидом (K562-A2+SLL) или *ivt-PHK*, кодирующей NY-ESO-1 (K562-A2+NYESO). В качестве отрицательного контроля, HLA-

A*02:01-трансгенные K562 нагружали неродственным пептидом (K562-A2+irr., FTV) или *ivt-PHK*, кодирующей eGFP (K562-A2+eGFP). Кроме того, HLA-A*02:01-трансгенные клетки K562 трансфицировали с использованием *ivt-PHK*, кодирующей eGFP, в комбинации с длинными пептидами (таким образом, внутренне процессируемыми клеткой), полученными из соответствующих антигенов, содержащих перекрестно распознаваемые эпитопы (K562-A2+#3, K562-A2+#6, K562-A2+#11, K562-A2+#32, K562-A2+#34, K562-A2+#51), с помощью трансгенных Т-клеток, экспрессирующих TCR T11.8-10-17 по изобретению (CD8_T11.8-10-17) или референс-TCR (CD8_референс-TCR).

На фигурах 6a и 6b показано специфическое высвобождение цитокинов (ИФН γ , ФНО α) и гранзима В, измеряемое в [нг/мл], CD8⁺-обогащенными PBMC двух разных здоровых доноров (фигура 6a: донор 1; фигура 6b: донор 2), экспрессирующими NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфический TCR T11.8-10-17 (CD8_T11.8-10-17) или NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфический референс-TCR (CD8_референс-TCR) после стимуляции HLA-A*02:01-положительными клетками Т2, нагруженными пептидом NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ (T2(SLL)) или неродственным пептидом, полученным из NY-ESO-1 (T2(FTV)). Оба трансгенных TCR приводили к сравнимым степеням секреции ИФН γ , ФНО α и гранзима В соответствующими Т-клетками и демонстрировали предпочтительный цитокиновый профиль в терминах эффекторных функций.

В качестве отрицательного контроля T11.8-10-17- или референс-трансгенные CD8⁺ Т-клетки стимулировали HLA-A*02:01-положительными, нагруженными FTV клетками Т2 (T2(FTV)) или нетрансдуированные CD8⁺-обогащенные PBMC (CD8_ut) сокультивировали с нагруженными пептидом клетками Т2. Не определяли значимого высвобождения цитокинов во всех отрицательных контролях. Кроме того, клетки Т2 или Т-клетки, культивируемые в отдельности, не демонстрировали какого-либо фонового высвобождения цитокинов. Секрецию ИФН γ , ФНО α и гранзима В T11.8-10-17- или референс-трансгенными CD8⁺ Т-клетками определяли посредством мультиплексного анализа с использованием набора Milliplex MAP Kit и анализатора MagPix.

На фигурах 7a и 7b показано специфическое высвобождение хемокинов (MIP-1 α и MIP-1 β) CD8⁺-обогащенными PBMC (фигура 7a: донор 1, или фигура 7b: донор 2), экспрессирующими NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфический TCR T11.8-10-17 (CD8_T11.8-10-17) или NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфический референс-TCR (CD8_референс-TCR) после стимуляции HLA-A*02:01-положительными клетками Т2, нагруженными пептидом NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ (SLL) (T2(SLL)) или неродственным пептидом, полученным из NY-ESO-1 (FTV) (T2(FTV)). Референс-TCR-трансгенные Т-клетки секретировали более высокие количества MIP-1 α и значительно более высокие количества MIP-1 β по сравнению с трансгенными по TCR T11.8-10-17 Т-клетками после стимуляции нагруженными пептидом SLL клетками Т2.

В качестве отрицательного контроля, T11.8-10-17- или референс-трансгенные CD8⁺ Т-клетки стимулировали HLA-A*02:01-положительными, нагруженными FTV клетками Т2 или нетрансдуированные CD8⁺-обогащенные PBMC (CD8_ut) сокультивировали с

нагруженными пептидом клетками T2. Незначительное высвобождение хемокинов измеряют во всех отрицательных контролях. Кроме того, клетки T2 или T-клетки, культивируемые в отдельности, не демонстрировали какое-либо высвобождение хемокинов. Секрецию MIP-1 α и MIP-1 β T11.8-10-17- или референс-трансгенными CD8⁺ T-клетками определяли посредством мультиплексного анализа с использованием набора Milliplex MAP Kit и анализатора MagPix.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Перед более подробным описанием изобретения в контексте некоторых из предпочтительных вариантов осуществления представлены следующие общие определения.

Настоящее изобретение, иллюстративно описанное далее, можно соответствующим образом осуществлять на практике в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, не описываемых конкретно в настоящем описании.

Настоящее изобретение будет описано в отношении конкретных вариантов осуществления и со ссылкой на некоторые фигуры, на изобретение ограничено не ими, а только формулой изобретения.

Если термин "содержащий" используют в настоящем описании и формуле изобретения, он не исключает другие элементы. В целях по настоящему изобретению термин "состоящий из" считают предпочтительным вариантом термина "содержащий из". Если далее в настоящем описании группу определяют так, что она содержит по меньшей мере некоторое количество вариантов осуществления, это также следует понимать как описание группы, предпочтительно, состоящей только из этих вариантов осуществления.

В целях по настоящему изобретению термин "полученный" считают предпочтительным вариантом термина "получаемый". Если далее в настоящем описании, например, антитело определяют как получаемое из конкретного источника, это также следует понимать как описание антитела, полученного из этого источника.

Использование термина в единственном числе включает ссылку на множественное число, если не указано иначе. Термин "приблизительно" в контексте настоящего изобретения означает интервал точности, который, как будет понятно специалисту в этой области, все равно будет обеспечивать технический эффект интересующего признака. Термин, как правило, означает отклонение от указанного числового значения $\pm 10\%$, и предпочтительно - $\pm 5\%$.

Технические термины используют в их смысле или значении, общепринято понятном специалисту в этой области. Если определенным терминам придается особенное значение, далее будут приведены определения в отношении используемых терминов.

Характеристика TCR

TCR состоит из двух разных и отдельных белковых цепей, а именно цепей TCR альфа (α) и TCR бета (β). α -цепь TCR содержит переменную (V), соединительную (J) и константную (C) области. β -цепь TCR содержит переменную область (V), область разнообразия (D), соединительную (J) и константную (C) области. Реаранжированные

области V(D)J α -цепи TCR и β -цепи TCR содержат гипервариабельные области (CDR, определяющие комплементарность области), среди которых область CDR3 определяет специфическое распознавание эпитопов. На C-концевой области α -цепи TCR и β -цепи TCR содержат гидрофобный трансмембранный домен и заканчиваются коротким цитоплазматическим хвостом.

Как правило, TCR является гетеродимером одной α -цепи и одной β -цепи. Этот гетеродимер может связываться с молекулами МНС, презентирующими пептид.

В контексте изобретения термин "вариабельная область TCR α ", или "вариабельная цепь TCR α ", или "вариабельный домен" относится к вариабельной области α -цепи TCR. В контексте изобретения термин "вариабельная область TCR β " или "вариабельная цепь TCR β " относится к вариабельной области β -цепи TCR.

Локусы и гены TCR названы с использованием номенклатуры TCR International Immunogenetics (IMGT) (базы данных IMGT, [www. IMGT.org](http://www.IMGT.org); Giudicelli, V., et al., IMGT/LIGM-DB, the IMGT® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences, Nucl. Acids Res., 34, D781-D784 (2006). PMID: 16381979; T cell Receptor Factsbook, LeFranc and LeFranc, Academic Press ISBN 0-12-441352-8).

Мишень

Первый аспект изобретения относится к выделенному Т-клеточному рецептору (TCR), специфическому в отношении NY-ESO-1/LAGE-1.

NY-ESO-1/LAGE-1 принадлежит к группе так называемых раково-тестикулярных антигенов. Раково-тестикулярные антигены экспрессируются в различных злокачественных опухолях и половых клетках, но не в других тканях взрослого организма. Таким образом, NY-ESO-1/LAGE-1 является интересующей иммунотерапевтической мишенью-антигеном. Ген человека, кодирующий NY-ESO-1, обозначают как STAG1A (ENSGT00000268651), он имеет две изоформы, обозначаемые как STAG1A-002 и STAG1A-201 (ENST00000599837 и ENST00000593606), с копией, обозначаемой как STAG1B (ENSG0000184033), имеющей две изоформы, обозначаемые как STAG1B-001 и STAG1B-002 (ENST00000359887 и ENST00000328435). Ген человека, кодирующий LAGE-1, обозначают как STAG2.1 (ENSG0000126890) и он имеет изоформу, обозначаемую как CATG2.1, и изоформу, обозначаемую как CATG2.2 (ENST0000247306 и ENST0000369585).

В частности, TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (LLMWI) или ее фрагмент. Более конкретно, TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (SLLMWI) или ее фрагмент. Даже более конкретно, TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3(SLLMWITQC) или ее фрагмент. SEQ ID NO: 1-3 являются частью NY-ESO-1, а также LAGE-1.

Как правило, TCR распознает пептидный фрагмент антигена, когда он презентован молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС).

Система или комплекс лейкоцитарного антигена человека (HLA) представляет собой комплекс генов, кодирующих белки главного комплекса гистосовместимости (МНС) у

людей. HLA-A*02 является одной из конкретных аллельных групп главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I в локусе HLA-A. HLA-A*02:01 является конкретным аллелем HLA-A*02.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления TCR специфически распознает HLA-A*02-связанную форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3.

В даже более конкретном варианте осуществления TCR специфически распознает HLA-A*02:01-связанную форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3.

TCR является высоко специфическим в отношении NY-ESO и демонстрирует низкую перекрестную реактивность к другим пептидам, таким как пептиды, приведенные в SEQ ID NO: 17-22, в частности, при внутреннем процессинге. В одном из вариантов осуществления TCR, по существу, не проявляет перекрестной реактивности к пептиду SEQ ID NO: 17, в частности, при внутреннем процессинге. В некоторых вариантах осуществления TCR, по существу, не демонстрирует перекрестную реактивность по меньшей мере к одному из пептидов, приведенных в SEQ ID NO: 17-22, в частности, при внутреннем процессинге. Перекрестную реактивность можно измерять по секреции ИФН γ , как представлено в настоящем описании.

TCR-специфические последовательность

Некоторые варианты осуществления относятся к выделенному TCR, содержащему цепь TCR α и цепь TCR β , где

- α -цепь TCR содержит определяющую комплементарность область 3 (CDR3), имеющую последовательность SEQ ID NO: 6,

- β -цепь TCR содержит CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

Конкретные варианты осуществления относятся к выделенному TCR, содержащему:

- α -цепь TCR, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 6.

- β -цепь TCR, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления TCR содержит вариабельную область TCR α , имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичной в отношении SEQ ID NO: 10, и вариабельную область TCR β , имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичной в отношении SEQ ID NO: 11.

Предпочтительный вариант осуществления относится к TCR, содержащему переменную область TCR α , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и переменную область TCR β , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

TCR клона Т-клетки T11.8-10-17, используемого в примерах, содержит α -цепь TCR, содержащую определяющую комплементарность область 3 (CDR3), имеющую последовательность SEQ ID NO: 6, и β -цепь TCR, содержащую CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В частности, TCR по изобретению содержит переменную область TCR α , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и переменную область TCR β , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

Как видно из примеров, TCR по изобретению являются специфическими NYESO-1/LAGE-1 и демонстрируют лишь очень низкую перекрестную реактивность к другим эпитопам или антигенам.

Другие варианты осуществления относятся к выделенному TCR, содержащему α -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичной в отношении SEQ ID NO: 12, и β -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичной в отношении SEQ ID NO: 13.

Конкретные варианты осуществления относятся к TCR, содержащему α -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и β -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. Таким образом, TCR, представленный в настоящем описании, являющийся специфическим для комплекса HLA-A*02:01 с пептидом NY-ESO-1/LAGE-1 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, содержит цепь V α , кодируемую геном TRAV12-2, и цепь V β , кодируемую геном TRBV12-4.

Другие варианты осуществления относятся к выделенному TCR, содержащему α -цепь TCR и β -цепь TCR, где

- переменная область TCR α имеет аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичной в отношении SEQ ID NO: 10, и содержит область CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

- переменная область TCR β имеет аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичную в отношении SEQ ID NO: 11, и содержит CDR3,

имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9.

Определение процента идентичности между множеством последовательностей, предпочтительно, осуществляют с использованием приложения AlignX программы Vector NTI Advance™ 10 (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, USA). В этой программе используют модифицированный алгоритм Clustal W (Thompson et al., 1994. Nucl Acids Res. 22:pp. 4673-4680; Invitrogen Corporation; Vector NTI Advance™ 10 DNA and protein sequence analysis software. User's Manual, 2004, pp.389-662). Определение процента идентичности осуществляют с использованием стандартных параметров приложения AlignX.

TCR по изобретению выделяют или очищают. В контексте изобретения термин "выделенный" означает, что TCR не находится в контексте, в котором он исходно присутствует в природе. В контексте изобретения термин "очищенный", например, означает, что TCR не содержит или по существу не содержит другие белки и небелковые части клетки, из которой он происходит.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность TCR может содержать одну или более фенотипически "молчащих" замен.

"Фенотипически, молчащие" замены" также называют "консервативными аминокислотными заменами". Концепция "консервативных аминокислотных замен" понятна специалистам в этой области и, предпочтительно, означает, что кодоны, кодирующие положительно заряженные остатки (H, K и R), заменяют кодонами, кодирующими положительно заряженные остатки, кодоны, кодирующие отрицательно заряженные остатки (D и E) заменяют кодонами, кодирующими отрицательно заряженные остатки, кодоны, кодирующие нейтральные полярные остатки (C, G, N, Q, S, T и Y) заменяют кодонами, кодирующими нейтральными полярными остатками, и кодоны, кодирующие нейтральные неполярные остатки (A, F, I, L, M, P, V и W), заменяют кодонами, кодирующими нейтральные неполярные остатки. Эти варианты могут возникать спонтанно, их можно встраивать посредством случайного мутагенеза, или их можно встраивать посредством направленного мутагенеза. Эти изменения можно осуществлять без нарушения важных характеристик этих полипептидов. Как правило, специалисты в этой области легко могут проводить скрининг вариантов аминокислот и/или нуклеиновых кислот, кодирующих их, для определения известными в этой области способами того, снижают ли или нарушают ли, по существу, эти варианты способность к связыванию лиганда.

Специалисту в этой области также понятно, что можно модифицировать нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR. Модификации в общей последовательности нуклеиновой кислоты, которые можно использовать, включают оптимизацию кодонов последовательности. Можно осуществлять изменения, приводящие к консервативным заменам в экспрессируемой аминокислотной последовательности. Эти варианты можно осуществлять в определяющих комплементарность и неопределяющих комплементарность областях аминокислотной последовательности цепи TCR, не влияющих на функцию. Как правило, добавления и делеции необходимо осуществлять в области CDR3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотную последовательность TCR модифицируют так, чтобы она содержала детектируемую метку, терапевтическое средство или модифицирующий фармакокинетику остаток.

Неограничивающими примерами детектируемых меток являются радиоактивные метки, флуоресцентные метки, зонды нуклеиновых кислот, ферменты и контрастные реагенты. Терапевтические средства, которые можно связывать с TCR, включают радиоактивные соединения, иммуномодуляторы, ферменты или химиотерапевтические средства. Терапевтические средства можно заключать в липосомы, связанные с TCR, таким образом, что соединение может высвободиться медленно в целевом участке. С помощью этого будут избегать повреждения во время транспорта в организме и обеспечивать, чтобы терапевтическое средство, например токсин, имело максимальный эффект после связывания TCR с соответствующими антигенпрезентирующими клетками. Другими примерами терапевтических средств являются: пептидные цитотоксины, т.е. белки или пептиды со способностью уничтожать клетки млекопитающих, такие как рицин, дифтерийный токсин, псевдомонадный бактериальный экзотоксин А, ДНКаза и РНКаза. Низкомолекулярные цитотоксические средства, т.е. соединения со способностью уничтожать клетки млекопитающих, имеющие молекулярную массу менее 700 Да. Такие соединения могут содержать токсические металлы, которые могут иметь цитотоксический эффект. Кроме того, следует понимать, что эти низкомолекулярные цитотоксические средства также включают про-лекарства, т.е. соединения, распадающиеся или превращающиеся в физиологических условиях с высвобождением цитотоксических средств. Такие средства, например, могут включать доцетаксел, гемцитабин, цисплатин, производные майтанзина, рахелмицин, калихимицин, этопозид, ифосфамид, иринотекан, порфирин натрия (фотофрин II), темозоломид, топотекан, триметрексет глюкуронат, митоксантрон, ауристатин Е, винкристин и доксорубицин; радионуклиды, такие как йод-131, рений-186, индий-111, иттрий-90, висмут-210 и 213, актиний-225 и астат-213. Связывание радионуклидов с TCR или их производными, например, можно осуществлять с помощью хелатирующих средств; иммуностимуляторы, также известные как иммуностимулирующие средства, т.е. иммунные эффекторное молекулы, стимулирующие иммунный ответ. Примерами иммуностимуляторов являются цитокины, такие как ИЛ-2 и ИФН γ , антитела или их фрагменты, включая антитела против детерминант Т-клеток или НК-клеток (например, антитела против CD3, против CD28 или против CD16); альтернативные белковые каркасы с антитело-подобными связывающими характеристиками; суперантигены, т.е. антигены, вызывающие неспецифическую активацию Т-клеток, что приводит к поликлональной активации Т-клеток и массивному высвобождению цитокинов, и их мутанты; хемокины, такие как ИЛ-8, тромбоцитарный фактор 4, белок, стимулирующий рост меланомы и т.д., активаторы комплемента; ксеногенные белковые домены, аллогенные белковые домены, вирусные/бактериальные белковые домены, вирусные/бактериальные пептиды.

Молекулы антигенных рецепторов (молекулы Т-клеточных рецепторов) на Т-

лимфоцитах человека нековалентно связаны с молекулярным комплексом CD3 (T3) на поверхности клетки. Нарушения этого комплекса под действием моноклональных антител против CD3 индуцирует активацию Т-клеток. Таким образом, некоторые варианты осуществления относятся к TCR, представленному в настоящем описании, связанному (как правило, посредством слияния с N- или C-концом альфа- или бета-цепи) с антителом против CD3 или функциональным фрагментом или вариантом указанного антитела против CD3. Фрагменты антител и их варианты/аналоги, которые можно использовать в композициях и способах, представленных в настоящем описании, включают минитела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, dsFv- и scFv- фрагменты, Nanobodies™ (Ablynx (Belgium)), молекулы, содержащие синтетический отдельный иммуноглобулиновый переменный домен тяжелой цепи, полученный из антител *Верблюдовых* (например, верблюдов или лам)) и доменные антитела (содержащие аффинно зрелые отдельные иммуноглобулиновые переменные домены тяжелой цепи, или иммуноглобулиновые переменные домены легкой цепи (Domantis (Belgium)), или альтернативные белковые каркасы, демонстрирующие антитело-подобные связывающие характеристики, такие как аффитела (содержащие сконструированный каркас протеина А (Affibody (Sweden))) или антикалины (содержащие сконструированные антикалины (Pieris (German))).

Терапевтическое средство, предпочтительно, можно выбирать из группы, состоящей из иммунной эффекторной молекулы, цитотоксического средства и радионуклида. Предпочтительно, иммунная эффекторная молекула является цитокином.

Модифицирующий фармакокинетику остаток может представлять собой, например, по меньшей мере одну повторяющуюся единицу полиэтиленгликоля, по меньшей мере одну гликолевую группу, по меньшей мере одну сиалиловую группу или их комбинацию. Связывание по меньшей мере одной повторяющейся единицы полиэтиленгликоля, по меньшей мере одной гликолевой группы, по меньшей мере одной сиалиловой группы можно вызывать рядом способов, известных специалистам в этой области. В предпочтительном варианте осуществления единицы ковалентно связывают с TCR. TCR по изобретению можно модифицировать с помощью одного или более модифицирующих фармакокинетику остатков. В частности, растворимую форму TCR модифицируют с помощью одного или более модифицирующих фармакокинетику остатков. С помощью модифицирующего фармакокинетику остатка можно достигать благоприятных изменений фармакокинетического профиля терапевтического средства, например, улучшенного периода полувыведения из плазмы, сниженной или повышенной иммуногенности и улучшенной растворимости.

TCR по изобретению может являться растворимым или мембраносвязанным. Термин "растворимый" относится к TCR, находящемуся в растворимой форме (т.е. не имеющему трансмембранного или цитоплазматического доменов), например, для использования в качестве направляющего средства для доставки терапевтических средств в антигенпрезентирующую клетку. Что касается стабильности, растворимые αβ-гетеродимерные TCR, предпочтительно, имеют встроенную дисульфидную связь между

остатками соответствующих константных доменов, как описано, например, в WO 03/020763. Один или оба константных домена, присутствующие в гетеродимере $\alpha\beta$ по изобретению, могут являться укороченными на С-конце или С-концах, например, на 15, или на до 10, или на до 8 или менее аминокислот. Для использования в адоптивной терапии, $\alpha\beta$ -гетеродимерный TCR, например, можно трансфицировать в виде полноразмерных цепей, содержащих цитоплазматические и трансмембранные домены. TCR могут содержать дисульфидную связь, соответствующую связи, обнаруживаемой в природе между соответствующими константными доменами альфа и бета, дополнительно или альтернативно, может присутствовать ненативная дисульфидная связь.

TCR, в частности, растворимую форму TCR по изобретению, таким образом, можно модифицировать посредством присоединения дополнительных функциональных остатков, например, для снижения иммуногенности, повышения гидродинамического размера (размера в растворе), растворимости и/или стабильности (например, посредством усиленной защиты от протеолитической деградации) и/или увеличения времени полужизни в сыворотке.

Другие полезные функциональные остатки и модификации включают "суицидальные" остатки или остатки-"переключатели", которые можно использовать для выключения эффекторных клеток-хозяев, несущих TCR по изобретению, в организме пациента. Примером является индуцибельный "переключатель" каспазы 9 (iCasp9), описанный в Gargett and Brown *Front Pharmacol.* 2014; 5: 235. В кратком изложении, эффекторные клетки-хозяева модифицируют хорошо известными способами так, чтобы они экспрессировали домен каспазы 9, димеризация которого зависит от низкомолекулярного лекарственного средства-димеризатора, такого как AP1903/CIP, и приводит к быстрому индуцированию апоптоза в модифицированных эффекторных клетках. Система, например, описана в EP2173869 (A2). В этой области известны примеры других "суицидальных" "переключателей", например, тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV-TK), экспрессия CD20 и последующее истощение с использованием антител против CD20 или меток мус (Kieback et al, *Proc Natl AcadSci U S A.* 2008 Jan 15;105(2):623-8).

Настоящее изобретение также включает TCR с измененным профилем гликозилирования. Как известно в этой области, профили гликозилирования могут зависеть от аминокислотной последовательности (например, наличия или отсутствия конкретных гликозилируемых аминокислотных остатков, описанных ниже) и/или клетки-хозяина или организма, в котором продуцируется белок. Гликозилирование полипептидов, как правило, является N-связанным или O-связанным. Термин "N-связанный" относится к присоединению молекулы углевода к боковой цепи остатка аспарагина. Добавление N-связанных участков гликозилирования к связывающей молекуле удобно осуществлять посредством изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более трипептидных последовательностей, выбранных из аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин (где X является любой аминокислотой, за исключением

пролина). O-связанные участки гликозилирования можно встраивать посредством добавления или замены одним или более остатками серина или треонина относительно исходной последовательности.

Другими способами гликозилирования TCR является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к белку. В зависимости от используемого способа связывания, сахара можно присоединять к (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как сульфгидрильные группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как гидроксильные группы серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Аналогично, дегликозилирование (т.е. удаление молекул углеводов, присутствующих на связывающей молекуле) можно осуществлять химически, например, посредством обработки TCR трифторметансульфоновой кислотой, или ферментативно с использованием эндо- и экзогликозидаз.

Также можно добавлять лекарственное средство, такое как низкомолекулярное соединение, к TCR, в частности, растворимой форме TCR по изобретению. Связывания можно достигать посредством ковалентных связей или нековалентных взаимодействий, например, электростатических сил. Для получения конъюгатов с лекарственными средствами можно использовать различные линкеры, известные в этой области.

TCR, в частности, растворимую форму TCR по изобретению, можно дополнительно модифицировать для встраивания дополнительных доменов, способствующих идентификации, отслеживанию, очистке и/или выделению соответствующей молекулы (меток). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления α -цепь TCR или β -цепь TCR можно модифицировать так, чтобы они содержали эпитопные метки.

Эпитопные метки являются полезными примерами меток, которые можно встраивать в TCR по изобретению. Эпитопные метки являются короткими фрагментами аминокислот, делающими возможным связывание конкретного антитела и, таким образом, идентификацию и отслеживание связывания и движения растворимых TCR или клеток-хозяев в организме пациента или культивируемых клетках (хозяевах). Детекции эпитопной метки и меченого таким образом TCR можно достигать рядом разных способов.

Метки можно дополнительно использовать для стимуляции и экспансии клеток-хозяев, несущих TCR по изобретению, посредством культивирования клеток в присутствии связывающих молекул (антител), специфических для указанной метки.

В основном, TCR в некоторых случаях можно модифицировать посредством различных мутаций, с помощью которых модифицируют аффинность и скорость обратной реакции TCR с антигеном-мишенью. В частности, мутации могут повышать аффинность и/или скорость обратной реакции. Таким образом, TCR может являться мутантным в по меньшей мере одной CDR и каркасной области варибельного домена.

Однако в предпочтительном варианте осуществления области CDR TCR не модифицируют или не подвергают созреванию аффинности *in vitro*, например, как

рецепторы TCR в примерах. Это означает, что области CDR имеют природные последовательности. Это может являться предпочтительным, т.к. созревание аффинности *in vitro* может приводить к иммуногенности к молекуле TCR. Это может приводить к продукции антител против лекарственных средств, снижая или инактивируя терапевтический эффект и лечение и/или вызывая нежелательные явления.

Мутация может представлять собой одну или более замен, делеций или инсерций. Эти мутации можно встраивать любым подходящим известным в этой области способом, таким как полимеразная цепная реакция, клонирование с помощью ферментов рестрикции, безлигазное клонирование, описанные, например, в Sambrook, *Molecular Cloning* - 4th Edition (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Теоретически, непрогнозируемая специфичность TCR с риском перекрестной реактивности может происходить в результате ошибочного спаривания между эндогенными и экзогенными цепями TCR. Во избежание ошибочного спаривания последовательностей TCR, рекомбинантную последовательность TCR можно модифицировать так, чтобы она содержала минимальные муринизированные области C α и C β , как показано, эта технология эффективно повышает правильное спаривание нескольких разных трансдуцированных цепей TCR. Муринизация TCR (т.е. замена константных областей человека в альфа- и бета-цепи соответствующими областями мыши) является способом, широко используемым для улучшения экспрессии TCR на поверхности клеток-хозяев. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что муринизированные TCR эффективнее связываются с корецепторами CD3; и/или преимущественно спариваются друг с другом и менее склонны к образованию смешанных TCR на Т-клетках человека, генетически модифицированных *ex vivo* для экспрессии TCR с желаемой антигенной специфичностью, но все равно сохраняющих и экспрессирующих свои "исходные" TCR.

Идентифицировано девять аминокислот, отвечающих за улучшенную экспрессию муринизированных TCR (Sommermeier and Uckert, *J Immunol.* 2010 Jun 1; 184(11):6223-31), и предусмотрена замена одного или всех аминокислотных остатков в константной области альфа- и/или бета-цепи TCR соответствующими остатками мыши. Этот способ также обозначают как "минимальная муринизация", и он обладает преимуществом повышения экспрессии на поверхности клетки с одновременным уменьшением количества "чужеродных" аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности и, таким образом, риска иммуногенности.

Некоторые варианты осуществления относятся к выделенному TCR, представленному в настоящем описании, где TCR имеет одноцепочечный тип, где α -цепь TCR и β -цепь TCR соединяют линкерной последовательностью.

Подходящая форма единой цепи TCR содержит первый сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей вариабельной области TCR α , второй сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей вариабельной области TCR β , слитой с N-концом аминокислотной последовательности,

соответствующей внеклеточной последовательности константной области β -цепи TCR, и линкерную последовательность, с помощью которой связывают С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента. Альтернативно, первый сегмент может состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей вариабельной области β -цепи TCR, второй сегмент может состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей последовательности вариабельной области α -цепи TCR, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области α -цепи TCR. Указанные выше одноцепочечные TCR могут дополнительно содержать дисульфидную связь между первой и второй цепями, и где длина линкерной последовательности и положение дисульфидной связи являются такими, что последовательности вариабельного домена первого и второго сегмента взаимно ориентированы, по существу, как в нативных Т-клеточных рецепторах. Более конкретно, первый сегмент может состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей последовательности вариабельной области α -цепи TCR, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области α -цепи TCR, второй сегмент может состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей вариабельной области β -цепи TCR, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области β -цепи TCR, и между первой и второй цепями может находиться дисульфидная связь. Линкерная последовательность может являться любой последовательностью, не ухудшающей функцию TCR.

В контексте настоящего изобретения термин "функциональный" слитый белок α - и/или β -цепи TCR должны означать TCR или вариант TCR, например, модифицированный посредством добавления, делеции или замены аминокислот, сохраняющий по меньшей мере значительную биологическую активность. В случае α - и/или β -цепи TCR это должно означать, что обе цепи все еще могут образовывать Т-клеточный рецептор (с немодифицированной α - и/или β -цепью или с другой α - и/или β -цепью слитого белка по изобретению), выполняющий свою биологическую функцию, в частности, связывание со специфическим комплексом пептид-МНС указанного TCR и/или функциональную передачу сигнала после специфического взаимодействия пептид:МНС.

В конкретных вариантах осуществления TCR можно модифицировать так, чтобы он являлся функциональным слитым белком α - и/или β -цепи Т-клеточного рецептора (TCR), где указанная эпитопная метка имеет длину от 6 до 15 аминокислот, предпочтительно - от 9 до 11 аминокислот. В другом варианте осуществления TCR можно модифицировать так, чтобы он являлся функциональным слитым белком α - и/или β -цепи Т-клеточного рецептора (TCR), где указанный слитый белок α - и/или β -цепи Т-клеточного рецептора (TCR) содержит две или более эпитопных метки, расположенных на расстоянии или непосредственно в тандеме. Варианты осуществления слитого белка могут содержать 2, 3, 4, 5 или даже больше эпитопных меток, при условии, что слитый белок сохраняет свою биологическую активность/активности ("является функциональным").

Предпочтительным является функциональный слитый белок α - и/или β -цепи Т-клеточного рецептора (TCR) по настоящему изобретению, где указанная эпитопная метка выбрана из, в качестве неограничивающих примеров, меток CD20 или Her2/neu, или других общепринятых меток, таких как метка мус, метка FLAG, метка T7, метка HA (гемагглютинаина), метка His, S-метка, GST-метка или GFP-метка. Метки мус, T7, GST, GFP являются эпитопами, полученными из существующих молекул. В отличие от этого, FLAG является синтетической эпитопной меткой, сконструированной для высокой антигенности (см., например, патенты США №№ 4703004 и 4851341). Предпочтительно, можно использовать метку мус, т.к. доступны реагенты высокого качества для использования в ее детекции. Разумеется, эпитопные метки имеют одну или более дополнительные функции, помимо распознавания антителом. Последовательности этих меток описаны в литературе и хорошо известны специалисту в этой области.

Варианты TCR

Другой аспект изобретения относится к полипептиду, содержащему функциональную часть TCR по настоящему изобретению, где функциональная часть содержит по меньшей мере одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6 и 9.

Функциональная часть может опосредовать связывание TCR с антигеном, в частности, комплексом антиген-МНС.

В одном из вариантов осуществления функциональная часть содержит переменную цепь TCR α и/или переменную цепь TCR β , представленные в настоящем описании.

Молекула варианта TCR может обладать связывающими свойствами рецептора TCR, но ее можно комбинировать с сигнальными доменами эффекторных клеток (иных, чем Т-клетки), в частности, сигнальными доменами NK-клеток. Таким образом, некоторые варианты осуществления относятся к белку, содержащему функциональную часть TCR, представленного в настоящем описании, в комбинации с сигнальными доменами эффекторной клетки, такой как NK-клетка.

Другой аспект изобретения относится к мультивалентному комплексу TCR, содержащему по меньшей мере два TCR, представленных в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления этого аспекта по меньшей мере две молекулы TCR соединяют через линкерные остатки для получения мультивалентных комплексов. Предпочтительно, комплексы являются водорастворимыми, таким образом, линкерные остатки необходимо выбирать с учетом этого. Предпочтительно, линкерный остаток можно присоединять к определенным положениям на молекулах TCR так, чтобы минимизировать структурное разнообразие образующихся комплексов. Один из вариантов осуществления относится к комплексу TCR по изобретению, где полимерная цепь или пептидная линкерная последовательность проходит между аминокислотными остатками каждого TCR, не находящимися в последовательности переменной области TCR. Т.к. комплексы по изобретению можно использовать в медицине, линкерные остатки необходимо выбирать с

учетом их фармацевтической пригодности, например, их иммуногенности. Примеры линкерных остатков, соответствующих указанным выше желаемым критериям, известны в этой области, например, в области связывания фрагментов антител.

Примерами линкеров являются гидрофильные полимеры и пептидные линкеры. Примерами гидрофильных полимеров являются полиалкиленгликоли. Наиболее общепотребительными из этого класса являются полимеры на основе полиэтиленгликоля или PEG. Однако другие линкеры основаны на других подходящих, необязательно замещенных полиалкиленгликолях, включающих полипропиленгликоль, и сополимерах этиленгликоля и пропиленгликоля. Пептидные линкеры состоят из цепей аминокислот и образуют небольшие линкеры или домены мультимеризации, к которым можно присоединять молекулы TCR.

Один из вариантов осуществления относится к мультивалентному комплексу TCR, где по меньшей мере один из указанных TCR связан с терапевтическим средством.

Высвобождение цитокинов и хемокинов

Некоторые варианты осуществления относятся к выделенным TCR, представленным в настоящем описании, полипептиду, представленному в настоящем описании, мультивалентному комплексу TCR, представленному в настоящем описании, где секрецию ИФН γ индуцируют связыванием TCR по изобретению, экспрессирующимся на эффекторной клетке, с HLA-A*02-связанной форме аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3.

Секреция ИФН γ , индуцируемая связыванием TCR по изобретению, экспрессирующегося на эффекторной клетке, с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, может составлять более 3 нг/мл, например, более 4 нг/мл, более 5 нг/мл, более предпочтительно - более 6 нг/мл, наиболее предпочтительно - даже более 7 нг/мл. Секреция ИФН γ может являться меньшей мере в 4 раза более высокой при связывании с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, по сравнению со связыванием с HLA-A*02-связанной формой неродственного пептида (например, SEQ ID NO: 15 или 16).

Высвобождение цитокинов и хемокинов, такое как секреция ИФН γ и секреция MIP-1 α и MIP-1 β , можно измерять с помощью анализа *in vitro*, в котором клетки T2, трансфицированные с использованием *ivt-PHK*, кодирующей одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, предпочтительно - SEQ ID NO: 3, инкубируют с CD8⁺-обогащенными PBMC, экспрессирующими исследуемый TCR, или с использованием клеток T2, нагруженных пептидом NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ (SLL) или неродственным пептидом, полученным из NY-ESO-1.

Некоторые варианты осуществления относятся к выделенному TCR, представленному в настоящем описании, полипептиду, представленному в настоящем описании, или мультивалентному комплексу TCR, представленному в настоящем

описании, где секреция MIP-1 α и MIP-1 β , индуцируемая связыванием TCR по изобретению, экспрессирующимся на эффекторной клетке, с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, или ее HLA-A*02-связанной формой, является более низкой, чем заранее определенное пороговое значение. Пороговое значение можно определять с использованием конкретного соотношения эффектора и мишени по меньшей мере 1:1.

Секреция MIP-1 α *in vitro*, индуцируемая связыванием TCR по изобретению, экспрессирующимся на эффекторной клетке, с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, может составлять менее 1 нг/мл, предпочтительно - менее 0,8 нг/мл, более предпочтительно - менее 0,7 нг/мл при соотношении трансгенных TCR⁺ эффекторных клеток и клеток-мишеней по меньшей мере 1:1 каждый раз с использованием 10000 клеток. Секреция MIP-1 β , индуцируемая связыванием с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, может составлять менее 3 нг/мл, предпочтительно - менее 2,8 нг/мл, более предпочтительно - менее 2,5 нг/мл при соотношении трансгенных TCR⁺ эффекторных клеток и клеток-мишеней по меньшей мере 1:1 каждый раз с использованием 10000 клеток.

"Эффекторная клетка" может являться лимфоцитом периферической крови (PBL) или мононуклеарной клеткой периферической крови (PBMC). Как правило, эффекторная клетка является иммунной эффекторной клеткой, в частности, Т-клеткой. Другие подходящие типы клеток включают гамма-дельта-Т-клетки и НК-подобные Т-клетки.

Секреция MIP-1 α может составлять по большей мере в 15 раз выше, предпочтительно по большей мере в 10 раз выше при связывании с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, по сравнению со связыванием с HLA-A*02-связанной формой неродственного пептида (например, SEQ ID NO: 15 или 16). Секреция MIP-1 β может составлять по большей мере в 30 раз выше, предпочтительно - по большей мере в 25 раз выше при связывании с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, по сравнению со связыванием с HLA-A*02-связанной формой неродственного пептида (например, SEQ ID NO: 15 или 16).

Настоящее изобретение также относится к способам идентификации TCR или его фрагмента, связывающегося с целевыми аминокислотными последовательностями, выбранными из SEQ ID NO: 1-3, или их HLA-A*02-, предпочтительно, или HLA-A*02:01-связанной формой, где способ включает приведение TCR-кандидата или его фрагмента в контакт с аминокислотными последовательностями, выбранными из SEQ ID NO: 1-3, или их HLA-A*02-, предпочтительно, или HLA-A*02:01-связанной форме и определение того, связывается ли TCR-кандидат или его фрагмент с мишенью и/или опосредует ли иммунный ответ.

Опосредует ли TCR-кандидат или его фрагмент иммунный ответ, можно определять, например, посредством измерения секреции цитокинов, такой как секреция ИФН γ . Как

описано выше, секрецию цитокинов можно измерять посредством анализа *in vitro*, в котором клетки K562 (или другие APC), трансфицированные с использованием *ivt-PHK*, кодирующей одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, предпочтительно - SEQ ID NO: 3, инкубируют с CD8⁺-обогащенными РВМС, экспрессирующими TCR или молекулу, содержащую фрагмент исследуемого TCR.

Нуклеиновые кислоты, векторы

Другой аспект изобретения относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей TCR, представленный в настоящем описании, или кодирующей полинуклеотид, кодирующий TCR, представленный в настоящем описании.

Как правило, термин "молекула нуклеиновой кислоты" означает полимер ДНК или РНК, который может являться одноцепочечным или двухцепочечным, синтезированным или полученным (например, выделенным и/или очищенным) из природных источников, который может содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды, и которые могут содержать природные, неприродные или измененные межнуклеотидные связи, такие как фосфорамидатная связь или фосфотиоатная связь, вместо фосфодиэфирной связи, обнаруживаемой между нуклеотидами немодифицированного олигонуклеотида. Предпочтительно, нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем описании, являются рекомбинантными. В рамках изобретения термин "рекомбинантный" относится к (i) молекулам, конструируемым вне живых клеток посредством соединения природных или синтетических сегментов нуклеиновых кислот с молекулами нуклеиновой кислоты, которые могут реплицироваться в живой клетке, или (ii) молекулам, являющимся результатом репликации молекул описанных в пункте (i) выше. В целях по настоящему изобретению репликация может являться репликацией *in vitro* или репликацией *in vivo*. Нуклеиновые кислоты можно конструировать с помощью реакций химического синтеза и/или ферментативного лигирования с использованием способов, известных в этой области или коммерчески доступных (например, Genscript, Thermo Fisher и схожие компании). См., например, Sambrook et al. Например, нуклеиновую кислоту можно химически синтезировать с использованием природных нуклеотидов или различных модифицированных нуклеотидов, предназначенных для повышения биологической стабильности молекул или повышения физической стабильности дуплекса, образующегося после гибридизации (например, фосфотиоатные производные и акридин-замещенные нуклеотиды). Нуклеиновая кислота может содержать любую нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из рекомбинантных TCR, полипептидов, или белков или их функциональных частей или функциональных вариантов.

Настоящее изобретение также относится к вариантам выделенных или очищенных нуклеиновых кислот, где варианты нуклеиновых кислот содержат нуклеотидную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности, кодирующей TCR, представленный в

настоящем описании. Такой вариант нуклеотидной последовательности кодирует функциональный TCR, специфически распознающий NY-ESO1/LAGE-1.

Настоящее изобретение также относится к выделенной или очищенной нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности любой из нуклеиновых кислот, представленных в настоящем описании, или нуклеотидной последовательности, гибридизующейся в строгих условиях с нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, представленных в настоящем описании.

Нуклеотидная последовательность, гибридизующаяся в строгих условиях, предпочтительно, гибридизуется в условиях с высокой строгостью. Термин "условия с высокой строгостью" означает, что нуклеотидная последовательность специфически гибридизуется с последовательностью-мишенью (нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, представленных в настоящем описании) в количестве, детектируемо большем, чем при неспецифической гибридизации. Условия с высокой строгостью включают условия, позволяющие различать полинуклеотид с точной комплементарной последовательностью или нуклеотид, содержащий лишь несколько рассеянных неправильно спаренных оснований из случайной последовательности, которая, как оказалось, содержит несколько небольших областей (например, 3-10 оснований), совпадающих с нуклеотидной последовательностью. Такие небольшие области комплементарности легче плавятся, чем полноразмерная комплементарная последовательность из 14-17 или более оснований, и гибридизация в условиях высокой строгости позволяет легко их различать. Условия с относительно высокой строгостью будут включать, например, условия с низкой концентрацией соли и/или высокой температурой, например, при приблизительно 0,02-0,1 М NaCl или эквивалента, при температурах приблизительно 50-70°C. Такие условия с высокой строгостью допускают небольшое, если вообще допускают, неправильное спаривание между нуклеотидной последовательностью и матрицей или целевой цепью, и особенно подходят для детекции экспрессии любого из TCR, представленных в настоящем описании. Как правило, следует понимать, что условия можно делать более строгими посредством добавления увеличивающихся количеств формамида.

Как представлено где-либо в настоящем описании, можно модифицировать нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR. Полезной модификацией в общей последовательности нуклеиновой кислоты может являться оптимизация кодонов. Можно осуществлять изменения, приводящие к консервативным заменам в экспрессируемой аминокислотной последовательности. Эти изменения можно осуществлять в определяющих комплементарность и неопределяющих комплементарность областях аминокислотной последовательности цепи TCR, и они не влияют на ее функцию. Как правило, добавления и делеции не следует осуществлять в области CDR3.

Другой вариант осуществления относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, представленный в настоящем описании.

Предпочтительно, вектор является плазмидой, челночным вектором, фагмидой, космидой, экспрессирующим вектором, ретровирусным вектором, аденовирусным вектором или частицей и/или вектором для использования в генной терапии.

"Вектор" является любой молекулой или композицией, способной нести последовательность нуклеиновой кислоты в подходящую клетку-хозяина, где может происходить синтез кодируемого полипептида. Как правило, и предпочтительно, вектор является нуклеиновой кислотой, сконструированной способами рекомбинантной ДНК, известными в этой области, для встраивания желаемой последовательности нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновой кислоты по изобретению). Вектор может содержать ДНК или РНК и/или содержать липосомы. Вектор может являться плазмидой, челночным вектором, фагмидой, космидой, экспрессирующим вектором, ретровирусным вектором, лентивирусным вектором, аденовирусным вектором или частицей и/или вектором для использования в генной терапии. Вектор может включать последовательности нуклеиновой кислоты, позволяющие реплицироваться в клетке-хозяине, такие как участок начала репликации. Вектор также может включать один или более генов селективных маркеров и другие генетические элементы, известные специалистам в этой области. Предпочтительно, вектор является экспрессирующим вектором, включающим нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, функционально связанную с последовательностями, делающими возможной экспрессию указанной нуклеиновой кислоты.

Предпочтительно, вектор является экспрессирующим вектором. Более предпочтительно, вектор является ретровирусным, более конкретно - гамма-ретровирусным или лентивирусным вектором.

Клетки, линии клеток

Другой аспект изобретения относится к клетке, экспрессирующей TCR, представленный в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления клетка является выделенной или неприродной.

В конкретных вариантах осуществления клетка может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, представленный в настоящем описании, или вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту.

В клетку можно встраивать описанный выше вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный выше TCR, или можно встраивать *ivt-РНК*, кодирующую указанный TCR. Клетка может являться лимфоцитом периферической крови, такой как Т-клетка. Способ клонирования и экзогенной экспрессии TCR, например, описан в Engels et al. (Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity. Cancer Cell, 23(4), 516-26. 2013). Трансдукция первичных Т-клеток человека с использованием лентивирусных векторов описана, например, в Cribbs "Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells" BMC Biotechnol. 2013; 13: 98.

Термин "трансфекция" и "трансдукция" используют взаимозаменяемо, и они

относятся к способу, посредством которого экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты встраивают в клетку-хозяина, например, в эукариотическую клетку-хозяина. Необходимо отметить, что встраивание или перенос последовательностей нуклеиновой кислоты не ограничены упомянутыми способами, но их можно достигать рядом способов, включая электропорацию, микроинъекцию, доставку с помощью генной пушки, липофекцию, суперфекцию и упомянутую инфекцию ретровирусами или другими подходящими вирусами для трансдукции или трансфекции.

Некоторые варианты осуществления относятся к клетке, содержащей:

а) экспрессирующий вектор, содержащий по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, представленную в настоящем описании, или

б) первый экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа-цепь TCR, представленного в настоящем описании, и второй экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую бета-цепь TCR, представленного в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления клетка является лимфоцитом периферической крови (PBL) или мононуклеарной клеткой периферической крови (PBMC). Клетка может являться естественным киллером или Т-клеткой. Предпочтительно, клетка является Т-клеткой. Т-клетка может являться CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеткой.

В некоторых вариантах осуществления клетка является стволовой клеткой, подобной Т-клетке памяти.

Стволовые клетки, подобные Т-клеткам памяти (TSCM), представляют собой менее дифференцированную субпопуляцию CD8⁺ Т-клеток, отличающуюся способностью к самоподдержанию и длительному персистированию. После встречи клеток со своим антигеном *in vivo*, они далее дифференцируются в Т-клетки центральной памяти (TCM), эффекторные Т-клетки памяти (TEM) и терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти (TEMRA), при этом некоторые TSCM остаются покоящимися (Flynn et al., *Clinical & Translational Immunology* (2014)). Эти оставшиеся клетки TSCM демонстрируют способность образовывать длительную иммунологическую память *in vivo*, и, таким образом, их считают важной субпопуляцией Т-клеток для адоптивной терапии Т-клетками (Lugli et al., *Nature Protocols* 8, 33-42 (2013), Gattinoni et al., *Nat. Med.* 2011 Oct; 17(10): 1290-1297). Для ограничения совокупности Т-клеток субпопуляциями стволовых клеток Т-клеток памяти можно использовать иммуномагнитную селекцию (Riddell et al. 2014, *Cancer Journal* 20(2): 141-44).

Антитела против TCR

Другой аспект изобретения относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающемуся с частью TCR, представленного в настоящем описании, опосредующей специфичность в отношении NY-ESO-1/LAGE-1. В одном из вариантов осуществления часть TCR, опосредующая специфичность в отношении NY-ESO-1/Lage-1, содержит CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 6 и/или CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 9.

Антитело и антигенсвязывающий фрагмент может модулировать активность TCR.

Оно может блокировать или не блокировать связывание TCR с NY-ESO. Его можно использовать для модуляции терапевтической активности TCR или для диагностических целей.

Фармацевтические композиции, лечение и наборы

Другой аспект изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей TCR, представленный в настоящем описании, полипептид, содержащий функциональную часть указанного TCR, мультивалентный комплекс TCR, представленный в настоящем описании, нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, клетку, содержащую указанный TCR, или антитело, специфически связывающееся с частью TCR, представленного в настоящем описании.

Эти активные компоненты по настоящему изобретению, предпочтительно, используют в такой фармацевтической композиции в дозах, смешанных с приемлемым носителем или материалом-носителем, что заболевание можно лечить или по меньшей мере облегчать. Такая композиция (в дополнение к активному компоненту и носителю) может включать материал-наполнитель, соли, буфер, стабилизаторы, солубилизаторы и другие материалы, известные в этой области.

Термин "фармацевтически приемлемый" определяет нетоксичный материал, не мешающий эффективности биологической активности активного компонента. Выбор носителя зависит от введения.

Фармацевтическая композиция может содержать дополнительные компоненты, повышающие активность активного компонента или дополняющие лечение. Такие дополнительные компоненты и/или факторы могут являться частью фармацевтической композиции для достижения синергического действия или минимизации нежелательных явлений.

Способы составления или получения и использования активных компонентов по настоящему изобретению описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, последнее издание. Подходящим путем введения является парентеральное введение, например, внутримышечные, подкожные, интрамедуллярные инъекции, а также интратекальные, прямые внутрижелудочковые, внутривенные, внутриузловые, интраперитонеальные или внутриопухолевые инъекции. Внутривенные инъекции являются предпочтительными для лечения пациента.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для инфузии или инъекции.

Инъецируемая композиция является фармацевтически приемлемой жидкой композицией, содержащей по меньшей мере один активный ингредиент, например, выращенную популяцию Т-клеток (например, аутологичных или аллогенных для пациента, подлежащего лечению), экспрессирующих TCR. Активный ингредиент, как правило, растворяют или суспендируют в физиологически приемлемом носителе, и композиция может дополнительно содержать незначительные количества одного или более нетоксичных вспомогательных средств, таких как эмульгаторы, консерванты и рН-

буферные средства и т.п. Такие инъеклируемые композиции, которые могут быть полезны для использования со слитыми белками по настоящему изобретению, являются общепринятыми; подходящие составы хорошо известны специалистам в этой области.

Как правило, фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Таким образом, другой аспект изобретения относится к TCR, представленному в настоящем описании, полипептиду, содержащему функциональную часть указанного TCR, мультивалентному комплексу TCR, представленному в настоящем описании, нуклеиновой кислоте, кодирующей указанный TCR, вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту, клетке, содержащей указанный TCR, или антителу, специфически связывающемуся с частью TCR, представленного в настоящем описании, для использования в качестве лекарственного средства.

Некоторые варианты осуществления относятся к TCR, представленному в настоящем описании, полипептиду, содержащему функциональную часть указанного TCR, мультивалентному комплексу TCR, представленного в настоящем описании, нуклеиновой кислоте, кодирующей указанный TCR, вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту, клетке, содержащей указанный TCR, для использования в лечении злокачественного новообразования.

В одном из вариантов осуществления злокачественное новообразование является гемобластозом или солидной опухолью.

Гемобластозы не образуют солидные опухоли и, таким образом, распространены по организму. Примерами гемобластозов являются лейкоз, лимфома или множественная миелома. Существует два основных типа солидных опухолей, саркомы и карциномы. Саркомы, например, являются опухолями кровеносного сосуда, кости, жировой ткани, связки, лимфатического сосуда, мышц или сухожилия.

В одном из вариантов осуществления злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из саркомы, рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, немелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, печеночноклеточной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, колоректального рака, холангиокарциномы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, миелолейкоза и острого лимфобластного лейкоза. Предпочтительно, злокачественное новообразование является саркомой или остеосаркомой.

TCR особенно хорошо распознают остеосаркому и меланому, такую как линия клеток остеосаркомы SAOS-2 и линии клеток меланомы MM415 и Mel624.38.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям и наборам, содержащим один или более из (i) выделенного TCR, представленного в настоящем описании; (ii) вирусных частиц, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный TCR; (iii) иммунных клеток, таких как Т-клетки или НК-клетки, модифицированные для экспрессии рекомбинантного TCR, представленного в

настоящем описании; (iv) нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный TCR, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, содержащим частицы лентивирусных векторов, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный TCR, представленный в настоящем описании (или Т-клетки, модифицированные с использованием векторных частиц, представленных в настоящем описании, для экспрессии рекомбинантного TCR). Такие композиции можно вводить индивидуумам способами по настоящему изобретению, как представлено в настоящем описании далее.

Композиции, содержащие модифицированные Т-клетки, представленные в настоящем описании, можно использовать в способах и композициях для адоптивной иммунотерапии известными способами или их вариантах, которые будут очевидны специалистам в этой области с учетом настоящего описания.

В некоторых вариантах осуществления клетки составляют сначала посредством их сбора из среды для культивирования, а затем промывки и концентрирования клеток в среде и контейнерной системе, подходящей для введения ("фармацевтически приемлемый" носитель) в терапевтически эффективном количестве. Подходящая инфузионная среда может являться любым изотоническим составом среды, как правило, нормальным физиологическим раствором, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), а также можно использовать 5%-ный раствор декстрозы в воде или лактат Рингера. Инфузионную среду можно дополнять сывороточным альбумином человека.

Количество клеток в композиции для эффективного лечения, как правило, составляет более 10 клеток, и до 10^6 , до 10^8 или 10^9 клеток включительно и может составлять более 10^{10} клеток. Количество клеток будет зависеть от конечного использования, для которого предназначена композиция, также как и типа включаемых клеток. Например, если желательными являются клетки, являющиеся специфическими в отношении конкретного антигена, то популяция будет содержать более 70%, как правило, более 80%, 85% и 90-95% таких клеток. Для применения по настоящему изобретению клетки, как правило, находятся в объеме одного литра или менее, объем может составлять 500 мл или менее, даже 250 мл, или 100 мл, или менее. Таким образом, плотность желаемых клеток, как правило, составляет более 10^6 клеток/мл и, как правило, составляет собой 10^7 клеток/мл, как правило, 10^8 клеток/мл или более. Клинически значимое количество иммунных клеток можно разделить на множество инфузий, в совокупности равных 10^9 , 10^{10} или 10^{11} клеток или более. Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, могут находиться в различных формах, например, в твердой, жидкой, порошкообразной, водной или лиофилизированной форме. В этой области известны примеры подходящих фармацевтических носителей. Такие носители и/или добавки можно составлять общепринятыми способами и можно вводить индивидууму в подходящей дозе. С помощью стабилизирующих средств, таких как липиды, ингибиторы нуклеаз, полимеры и хелатирующие средства, можно предотвращать деградацию композиции в организме. В композиции, предназначенные для введения посредством инъекции, можно включать одно

или более поверхностно-активных веществ, консервантов, увлажнителей, диспергирующих средств, суспендирующих средств, буферов, стабилизаторов и изотонических средств.

Рекомбинантные TCR, представленные в настоящем описании, или частицы вирусного вектора, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный TCR, представленный в настоящем описании, можно упаковывать в виде наборов. Наборы, необязательно, могут включать один или более компонентов, таких как инструкции по использованию, устройства и дополнительные реагенты и компоненты, такие как пробирки, контейнеры и шприцы для практического осуществления способов. Примеры наборов могут включать нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантные TCR, рекомбинантные полипептиды TCR или вирусы, представленные в настоящем описании, и, необязательно, могут включать инструкции по использованию, устройство для детекции вируса у индивидуума, устройство для введения композиции индивидууму и устройство для введения композиции индивидууму.

Настоящее изобретение также относится к наборам, содержащим полинуклеотиды, кодирующие интересующий ген (например, рекомбинантный TCR). Настоящее изобретение также относится к наборам, содержащим вирусный вектор, кодирующий интересующую последовательность (например, рекомбинантный TCR), и, необязательно, полинуклеотидную последовательность, кодирующую ингибитор иммунных контрольных точек.

Наборы, предусмотренные в настоящем описании, также включают наборы для осуществления способов детекции наличия полинуклеотидов, кодирующих любую один или более из TCR, представленных в настоящем описании. В частности, такие диагностические наборы могут включать наборы подходящих праймеров для амплификации и детекции и другие соответствующие реагенты для осуществления глубокого секвенирования для детекции полинуклеотидов, кодирующих TCR, представленные в настоящем описании. В дополнительных вариантах осуществления наборы по настоящему изобретению могут содержать реагенты для детекции TCR, представленные в настоящем описании, такие как антитела или другие связывающие молекулы. Диагностические наборы также могут содержать инструкции для определения наличия полинуклеотидов, кодирующих TCR, представленные в настоящем описании, или для определения наличия TCR, представленных в настоящем описании. Набор также может содержать инструкции. Инструкции, как правило, включают конкретные выражения, описывающие компоненты, включенные в набор, и способы введения, включая способы определения соответствующего состояния индивидуума, соответствующего дозируемого количества и соответствующего способа введения. Инструкции также могут включать руководство по мониторингу индивидуума в ходе курса лечения.

Наборы по настоящему изобретению также могут включать устройство для введения индивидууму композиции, представленной в настоящем описании. В наборы по настоящему изобретению можно включать любые из различных устройств, известных в этой области для введения лекарственных средств или вакцин. Неограничивающие

примеры устройств включают гиподермальную иглу, внутривенную иглу, катетер, безыгольное инъекционное устройство, ингалятор и дозатор для жидкости, такой как глазная пипетка. Как правило, устройство для введения вируса из набора будет совместимым с вирусом из набора; например, безыгольное инъекционное устройство, такое как устройство для инъекций под высоким давлением, можно включать в наборы с вирусами, не повреждаемыми при инъекции под высоким давлением, но, как правило, их не включают в наборы с вирусами, повреждаемыми при инъекции под высоким давлением.

Наборы по настоящему изобретению также могут включать устройство для введения индивидууму соединения, такого как активатор или стимулятор Т-клеток или агонист TLR, такой как агонист TLR4. В наборы по настоящему изобретению можно включать любые из различных устройств, известных в этой области, для введения лекарственных средств индивидууму. Примеры устройств включают гиподермальную иглу, внутривенную иглу, катетер, безыгольное инъекционное устройство, но они не ограничены гиподермальной иглой, внутривенной иглой, катетером, безыгольным инъекционным устройством, ингалятором и дозатором для жидкости, таким как глазная пипетка. Как правило, устройство для введения соединения из набора будет совместимым с желаемым способом введения соединения.

Эксперименты

Примеры:

Пример 1: Выделение NY-ESO-1/LAGE-1-специфического клона Т клеток

Использовали подход примирования *in vitro* для выделения клонов Т-клеток с любым желаемым рестриктированием МНС и антигенспецифичностью. В системе примирования используют зрелые дендритные клетки (mDC) HLA-A*02:01-отрицательного донора в качестве антигенпрезентирующих клеток и аутологичные CD8⁺-обогащенные Т-клетки в качестве реактивных клеток. Транскрибируемая *in vitro* РНК (*ivt-РНК*), кодирующая полноразмерную аминокислотную последовательность STAG1A/B человека, приведенную в SEQ ID NO: 14, служит в качестве источника специфического антигена. Одновременно, *ivt-РНК*, кодирующую HLA-A*02:01 человека, используют в качестве источника элемента рестрикции, трансфицируемого в mDC для достижения аллогенного примирования в контексте специального аллеля HLA (как описано в WO2007/017201). После электропорации mDC STAG1-кодирующую *ivt-РНК* транслируют в полноразмерный белок, который затем процессируется и презентуется в виде пептидов трансгенными молекулами HLA-A*02:01, экспрессируемыми трансфицированными mDC. Совместные культуры *in vitro* Т-клеток с *ivt-РНК*-трансфицированными mDC от того же донора приводили к индуцированию *de novo* антиген-специфических Т-клеток, служащих в качестве источника соответствующих TCR. Антиген-специфические Т-клетки можно обогащать различными способами, и их клонируют посредством ограничивающих разведений или сортировки отдельных клеток на основе FACS.

Пример 1.1: Подход аллогенного примирования с использованием зрелых дендритных клеток, трансфицированных с использованием HLA-A*02:01-

кодирующей *ivt-PHK*.

Примирование Т-клеток с высокоаффинным TCR с помощью дендритных клеток осуществляли с использованием презентирования пептида аллогенными молекулами HLA-A*02:01 следующим образом:

Примирование HLA-A*02:01/CTAG1

Зрелые дендритные клетки получали (8-дневные mDC) с использованием подходящих смесей для созревания по Jonuleit et al. в случае DC (Jonuleit et al. 1997, Eur. J.Immunol. 1997, 27:3135-3142).

Антигенпрезентирующие клетки (8-дневные зрелые mDC) получали из здоровых доноров и подвергали электропорации с помощью 20 мкг *ivt-PHK*, кодирующей желаемый антиген и молекулу HLA (HLA-A*02:01). Затем полученные mDC сокультивировали с CD8⁺-обогащенными PBMC здорового донора в соотношении 1:10 в течение приблизительно 14 дней в подходящей среде для культивирования клеток, дополненной ИЛ-2 (50 ед./мл через день) при 37°C (6% CO₂). Затем NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфические клетки идентифицировали с использованием мультимеров HLA-A*02:01 NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ (ProImmune), а затем разделяли посредством сортировки отдельных клеток с использованием технологии FACS.

Пример 2: Анализы функции/специфичности

После идентификации TCR-кандидата (T11.8-10-17), связывающегося с желаемым эпитопом NY-ESO-1/LAGE-1 (NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅) на HLA-A2, осуществляли полную характеризацию функции и специфичности. С помощью анализов подтверждали специфичность клона Т-клеток T11.8-10-17 к NY-ESO-1, более точно - к NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ (фигура 1), способность T11.8-10-17-трансдуцированных CD8⁺-обогащенных Т-клеток специфически лизировать HLA-A2-положительные, нагруженные пептидом NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ линии опухолевых клеток (фигура 2) и распознавание опухолевых клеток T11.8-10-17-трансдуцированными CD8⁺-обогащенными Т-клетками в совместной культуре с различными линиями опухолевых клеток человека (фигура 3).

Пример 2.1: Анализ исходного клона Т-клеток T11.8-10-17**Пример 2.1.1: Антигенспецифичность**

Схема эксперимента: Стимуляция *ivt-PHK*-нагруженными клетками K562 или нагруженными пептидом клетками T2

Специфичность к NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ подтверждали следующим образом: осуществляли стандартный анализ ELISA сэндвич-типа, определяя ИФН γ (набор для ELISA ИФН γ человека BD).

В качестве клеток-мишеней клетки T2 (HLA-A*02^{pos}) нагружали насыщенными количествами (10⁻⁵ M) пептида NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ ("пептида SLL"; SEQ ID NO: 3) или неродственного пептида, полученного из NY-ESO-1 ("пептида FTV"; SEQ ID NO: 15), т.е. пептида FTVSGNILTI ("пептида FTV") или пептида RLLEFYLAM ("пептида RLL", SEQ ID NO: 16). Кроме того, клетки K562 (трансдуцированные с использованием HLA-A*02:01; "K562-A2") трансфицировали с использованием 20 мкг *ivt-PHK*, кодирующей NY-ESO-

1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅, или подвергали электропорации с водой в качестве контроля. Каждую линию клеток-мишеней сокультивировали с клоном Т-клеток T11.8-10-17 в соотношении приблизительно 2:1 с использованием 20000 клеток-мишеней и 10000 Т-клеток. ИФН γ определяли посредством стандартного ELISA сэндвич-типа (набор для ELISA ИФН γ человека BD).

Результаты

Клон-кандидат секретировал ИФН γ только после стимуляции с помощью NY-ESO-1-экспрессирующими клетками K562-A2 или нагруженными SLL-пептидом клетками T2, но не в комбинации с электропорированными с водой клетками K562-A2 или клетками T2, нагруженными неродственными пептидами (FVT или RLL) (фигура 1).

Пример 2.2: Распознавание опухолевых клеток

Схема эксперимента: Уничтожение опухолевых клеток

Способность T11.8-10-17- или референс-TCR-трансдуцированных CD8⁺ Т-клеток (CD8-T11.8-10-17 или CD8_референс-TCR) к уничтожению оценивали посредством сокультивирования с HLA-A*02-положительной NY-ESO-1/LAGE-1-положительной линией опухолевых клеток Mel624.38 (фигура 2a). Кроме того, уничтожение CD8-T11.8-10-17 также тестировали с использованием HLA-A*02-положительной NY-ESO-1/LAGE-1-положительной линии опухолевых клеток MM415 (фигура 2b). Что касается отрицательного контроля, нетрансдуцированные CD8⁺-обогащенные PBMC использовали в качестве эффекторных клеток (CD8_UT) или HLA-A*02-положительную, но NY-ESO-1/LAGE-1-отрицательную линию опухолевых клеток SK-Mel23 использовали в качестве клеток-мишеней. Сокультивирование осуществляли при соотношении эффектор-мишень приблизительно 4:1, т.е. 10000 адгезивных опухолевых клеток высевали за день до сокультивирования, а затем добавляли 40000 трансгенных TCR⁺ Т-клеток. Повышение красной флуоресценции клеток-мишеней (общей интегральной интенсивности в GCU \times мкм²/изображение), свидетельствующее об индуцировании апоптоза клеток-мишеней (аннексин V, красный), измеряли каждые четыре часа всего в течение 67 часов посредством мониторинга живых клеток (IncuCyte[®]ZOOM).

Результаты

T11.8-10-17- или референс-TCR-трансдуцированные CD8⁺ Т-клетки демонстрировали уничтожение лишь NY-ESO-1/LAGE-1-положительных и HLA-A2-положительных линий опухолевых клеток Mel624.38 (фигура 2a) или MM415 (фигура 2b), о чем свидетельствует повышение красной флуоресценции (IncuCyte[®], аннексин V), начинающееся уже через 10 часов. В отличие от этого, в случае опухолевых клеток, культивируемых без эффекторных клеток, или в случае NY-ESO-1/LAGE-1-отрицательной и HLA-A2-положительной линии опухолевых клеток SK-Mel23, культивируемой с T11.8-10-17-трансдуцированными CD8⁺ Т-клетками, не наблюдали повышения красной флуоресценции, что означает отсутствие уничтожения клеток-мишеней. В случае нетрансдуцированных CD8⁺ Т-клеток не наблюдали лизиса какой-либо линии опухолевых клеток.

Пример 2.3: Распознавание опухолевых клеток

Схема эксперимента: Стимуляция линиями опухолевых клеток

ELISA на ИФН γ использовали для оценки секреции цитокинов после стимуляции T11.8-10-17-трансдуцированных Т-клеток (CD8_T11.8-10-17) панелью HLA-A*02:01-положительных, NY-ESO-1/LAGE-1-положительных линий опухолевых клеток человека (Mel624.38, FM6, FM3.29, MM415, SAOS2, U266). Экспрессию NY-ESO-1/LAGE-1 в клетках-мишенях определяли посредством анализа NanoStringnCounter®. Что касается положительного контроля для T11.8-10-17-трансдуцированных Т-клеток, клетки T2 нагружали SLL-пептидом (10^{-5} М). Что касается отрицательных контролей для эффекторной функции, T11.8-10-17-трансдуцированные Т-клетки сокультивировали с клетками T2, нагруженными неродственным (FTV) пептидом (10^{-5} М), SK-Mel23 (HLA-A2-положительные, NY-ESO-1/LAGE-1-отрицательные) или SKM1 (HLA-A2-положительные, NY-ESO-1/LAGE-1-отрицательные), или нетрансдуцированные Т-клетки сокультивировали с опухолевыми клетками или нагруженными пептидом клетками T2. Культивирование клеток-мишеней без эффекторных клеток служило в качестве дополнительного отрицательного контроля. Клетки-мишени сокультивировали с Т-клетками в соотношении 2:1 с использованием 40000 T11.8-10-17-трансдуцированных Т-клеток и 20000 клеток-мишеней (фигура 3).

Результаты

T11.8-10-17-трансгенные CD8⁺ Т-клетки демонстрировали высокую степень секреции ИФН γ в совместной культуре с NY-ESO-1/LAGE-1-положительными, HLA-A*02-положительными линиями опухолевых клеток Mel624.38, FM6, FM3.29, MM415, SAOS2 и U266 или нагруженными NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ клетками T2. В отличие от этого, не наблюдали распознавания HLA-A*02-положительных, NY-ESO-1/LAGE-1-отрицательных линий опухолевых клеток SK-Mel23 и SKM1 или нагруженных неродственным пептидом клеток T2 T11.8-10-17-трансгенными CD8⁺ Т-клетками. В случае нетрансдуцированных Т-клеток, сокультивируемых с любыми клетками-мишенями или клетками-мишенями без эффекторных Т-клеток, не наблюдали секрецию ИФН γ (фигура 3).

Пример 2.4: Распознавание эпитопов с неправильным спариванием

Схема эксперимента 2.4.1: Распознавание нагруженных пептидом эпитопов

Секрецию ИФН γ NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфическими референс-(CD8-референс-TCR) или T11.8-10-17-TCR-трансдуцированными CD8⁺ (CD8_T11-10-17) Т-клетками тестировали на распознавание пептидов (секреция ИФН γ) с использованием нагруженных пептидом (10^{-5} М) клетками T2. С помощью анализа *in silico* Expitope® (Expitope® 2.0; Jaravine et al. BMC Cancer 2017) всех используемых баз данных и удаления комбинированного порогового значения (установленного на 0), тестировали 75 пептидов, являющихся на по меньшей мере 56% гомологичными (до 4 неправильных спариваний) в отношении последовательности SLL-пептида (9-мерного) и имеющих более низкий показатель связывания с МНС (IC₅₀), чем 20000 нМ. Что касается отрицательного контроля, нетрансдуцированные CD8⁺-обогащенные PBMC (CD8_UT) использовали в качестве

эффektorных клеток или TCR-трансгенные T-клетки стимулировали нагруженными неродственным (irr.; FTVSGNILTI) пептидом клетками T2 (10^{-5} M). Также тестировали фоновую секрецию ИФН γ клетками-мишенями (только клетки-мишени). Что касается положительного контроля, T-клетки активировали нагруженными пептидом SLL (#10*) клетками T2 (10^{-5} M). Клетки-мишени сокультивировали с T-клетками в соотношении 1:1 с использованием 20000 клеток-мишеней и 20000 T11.8-10-17- или референс-TCR-трансдуцированных или нетрансдуцированных T-клеток. Секрецию ИФН γ измеряли посредством стандартного ELISA в [пг/мл]. Представлены шесть распознаваемых пептидов (фигура 4).

Таблица 1

Перекрестно распознаваемый пептид	Название антигена	Пептидная последовательность	Аффинность связывания МНС [IC ₅₀]	SEQ ID NO:
#3	TBC1D32	ICLQWITQC	10668	17
#6	ITPR3	SLLFWILIC	1076	18
#11	NEMP2	SLLMWMLRL	25	19
#32	CD53	NLLFWICGC	1190	20
#34	TENM3	SLMYWITIQ	2172	21
#51	ZNF446	QLLGWITAH	9450	22

В таблице 1 приведены пептидные последовательности шести пептидов из 75 тестируемых пептидов, распознаваемых T11.8-10-17-TCR-трансдуцированными CD8⁺ (CD8_T11-10-17) T-клетками.

Результаты

Представлены пептиды, перекрестно распознаваемые T11.8-10-17- и референс-TCR-трансгенными CD8⁺ T-клетками (пептидные последовательности приведены в таблице 1). Трансгенные T-клетки распознавали пептид положительного контроля (SLL, SLLMWITQC), но не неродственный пептид (irr.; FTVSGNILTI), что, таким образом, подтверждает функциональность трансгенных T-клеток. Кроме того, оба типа трансгенных T-клеток перекрестно распознавали пептид #3, и T11.8-10-17-трансгенные T-клетки также немного активировались клетками T2, нагруженными пептидом #6, #11, #32, #34 и #51. Не наблюдали распознавания каких-либо клеток T2 нетрансдуцированными T-клетками. T-клетки или клетки-мишени T2, культивируемые отдельно, не секретировали ИФН γ (фигура 4).

Схема эксперимента 2.4.2: Распознавание неправильно спаренных эпитопов *ivt*-PHK

Специфическое высвобождение ИФН γ CD8⁺-обогащенными PBMC, экспрессирующими NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфический TCR T11.8-10-17 (CD8_T11.8-10-17) или референс-TCR (CD8_референс-TCR), в совместной культуре с

нагруженными пептидом HLA-A*02:01-трансгенными клетками K562 (K562-A2+irr., K562-A2+SLL) или с *ivt-PHK*-трансфицированными HLA-A2-трансгенными клетками K562 (K562-A2+NY-ESO-1, K562-A2+eGFP) тестировали через 16 часов после начала сокультивирования. Для этого эксперимента 3×10^6 клеток K562 в 300 мкл среды RPMI1640 подвергали электропорации с 20 мкг NY-ESO-1 или eGFP-*ivt-PHK* (300 В и 300 мкФ; экспоненциальный импульс). Что касается положительного контроля, Т-клетки стимулировали HLA-A*02:01-трансгенными клетками K562, нагруженными SLL-пептидом (10^{-5} М) (K562-A2+SLL) или 20 мкг *ivt-PHK*, кодирующей NY-ESO-1 (K562-A2+NY-ESO-1). Что касается отрицательного контроля, HLA-A*02:01-трансгенные клетки K562 нагружали неродственным пептидом (10^{-5} М; K562-A2+FTV) или 20 мкг *ivt-PHK*, кодирующей eGFP (K562-A2+eGFP). Кроме того, HLA-A*02:01-положительные клетки K562 трансфицировали с использованием 20 мкг *ivt-PHK*, кодирующей eGFP в комбинации с длинными пептидами, содержащими перекрестно распознаваемые эпитопы и фланкирующие последовательности ((K562-A2+#3, K562-A2+#6, K562-A2+#11, K562-A2+#32, K562-A2+#34, K562-A2+#51), распознаваемые трансгенными Т-клетками, экспрессирующими TCR T11.8-10-17 по изобретению (CD8_T11.8-10-17) или референс-TCR (CD8_референс-TCR). Клетки-мишени сокультивировали с Т-клетками в соотношении 2:1 с использованием 40000 клеток-мишеней и 20000 T11.8-10-17- или референс-TCR-трансдуцированных Т-клеток. Секрецию ИФН γ измеряли посредством стандартного ELISA в [пг/мл] (фигура 5).

Результаты

T11.8-10-17- и референс-TCR-трансгенные CD8⁺ Т-клетки распознавали положительные контроли, т.е. нагруженные пептидом SLL HLA-A*02:01-положительные клетки K562 (K562-A2+SLL) или трансфицированные с использованием NY-ESO-1-*ivt-PHK* HLA-A*02:01-положительные клетки K562 (K562-A2+NYESO), но не распознавали нагруженные неродственным белком HLA-A*02:01-положительные клетки K562 (K562-A2+irr. и K562-A2+eGFP), что доказывает специфичность и функциональность трансгенных Т-клеток. Хотя референс-TCR-трансгенные Т-клетки все равно могли распознавать пептид #3, когда он внутриклеточно процессируется и презентуется на HLA-A*02:01-положительных клетках K562, T11.8-10-17 больше не демонстрировал перекрестного распознавания внутренне процессируемого пептида (#3, #6, #11, #32, #34 и #51). Из этого следует, что T11.8-10-17-трансгенные Т-клетки не распознают перекрестно какой-либо из тестируемых пептидов при внутреннем процессинге по сравнению с референсным TCR.

Пример 3: Цитокиновый профиль

Схема эксперимента 3.1: Секреция ИФН γ , ФНО α и гранзима В

Оценивали специфическое высвобождение цитокинов (ИФН γ , ФНО α и гранзима В, измеряемое в [нг/мл]) TCR-трансгенными CD8⁺-обогащенными РВМС двух разных здоровых доноров (фигура 6а: донор 1; фигура 6б: донор 2), генетически модифицированными для экспрессии NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфического TCR T11.8-

10-17 (CD8_T11.8-10-17) или референс-TCR (CD8_референс-TCR) после стимуляции HLA-A*02:01-положительными клетками T2, нагруженными 10^{-5} М пептидом NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ (T2(SLL)) или 10^{-5} М неродственного пептида, полученного из NY-ESO-1 (T2(FTV)).

Что касается отрицательного контроля, T11.8-10-17- или референс-трансгенные CD8⁺ Т-клетки стимулировали HLA-A*02:01-положительными, нагруженными FTV клетками T2 (T2(FTV)) или нетрансдуированные CD8⁺-обогащенные PBMC (CD8_ut) сокультивировали с нагруженным пептидом клетками T2. Кроме того, клетки T2 или Т-клетки культивировали отдельно.

Клетки-мишени и Т-клетки сокультивировали в соотношении 1:1 с использованием 10000 клеток-мишеней и 10000 T11.8-10-17- или референс-TCR-трансдуцированных Т-клеток. Секрецию ИФН γ , ФНО α и гранзима В T11.8-10-17- или референс-трансгенными CD8⁺ Т-клетками определяли через 18 часов после начала сокультивирования посредством мультиплексного анализа с использованием набора Milliplex MAP Kit и анализатора MagPix.

Результаты

Не измеряли значимого высвобождения цитокинов во всех отрицательных контролях. Оба трансгенных TCR приводили к секреции сравнимых количеств ИФН γ , ФНО α и гранзима В соответствующими Т-клетками и демонстрировали предпочтительный цитокиновый профиль в терминах эффекторной функции.

Схема эксперимента 3.2: Секреция MIP-1 α и MIP-1 β

Специфическое высвобождение хемокинов (MIP-1 α и MIP-1 β) CD8⁺-обогащенными PBMC (фигура 7a: донор 1 или фигура 7b: донор 2), экспрессирующими NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅-специфический TCR T11.8-10-17 (CD8_T11.8-10-17) или референс-TCR (CD8_референс-TCR), после стимуляции HLA-A*02:01-положительными клетками T2, нагруженными 10^{-5} М пептида NY-ESO-1/LAGE-1₁₅₇₋₁₆₅ (SLL) (T2(SLL)) или 10^{-5} М неродственного пептида, полученного из NY-ESO-1 (FTV) (T2(FTV)). Референс-TCR-трансгенные Т-клетки секретировали более высокие количества MIP-1 α и MIP-1 β по сравнению с TCR T11.8-10-17-трансгенными Т-клетками после стимуляции нагруженными пептидом SLL клетками T2.

Что касается отрицательного контроля, T11.8-10-17- или референс-трансгенные CD8⁺ Т-клетки стимулировали HLA-A*02:01-положительными FTV-нагруженными клетками T2 или нетрансдуированные CD8⁺-обогащенные PBMC (CD8_ut) сокультивировали с нагруженными пептидом клетками T2. Кроме того, клетки T2 или Т-клетки культивировали отдельно.

Клетки-мишени и Т-клетки сокультивировали в соотношении 1:1 с использованием 10000 клеток-мишеней и 10000 T11.8-10-17- или референс-TCR-трансдуцированных Т-клеток. Секрецию MIP-1 α и MIP-1 β T11.8-10-17- или референс-трансгенными CD8⁺ Т-клетками определяли через 18 часов после начала сокультивирования посредством мультиплексного анализа с использованием набора Milliplex MAP Kit и анализатора MagPix.

Результаты

Незначительное высвобождение хемокинов измеряют во всех отрицательных контролях. Кроме того, клетки T2 или T-клетки, культивируемые отдельно, не демонстрировали какого-либо высвобождения хемокинов. T11.8-10-17-трансдуцированные T-клетки высвобождали значимо более низкие количества MIP-1 α и MIP-1 β по сравнению с референс-TCR-трансгенными T-клетками. Т.к. известно, что хемокины, такие как MIP-1 α и MIP-1 β , также называемые CCL3 и CCL4, соответственно, в частности MIP-1 α , способствуют прогрессированию опухоли (Liao et al. *Oncotarget*, 7(4): 4310-4325 (2015); Silva et al. *Oncotarget* 8 (11): 51024-51036 (2017), Yu Wu et al. *J Immunol.*, Nov 1;181(9):6384-93 (2008)), более низкие уровни секреции MIP-1 α и MIP-1 β являются предпочтительными.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), специфический в отношении NY-ESO-1/LAGE-1.

2. Выделенный TCR по п.1, где TCR содержит

- α -цепь TCR, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 6; и

- β -цепь TCR, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 9.

3. Выделенный TCR по п.1 или 2, где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент.

4. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или ее фрагмент.

5. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее фрагмент.

6. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где TCR специфически распознает HLA-A*02-связанную форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3.

7. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где TCR специфически распознает HLA-A*02:01-связанную форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3.

8. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где TCR содержит переменную область TCR α , имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 10, и переменную область TCR β , имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 11.

9. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где TCR содержит переменную область TCR α , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и переменную область TCR β , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

10. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где TCR содержит α -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 12, и β -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 13.

11. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где TCR содержит α -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и β -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

12. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где TCR является

выделенным или очищенным.

13. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где его аминокислотная последовательность содержит одну или более фенотипически "молчащих" замен.

14. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где его аминокислотная последовательность модифицирована так, что она содержит детектируемую метку, терапевтическое средство или модифицирующий фармакокинетику остаток.

15. Выделенный TCR по п.14, где терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из иммунной эффекторной молекулы, цитотоксического средства и радионуклида.

16. Выделенный TCR по п.15, где иммунная эффекторная молекула является цитокином.

17. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где TCR является растворимым или мембраносвязанным.

18. Выделенный TCR по п.14, где модифицирующий фармакокинетику остаток является по меньшей мере одной повторяющейся единицей полиэтиленгликоля, по меньшей мере одной гликолевой группой, по меньшей мере одной сиалиновой группой или их комбинацией.

19. Выделенный TCR по любому из предшествующих пп., где TCR имеет одноцепочечный тип, где α -цепь TCR и β -цепь TCR соединяют линкерной последовательностью.

20. Выделенный TCR по пп.1-19, где α -цепь TCR или β -цепь TCR модифицирована так, что содержит эпитопную метку.

21. Выделенный полипептид, содержащий функциональную часть TCR по любому из пп.1-20, где функциональная часть содержит по меньшей мере одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6 и 9.

22. Выделенный полипептид по п.21, где функциональная часть содержит переменную цепь TCR α и/или переменную цепь TCR β .

23. Мультивалентный комплекс TCR, содержащий по меньшей мере два TCR по любому из пп.1-20.

24. Мультивалентный комплекс TCR по п.23, где по меньшей мере один из указанных TCR связан с терапевтическим средством.

25. Выделенный TCR по пп.1-20, полипептид по пп.21 и 22, мультивалентный комплекс TCR по пп.23 и 24, где секреция ИФН γ индуцируется связыванием с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3.

26. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по п.25, где секреция ИФН γ , индуцируемая связыванием с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, составляет более 3 нг/мл, например, более 4 нг/мл, более 5 нг/мл, более предпочтительно - более 6 нг/мл, наиболее предпочтительно - даже более 7 нг/мл.

27. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по п.25 или 26, где секреция ИФН γ является по меньшей мере в 4 раза более высокой при связывании с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, по сравнению со связыванием с HLA-A*02-связанной формой неродственного пептида (например SEQ ID NO: 15 или 16).

28. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по пп.25-27, где секрецию ИФН γ измеряют посредством анализа *in vitro*, в котором клетки T2, трансфицированные с использованием *inv*-РНК, кодирующей одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, предпочтительно - SEQ ID NO: 3, инкубируют с CD8⁺-обогащенными РВМС, экспрессирующими исследуемый TCR.

29. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по пп.25-28, где секреция MIP-1 α и/или MIP-1 β , индуцируемая связыванием с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, или ее HLA-A*02-связанной формой, является более низкой, чем заранее определенное пороговое значение.

30. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по п.29, где секреция MIP-1 α , индуцируемая связыванием с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, составляет менее 1 нг/мл, предпочтительно - менее 0,8 нг/мл, более предпочтительно - менее 0,7 нг/мл.

31. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по п.29 или 30, где секреция MIP-1 β , индуцируемая связыванием с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, составляет менее 3 нг/мл, предпочтительно - менее 2,8 нг/мл, более предпочтительно - менее 2,5 нг/мл.

32. Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR по любому из пп.1-20 или кодирующая полипептид по пп.21-22.

33. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.32.

34. Вектор по п.33, где вектор является экспрессирующим вектором.

35. Вектор по п.33 или 34, где вектор является ретровирусным вектором.

36. Вектор по п.33 или 34, где вектор является лентивирусным вектором.

37. Клетка, экспрессирующая TCR по пп.1-20.

38. Клетка по п.37, где клетка является выделенной или неприродной.

39. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.32 или вектор по пп.33-36.

40. Клетка по пп.37-39, где клетка содержит:

а) экспрессирующий вектор, содержащий по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по п. 35.

б) первый экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа-цепь TCR по любому из пп.1-23, и второй экспрессирующий вектор,

содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую бета-цепь TCR по любому из пп.1-23.

41. Клетка по любому из пп.37-40, где клетка является лимфоцитом периферической крови (PBL) или моноклеарной клеткой периферической крови (PBMC).

42. Клетка по любому из пп.37-41, где клетка является Т-клеткой.

43. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с частью TCR по пп.1-20, опосредующей специфичность в отношении NY-ESO-1/LAGE-1.

44. Антитело по п.43, где часть TCR, опосредующая специфичность в отношении NY-ESO-1/Lage-1, содержит CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 6 и/или CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 9.

45. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный TCR по пп.1-20 и 25-31, полипептид по пп.21-22 и 25-31, мультивалентный комплекс TCR по любому из пп.23-24 и 25-31, нуклеиновую кислоту по п.32, вектор по пп.33-36, клетку по любому из пп.37-42 или антитело по пп.43-44.

46. Фармацевтическая композиция по п.45, где фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

47. Выделенный TCR по пп.1-20 и 25-31, полипептид по пп.21-22 и 25-31, мультивалентный комплекс TCR по любому из пп.23-24 и 25-31, нуклеиновая кислота по п.32, вектор по пп.33-36, клетка по любому из пп.37-42 или антитело по пп.43-44 для применения в качестве лекарственного средства.

48. Выделенный TCR по пп.1-20 и 25-31, полипептид по пп.21-22 и 25-31, мультивалентный комплекс TCR по любому из пп.23-24 и 25-31, нуклеиновая кислота по п.32 или клетка по любому из пп.37-42 для применения в лечении злокачественного новообразования.

49. TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота или клетка по п.48, где злокачественное новообразование является гемобластомом или солидной опухолью.

50. TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота или клетка по пп.48 и 49, где злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из саркомы, рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, немелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, печеночноклеточной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, колоректального рака, холангиокарциномы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, миелолейкоза и острого лимфобластного лейкоза.

По доверенности

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ ПО СТ.34 РСТ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ**

1. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), специфический в отношении NY-ESO-1/LAGE-1, где TCR содержит

- α -цепь TCR, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 6; и

- β -цепь TCR, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и CDR3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 9.

2. Выделенный TCR по п.1, где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент.

3. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или ее фрагмент.

4. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее фрагмент.

5. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR специфически распознает HLA-A*02-связанную форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3.

6. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR специфически распознает HLA-A*02:01-связанную форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3.

7. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR содержит переменную область TCR α , имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 10, и переменную область TCR β , имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 11.

8. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR содержит переменную область TCR α , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и переменную область TCR β , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

9. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR содержит α -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 12, и β -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% идентичной в отношении SEQ ID NO: 13.

10. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR содержит α -цепь TCR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и β -цепь TCR,

имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

11. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR является выделенным или очищенным.

12. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где его аминокислотная последовательность содержит одну или более фенотипически "молчащих" замен.

13. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где его аминокислотная последовательность модифицирована так, что она содержит детектируемую метку, терапевтическое средство или модифицирующий фармакокинетику остаток.

14. Выделенный TCR по п.13, где терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из иммунной эффекторной молекулы, цитотоксического средства и радионуклида.

15. Выделенный TCR по п.14, где иммунная эффекторная молекула является цитокином.

16. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR является растворимым или мембраносвязанным.

17. Выделенный TCR по п.13, где модифицирующий фармакокинетику остаток является по меньшей мере одной повторяющейся единицей полиэтиленгликоля, по меньшей мере одной гликолевой группой, по меньшей мере одной сиалиновой группой или их комбинацией.

18. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR имеет одноцепочечный тип, где α -цепь TCR и β -цепь TCR соединяют линкерной последовательностью.

19. Выделенный TCR по пп.1-18, где α -цепь TCR или β -цепь TCR модифицирована так, что содержит эпитопную метку.

20. Выделенный полипептид, содержащий функциональную часть TCR по любому из пп.1-20, где функциональная часть содержит по меньшей мере одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6 и 9.

21. Выделенный полипептид по п.20, где функциональная часть содержит переменную цепь TCR α и/или переменную цепь TCR β .

22. Мультивалентный комплекс TCR, содержащий по меньшей мере два TCR по любому из пп.1-20.

23. Мультивалентный комплекс TCR по п.22, где по меньшей мере один из указанных TCR связан с терапевтическим средством.

24. Выделенный TCR по пп.1-19, полипептид по пп.21 и 22, мультивалентный комплекс TCR по пп.23 и 24, где секреция ИФН γ индуцируется связыванием с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3.

25. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по п.24, где

секреция ИФН γ , индуцируемая связыванием с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, составляет более 3 нг/мл, например, более 4 нг/мл, более 5 нг/мл, более предпочтительно - более 6 нг/мл, наиболее предпочтительно - даже более 7 нг/мл.

26. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по п.24 или 25, где секреция ИФН γ является по меньшей мере в 4 раз более высокой при связывании с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, по сравнению со связыванием с HLA-A*02-связанной формой неродственного пептида (например, SEQ ID NO: 15 или 16).

27. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по пп.24-26, где секрецию ИФН γ измеряют посредством анализа *in vitro*, в котором клетки T2, трансфицированные с использованием *inv*-РНК, кодирующей одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, предпочтительно - SEQ ID NO: 3, инкубируют с CD8⁺-обогащенными PBMC, экспрессирующими исследуемый TCR.

28. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по пп.24-27, где секреция MIP-1 α и/или MIP-1 β , индуцируемая связыванием с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, или ее HLA-A*02-связанной формой, является более низкой, чем заранее определенное пороговое значение.

29. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по п.28, где секреция MIP-1 α , индуцируемая связыванием с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, составляет менее 1 нг/мл, предпочтительно - менее 0,8 нг/мл, более предпочтительно - менее 0,7 нг/мл.

30. Выделенный TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR по п.28 или 29, где секреция MIP-1 β , индуцируемая связыванием с HLA-A*02-связанной формой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3, составляет менее 3 нг/мл, предпочтительно - менее 2,8 нг/мл, более предпочтительно - менее 2,5 нг/мл.

31. Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR по любому из пп.1-19 или кодирующая полипептид по пп.20-21.

32. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.31.

33. Вектор по п.32, где вектор является экспрессирующим вектором.

34. Вектор по п.32 или 33, где вектор является ретровирусным вектором.

35. Вектор по п.32 или 33, где вектор является лентивирусным вектором.

36. Клетка, экспрессирующая TCR по пп.1-19.

37. Клетка по п.36, где клетка является выделенной или неприродной.

38. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.31 или вектор по пп.32-35.

39. Клетка по пп.36-38, где клетка содержит:

а) экспрессирующий вектор, содержащий по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по п.34.

б) первый экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа-цепь TCR по любому из пп.1-22, и второй экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую бета-цепь TCR по любому из пп.1-22.

40. Клетка по любому из пп.36-39, где клетка является лимфоцитом периферической крови (PBL) или мононуклеарной клеткой периферической крови (PBMC).

41. Клетка по любому из пп.36-40, где клетка является Т-клеткой.

42. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с частью TCR по пп.1-19, опосредующей специфичность в отношении NY-ESO-1/LAGE-1.

43. Антитело по п.42, где часть TCR, опосредующая специфичность в отношении NY-ESO-1/Lage-1, содержит CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 6 и/или CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 9.

44. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный TCR по пп.1-19 и 24-30, полипептид по пп.20-21 и 24-30, мультивалентный комплекс TCR по любому из пп.22-23 и 24-30, нуклеиновую кислоту по п.31, вектор по пп.32-35, клетку по любому из пп.36-41 или антитело по пп.42-43.

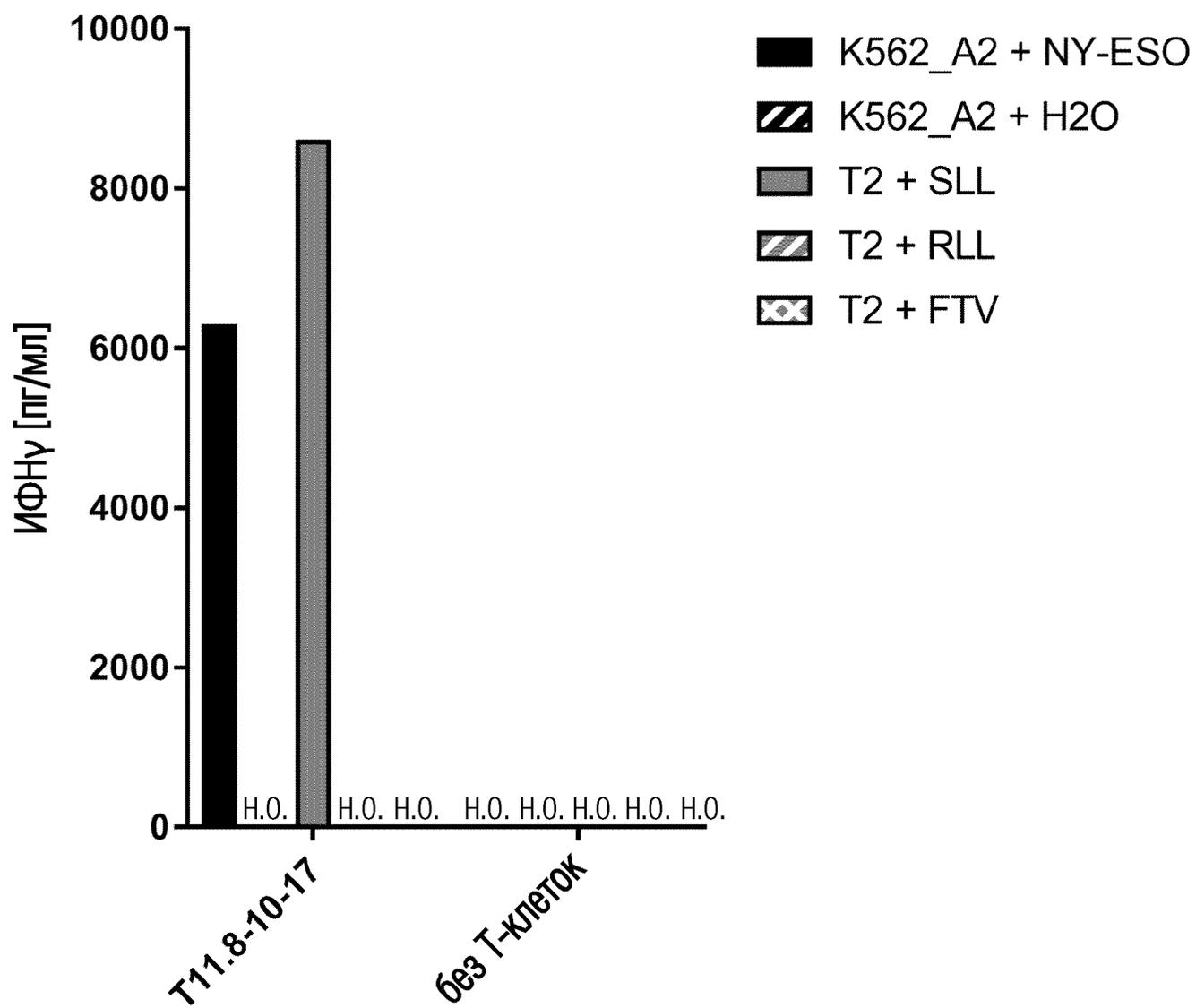
45. Фармацевтическая композиция по п.44, где фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

46. Выделенный TCR по пп.1-19 и 24-30, полипептид по пп.20-21 и 24-30, мультивалентный комплекс TCR по любому из пп.22-23 и 24-30, нуклеиновая кислота по п.31, вектор по пп.32-35, клетка по любому из пп.36-41 или антитело по пп.42-43 для применения в качестве лекарственного средства.

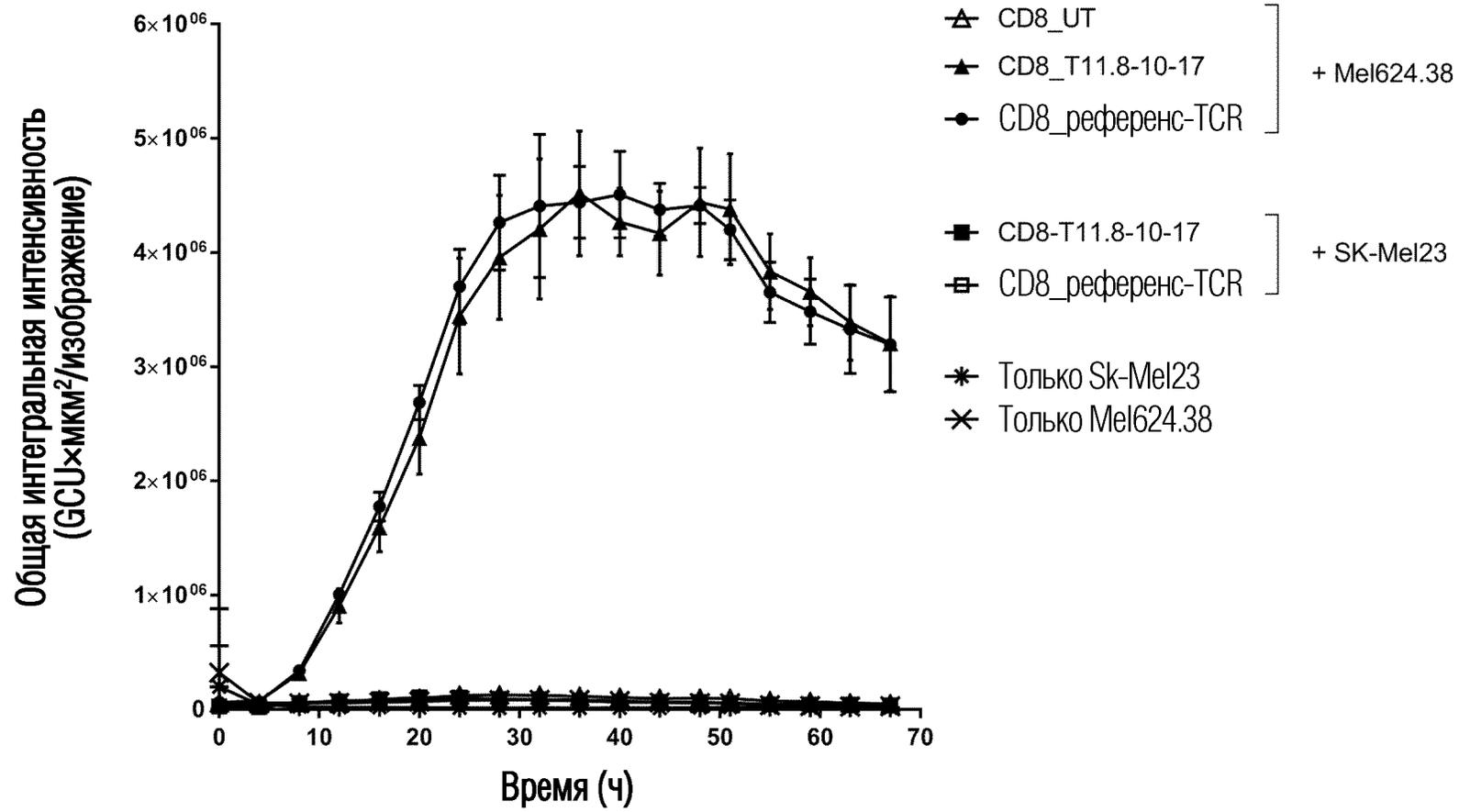
47. Выделенный TCR по пп.1-19 и 24-30, полипептид по пп.20-21 и 24-30, мультивалентный комплекс TCR по любому из пп.22-23 и 24-30, нуклеиновая кислота по п.31 или клетка по любому из пп.36-41 для применения в лечении злокачественного новообразования.

48. TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота или клетка по п.47, где злокачественное новообразование является гемобластозом или солидной опухолью.

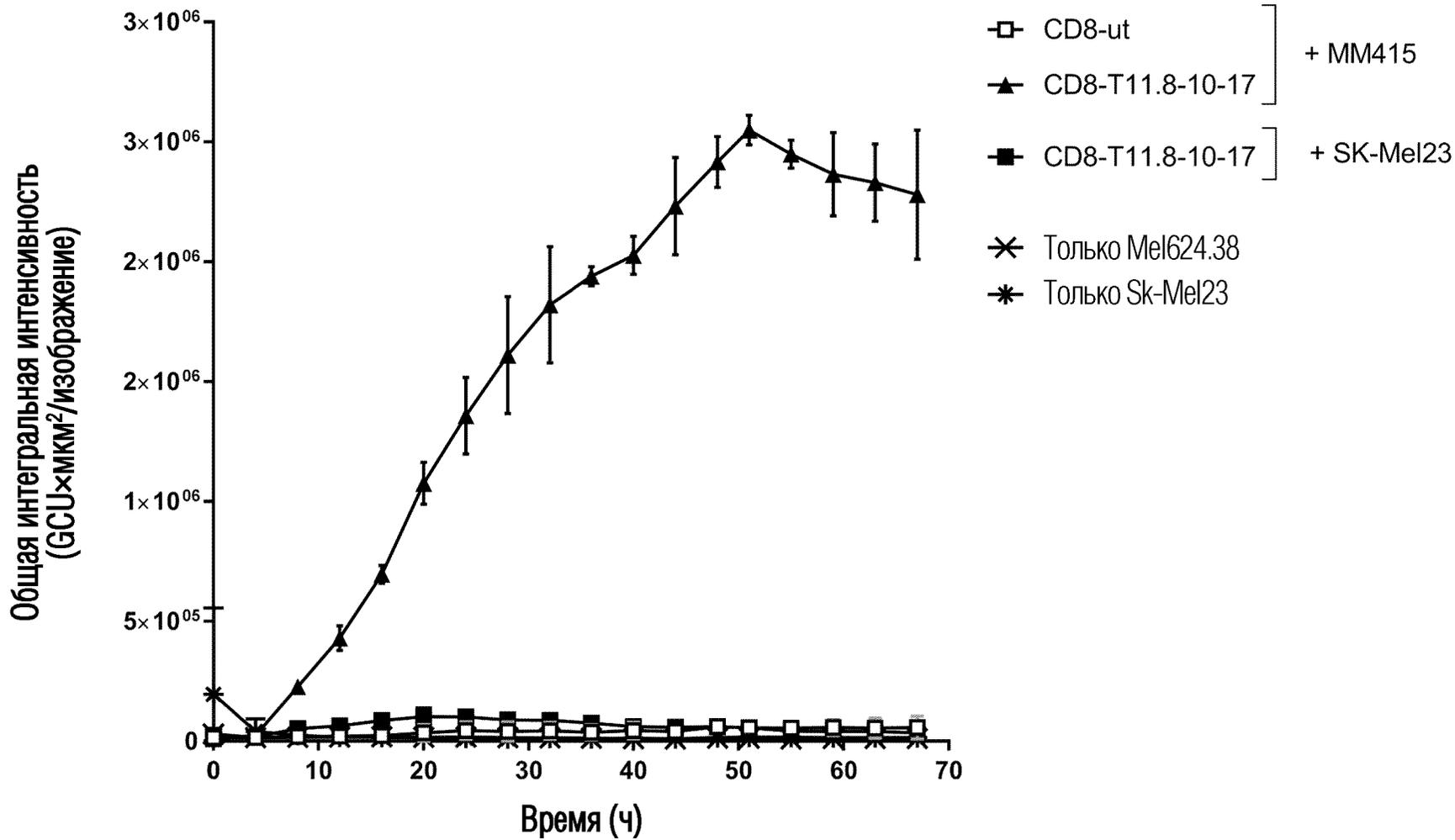
49. TCR, полипептид, мультивалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота или клетка по пп.47 и 48, где злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из саркомы, рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, немелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, печеночноклеточной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, колоректального рака, холангиокарциномы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, миелолейкоза и острого лимфобластного лейкоза.



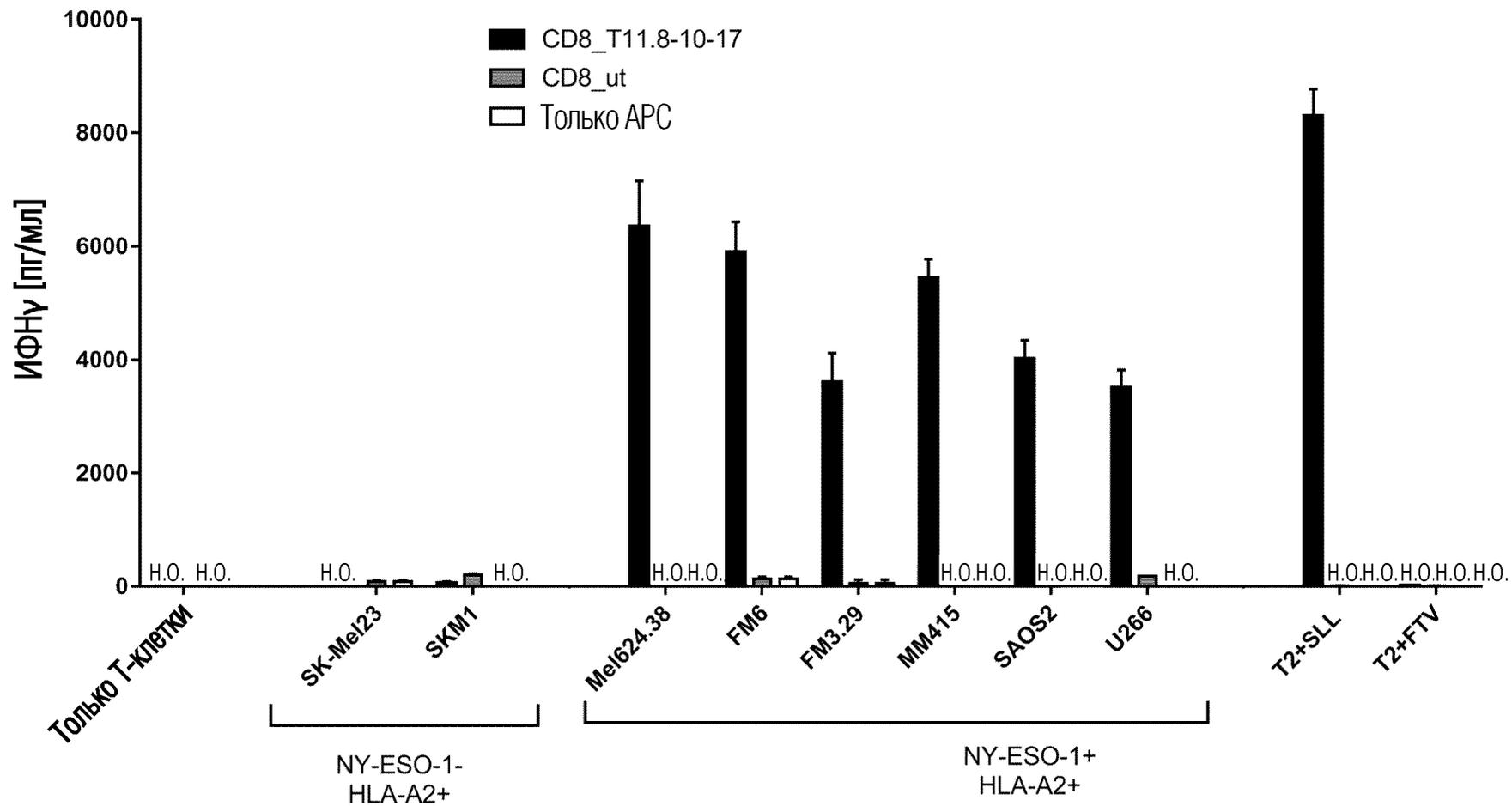
ФИГ. 1



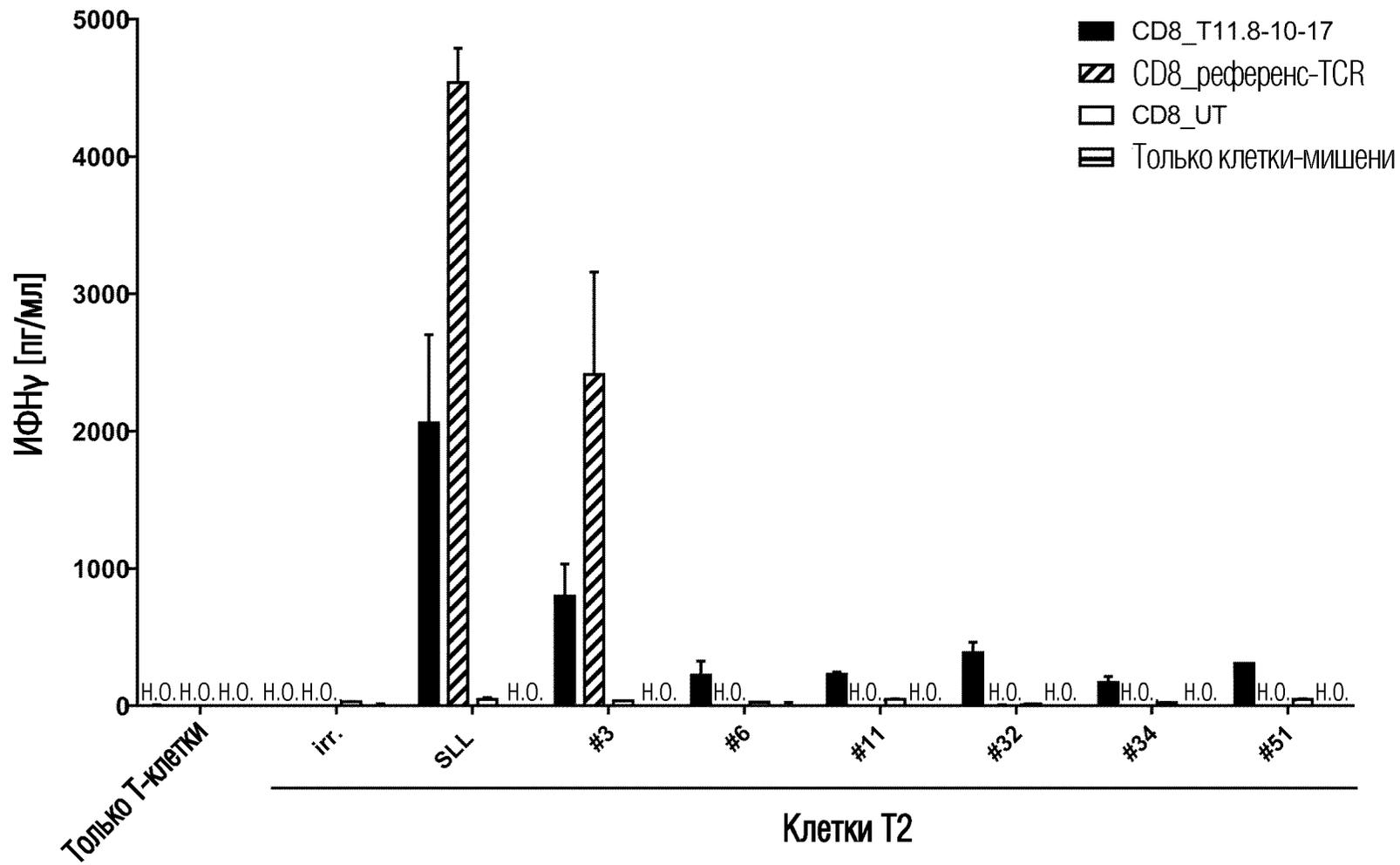
ФИГ. 2А



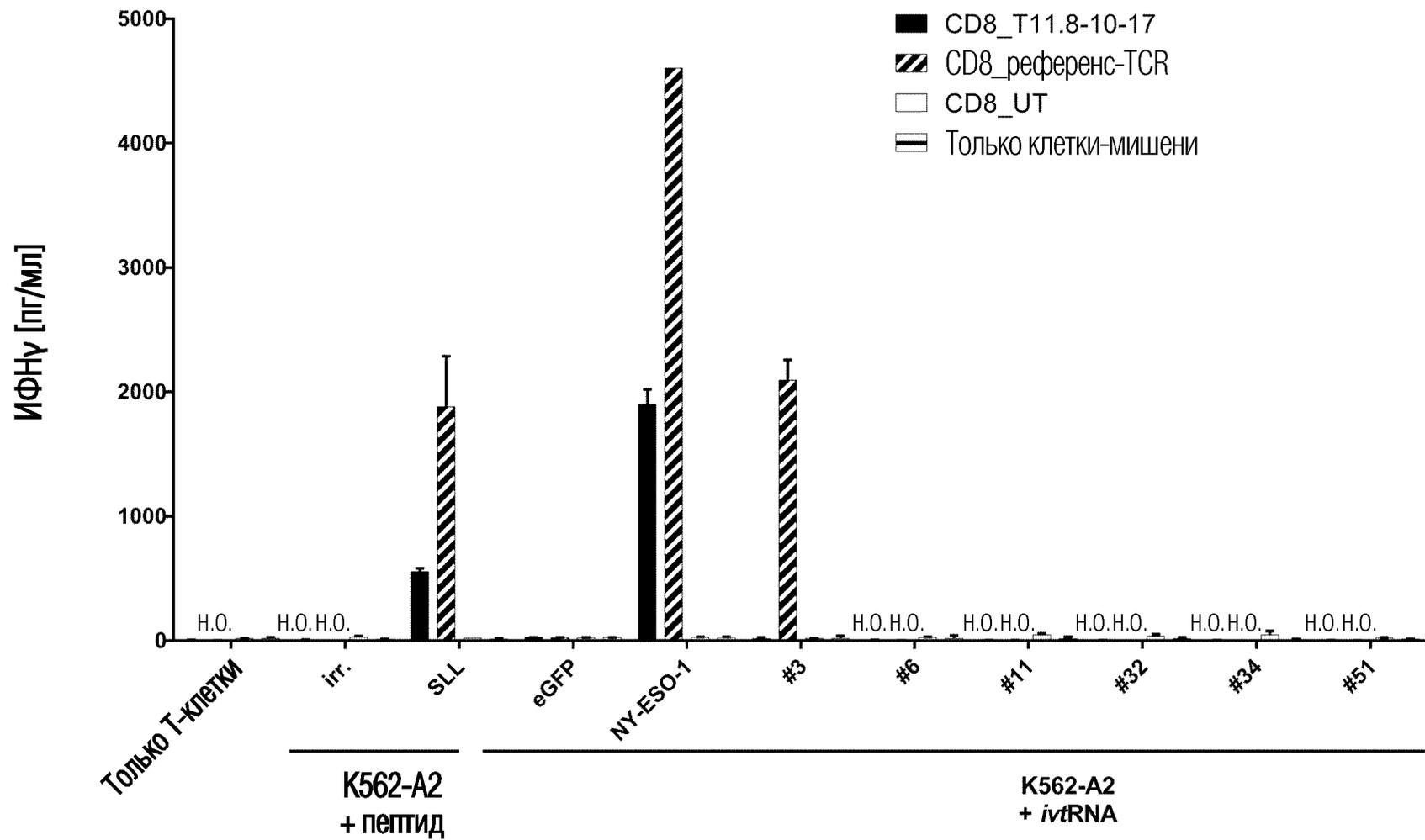
ФИГ. 2В



ФИГ. 3

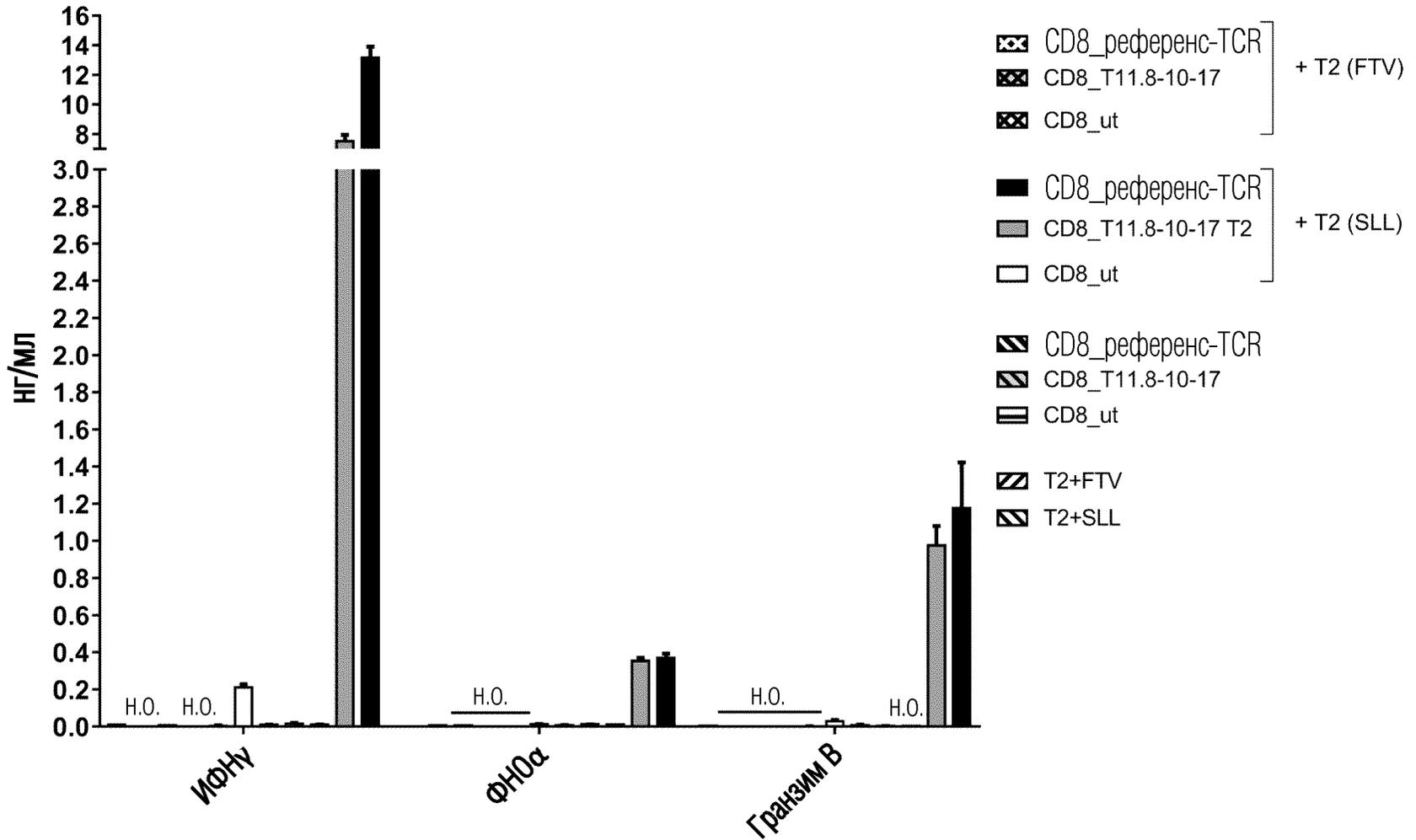


ФИГ. 4



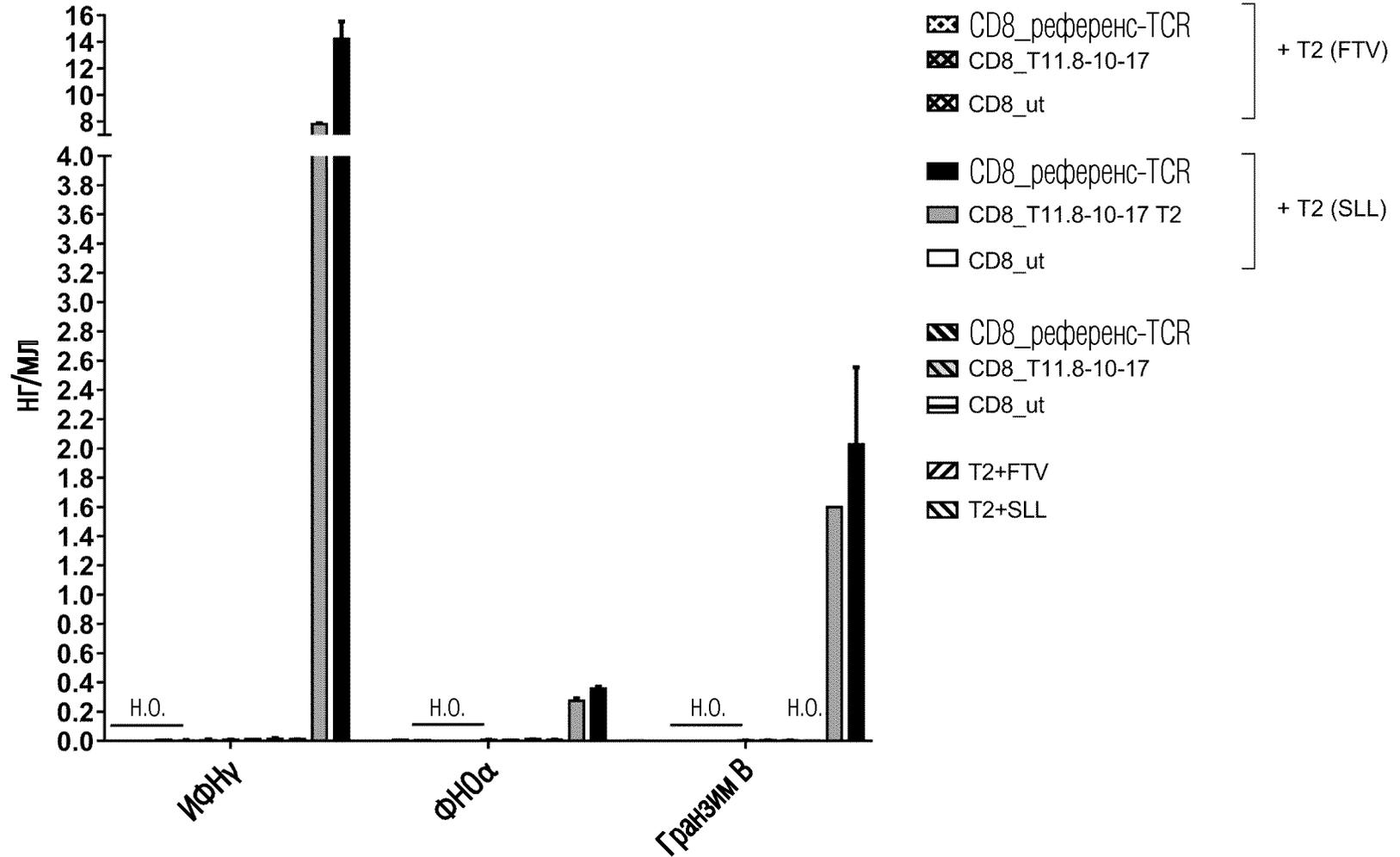
ФИГ. 5

Донор 1



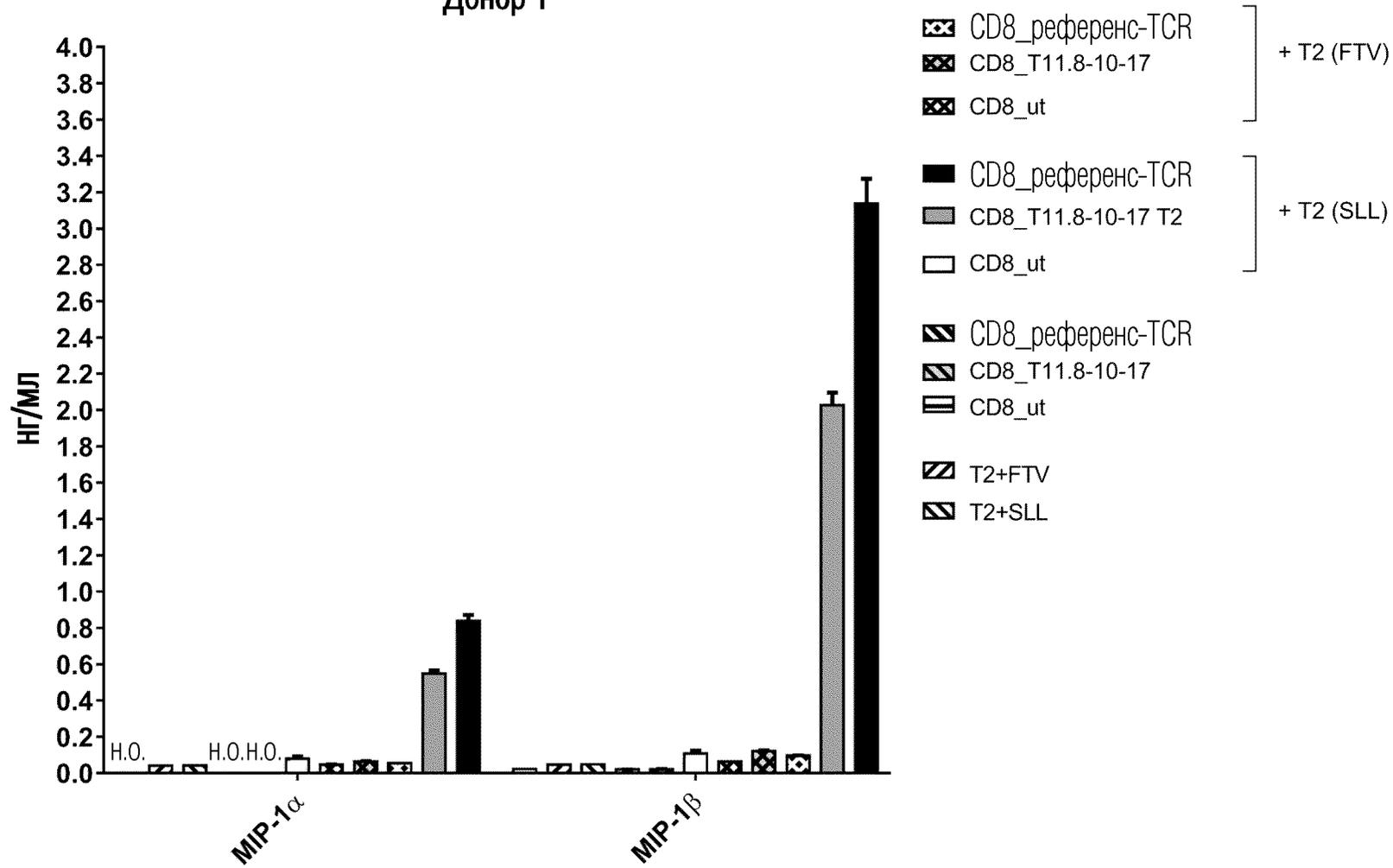
ФИГ. 6А

Донор 2



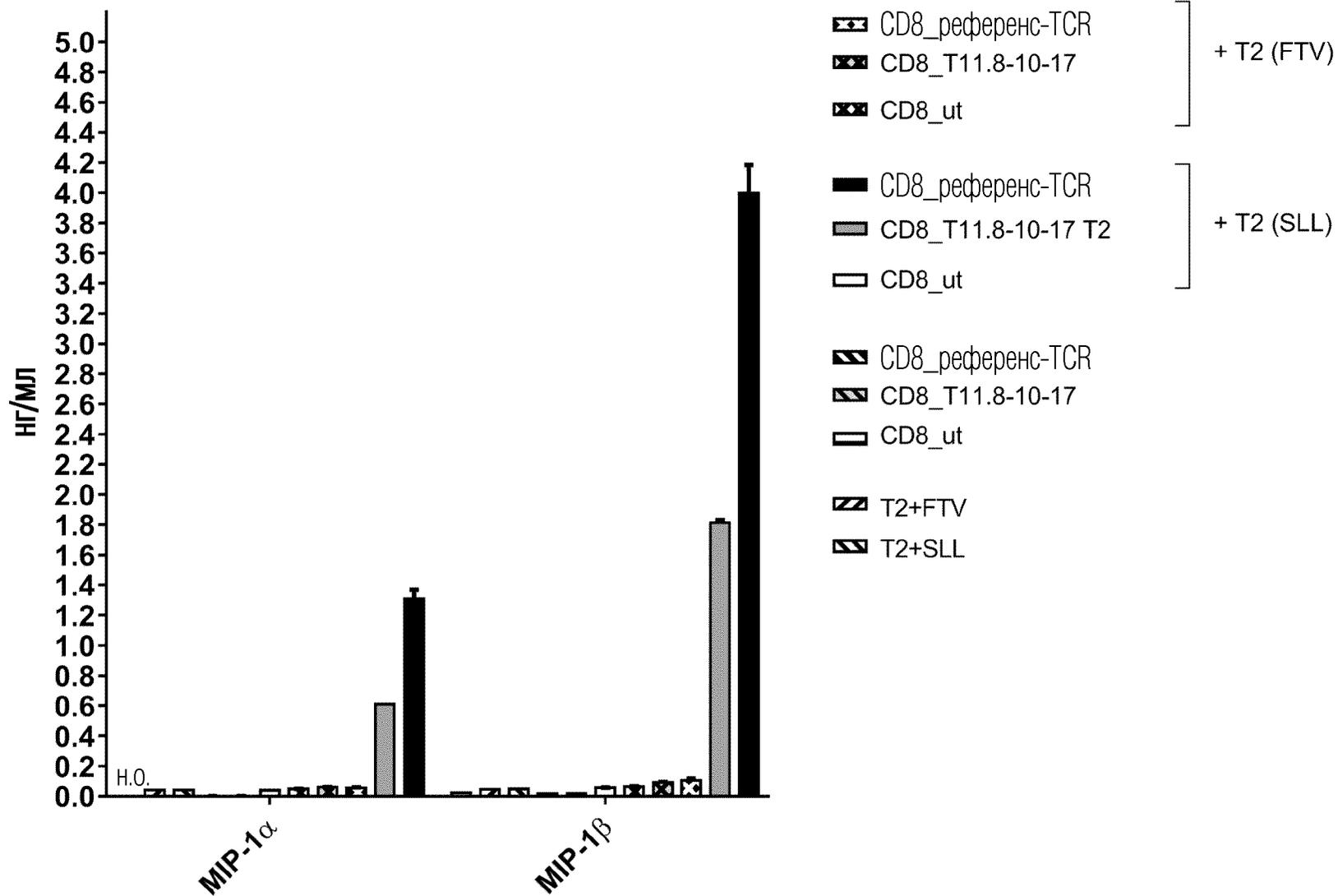
ФИГ. 6В

Донор 1



ФИГ. 7А

Донор 2



ФИГ. 7В