

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202191083 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.07.23

(51) Int. Cl. C07K 14/73 (2006.01)  
C07K 14/705 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.10.18

(54) ХИМЕРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ

(31) 18201560.2

(32) 2018.10.19

(33) EP

(86) PCT/EP2019/078449

(87) WO 2020/079264 2020.04.23

(71) Заявитель:  
ЕТХ ЦЮРИХ (CH)

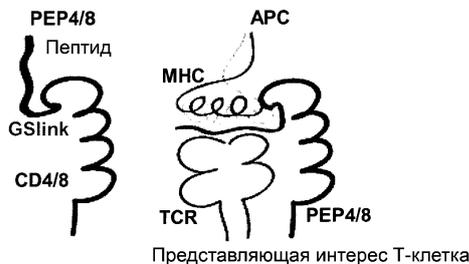
(72) Изобретатель:

Кизилев Ян, Обермайр Франц Йозеф,  
Копф Манфред (CH)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к способу одновременного обнаружения и обогащения антиген-специфических Т-клеток и пептидов, специфически распознаваемых их Т-клеточными рецепторами (TCR). Этот способ также позволяет идентифицировать Т-клеточные антигены для вмешательств *in vivo* и/или *in vitro*, включая вакцинацию, индукцию иммунологической толерантности, блокирование TCR и опосредованную MHC доставку токсина, для тестирования иммуногенности и других тестов на реактивность Т-клеток *in vitro*. Изобретение также относится к химерным молекулам, используемым в указанных способах.



202191083

A1

A1

202191083

## ХИМЕРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ

Настоящее изобретение относится к способу одновременного обнаружения и обогащения антиген-специфических Т-клеток и пептидов, специфически распознаваемых их Т-клеточными рецепторами (TCR). Этот способ также позволяет идентифицировать Т-клеточные антигены для вмешательств *in vivo* и/или *in vitro*, включая вакцинацию, индукцию иммунологической толерантности, блокирование TCR и опосредованную MHC доставку токсина, для тестирования иммуногенности и других тестов на реактивность Т-клеток *in vitro*. Настоящее изобретение также относится к химерным молекулам, используемым в указанных способах.

По мере того, как медицина в богатых обществах вступает в новую эру персонализации, большинство методов лечения и медицинских продуктов постепенно адаптируются к индивидуальному пациенту. В случае иммунотерапии основное внимание уделяется антигенной специфичности Т-клеток, и их беспристрастная и эффективная идентификация приобретает центральное значение.

В частности, разработка противоопухолевых вакцин на основе опухолеспецифического антигена (TSA) является одной из основных целей современной медицины.

Опухолевые пептиды, так называемые неоантигены, присутствуют только в опухолевых клетках и полностью отсутствуют в нормальной ткани. Такие опухолеспецифические пептиды создаются опухолеспецифическими изменениями ДНК, которые приводят к образованию новых белковых последовательностей. Опухолевые пептиды отображаются в контексте MHC на поверхности опухолевых клеток и так называемых антигенпредставляющих клеток (APC). APC, такие как дендритные клетки или макрофаги, могут интернализировать антигены посредством фагоцитоза или рецептор-опосредованного эндоцитоза. Молекулы MHC играют важную роль в презентации клеточных антигенов Т-клеткам в форме коротких линейных пептидов. Они взаимодействуют с Т-клеточными рецепторами (TCR), присутствующими на поверхности Т-клеток, что приводит к активации Т-клеток. MHC состоит из альфа- и бета-цепей и пептида, связанного в бороздке, образованной этими цепями. Стабильность этого комплекса сильно зависит от связывания пептида, так что пустые молекулы MHC отрицательно регулируются с поверхности клетки и разрушаются. Тем не менее, пустые молекулы MHC существуют на поверхности клеток и могут связывать внеклеточные пептиды и презентировать их Т-клеткам.

Сразу после того как опухолеспецифические пептиды презентуются на поверхности клетки, клетка может быть распознана и уничтожена иммунной системой. Таким образом, вакцины, содержащие опухолеспецифические пептиды, могут стимулировать иммунную систему к обнаружению и разрушению злокачественных опухолевых клеток, которые презентуют такие молекулы на своей поверхности.

T-клеточные рецепторы (TCR) связывают комплексы гистосовместимости пептидов (pMHC) с низкой аффинностью, что создает значительную проблему для прямой идентификации пептидов (эпитопов), когнатных T-клеткам. Для решения этой проблемы было разработано несколько различных подходов, но все они страдают серьезным недостатком: они сильно ограничивают параллельную обработку и не позволяют осуществить одновременный скрининг многих TCR против многих эпитопов. Представляющие интерес TCR должны быть подвергнуты скринингу против библиотек эпитопов один за другим. И наоборот, обнаружение TCR, реактивных по отношению к интересующим эпитопам, требует, чтобы эпитопы подвергались скринингу против библиотек TCR один за другим.

Следовательно, существует потребность в обеспечении средств и способов для одновременного обнаружения и обогащения антиген-специфических T-клеток и пептидов, специфически распознаваемых их TCR, и для идентификации T-клеточно-специфических антигенов для вмешательств *in vivo* и/или *in vitro*. Настоящее изобретение теперь удовлетворяет эту потребность, поскольку оно обеспечивает такие средства и способы, которые более конкретно определены в формуле изобретения и следующих воплощениях изобретения.

Воплощения изобретения:

A1. Химерная молекула, содержащая белок корецептора CD4, LAG3 или CD8 и пептид, присоединенный к N-концу корецептора.

A2. Химерная молекула по воплощению A1, отличающаяся тем, что пептид или часть пептида могут быть презентированы главным комплексом гистосовместимости.

A3. Химерная молекула в соответствии с воплощениями A1 или A2, отличающаяся тем, что пептид имеет длину от 6 до 200 аминокислотных остатков.

A4. Химерная молекула по любому из воплощений от A1 до A3, отличающаяся тем, что пептид имеет длину от 7 до 30 аминокислотных остатков.

A5. Химерная молекула по любому из воплощений с A1 по A4, отличающаяся тем, что пептид представляет собой случайный пептид.

A6. Химерная молекула по любому из воплощений изобретения от A1 до A5, отличающаяся тем, что пептид представляет собой пептид, который кодируется данной

молекулой ДНК или кДНК.

A7. Химерная молекула по воплощению A6, отличающаяся тем, что молекула ДНК или кДНК, кодирующая пептид, получена путем фрагментации более крупной молекулы ДНК или кДНК.

A8. Химерная молекула по любому из воплощений изобретения от A1 до A7, отличающаяся тем, что пептид получен из опухолевой клетки или из клетки, инфицированной патогеном.

A9. Химерная молекула по любому из воплощений изобретения от A1 до A8, отличающаяся тем, что пептид включает эпитоп опухолевого антигена.

A10. Химерная молекула по воплощению A9, отличающаяся тем, что опухолевый антиген представляет собой неоантиген.

A11. Химерная молекула по любому из воплощений от A1 до A10, отличающаяся тем, что пептид включает аминокислотную последовательность, идентичную, по меньшей мере, на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% последовательности эпитопа опухолевого антигена.

A12. Химерная молекула по любому из воплощений изобретения от A1 до A11, отличающаяся тем, что пептид включает эпитоп МНС класса I, когда корецепторный белок представляет собой CD8.

A13. Химерная молекула по любому из воплощений от A1 до A12, отличающаяся тем, что пептид включает эпитоп МНС класса II, когда корецепторный белок представляет собой CD4 или LAG3.

A14. Химерная молекула по любому из воплощений изобретения от A1 до A13, отличающаяся тем, что белок корецептора CD4 представляет собой белок корецептора CD4 человека, белок корецептора LAG3 представляет собой белок корецептора LAG3 человека, а белок корецептора CD8 представляет собой белок корецептора CD8 человека.

A15. Химерная молекула по любому из воплощений от A1 до A14, отличающаяся тем, что пептид присоединен к N-концу корецептора через линкер.

A16. Химерная молекула по воплощению A15, отличающаяся тем, что линкер имеет длину от 5 до 30 аминокислот.

A17. Химерная молекула по воплощениям A15 или A16, отличающаяся тем, что, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% аминокислотных остатков в линкере представляют собой остатки глицина или серина.

A18. Химерная молекула по любому из воплощений A15-A17, отличающаяся тем, что линкер включает аминокислотную последовательность (GGGGS)<sub>x</sub>, где G представляет собой глицин, S представляет собой серин и x представляет собой количество повторов,

где  $x$  может быть любым числом от 1 до 5.

A19. Полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу любого из воплощений от A1 до A18.

A20. Библиотека полинуклеотидов, содержащая множество полинуклеотидов по воплощению A19.

A21. Библиотека полинуклеотидов по воплощению A20, отличающаяся тем, что по меньшей мере два полинуклеотида библиотеки кодируют идентичный корецепторный белок, присоединенный к другому пептиду.

A22. Клетка, содержащая полинуклеотид по воплощению A19.

A23. Способ одновременной идентификации антиген-специфических Т-клеточных рецепторов и пептидов, специфически распознаваемых указанными Т-клеточными рецепторами (TCR), включающий стадии:

(a) предоставления представляющих интерес поликлональных Т-клеток, экспрессирующих библиотеку полинуклеотидов по воплощениям A20 или A21;

(b) контакта Т-клеток стадии (a) с антигенпрезентирующими клетками (APC), содержащими главный комплекс гистосовместимости (MHC);

(c) выделения по меньшей мере одной Т-клетки, которая активируется при контакте с APC на стадии (b);

(d) секвенирования ДНК выделенных Т-клеток на стадии (c) для получения информации о последовательностях TCR и пептидных последовательностях, присоединенных к корецепторам CD4, LAG-3 или CD8, присутствующим в этих Т-клетках; и

(e) идентификации когнатных пар Т-клеточный рецептор - пептид на основе данных секвенирования, полученных на стадии (d).

A24. Способ идентификации по меньшей мере одного антигенспецифического Т-клеточного рецептора, включающий следующие стадии:

(a) предоставления представляющих интерес поликлональных Т-клеток, экспрессирующих полинуклеотид по воплощению A19;

(b) контакта Т-клеток стадии (a) с антигенпрезентирующими клетками (APC), содержащими главный комплекс гистосовместимости (MHC);

(c) выделения по меньшей мере одной Т-клетки, которая активируется при контакте с APC на стадии (b);

(d) секвенирования локусов TCR по меньшей мере одной Т-клетки, выделенной на стадии (c); и

(e) идентификации по меньшей мере одного Т-клеточного рецептора, кодируемого

локусами TCR по меньшей мере одной Т-клетки, как антиген-специфичного.

A25. Способ идентификации по меньшей мере одного Т-клеточно-специфического антигена, включающий следующие стадии:

(a) предоставления представляющих интерес моноклональных Т-клеток, экспрессирующих полинуклеотид по воплощению A19 или библиотеку полинуклеотидов по воплощениям A20 или A21;

(b) контакта Т-клеток стадии (a) с антигенпрезентирующими клетками (APC), содержащими главный комплекс гистосовместимости (МНС);

(c) выделения по меньшей мере одной Т-клетки, которая активируется при контакте с APC на стадии (b);

(d) секвенирования части полинуклеотида, кодирующего пептид, присоединенный к N-концу корецепторного белка CD4, LAG-3 или CD8 по меньшей мере одной Т-клетки, выделенной на стадии (c); и

(e) идентификации по меньшей мере одного пептида, кодируемого полинуклеотидом, содержащимся по меньшей мере в одной Т-клетке, как Т-клеточно-специфичного антигена.

A26. Способ по любому из воплощений A23-A25, отличающийся тем, что APC представляет собой аутологичную или гетерологичную APC.

A27. Способ по любому из воплощений изобретения от A23 до A26, отличающийся тем, что APC представляет собой генетически модифицированную аутологичную или гетерологичную клетку или линию клеток, экспрессирующую мутированную молекулу МНС.

A28. Способ по воплощению A27, отличающийся тем, что мутированная молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса II, содержащую внеклеточную альфа-цепь МНС класса II и нативный или гетерологичный трансмембранный домен, а также внеклеточную бета-цепь МНС класса II и нативный или гетерологичный трансмембранный домен.

A29. Способ по воплощению A27, отличающийся тем, что мутированная молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса I, содержащую внеклеточную альфа-цепь МНС класса I и нативный или гетерологичный трансмембранный домен, а также бета-2-микроглобулин.

A30. Способ в соответствии с воплощениями от A23 до A29, отличающийся тем, что корецепторный белок, кодируемый полинуклеотидом или библиотекой полинуклеотидов, представляет собой CD8, если молекула МНС, содержащаяся в APC, является молекулой МНС класса I.

A31. Способ в соответствии с воплощениями от A23 до A29, отличающийся тем, что корецепторный белок, кодируемый полинуклеотидом, представляет собой CD4 или LAG-3, если молекула МНС, экспрессируемая APC, является молекулой МНС класса II.

A32. Способ лечения объекта, страдающего от онкологического заболевания, включающий стадии:

(a) идентификации по меньшей мере одного антигенспецифического Т-клеточного рецептора и/или по меньшей мере одного Т-клеточного антигена с помощью способов по воплощениям от A23 до A31;

(b) введения объекту, страдающему от онкологического заболевания по меньшей мере одного Т-клеточного рецептора и/или Т-клеточно-специфического антигена, идентифицированного на стадии (a).

A33. Способ по воплощению A32, отличающийся тем, что антиген-специфический Т-клеточный рецептор вводят объекту посредством доставки гена, опосредованной вирусом.

A34. Способ по воплощению A32, отличающийся тем, что Т-клеточно-специфичный антиген вводят объекту в форме пептида или в форме полинуклеотида, кодирующего пептид.

A35. Способ по воплощению A34, отличающийся тем, что пептид или полинуклеотид, кодирующий пептид, присоединен к соединению, которое улучшает доставку пептида или полинуклеотида, кодирующего пептид, в APC.

В настоящем изобретении предлагается способ, который позволяет одновременно обнаруживать и обогащать антиген-специфические Т-клетки и идентифицировать TCR и их когнатные эпитопы.

Соответственно, в одном воплощении изобретение относится к химерной молекуле, включающей белок корецептора CD4, LAG3 или CD8 и пептид, присоединенный к N-концу корецептора.

Таким образом, настоящее изобретение относится к химерной молекуле, которая облегчает идентификацию пептидов, которые могут быть презентированы молекулой МНС, так что пептид распознается Т-клеточным рецептором. Неожиданно было обнаружено, что экспрессия полинуклеотида, кодирующего химерную молекулу изобретения, в Т-клетке позволяет образовывать комплекс между пептидом, ковалентно присоединенным к N-концу корецептора, и основным комплексом гистосовместимости на поверхности антигенпрезентирующей клетки (APC), которая расположена в непосредственной близости от Т-клетки. Этот комплекс пептид-МНС затем может распознаваться Т-клеточным рецептором той же самой Т-клетки, что приводит к

активации этой Т-клетки (см. Фиг. 1А). Соответственно, как Т-клеточный рецептор, так и его когнатный антигенный пептид, который является частью химерной молекулы по настоящему изобретению, кодируются одной и той же Т-клеткой, тем самым значительно облегчая идентификацию когнатных пар ТCR-антиген по сравнению с предыдущими способами. Даже если и ТCR, и антигенный пептид присутствуют на поверхности одной и той же Т-клетки, Т-клетка может быть активирована только тем антигенным пептидом, который образовал комплекс с подходящей молекулой МНС на поверхности других клеток.

В примерах было продемонстрировано, что Т-клетки могут активироваться, если когнатный антигенный пептид присоединен к N-концу корецептора CD4 (ФИГ. 1С-Е). И, наоборот, не наблюдалось активации, когда к корецепторному белку присоединяли некогнатный антигенный пептид. Кроме того, не наблюдалось активации Т-клетки, когда когнатный антигенный пептид был присоединен к CD3, что указывает, что присоединение антигенного пептида к N-концу корецептора, который напрямую взаимодействует с молекулами МНС, такому как корецептор CD4, необходимо для образования комплекса пептид-МНС. Таким образом, в конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, в которой корецепторный белок представляет собой CD4.

Химерные молекулы по настоящему изобретению значительно отличаются от предшествующих гибридных белков, включающих определенные части CD4. Al-Jaufy et al. (*Infect Immun.* 1995 Aug; 63 (8): 3073–3078.), например, объединили субъединицу А токсина Шига со 180 N-концевыми аминокислотами CD4 (всего 433 аминокислоты), которые сохраняют способность связываться с гликопротеином 120 на поверхности HIV, чтобы создать цитотоксический гибридный белок для лечения HIV. Breuer et al. (*PLoS One.* 2011; 6 (5): e20033.) разработали синтетический белковый ингибитор против фактора патогенности Nef из HIV-1, который включает мотив CD4 из 37 аминокислот. Таким образом, оба документа предшествующего уровня техники относятся к растворимым белкам, которые включают только короткий фрагмент CD4. С другой стороны, воплощения настоящего изобретения относятся к корецепторным белкам, которые, как понимает специалист в данной области техники, являются рецепторами клеточной поверхности, которые прикреплены к клеточной мембране.

Корецепторы CD4 и LAG3 обладают примерно 20% идентичностью последовательностей у людей, и оба связываются с молекулами МНС класса II, облегчая распознавание комплекса пептид-МНС класса II Т-клеточным рецептором. Корецептор CD8 выполняет аналогичную роль во взаимодействии между Т-клеточным рецептором и

комплексом пептид-МНС, содержащим молекулу МНС класса I. Таким образом, вероятно, что способы по настоящему изобретению можно также проводить с химерной молекулой, содержащей корецепторы LAG3 или CD8.

Пептид, который присоединен к корецепторному белку, может быть любым пептидом. Как обсуждалось выше, пептид, который присоединен к корецепторному белку, предпочтительно представляет собой пептид, который потенциально может быть презентирован молекулой МНС. Считается, что пептид потенциально может быть презентирован основным комплексом гистосовместимости, если пептид и МНС образуют комплекс пептид-МНС, который может распознаваться Т-клеточным рецептором, где Т-клеточным рецептором может быть любой Т-клеточный рецептор. Используемый в данном документе термин «комплекс пептид-МНС» относится к молекуле МНС (МНС класса I или МНС класса II) с пептидом, связанным в признанном в данной области пептидсвязывающем кармане МНС. В рамках настоящего изобретения весь пептид, который присоединен к корецепторному белку, может участвовать в образовании комплекса пептид-МНС. Однако изобретение также включает пептиды, в которых только часть пептида участвует в образовании комплекса пептид-МНС. Соответственно, в одном воплощении изобретение относится к химерной молекуле, содержащей белок корецептора CD4, LAG3 или CD8 и пептид, присоединенный к N-концу корецептора, где пептид или часть пептида могут быть презентированы крупным комплексом гистосовместимости.

В конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, в которой пептид имеет длину от 6 до 200 аминокислотных остатков.

То есть пептид, который присоединен к корецепторному белку, может быть пептидом длиной от 6 до 200 аминокислотных остатков. В частности, предпочтительно, чтобы, по меньшей мере, часть этого пептида могла участвовать в образовании комплекса пептид-МНС.

Пептиды, которые презентуются молекулами МНС класса I, также называемые в данном документе эпитопами МНС класса I или пептидами МНС класса I, обычно имеют длину от 8 до 15 аминокислот, причем большинство пептидов имеет длину 9 аминокислот. Пептиды, которые презентуются молекулами МНС класса II, также называемые в данном документе эпитопами МНС класса II или пептидами МНС класса II, обычно имеют длину от 11 до 30 аминокислот. Таким образом, в конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле изобретения, в которой пептид имеет длину от 7 до 30 аминокислотных остатков.

Пептиды, которые присоединены к корецепторному белку, могут содержать дополнительные аминокислоты, присоединенные к N- и/или C-концу эпитопа МНС класса

I или II без значительного влияния на связывание эпитопа МНС класса I или II с молекулой МНС. Таким образом, в альтернативном воплощении изобретение относится к химерной молекуле изобретения, в которой пептид имеет длину от 30 до 50 аминокислотных остатков.

В конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, где пептид представляет собой случайный пептид.

То есть, пептид, который присоединен к корцепторному белку, может иметь любую аминокислотную последовательность. Химерная молекула по изобретению может использоваться для идентификации пептидов, которые могут стимулировать Т-клеточный рецептор при связывании молекулой МНС. Используемый в данном документе «случайный пептид» может быть пептидом со случайной аминокислотной последовательностью, который не имеет какой-либо идентичности последовательности с пептидами, которые, как известно, связываются с молекулами МНС класса I или МНС класса II.

В ином случае, пептид, который присоединен к корцепторному белку, может иметь идентичность последовательности с пептидами или белками, которые были описаны ранее. Таким образом, в конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, где пептид представляет собой пептид, который кодируется данной молекулой ДНК или кДНК.

То есть химерная молекула по изобретению может использоваться для идентификации ранее неизвестных антигенных пептидов. Например, молекула ДНК или кДНК, кодирующая пептид, может быть клонирована в полинуклеотид, кодирующий корцепторный белок, так что получается полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу по изобретению. Затем можно проверить с помощью способов по изобретению, может ли пептид, который присоединен к корцепторному белку, претерпевать образование комплекса пептид-МНС, так что активируется Т-клетка, которая экспрессирует полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу.

Молекула ДНК или кДНК может быть получена из любого источника. В частности, ДНК может быть получена из антигенпрезентирующей клетки или кДНК может быть получена обратной транскрипцией РНК, полученной из антигенпрезентирующей клетки. Антигенпрезентирующая клетка может быть опухолевой клеткой, полученной при биопсии. В ином случае, антигенпрезентирующая клетка может быть клеткой, инфицированной патогеном.

В ином случае, молекула ДНК или кДНК может быть молекулой ДНК или кДНК, кодирующей пептид или белок, который должен быть введен объекту. Разработка

лекарственных средств или других пептидов или белков, которые вводятся объектам, обычно включает тестирование иммуногенности, чтобы гарантировать, что введение соединения объекту не приведет к нежелательным иммуногенным реакциям. Соответственно, молекула ДНК или кДНК, кодирующая пептид или белок, или часть указанной молекулы ДНК или кДНК, может быть клонирована в полинуклеотид, кодирующий белок корцептора, для получения полинуклеотида, кодирующего химерную молекулу по изобретению.

В ином случае, молекула ДНК или кДНК может быть получена непосредственно от патогена и клонирована в полинуклеотид, кодирующий корцепторный белок, для получения полинуклеотида, кодирующего химерную молекулу по изобретению. Патоген, как в данном документе используется, предпочтительно относится к вирусному или бактериальному патогену.

Термин «данная молекула ДНК или кДНК» относится к любой молекуле ДНК или кДНК, которая была прямо или косвенно получена из клетки или патогена. Например, молекула ДНК может быть получена непосредственно из клетки или патогена путем выделения ДНК из указанной клетки или патогена. Молекула кДНК может быть получена непосредственно из клетки или патогена путем выделения РНК и обратной транскрипции РНК в кДНК. Однако молекулы ДНК также могут быть получены косвенно, например, путем химического синтеза сконструированных с помощью компьютера полинуклеотидных последовательностей. Сконструированные с помощью компьютера полинуклеотидные последовательности могут быть основаны, например, на данных секвенирования экзома из отдельных клеток или данных секвенирования пептидов, в частности, секвенирования пептидов, которые были выделены из поверхности антиген-представляющих клеток. В ином случае, сконструированные с помощью компьютера полинуклеотидные последовательности могут быть основаны на геномных данных патогенов.

Молекула ДНК или кДНК может быть получена любым способом, известным в данной области. В конкретном воплощении способ относится к химерной молекуле по изобретению, где молекула ДНК или кДНК, кодирующая пептид, получена путем фрагментации более крупной молекулы ДНК или кДНК.

То есть пептид может кодироваться молекулой ДНК или кДНК, которая была получена путем фрагментации более крупной молекулы ДНК или кДНК.

Фрагментация молекулы ДНК или кДНК может быть достигнута целевым или нецелевым образом, например, с использованием эндонуклеаз. Однако фрагментация молекул ДНК или кДНК также может быть достигнута путем случайного сдвига этих

молекул. В ином случае, фрагмент известной молекулы ДНК или кДНК также может быть получен способами молекулярного клонирования, например, с помощью ПЦР. Специалисту известны способы комбинирования фрагмента ДНК или кДНК с полинуклеотидом, кодирующим корецепторный белок, таким образом, чтобы получить полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу по изобретению.

Таким образом, в конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, в которой пептид получен из опухолевой клетки или из клетки, инфицированной патогеном.

Химерная молекула по изобретению может использоваться для идентификации ранее неизвестных опухолевых или ассоциированных с патогенами антигенов. Считается, что пептид происходит из опухолевой клетки, если пептид включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности с пептидом или белком, который синтезируется в опухолевой клетке. Считается, что пептид получен из клетки, инфицированной патогеном, если пептид включает аминокислотную последовательность, которая разделяет идентичность последовательности с пептидом или белком, синтезируемым в клетке, инфицированной патогеном. Пептид, полученный из опухолевой клетки или клетки, инфицированной патогеном, может иметь идентичность последовательности с любым пептидом или фракцией белка, которые могут быть обнаружены в этих клетках.

В некоторых воплощениях пептид, который присоединен к белку корецептора по изобретению, может включать аминокислотную последовательность пептида, который, как было описано ранее, презентирован молекулой МНС I или МНС II. Химерная молекула, содержащая пептид, который, как известно, презентруется молекулой МНС класса I или II, может позволить идентифицировать Т-клеточные рецепторы, которые эффективно стимулируются этим пептидом. Пептид, который, как известно, презентруется пептидом МНС класса I или II, может быть пептидом, полученным из опухолевой клетки или из клетки, инфицированной патогеном.

В некоторых воплощениях химерная молекула по изобретению используется для идентификации опухолеспецифических рецепторов Т-клеток. Например, пептид, который, как известно, презентруется на поверхности опухолевых клеток объекта молекулой МНС, может быть присоединен к корецепторному белку для идентификации Т-клеточных рецепторов, которые специфически распознают этот эпитоп. Таким образом, в конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, в которой пептид включает эпитоп опухолевого антигена. Считается, что пептид включает эпитоп опухолевого антигена, если пептид включает аминокислотную последовательность,

идентичную аминокислотной последовательности эпитопа опухолевого антигена.

Используемый в данном документе термин «опухолевый антиген» может представлять собой опухоль-ассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген и указывает на молекулу (например, белок или пептид), которая экспрессируется опухолевой клеткой, и либо (а) отличается качественно от своего аналога, экспрессируемого в нормальных клетках, или (б) экспрессируется на более высоком уровне в опухолевых клетках, чем в нормальных клетках. Таким образом, опухолевый антиген может отличаться (например, одним или несколькими аминокислотными остатками, где молекула представляет собой белок) или может быть идентичным своему аналогу, экспрессируемому в нормальных клетках. Некоторые опухолевые антигены не экспрессируются нормальными клетками или экспрессируются на уровне по меньшей мере примерно в два раза выше (например, примерно в два, три, пять, десять, 20, 40 раз, 100 раз, 500 раз, 1000 раз, 5000 раз или 15000 раз выше) в опухолевой клетке, чем в нормальном аналоге опухолевой клетки.

В некоторых воплощениях опухолевый антиген представляет собой иммуногенный белок, экспрессируемый в или на неопластической клетке или опухоли, такой как злокачественная опухолевая клетка или злокачественная опухоль. В некоторых воплощениях опухолевый антиген представляет собой неспецифический, мутантный, сверхэкспрессируемый или аномально экспрессируемый белок, который может присутствовать как в неопластической клетке или опухоли, так и в нормальной клетке или ткани. В некоторых воплощениях опухолевый антиген представляет собой опухолеспецифический антиген, который ограничен опухолевыми клетками. В некоторых воплощениях опухолевый антиген представляет собой специфический для злокачественных опухолей антиген, который ограничен злокачественными опухолевыми клетками.

В некоторых воплощениях опухолевый антиген может проявлять одну, две, три или более, включая все, из следующих характеристик: сверхэкспрессия/накопление (т.е. экспрессируется как нормальной, так и неопластической тканью, но сильно экспрессируется при неоплазии), онкофетальный (т.е., обычно экспрессируется только в тканях плода и в злокачественных соматических клетках), онковирусный или онкогенный вирусный (т.е. кодируется онкогенными трансформирующими вирусами), раково-тестискулярный (т.е. экспрессируется только злокачественными опухолевыми клетками и взрослыми репродуктивными тканями, например, яичками), линиеспецифический (т.е. экспрессируется в основном одним гистотипом злокачественной опухоли), мутированный (т.е. экспрессируется только в неопластической ткани в результате генетической мутации

или изменения транскрипции), посттрансляционно измененный (например, опухоль-ассоциированные изменения гликозилирования), или идиотипический (т.е. возникший в результате злокачественных клональных разрастаний В- или Т-лимфоцитов).

В некоторых воплощениях опухолевый антиген включает антигены опухолевых заболеваний, включая острый лимфобластный лейкоз; острую лимфобластную лимфому; острый лимфолейкоз; острый миелолейкоз; острый миелолейкоз (взрослый/детский); аденокортикальную карциному; онкологические заболевания, связанные со СПИД; лимфому, связанную со СПИД; рак анального канала; рак аппендикса; астроцитому; атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль; базально-клеточную карциному; рак желчных протоков, внепеченочную (холангиокарциному); рак мочевого пузыря; костную остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому; рак мозга (взрослый/детский); опухоль головного мозга, астроцитому мозжечка (взрослый/детский); опухоль головного мозга, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, опухоль головного мозга; опухоль головного мозга, эпендимому; опухоль головного мозга, медуллобластому; опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли; опухоль головного мозга, глиому зрительных путей и гипоталамуса; глиому ствола мозга; рак молочной железы; бронхиальные аденомы/карциномы; опухоль бронхов; лимфому Беркитта; детские злокачественные новообразования; карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта; карциноидную опухоль; карциному взрослого, неизвестной первичной локализации; первичную карциному неизвестного происхождения; эмбриональную опухоль центральной нервной системы; лимфому центральной нервной системы, первичную; рак шейки матки; аденокортикальную карциному у детей; детские злокачественные новообразования; детскую церебральную астроцитому; хордому, детскую; хронический лимфолейкоз; хронический миелогенный лейкоз; хронический миелоидный лейкоз; хронические миелопролиферативные нарушения; рак толстой кишки; колоректальный рак; краниофарингиому; кожную Т-клеточную лимфому; десмопластическую мелкоклеточную опухоль; эмфизему; рак эндометрия; эпендимобластому; эпендимому; рак пищевода; саркому Юинга из семейства опухолей Юинга; экстракраниальную герминогенную опухоль; внегонадную герминогенная опухоль; рак внепеченочных желчных протоков; рак желчного пузыря; рак желудка; карциноид желудка; карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта; опухоль стромы желудочно-кишечного тракта; опухоль зародышевых клеток: экстракраниальную, внегонадную или гестационную трофобластическую опухоль яичников; гестационную трофобластическую опухоль, с неизвестной первичной локализацией; глиому; глиому ствола головного мозга; глиому зрительных путей и

гипоталамуса у детей; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; рак сердца; гепатоцеллюлярный рак (печень); лимфому Ходжкина; рак гортани; глиому гипоталамуса и зрительного путей; внутриглазную меланому; островково-клеточную карциному (эндокринную панкреатическую); саркому Капоши; рак почки (почечно-клеточный рак); гистиоцитоз клеток Лангерганса; рак гортани; рак губы и полости рта; липосаркому; рак печени (первичный); немелкоклеточный рак легкого; мелкоклеточный рак легкого; лимфому, первичную центральную нервную систему; макроглобулинемию Вальденстрема; рак молочной железы у мужчин; злокачественную фиброзную гистиоцитому кости/остеосаркому; медуллобластому; медуллоэпителиому; меланому; внутриглазную (глазную) меланому; рак клеток Меркеля; карциному кожи из клеток Меркеля; мезотелиому; мезотелиому, злокачественную опухоль взрослых; метастатический плоскоклеточный рак шеи с первичным скрытым; рак ротовой полости; синдром множественной эндокринной неоплазии; множественную миелому/новообразование плазматических клеток; грибовидный микоз, миелодиспластические синдромы; миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания; миелолейкоз хронический; миелоидный лейкоз, острый взрослый; миелоидный лейкоз, детский острый; миелому, множественную (злокачественное новообразование костного мозга); хронические миелопролиферативные заболевания; рак полости носа и придаточных пазух носа; карциному носоглотки; нейробластому, немелкоклеточный рак легкого; неходжкинскую лимфому; олигодендроглиому; рак полости рта; рак полости рта; рак ротоглотки; остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости; рак яичников; эпителиальный рак яичников (поверхностную эпителиально-стромальную опухоль); опухоль зародышевых клеток яичников; опухоль яичников с низким потенциалом злокачественности; рак поджелудочной железы; рак поджелудочной железы, островковых клеток; папилломатоз; рак придаточных пазух носа и полости носа; рак паращитовидной железы; рак полового члена; рак глотки; феохромоцитому; астроцитому эпифиза; герминому эпифиза; опухоли паренхимы эпифиза, промежуточной дифференцировки; пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли; опухоль гипофиза; аденому гипофиза; неоплазию плазматических клеток/множественную миелому; плеврорлегочную бластому; первичную лимфому центральной нервной системы; рак предстательной железы; рак прямой кишки; почечно-клеточную карциному (рак почки); переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; карциному дыхательных путей с участием гена NUT на хромосоме 15; ретинобластому; детскую рабдомиосаркому; рак слюнной железы; саркому, опухоль семейства Юинга; синдром Сезари; рак кожи (меланому); рак кожи

(немеланому); мелкоклеточный рак легкого; саркому мягких тканей при раке тонкой кишки; саркому мягких тканей; опухоль спинного мозга; плоскоклеточную карциному; плоскоклеточный рак шеи с первичным скрытым метастазом; рак желудка (желудка); супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль; Т-клеточную лимфому, кожную (грибовидный микоз и синдром Сезари); рак яичек; рак горла; тимому; тимому и карциному тимуса; рак щитовидной железы; детский рак щитовидной железы; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; рак уретры; рак матки, эндометрия; саркому матки; рак влагалища; рак вульвы; и опухоль Вильмса.

В некоторых воплощениях опухолевый антиген включает онкогенные вирусные антигены, раково-тестикулярные антигены, онкофетальные антигены, антигены тканевой дифференцировки, мутантные белковые антигены, неоантигены, адипофилин, AIM-2, ALDH1A1, BCLX (L), BING-4, CALCA, CD45., CPSF, циклин D1, DKKI, ENAH (hMena), Ga733 (EpcAM), EphA3, EZH2, FGF5, глипикан-3, G250/MN/CAIX, HER-2/neu, IDO1, IGF2B3, IL13R-альфа 2, карбоксилэстеразу кишечника, альфа-фозтопротеин, калликреин 4, KIF20A, ленгсин, M-CSF, MCSP, mdm-2, Meloe, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, p53 (немутантный), PAX5, PBF, PRAME, PSMA, RAGE, RAGE-1, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, сесернин 1, SOX10, STEAP1 (шестипроходный трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 1), сурвивин, теломеразу, VEGF, WT1, EGF-R, CEA, CD20, CD33, CD52, гликопротеин 100 (белок GP100 или gp 100), MEL ANA/MART 1, MART2, NY-ESO-1, p53, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, CDK4, альфа-актинин-4, ARTC1, BCR-ABL, слитый белок BCR-ABL (b3a2), B-RAF, CASP-5, CASP-8, бета-катенин, Cdc27, CDK4, CDK 2A, CLPP, COA-1, гибридный белок dek-can, EFTUD2, фактор элонгации 2, ETV6-AML, гибридный белок ETV6-AML1, FLT3-ITD, FN1, GPNMB, гибридный белок LDLR-фукозилтрансферазу-AS, NFYC, OGT, OS-9, гибридный белок pml-RAR-альфа, PRDX5, PTPR, H-ras, K-ras (V-Ki-ras2 вирусный онкоген крысиной саркомы Кирстена), N-ras, RBAF600, SIRT2, SNRPD1, SSX, SSX2, SYT-SSX1 или гибридный белок-SSX2, TGF-betaRII, триозофосфат-изомеразу, ormdm-2, LMP2, HPV E6/E7, EGFRvIII (вариант эпидермального фактора роста III), идиотип, GD2, ганглиозид G2), Ras-мутант, p53 (мутант), протеиназу 3 (PR1), тирозиназу, PSA, hTERT, контрольные точки транслокации саркомы, EphA2, фосфатазу простатической кислоты PAP, нео-PAP, ML-IAP, AFP, ERG (гибридный ген TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, рецептор андрогенов, циклин B1, полисиаловую кислоту, MYCN, TRP2, TRP2-Int2, GD3, фукозил GM1, мезотелин, PSCA, sLe (a), cyclB1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, SART3, STn, карбоангидразу IX, OY-TES1, белок спермы 17, LCK, высокомолекулярный антиген, связанный с меланомой (HMWMAA), AKAP-4, SSX2,

XAGE 1, B7H3, легумаин, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-бета, MAD-CT-2, For-родственный антиген 1, TRP1, CA-125, CA19-9, кальретинин, эпителиальный мембранный антиген (EMA), эпителиальный опухолевый антиген (ETA), CD 19, CD34, CD99, CD117, хромогранин, цитокератин, десмин, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), белок жидкости крупной кистозной болезни-15 (GCDFP-15), антиген HMB-45, Myo-D1, мышечно-специфический актин (MSA), нейрофиламент, нейрон-специфическую эналазу (NSE), плацентарную щелочную фосфатазу, синаптофиз, тиреоглобулин, фактор транскрипции щитовидной железы-1, димерную форму изофермента пируваткиназы типа M2 (опухоль M2-PK), BAGE BAGE-1, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE- 3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-SAR-35, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1, TPTE, Углевод/ганглиозид GM2 (онкофетальный антиген-иммуноген-1 OFA-I-1), GM3, CA 15-3 (CA 27.29 \ ВСАА), CA 195, CA 242, CA 50, CAM 43, СЕА, EBNA, EF2, антиген вируса Эпштейна-Барр, HLA-A2, HLA-A11, HSP70-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозин класса I, GnTV, Herv-K-mel, LAGE-1, LAGE-2, (белок спермы) SP17, SCP-1, P15 (58), Hom/Mel-40, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, TSP-180, P185erbB2, pl80erbB-3, c-met, nm-23H1, TAG-72, TAG-72-4, CA-72 -4, CAM 17.1, NuMa, 13-катенин, P16, TAGE, CT7, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, ВСА225, ВТАА, CD68\KP1, CO-029, HTgp-175, M344, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TLP, TPS, CD22, CD27, CD30, CD70, простеин, TARP (белок альтернативной рамки считывания Т-клеточного рецептора гамма), Ttr-p8, интегрин  $\alpha\beta3$  (CD61), галактин или Ral-B, CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138 и ROR1.

В некоторых воплощениях опухолевый антиген включает онкогенные вирусные антигены, причем антигенами онкогенных вирусов являются антигены вируса папилломы человека (HPV), антигены вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши, такие как ядерный антиген, ассоциированный с латентностью, антигены вируса Эпштейна-Барр, такие как такие как EBV-EA, EBV-MA или EBV-VCA, антигены полиомавируса клеток Меркеля, такие как антиген MCV T, или антигены Т-лимфотропного вируса человека, такие как антиген HTLV-1 Tax.

В некоторых воплощениях опухолевый антиген представляет собой опухоль-ассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген.

В некоторых воплощениях опухолевый антиген представляет собой неоантиген. «Неоантиген», при использовании в данном документе, означает антиген, который возникает в результате мутации в опухолевой клетке, и такой антиген обычно не экспрессируется в нормальных клетках или тканях. Не желая ограничивать себя теорией,

полагаем, что поскольку здоровые ткани обычно не обладают этими антигенами, неоантигены представляют собой предпочтительную мишень. Кроме того, не желая ограничивать себя теорией, полагаем, что в контексте настоящего изобретения, поскольку Т-клетки, распознающие неоантиген, возможно, не подверглись отрицательной селекции в тимусе, такие клетки могут иметь высокую авидность к антигену и вызывать сильный иммунный ответ против опухолей, при отсутствии риска вызвать разрушение нормальных тканей и аутоиммунное повреждение. Таким образом, в конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, в которой опухолевый антиген представляет собой неоантиген.

В некоторых воплощениях опухолевый антиген может быть ортологом антигена, например, из млекопитающего (т.е. не являющегося человеком примата, свиньи, собаки, кошки или лошади) к опухолевому антигену человека.

Используемый в данном документе термин «эпитоп» относится к той части антигена, которая контактирует с конкретным иммуноглобулином, таким как Т-клеточный рецептор.

Химерная молекула по изобретению также может использоваться для идентификации мутировавших вариантов эпитопов известных опухолевых антигенов, которые эффективно распознаются рецептором Т-клеток. Таким образом, в конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, в которой пептид включает аминокислотную последовательность, по меньшей мере, с 50%, 60%, 70%, 80%, 90% идентичностью последовательности с эпитопом опухолевого антигена.

То есть химерная молекула по изобретению может использоваться для идентификации мутировавших антигенных пептидов, которые распознаются молекулой МНС и приводят к более или менее эффективной активации Т-клетки по сравнению с их немутантными аналогами. В рамках настоящего изобретения предпочтительно, чтобы химерные молекулы кодировались полинуклеотидом, который экспрессируется в клетке. Квалифицированному специалисту известны способы введения мутаций в последовательности ДНК, кодирующие пептид, случайным образом или целенаправленно, в результате чего получается мутированный пептид.

В конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, где пептид включает эпитоп МНС класса I, когда корцепторный белок представляет собой CD8.

То есть корцептор CD8 облегчает связывание Т-клеточного рецептора с комплексом пептид-МНС класса I. Таким образом, предпочтительно, чтобы пептид, который присоединен к корцептору CD8, содержал эпитоп МНС класса I.

В конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, где эпитоп представляет собой эпитоп МНС класса II, когда корецепторные белки представляют собой CD4 или LAG3.

То есть корецепторы CD4 и LAG3 способствуют связыванию Т-клеточного рецептора с комплексом пептид-МНС класса II. Таким образом, предпочтительно, чтобы пептид, который присоединен к корецепторам CD4 или LAG3, содержал эпитоп МНС класса II.

В случаях, когда еще предстоит идентифицировать пептид, который должен быть презентируван молекулой МНС, пептид может быть присоединен к любому корецептору, то есть к CD4, CD8 или LAG3.

Корецепторные белки химерной молекулы могут происходить из любого млекопитающего. Однако предпочтительно, чтобы корецептор происходил из того же организма, что и Т-клетка, в которой он предназначен для синтеза. Например, если предполагается идентифицировать когнатную пару антигенный пептид - Т-клеточный рецептор у человека, предпочтительно, чтобы химерная молекула содержала белок корецептора человека. Корецепторные белки CD4, LAG-3 или CD8 представляют собой, в частности, полноразмерные корецепторные белки CD4, LAG-3 или CD8.

В рамках настоящего изобретения предпочтительно, чтобы белок корецептора был белком корецептора человека. Таким образом, в конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, в которой белок корецептора CD4 представляет собой белок корецептора CD4 человека, белок корецептора LAG3 представляет собой белок корецептора LAG3 человека или белок корецептора LAG3 человека. Корецепторный белок CD8 представляет собой корецепторный белок CD8 человека.

То есть в некоторых воплощениях химерная молекула содержит белок корецептора CD4 человека, где пептид присоединен к N-концу CD4. В других воплощениях химерная молекула содержит белок корецептора LAG3 человека, где пептид присоединен к N-концу LAG3. В других воплощениях химерная молекула содержит белок корецептора CD8 человека, где пептид присоединен к N-концу цепи CD8-альфа или цепи CD8-бета. В случае, если пептид присоединен к N-концу цепи CD8-бета, предпочтительно, чтобы клетка также синтезировала немодифицированную цепь CD8-альфа. Соответственно, химерные молекулы, содержащие корецепторные белки CD4, CD8 или LAG3 человека, предпочтительно синтезируются в клетках человека, в частности, Т-клетках человека.

В конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, в которой пептид присоединен к N-концу корецептора через линкер.

То есть химерная молекула может включать линкер между корцептором и пептидом для оптимизации распознавания между пептидом, Т-клеточным рецептором и молекулой МНС на APC.

Линкер может иметь любую длину, которая обеспечивает эффективное взаимодействие пептида с TCR и молекулой МНС на APC. В частности, линкер может иметь длину от 5 до 30 аминокислотных остатков. Таким образом, в конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле, в которой линкер имеет длину от 5 до 30 аминокислот.

Чтобы позволить пептиду эффективно взаимодействовать с TCR и молекулой МНС на APC, предпочтительно, чтобы линкер был гибким линкером. Специалисту известны линкеры с высокой степенью гибкости. Например, известно, что линкеры с высоким процентом остатков глицина или серина обладают высокой степенью гибкости. Таким образом, в конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, где, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% аминокислотные остатки в линкере представляют собой остатки глицина или серина.

Линкерная последовательность GGGGS, состоящая из четырех остатков глицина и С-концевого остатка серина, часто используется в данной области в качестве гибкого пептидного линкера для связывания первого полипептида со вторым полипептидом. Таким образом, линкер по изобретению предпочтительно включает один или несколько мотивов с последовательностью GGGGS. Соответственно, в конкретном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, в которой линкер включает аминокислотную последовательность (GGGGS)<sub>x</sub>, где G представляет собой глицин, S представляет собой серин и x представляет собой количество повторов, где x может быть любым числом от 1 до 5.

Таким образом, в некоторых воплощениях линкер включает аминокислотную последовательность GGGGS один раз. В других воплощениях линкер включает аминокислотную последовательность GGGGS два раза. В других воплощениях линкер включает аминокислотную последовательность GGGGS три раза. В других воплощениях линкер включает аминокислотную последовательность GGGGS четыре раза. В других воплощениях линкер включает аминокислотную последовательность GGGGS пять раз. Если линкер включает аминокислотную последовательность GGGGS более одного раза, аминокислотные последовательности GGGGS могут быть смежными или могут быть прерваны одной или несколькими другими аминокислотами.

В примерах показано, что самая высокая активация Т-клеток может наблюдаться,

если пептид присоединен к корцептору с линкером, состоящим из 12 или 15 аминокислот (Фигура 1 С и D). Таким образом, в предпочтительных воплощениях изобретение относится к химерной молекуле изобретения, в которой линкер имеет длину от 12 до 15 аминокислотных остатков. В более предпочтительном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, в которой линкер включает последовательность GSGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 1). В еще более предпочтительном воплощении изобретение относится к химерной молекуле по изобретению, в которой линкер включает последовательность GSGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 2).

В конкретном воплощении изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему химерную молекулу изобретения.

В рамках настоящего изобретения предполагается, что химерная молекула изобретения синтезируется в клетке посредством экспрессии полинуклеотида, кодирующего указанную химерную молекулу. Кроме того, полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу по изобретению, может дополнительно включать полинуклеотид, кодирующий сигнальный пептид, который направляет химерную молекулу к поверхности клетки.

Используемый в данном документе термин «полинуклеотид» относится к последовательности нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями. Полинуклеотид по настоящему изобретению может представлять собой молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или молекулу рибонуклеиновой кислоты (РНК) в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Нуклеотидные основания обозначены в данном документе однобуквенным кодом: аденин (A), гуанин (G), тимин (T), цитозин (C), инозин (I) и урацил (U). Полинуклеотид по настоящему изобретению может быть получен с использованием стандартных методов, хорошо известных типичному специалисту в данной области. Этот термин не следует истолковывать как ограничение в отношении длины полимера и охватывает известные аналоги природных нуклеотидов, а также нуклеотиды, которые модифицированы в сахарных и/или фосфатных фрагментах. Этот термин также включает нуклеиновые кислоты, содержащие модифицированные остатки основной цепи или связи, которые могут быть синтетическими или встречающимися в природе, и которые обладают такими же связывающими свойствами, что и референсная нуклеиновая кислота, и метаболизируются аналогично референсным нуклеотидам.

В конкретном воплощении изобретение относится к библиотеке полинуклеотидов, содержащей множество полинуклеотидов по изобретению.

Изобретение также включает библиотеку полинуклеотидов. Библиотека полинуклеотидов по изобретению включает множество полинуклеотидов, которые

кодируют химерные молекулы по изобретению. Например, библиотека полинуклеотидов может включать два или более полинуклеотидов, которые кодируют химерную молекулу по изобретению. В некоторых воплощениях библиотека полинуклеотидов может включать, по меньшей мере, 100, по меньшей мере, 1000, по меньшей мере, 10000, по меньшей мере, 100000, по меньшей мере, 1000000 или, по меньшей мере, 10000000 полинуклеотидов, которые кодируют химерную молекулу по изобретению.

В некоторых воплощениях полинуклеотиды в библиотеке полинуклеотидов содержатся в более крупном полинуклеотиде. В некоторых воплощениях полинуклеотиды в библиотеке полинуклеотидов содержатся в кольцевых полинуклеотидах, таких как векторы ДНК или РНК. В некоторых воплощениях полинуклеотиды в библиотеке полинуклеотидов содержатся в вирусных векторах, которые можно использовать для вирус-опосредованной доставки генов.

В конкретном воплощении изобретение относится к библиотеке полинуклеотидов по изобретению, где по меньшей мере два полинуклеотида библиотеки кодируют идентичный белок корцептора, присоединенный к другому пептиду.

То есть, библиотеку полинуклеотидов по изобретению можно использовать для идентификации антигенных пептидов, которые могут индуцировать Т-клеточный ответ. Предпочтительно, чтобы полинуклеотиды библиотеки кодировали идентичный корцепторный белок, но различались областью полинуклеотида, который кодирует пептид. То есть в некоторых воплощениях библиотека по изобретению включает по меньшей мере два полинуклеотида, где каждый из этих полинуклеотидов кодирует белок CD4 корцептора, присоединенный к пептиду с другой аминокислотной последовательностью. В других воплощениях библиотека по изобретению содержит по меньшей мере два полинуклеотида, где каждый из этих полинуклеотидов кодирует корцепторный белок CD8, присоединенный к пептиду с другой аминокислотной последовательностью. В других воплощениях библиотека по изобретению включает по меньшей мере два полинуклеотида, где каждый полинуклеотид кодирует корцепторный белок LAG3, присоединенный к пептиду с другой аминокислотной последовательностью.

Пептиды, которые кодируются в библиотеке полинуклеотидов по изобретению, могут иметь любую аминокислотную последовательность. Например, пептиды могут иметь идентичность последовательности с известным антигенным пептидом, например, антигенным пептидом, полученным из опухолевой клетки или из клетки, инфицированной патогеном. В этом случае библиотека полинуклеотидов может быть получена путем введения случайных или целевых мутаций в полинуклеотид, кодирующий белок корцептора, и пептид, содержащий аминокислотную последовательность известного

антигенного пептида. В частности, мутации можно вводить исключительно в ту часть полинуклеотида, которая кодирует антигенный пептид.

В некоторых воплощениях библиотека полинуклеотидов по изобретению может использоваться для идентификации ранее неизвестных антигенных пептидов. Например, библиотека полинуклеотидов может быть создана путем выделения мРНК из клетки, в частности, антигенпрезентирующей клетки, и обратной транскрипции мРНК в кДНК. Затем кДНК может быть клонирована во множество полинуклеотидов, кодирующих белок корцептора, для получения библиотеки полинуклеотидов по изобретению. В частности, кДНК могут быть фрагментированы перед стадией клонирования, и полученные фрагменты могут быть клонированы во множество полинуклеотидов, кодирующих белок корцептора. В некоторых воплощениях мРНК выделяют из опухолевой клетки или клетки, инфицированной патогеном. Специалисту известны способы выделения РНК, обратной транскрипции и молекулярного клонирования.

В других воплощениях библиотека полинуклеотидов может быть создана на основе данных секвенирования экзона. Специалисту известны способы секвенирования экзона клетки. Данные экзона могут быть получены из любой клетки. В некоторых воплощениях данные экзона получают из опухолевой клетки или из клетки, инфицированной патогеном. Полученные данные экзона затем могут быть обработаны биоинформатическими способами для прогнозирования множества фрагментов ДНК заданного размера, которые покрывают части или, предпочтительно, весь экзон клетки. Спрогнозированные фрагменты ДНК могут иметь любой размер. Однако предпочтительно, чтобы спрогнозированные фрагменты ДНК имели размер от 30 до 300 пар оснований, более предпочтительно от 60 до 150 пар оснований, наиболее предпочтительно от 75 до 105 пар оснований. Спрогнозированные фрагменты ДНК затем можно химически синтезировать и клонировать во множество полипептидов, кодирующих корцептор, для получения библиотеки полинуклеотидов по изобретению.

В некоторых воплощениях пептиды, презентруемые на поверхности APC, могут быть выделены из APC, и их последовательность может быть определена любым способом, известным в данной области, в частности, с помощью масс-спектрометрии. Затем можно получить полинуклеотиды, кодирующие эти выделенные пептиды, например, путем химического синтеза, и клонировать во множество полинуклеотидов, кодирующих белок корцептора, для создания библиотеки полипептидов по изобретению. Такую библиотеку можно, например, использовать для идентификации того, какой из пептидов, выделенных с поверхности клетки, может распознаваться T-клеточным рецептором в целом и, в частности, каким рецептором T-клеток.

Как упоминалось выше, библиотека полинуклеотидов предпочтительно включает по меньшей мере два полинуклеотида, которые кодируют идентичный корцепторный белок, присоединенный к другому пептиду. Однако еще более предпочтительно, чтобы по меньшей мере 10, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 10000, по меньшей мере 100000 или по меньшей мере 1000000 полинуклеотидов библиотеки кодировали идентичный корцепторный белок, но различались последовательностью пептида, присоединенного к корцепторному белку.

Квалифицированному специалисту известны способы создания библиотеки полинуклеотидов согласно изобретению. Например, библиотека согласно изобретению может быть создана путем молекулярного клонирования. Например, множество идентичных ДНК-векторов, содержащих полинуклеотид, кодирующий корцепторный белок и, необязательно, линкер и сигнальный пептид, можно сначала расщепить одним или несколькими рестрикционными ферментами. На второй стадии множество полинуклеотидов, кодирующих пептиды с различными аминокислотными последовательностями, можно гидролизовать совместимыми рестрикционными ферментами и лигировать в вектор, кодирующий белок корцептора. Предпочтительно полинуклеотид, кодирующий пептид, вводят в вектор выше полинуклеотидов, кодирующих белок корцептора и линкер, и ниже полинуклеотида, кодирующего сигнальный пептид, так что пептид будет прикреплен к N-концу белка корцептора. В ином случае, полинуклеотиды, содержащиеся в библиотеке по настоящему изобретению, могут быть сконструированы на компьютере и синтезированы путем химического синтеза ДНК.

В конкретном воплощении изобретение относится к клетке, содержащей полинуклеотид по изобретению.

То есть, изобретение охватывает любую клетку, содержащую полинуклеотид по изобретению. Предпочтительно клетка, содержащая полинуклеотид по изобретению, представляет собой Т-клетку.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу одновременной идентификации антиген-специфических Т-клеточных рецепторов и пептидов, специфически распознаваемых указанными Т-клеточными рецепторами (TCR), причем способ включает стадии: (a) получения поликлональных Т-клеток из представляющей интерес библиотеки полинуклеотидов по изобретению; (b) контакта Т-клеток стадии (a) с антигенпрезентирующими клетками (APC), содержащими главный комплекс гистосовместимости (MHC); (c) выделения по меньшей мере одной Т-клетки, которая

активируется при контакте с APC на стадии (b); (d) секвенирования ДНК выделенных Т-клеток на стадии (c) для получения информации о последовательностях TCR и пептидных последовательностях, присоединенных к корецепторам CD4, LAG-3 или CD8, присутствующим в этих Т-клетках; и (e) идентификации когнатных пар Т-клеточный рецептор-пептид на основе данных секвенирования, полученных на стадии (d).

То есть, способ по изобретению можно использовать для одновременной идентификации когнатных пар Т-клеточный рецептор/пептид. Предыдущие способы идентификации когнатных пар TCR-пептид имеют недостаток, заключающийся в том, что они позволяют проводить скрининг только нескольких Т-клеточных рецепторов против одного антигенного пептида за раз, что приводит к подходам к скринингу, требующим больших затрат времени и средств. С другой стороны, способ настоящего изобретения имеет преимущество, которое заключается в том, что клетки, экспрессирующие полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу изобретения, содержат генетическую информацию рецептора Т-клетки и антигенного пептида, который стимулирует рецептор Т-клетки. Таким образом, способ по настоящему изобретению позволяет проводить скрининг популяции поликлональных Т-клеток против множества пептидов в одном эксперименте, а также обогащать и идентифицировать Т-клетки, которые синтезируют когнатные пары TCR-пептид. Соответственно, способ по изобретению может значительно облегчить идентификацию ранее неизвестных антигенных пептидов и Т-клеточных рецепторов, которые распознают эти пептиды.

Для этого на первой стадии библиотеку полинуклеотидов, кодирующих химерную молекулу по изобретению, вводят в популяцию поликлональных Т-клеток. Специалисту известны способы введения полинуклеотидов в Т-клетки. Например, полинуклеотид можно ввести в Т-клетку путем трансфекции или вирусной трансдукции. Предполагается, что Т-клетки в популяции Т-клеток трансфицируются или трансдуцируются библиотекой полинуклеотидов, так что каждая Т-клетка не получает более одного полинуклеотида, кодирующего химерную молекулу по изобретению. Считается, что поликлональные Т-клетки экспрессируют библиотеку полинуклеотидов по изобретению, если Т-клетки продуцируют детектируемые количества химерной молекулы по изобретению. Предпочтительно, если по меньшей мере две Т-клетки в поликлональной популяции Т-клеток экспрессируют полинуклеотид, кодирующий идентичный корецепторный белок, присоединенный к пептиду с другой аминокислотной последовательностью.

Используемый в данном документе термин «популяция» относится к более чем одной клетке одного и того же типа. «Популяция поликлональных Т-клеток» в контексте настоящего описания относится к популяции Т-клеток, где по меньшей мере две из Т-

клеток, входящих в популяцию, содержат различные Т-клеточные рецепторы. Популяция поликлональных Т-клеток может быть из любого источника. Например, популяция поликлональных Т-клеток может быть получена из субъекта. Квалифицированному специалисту известны способы выделения Т-клеток из образца, полученного из субъекта, такого как кровь, селезенка, лимфатические узлы или опухолевая ткань, или из любого другого подходящего источника. Настоящее изобретение также охватывает популяции поликлональных Т-клеток, которые были получены с помощью генной инженерии. Например, популяция TCR-отрицательных клеток может быть трансфицирована или трансдуцирована библиотекой, кодирующей множество Т-клеточных рецепторов с получением популяции поликлональных Т-клеток.

В частности, можно использовать CD4- или CD8-отрицательные Т-клеточные гибридомы, в частности CD4- или CD8-отрицательные Т-клеточные гибридомы, несущие флуоресцентный репортер. Однако это не является обязательным условием, поскольку также можно использовать CD4+ клетки (Фигура 2). Подходящим флуоресцентным репортером для активации Т-клеток является, например, флуоресцентный репортер *puG77*, флуоресцентный репортер NFAT или любая другая подходящая репортерная молекула (например, CD69).

На второй стадии поликлональные Т-клетки, экспрессирующие библиотеку полинуклеотидов по настоящему изобретению, культивируют в присутствии антигенпрезентирующей клетки, которая содержит главный комплекс гистосовместимости на своей клеточной поверхности. Как упоминалось выше, молекула МНС на поверхности APC необходима для образования комплекса пептид-МНС с пептидом, который содержится в молекуле по изобретению, так что комплекс пептид-МНС может стимулировать Т-клеточный рецептор на клеточной поверхности Т-клетки.

Термин «антигенпрезентирующая клетка» в контексте настоящего описания в широком смысле относится к любой клетке, которая включает главный комплекс гистосовместимости на своей клеточной поверхности. Таким образом, антигенпрезентирующая клетка может быть самой Т-клеткой. В некоторых воплощениях антигенпрезентирующая клетка представляет собой первичную дендритную клетку костного мозга (BMDC). Предпочтительно, чтобы молекула МНС, содержащаяся на поверхности APC, была либо молекулой МНС класса I, либо молекулой МНС класса II. В случае, если молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса I, предпочтительно, чтобы Т-клетки экспрессировали полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу, содержащую корцептор CD8. В случае, если молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса II, предпочтительно, чтобы Т-клетки

экспрессировали полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу, содержащую корецепторы CD4 или LAG3.

Используемый в данном документе термин «контакт» относится к действию по объединению двух или более компонентов, таких как Т-клетки и APC, путем растворения, смешивания, суспендирования, блендирования, превращения в жидкую массу или встряхивания. Считается, что Т-клетка, экспрессирующая полинуклеотид по изобретению, контактирует с APC, если две клетки находятся на достаточно близком расстоянии, так что пептид, присоединенный к корецептору Т-клетки, может образовывать комплекс пептид-МНС с молекулой МНС, находящейся на поверхности APC. Предпочтительно клетки контактируют в растворе, таком как среда для культивирования клеток. Можно обеспечивать контакт указанных клеток в течение любого времени, достаточного для активации Т-клетки. В некоторых воплощениях Т-клетки контактируют с APC в течение нескольких часов или дней, так что Т-клетки в культуре, которые активируются при контакте с APC, пролиферируют и могут быть обогащены. Таким образом, в некоторых воплощениях термин «контакт» используется взаимозаменяемо с термином «совместное культивирование». То есть, контакт популяции Т-клеток, синтезирующих химерные молекулы по изобретению, с APC может быть достигнут путем совместного культивирования клеток в жидкой среде в течение определенного периода времени. Предпочтительно совместное культивирование приводит к активации Т-клеток, экспрессирующих родственную пару TCR-пептид, и, таким образом, приводит к пролиферации и обогащению этих Т-клеток.

На четвертой стадии выделяют Т-клетки, которые были активированы при контакте с APC. Как показано в Примере 1, только Т-клетки, которые синтезируют химерную молекулу, содержащую антигенный пептид, который распознается их Т-клеточным рецептором, активируются в присутствии APC. Таким образом, контакт с APC приводит только к активации и пролиферации Т-клеток, которые экспрессируют когнатный антигенный пептид. Эти Т-клетки затем могут быть выделены из Т-клеток, которые не были активированы в присутствии APC, для определения когнатных пар TCR-пептид выделенных Т-клеток. Специалисту известны способы выделения активированных и обогащенных Т-клеток.

Например, активированные и обогащенные Т-клетки можно идентифицировать с помощью проточной цитометрии, такой как сортировка FACS, по экспрессии маркеров активации, таких как CD69, CD44 или CD25, и/или репортерных белков, таких как GFP, mCherry, mTomato, dsRed или других подходящих маркеров активации или репортерных белков, управляемых, например, промоторами, содержащими связывающие

последовательности NFAT или Nur77.

В частности, активацию можно измерить с помощью сортировки клеток, активируемых флуоресценцией (FACS).

FACS относится к способу разделения популяции клеток на одну или несколько субпопуляций на основе присутствия, отсутствия или уровня одного или нескольких конкретных полипептидов, экспрессируемых этими клетками. FACS действует на основе оптических свойств отдельных клеток, включая флуоресценцию, для разделения клеток на субпопуляции. Сортировщики клеток, подходящие для осуществления описанного в данном документе способа, хорошо известны в данной области и коммерчески доступны. Примеры сортировщиков клеток включают сортировщик MoFlo (DakoCytomation, Форт-Коллинс, Колорадо), FACSAria™, FACSArray™, FACS Vantage™, BD™ LSR II и FACSCalibur™ (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) и другие аналогичные сортировщики клеток, производимые другими коммерческими поставщиками, такими как Sony, Bio-Rad и Beckman Coulter.

В качестве альтернативы, Т-клетки, содержащие пептиды, эффективно презентированные МНС, могут быть обогащены сортировкой клеток на основе MACS.

«MACS» относится к способу разделения популяции клеток на одну или несколько субпопуляций на основе присутствия, отсутствия или уровня одного или нескольких MACS-селектируемых полипептидов, экспрессируемых этими клетками. В MACS для сортировки клеток на субпопуляции используются свойства магнитной восприимчивости помеченных отдельных клеток. Для MACS в качестве меток можно использовать магнитные гранулы (например, доступные у Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Германия; 130-048-402). Сортировщики клеток MACS, подходящие для осуществления описанного в данном документе способа, хорошо известны в данной области техники и коммерчески доступны. Примеры сортировщиков клеток MACS включают autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec).

В результате сортировки получают популяцию нефлуоресцентных клеток и по меньшей мере одну популяцию флуоресцентных клеток, в зависимости от того, сколько флуоресцентных меток было использовано. Присутствие по меньшей мере одной клеточной популяции с флуоресцентными клетками указывает на то, что по меньшей мере один пептид-кандидат эффективно презентуется APC. Таким образом, FACS позволяет сортировать популяцию клеток для получения популяции клеток, обогащенных Т-клетками, содержащими пептиды, эффективно презентуемыми с помощью МНС.

На четвертой стадии секвенируют ДНК из выделенных Т-клеток. Как описано выше, Т-клетки, которые активируются и обогащаются в присутствии APC, включают

когнатную пару TCR-пептид. Таким образом, секвенирование активированных Т-клеток, выделенных на предыдущей стадии, дает информацию о том, какой пептид активирует какой Т-клеточный рецептор.

Последовательность TCR и соответствующих когнатных пептидов может быть получена путем секвенирования РНК/ДНК одной клетки такой популяции обогащенных Т-клеток.

Способы выделения и секвенирования ДНК известны специалистам в данной области.

В общем, цель состоит в том, чтобы отделить ДНК, присутствующую в ядре клетки, от других клеточных компонентов. Выделение ДНК обычно начинается с лизиса или разрушения клеток. Этот процесс необходим для разрушения белковых структур и позволяет высвободить нуклеиновые кислоты из ядра. Лизис проводится в солевом растворе, содержащем детергенты для денатурирования белков или протеазы (ферменты, гидролизующих белки), такие как протеиназа К, или, в некоторых случаях, содержащих и то, и другое. Это приводит к разрушению клеток и растворению мембран. Способы выделения ДНК включают, без ограничения указанным, экстракцию фенол:хлороформом, преципитацию в присутствии высокого содержания солей, щелочную денатурацию, ионообменную колоночную хроматографию, связывание со смолой и связывание с парамагнитными шариками.

Способы получения кДНК известны специалистам в данной области. В общем, цель состоит в том, чтобы преобразовать выделенную РНК, присутствующую в клетках, в ДНК, так называемую ДНК-копию, чтобы использовать ее в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделение РНК обычно начинается с лизиса или разрушения клеток. Этот процесс необходим для разрушения белковых структур и позволяет высвободить из них нуклеиновые кислоты. Лизис обычно проводят в растворе, содержащем фенол (например, TRIzol™). Это приводит к разрушению клеток и растворению мембран и позволяет отделить РНК от других клеточных компонентов. Затем выделенная РНК преобразуется в кДНК с помощью обратной транскриптазы (например, Superscript™, Goscript™).

Последовательность пептидов-кандидатов, переносимых активированными Т-клетками (которые связываются с комплексами МНС, презентированными на поверхности антигенпрезентирующих клеток), затем амплифицируют с помощью ПЦР и могут секвенировать любым способом, известным в данной области.

Последовательность пептидов-кандидатов может быть определена с помощью цифровой ПЦР. Цифровая полимеразная цепная реакция (цифровая ПЦР, DigitalPCR,

dPCR или dePCR) - это усовершенствование традиционных способов полимеразной цепной реакции, которые можно использовать для прямого количественного определения и клональной амплификации нуклеиновых кислот, включая ДНК, кДНК или РНК.

Секвенирование также может быть выполнено с использованием микрогидродинамики. Микрогидродинамика включает микромасштабные устройства, которые работают с небольшими объемами жидкостей. Поскольку микрогидродинамика может точно и воспроизводимо контролировать и распределять небольшие объемы жидкости, в частности объемы менее 1 мкл, применение микрогидродинамики обеспечивает значительную экономию средств. Применение технологии микрогидродинамики сокращает время цикла, сокращает время получения результатов и увеличивает пропускную способность. Кроме того, внедрение технологии микрогидродинамики улучшает интеграцию и автоматизацию системы. Микрогидродинамические реакции обычно проводят в микрокаплях.

Секвенирование также может быть выполнено с использованием технологии секвенирования второго поколения (или следующего поколения или Next-Gen), третьего поколения (или Next-Next-Gen) или четвертого поколения (или N3-Gen), включая, без ограничения указанным, пиросеквенирование, секвенирование путем лигирования, секвенирование одиночной молекулы, секвенирование путем синтеза (SBS), массовое параллельное клональное секвенирование, массовое параллельное SBS одиночной молекулы, массовое параллельное секвенирование одиночной молекулы в реальном времени, массовое параллельное секвенирование одиночной молекулы в реальном времени по нанопоровой технологии. Morozova и Marra предоставляют обзор некоторых таких технологий в *Genomics*, 92: 255 (2008).

До, после или одновременно с секвенированием нуклеиновые кислоты могут быть амплифицированы. Иллюстративные неограничивающие примеры методов амплификации нуклеиновых кислот включают, без ограничения указанным, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), транскрипционно-опосредованную амплификацию (ТМА), лигазную цепную реакцию (LCR), амплификация с замещением цепей (SDA) и амплификацию, основанную на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA). Специалисты в данной области поймут, что некоторые методы амплификации (например, ПЦР) требуют обратной транскрипции РНК в ДНК перед амплификацией (например, ОТ-ПЦР), тогда как другие методы амплификации непосредственно амплифицируют РНК (например, ТМА и NASBA).

На заключительной стадии когнатные пары TCR-пептид активированных и

обогащенных Т-клеток идентифицируют путем анализа данных секвенирования. Квалифицированному специалисту известны биоинформатические инструменты для анализа данных секвенирования. Таким образом, с помощью описанного выше способа можно будет идентифицировать несколько когнатных пар TCR-пептид в одном эксперименте.

В некоторых воплощениях способ согласно изобретению можно использовать для идентификации ранее неизвестных антигенных пептидов. Для этого в популяцию поликлональных Т-клеток можно ввести библиотеку полинуклеотидов, кодирующую белок корцептора, присоединенный к пептиду, где по меньшей мере два полипептида библиотеки кодируют пептиды с разными аминокислотными последовательностями.

В некоторых воплощениях пептиды в библиотеке могут кодироваться случайными молекулами ДНК или кДНК. Случайные молекулы ДНК или кДНК могут, например, быть получены из клетки, в частности, из антигенпрезентирующей клетки, такой как опухолевая клетка или клетка, инфицированная патогеном, как описано выше. Кроме того, случайные молекулы ДНК могут быть молекулами ДНК или фрагментами молекул ДНК, кодирующими пептид или белок для тестирования иммуногенности.

В других воплощениях полинуклеотиды библиотеки, кодирующие пептид, могут быть получены химическим синтезом. Например, последовательности полинуклеотидов, кодирующих пептиды библиотеки, могут быть разработаны вычислительным способом на основе данных экзона, как описано выше. В ином случае, последовательности полинуклеотидов, кодирующих пептиды библиотеки, могут быть сконструированы на основе последовательности пептидов, которые были выделены из антигенпрезентирующей клетки, как описано выше.

Библиотека полинуклеотидов может быть введена в любую популяцию Т-клеток. В частности, популяция Т-клеток может быть популяцией Т-клеток, полученной от того же объекта, что и молекулы ДНК или кДНК, кодирующие пептиды библиотеки.

В некоторых воплощениях способы по настоящему изобретению можно использовать для идентификации ранее неизвестных опухолевых антигенов. В этом случае предпочтительно, чтобы информация о последовательностях пептидов, которые кодируются в библиотеке полинуклеотидов, была получена из опухолевой клетки. Для идентификации Т-клеточных рецепторов, которые специфически связываются с этими пептидами, дополнительно предпочтительно, чтобы библиотека полинуклеотидов подвергалась скринингу против моноклональных или поликлональных Т-клеток, которые были получены от субъекта, в частности субъекта, страдающего от онкологического заболевания, в частности, того же субъекта, из которого была получена опухолевая

клетка, которую использовали для создания библиотеки полинуклеотидов.

В некоторых воплощениях способы по настоящему изобретению можно использовать для идентификации ранее неизвестных патоген-ассоциированных антигенов. В этом случае предпочтительно, чтобы информация о последовательности пептидов, кодируемых в библиотеке полинуклеотидов, была получена из клетки, инфицированной патогеном. Для идентификации Т-клеточных рецепторов, которые специфически связываются с этими пептидами, дополнительно предпочтительно, чтобы библиотека полинуклеотидов подвергалась скринингу против моноклональных или поликлональных Т-клеток, которые были получены из субъекта, в частности субъекта, страдающего инфекционным заболеванием. Предпочтительно клетки, которые используются для создания библиотеки и популяции моноклональных или поликлональных Т-клеток, были получены из субъектов, страдающих одним и тем же инфекционным заболеванием, более предпочтительно из одного и того же субъекта.

В некоторых воплощениях способы по настоящему изобретению можно использовать для идентификации антигенных пептидов, которые участвуют в возникновении и прогрессировании аутоиммунных заболеваний. Аутоиммунные заболевания могут быть вызваны патогенными Т-клетками, которые активируются антигенами, присутствующими на здоровой клетке. Таким образом, идентификация антигенных пептидов, которые часто распознаются патогенными Т-клетками, может способствовать разработке агентов, блокирующих это распознавание, таких как связывающие агенты, которые связываются с антигенными пептидами и предотвращают распознавание патогенной Т-клеткой. Соответственно, способ по изобретению можно использовать для идентификации антигенных пептидов, которые могут распознаваться патогенными Т-клетками. Для этого библиотека полинуклеотидов может быть подвергнута скринингу против моноклональной или поликлональной популяции патогенных Т-клеток. Предпочтительно, чтобы моноклональная или поликлональная популяция патогенных Т-клеток была получена от пациента, страдающего аутоиммунным заболеванием. В ином случае, полинуклеотиды, кодирующие один или несколько известных патогенных Т-клеточных рецепторов, могут быть введены в непатогенные Т-клетки для получения популяции патогенных Т-клеток. Термин «патогенная Т-клетка» в контексте настоящего описания относится к Т-клетке, которая реагирует на аутоантиген во время начала или прогрессирования аутоиммунного заболевания.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу идентификации по меньшей мере одного антиген-специфического Т-клеточного рецептора, причем способ включает стадии: (а) получения представляющих интерес поликлональных Т-клеток,

экспрессирующих полинуклеотид по изобретению; (b) контакта Т-клеток со стадии а) с антигенпрезентирующими клетками (АРС), содержащими главный комплекс гистосовместимости (МНС); (с) выделения по меньшей мере одной Т-клетки, которая активируется при контакте с АРС на стадии (b); (d) секвенирования локусов TCR по меньшей мере одной Т-клетки, выделенной на стадии (с); и (е) идентификации по меньшей мере одного Т-клеточного рецептора, кодируемого локусами TCR по меньшей мере одной Т-клетки, как антиген-специфичного.

Вместо одновременного скрининга различных Т-клеточных рецепторов против множества антигенных пептидов химерные молекулы по изобретению также можно использовать для идентификации Т-клеточных рецепторов, которые стимулируются конкретным антигеном. Для этого полинуклеотид, кодирующий белок корецептора, присоединенный к конкретному пептиду, экспрессируется в популяции поликлональных Т-клеток.

Соответственно, способ по изобретению можно использовать для идентификации Т-клеточных рецепторов с высокой специфичностью в отношении известной антигенной мишени. Например, известной антигенной мишенью может быть антигенный пептид, который, как было установлено, присутствует на поверхности антигенпрезентирующей клетки объекта. В частности, антигенный пептид может быть пептидом, происходящим от патогена, который презентируется молекулой МНС на поверхности клетки, инфицированной патогеном. В ином случае, антигенный пептид может быть пептидом, который специфически презентируется молекулой МНС на поверхности опухолевой клетки, но не на поверхности здоровой клетки. Присоединяя пептид к корецептору, который присоединяет аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности антигенных пептидов, презентируемых на инфицированной клетке или опухолевой клетке, можно идентифицировать Т-клеточные рецепторы с высокой специфичностью к этим антигенным пептидам.

Антигенспецифические Т-клеточные рецепторы, которые можно идентифицировать с помощью способа по настоящему изобретению, могут быть Т-клеточными рецепторами природного происхождения. Например, в некоторых воплощениях популяция поликлональных Т-клеток может быть выделена из субъекта. В некоторых воплощениях популяция поликлональных Т-клеток может быть выделена из объекта, который, как было установлено, содержит инфицированные клетки или опухолевые клетки, которые отображают антигенные пептиды на своих клеточных поверхностях.

В ином случае, популяция поликлональных Т-клеток может быть получена с

помощью генной инженерии. Например, популяция поликлональных Т-клеток может быть получена путем введения библиотеки Т-клеточных рецепторов в популяцию Т-клеток, в частности Т-лимфоцитов, отрицательных по TCR. В некоторых воплощениях библиотека Т-клеточных рецепторов может быть создана на основе последовательности Т-клеточного рецептора, которая уже демонстрирует определенную степень связывания с антигенным пептидом, который презентируется молекулой МНС на поверхности APC. Таким образом, библиотека может быть создана путем введения случайных или целевых мутаций в последовательность ДНК, кодирующую Т-клеточный рецептор, с целью идентификации мутированного варианта Т-клеточного рецептора, который более эффективно стимулируется антигенным пептидом.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу идентификации по меньшей мере одного Т-клеточно-специфического антигена, причем способ включает стадии: (а) получения представляющих интерес моноклональных Т-клеток, экспрессирующих полинуклеотид по изобретению или библиотеку полинуклеотидов изобретения; (b) контакта Т-клеток стадии (а) с антигенпрезентирующими клетками (APC), содержащими главный комплекс гистосовместимости (МНС); (с) выделения по меньшей мере одной Т-клетки, которая активируется при контакте с APC на стадии (b); (d) секвенирования части полинуклеотида, кодирующего пептид, присоединенный к N-концу корцепторного белка CD4, LAG-3 или CD8 по меньшей мере одной Т-клетки, выделенной на стадии (с); и (е) идентификации по меньшей мере одного пептида, кодируемого полинуклеотидом, содержащимся по меньшей мере в одной Т-клетке, как антиген, специфичный для Т-клеток.

То есть, в некоторых воплощениях химерная молекула по изобретению используется для идентификации пептидов, которые эффективно стимулируют специфический Т-клеточный рецептор. Для этого популяция моноклональных Т-клеток может быть подвергнута скринингу против библиотеки полинуклеотидов по изобретению. Популяция моноклональных Т-клеток представляет собой группу из более чем одной Т-клетки, где по существу все Т-клетки в популяции синтезируют идентичный Т-клеточный рецептор. Соответственно, способ по изобретению можно использовать для идентификации пептидов из библиотеки пептидов, которые эффективно стимулируют специфический Т-клеточный рецептор. Например, библиотека пептидов может кодироваться библиотекой полинуклеотидов по изобретению, где по меньшей мере два полинуклеотида библиотеки кодируют идентичный белок корцептора, присоединенный к пептиду с другой аминокислотной последовательностью.

В некоторых воплощениях пептиды, которые присоединены к корцепторному

белку, могут отличаться по своей аминокислотной последовательности, поскольку они содержат по меньшей мере два разных антигенных пептида, которые, как известно, презентруются молекулой МНС. В частности, антигенные пептиды могут быть пептидами, происходящими из опухолевой клетки или из клетки, инфицированной патогеном.

В других воплощениях пептиды, которые присоединены к корцепторному белку, могут отличаться по своей аминокислотной последовательности, поскольку они представляют собой мутированные варианты известного антигенного пептида. То есть, способ по настоящему изобретению можно использовать для идентификации мутировавших вариантов известного антигенного пептида, которые приводят к улучшенной стимуляции когнатного Т-клеточного рецептора. Например, случайные или целевые мутации могут быть введены в пептид, который содержит аминокислотную последовательность известного антигенного пептида, для идентификации пептидов, которые приводят к более эффективной стимуляции известного Т-клеточного рецептора.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу изобретения, в котором APC представляет собой представляет собой аутологичную или гетерологичную APC.

То есть APC, который контактирует с Т-клетками в способах по изобретению, может быть аутологичным или гетерологичным APC. «Аутологичная APC», при использовании в данном документе, представляет собой APC, которая была получена от того же субъекта, что и Т-клетки, с которыми контактирует APC. «Гетерологичная APC», при использовании в данном документе, представляет собой APC, которая была получена от другого субъекта, чем Т-клетки, с которыми контактирует APC.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу изобретения, где APC представляет собой генетически модифицированную аутологичную или гетерологичную клетку или линию клеток, экспрессирующую мутированную молекулу МНС.

Аутологичная или гетерологичная APC, которая контактирует с Т-клетками в способах по изобретению, может быть генетически модифицированной APC, которая экспрессирует мутированную молекулу МНС.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу по изобретению, где мутированная молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса II, содержащую внеклеточную альфа-цепь МНС класса II и нативный или гетерологичный трансмембранный домен, а также внеклеточную бета-цепь МНС класса II и нативный или гетерологичный трансмембранный домен.

То есть, мутированная молекула МНС класса II может содержать альфа-цепь МНС

класса II и внеклеточный домен бета-цепи МНС класса II, слитые с нативным или гетерологичным трансмембранным доменом. В ином случае, мутированная молекула МНС класса II может содержать бета-цепь МНС класса II и внеклеточный домен альфа-цепи МНС класса II, слитые с нативным или гетерологичным трансмембранным доменом. В ином случае, мутированная молекула МНС класса II может включать внеклеточный домен альфа-цепи МНС класса II, слитый с нативным или гетерологичным трансмембранным доменом, и внеклеточный домен бета-цепи МНС класса II, слитый с нативным или гетерологичным трансмембранным доменом.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу по изобретению, в котором мутированная молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса I, содержащую внеклеточную альфа-цепь МНС класса I и нативный или гетерологичный трансмембранный домен, а также бета-2-микроглобулин.

То есть, внеклеточный домен молекулы МНС класса I или II считается слитым с нативным трансмембранным доменом, если внеклеточный домен молекулы МНС класса I или класса II ковалентно связан с трансмембранным доменом другой молекулы МНС класса I или II класса, соответственно. Внеклеточный домен молекулы МНС класса I или II считается слитым с гетерологичным трансмембранным доменом, если внеклеточный домен молекулы МНС класса I или II ковалентно связан с трансмембранным доменом любого другого трансмембранного белка, в частности любого другого трансмембранного белка, другого трансмембранного белка млекопитающих. Квалифицированному специалисту известны способы слияния внеклеточного домена первого белка с трансмембранным доменом второго белка.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу по изобретению, в котором корцепторный белок, кодируемый полинуклеотидом или библиотекой полинуклеотидов, представляет собой CD8, и где молекула МНС, содержащаяся в APC, представляет собой молекулу МНС класса I.

То есть, корцепторный белок CD8, как известно, способствует связыванию между комплексами пептид-МНС класса I и когнатным TCR. Таким образом, в рамках настоящего изобретения предпочтительно, чтобы полинуклеотид или библиотека полинуклеотидов, которые вводятся в T-клетки, кодировали корцепторный белок CD8, если полученные клетки должны контактировать с APC, которая включает молекулу МНС класса I.

Молекулы МНС класса I экспрессируются на поверхности клеток у всех челюстных позвоночных и отвечают за презентацию антигенов T-клеткам. Гены, кодирующие молекулы МНС, находятся в области МНС генома позвоночных, хотя состав

генов и расположение генома сильно различаются.

У людей эти гены называют генами лейкоцитарного антигена человека (HLA). Наиболее изученными генами HLA являются девять так называемых классических генов MHC: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA 1, HLA-DPB 1, HLA-DQA 1, HLA-DQB 1, HLA-DRA и HLA-DRB 1. У человека MHC делится на три области: классы I, II и III. Гены A, B и C принадлежат к классу MHC I, тогда как шесть генов D принадлежат к классу II.

Молекулы белка MHC класса I представляют собой гетеродимеры, состоящие из двух полипептидных цепей: высокополиморфной цепи  $\alpha$  (содержащей 3 домена:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ ) и нековалентно связанного P2-микροглобулина. Молекулы белка MHC класса I человека могут называться в данной области как «молекулы HLA» или «молекулы белка HLA».

Соответственно, используемый в данном документе термин «молекула MHC класса I» включает все молекулы MHC класса I млекопитающих, включая человека и не являющихся человеком млекопитающих. Предпочтительно молекула MHC класса I представляет собой молекулу MHC класса I человека (молекула белка HLA).

Молекулы MHC класса I отвечают за связывание и презентацию антигенов на поверхности клетки и, следовательно, существуют со связанным антигеном или без него. Соответственно, термин «молекула MHC класса I» относится к молекуле MHC класса I либо сама по себе, либо когда она связана с антигеном.

Молекула MHC класса I может быть молекулой HLA. Предпочтительно молекула HLA является продуктом гена HLA-A. Ген HLA-A является полиаллельным, и поэтому в популяции существует множество различий в  $\alpha$ -цепи кодируемого белка.

Предпочтительно молекула HLA, связанная первой частью согласно изобретению, является продуктом гена HLA-A2. HLA-A2 является серотипом HLA в группе серотипов HLA-A 'A' и кодируется группой аллелей HLA-A 02, включая продукты генов HLA-A0201, HLA-A0202, HLA-A0203, HLA-A0205, HLA-A0206, HLA-A0207 и HLA-A0211. HLA-A2 очень распространен среди населения европеоидной расы (40-50%) и представляет собой идеальную клеточную мишень для первой порции, поскольку он подходит для использования во многих комбинациях донора и реципиента. Такой подход подходит примерно для четверти всех случаев трансплантации у европейцев. Соответственно, любой представитель группы аллелей HLA-A2 охватывается термином «HLA-A2».

В конкретном воплощении изобретение относится к способу по изобретению, в котором корцепторный белок, кодируемый полинуклеотидом, представляет собой CD4 или LAG-3, и где молекула MHC, экспрессируемая APC, представляет собой молекулу

МНС класса II.

Кроме того, предпочтительно, чтобы полинуклеотид или библиотека полинуклеотидов, которые вводятся в Т-клетки, кодировали корцепторные белки CD4 или LAG3, если полученные клетки должны контактировать с APC, которая содержит молекулу МНС класса II.

Молекула МНС класса II состоит из двух мембранных полипептидных цепей,  $\alpha$  и  $\beta$ , одинакового размера (около 30000 Да). Каждая цепь состоит из двух доменов, где  $\alpha 1$  и  $\beta 1$  образуют 9-карманную пептид-связывающую щель, где карманы 1, 4, 6 и 9 рассматриваются как основные карманы для связывания пептидов.  $\alpha 2$  и  $\beta 2$ , как  $\alpha 2$  и  $\beta 2m$  в молекулах МНС класса I, имеют аминокислотную последовательность и структурное сходство с константными доменами иммуноглобулинов. В отличие от комплексов МНС класса I, где концы антигенного пептида скрыты, пептидные концы в комплексах МНС класса II не скрыты. HLA-DR, DQ и DP представляют собой молекулы класса II человека, H-2A, M и E - молекулы класса II мышей.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу лечения объекта, страдающего от онкологического или инфекционного заболевания, причем способ включает стадии: (a) идентификации по меньшей мере одного антигенспецифического Т-клеточного рецептора и/или по меньшей мере одного Т-клеточного рецептора с помощью способов по изобретению; (b) введения объекту, страдающему от онкологического заболевания или инфекционного заболевания по меньшей мере одного Т-клеточного рецептора и/или Т-клеточно-специфического антигена, идентифицированного на стадии (a).

То есть, способ по изобретению можно использовать для идентификации антигенных пептидов или антиген-специфических Т-клеточных рецепторов, которые можно использовать при лечении объекта, страдающего от онкологического заболевания или инфекционного заболевания. Например, способы по настоящему изобретению можно использовать для идентификации встречающихся в природе или сконструированных Т-клеточных рецепторов, которые эффективно стимулируются антигенным пептидом, который презентируется молекулами МНС на опухолевых клетках объекта или на клетках, инфицированных патогеном. В этом случае идентифицированный антигенспецифический Т-клеточный рецептор может быть введен объекту, страдающему от онкологического заболевания, для атаки опухолевых клеток этого объекта, или объекту, страдающему инфекционным заболеванием, для атаки клеток, инфицированных патогеном.

В качестве альтернативы способы по настоящему изобретению можно использовать для идентификации ранее неизвестных антигенных пептидов. В частности,

способы по настоящему изобретению можно использовать для идентификации ранее неизвестных антигенных пептидов, которые экспрессируются APC, в частности, опухолевой клеткой или клеткой, инфицированной патогеном.

Способы по изобретению могут дополнительно использоваться для определения того, распознается ли вновь идентифицированный антигенный пептид Т-клеткой, в частности Т-клеткой, полученной от того же объекта, что и опухолевая клетка или инфицированная клетка. Если ранее неизвестная родственная пара TCR-пептид идентифицирована у объекта, страдающего от онкологического заболевания или инфекционного заболевания, с помощью способов по изобретению, указанный объект можно лечить антигенным пептидом или его когнатным Т-клеточным рецептором.

В некоторых воплощениях предпочтительно, чтобы моноклональные или поликлональные Т-клетки, которые использовались для идентификации антигенного пептида и/или антигенспецифического Т-клеточного рецептора, были получены от пациента, страдающего от онкологического заболевания или инфекционного заболевания. В дополнительных воплощениях предпочтительно, чтобы библиотека полинуклеотидов, которую вводят в Т-клетки, включала полинуклеотидные последовательности, которые были получены из APC объекта, страдающего от онкологического заболевания или инфекционного заболевания, в частности, из опухолевых клеток объекта, страдающего от онкологического заболевания или из клеток, инфицированных патогеном.

Онкологические заболевания, которые можно лечить с помощью способа по настоящему изобретению, включают опухоли, которые не васкуляризованы или еще не васкуляризованы, а также васкуляризованные опухоли. Онкологические заболевания могут включать несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкозы и лимфомы) или могут включать солидные опухоли. Типы онкологических заболеваний, подлежащие лечению лимфоцитами по изобретению, включают, без ограничения указанным, карциному, бластому и саркому, а также некоторые лейкозы или лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли и злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Также включены взрослые опухоли/злокачественные опухоли и детские опухоли/злокачественные опухоли.

Гематологические онкологические заболевания - это онкологические заболевания крови или костного мозга. Примеры гематологического (или гематогенного) онкологического заболевания включают лейкозы, включая острые лейкозы (например, острый лимфолейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и

эритролейкозный), хронические лейкозы (такие как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелолейкоз, и хронический лимфолейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (вялотекущие и тяжелые формы), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазию.

Солидные опухоли - это аномальные массы ткани, которые обычно не содержат кист или жидких областей. Солидные опухоли могут быть доброкачественными и злокачественными. Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их образуют (например, саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному ободочной кишки, лимфоидную злокачественную опухоль, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак простаты, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитому карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичек, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (например, глиома ствола мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома), астроцитому, лимфому ЦНС, герминому, медуллобластома, шванному краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластома, акустическую неврому, олигодендроглиому, менангиому, нейробластома, ретинобластома и метастазы в мозг).

В рамках настоящего изобретения инфекционное заболевание может быть вызвано любым патогеном. В некоторых воплощениях инфекционное заболевание вызвано вирусным патогеном. В некоторых воплощениях вирусный патоген представляет собой цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна-Барр (EBV), аденовирусы, полиомавирусы, вирус варицелла-зостер (VZV), вирус герпеса человека (HHV), вирус иммунодефицита человека (HIV) или вирус гриппа.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу изобретения, в котором антигенспецифический Т-клеточный рецептор вводят объекту посредством

доставки гена, опосредованной вирусом.

Встречающийся в природе или сконструированный Т-клеточный рецептор, который был идентифицирован способами по настоящему изобретению для эффективного связывания антигена, который презентирован на поверхности опухолевой клетки, полученной от объекта, страдающего от онкологического заболевания, или на поверхности патоген-инфицированной клетки, полученной от объекта, может быть введена этому объекту любым путем. Например, Т-клеточный рецептор можно вводить объекту посредством доставки гена, опосредованной вирусом. Для этого предпочтительно, чтобы популяция Т-клеток сначала была выделена из субъекта. Гены, кодирующие антиген-специфический TCR, вводятся в популяцию Т-клеток посредством доставки генов, опосредованной вирусом, и Т-клетки, которые получили гены и синтезируют антиген-специфический Т-клеточный рецептор, затем повторно вводятся субъекту. Квалифицированному специалисту известны способы и подходящие вирусные векторы для доставки генов, опосредованной вирусом. В частности, векторы на основе лентивируса или аденоассоциированного вируса можно использовать для доставки генов TCR в Т-клетку.

В ином случае, антиген-специфический Т-клеточный рецептор может быть растворимым антиген-специфическим Т-клеточным рецептором, который вводится непосредственно субъекту. В конкретном воплощении растворимый антигенспецифический Т-клеточный рецептор конъюгирован с другой молекулой, такой как фармацевтическое соединение.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу изобретения, в котором Т-клеточно-специфичный антиген вводится объекту в форме пептида или в форме полинуклеотида, кодирующего пептид.

Антигенный пептид, который был идентифицирован способами по настоящему изобретению, можно вводить субъекту, страдающему от онкологического заболевания или инфекционного заболевания, любым способом. То есть, антигенный пептид можно вводить субъекту в форме пептида, так что пептид поглощается и презентуется антигенпрезентирующей клеткой, что, в свою очередь, может приводить к активации антигенспецифических Т-клеток. В ином случае, антигенный пептид также можно вводить субъекту в форме более крупного пептида или белка, содержащего антигенный пептид. Затем более крупный пептид или белок может быть поглощен антигенпрезентирующей клеткой и процессирован, так что антигенный пептид будет презентирован МНС на поверхности антигенпрезентирующей клетки. В ином случае, антигенный пептид можно вводить субъекту в форме полинуклеотида, который может

поглощаться APC, так что антигенный пептид экспрессируется и презентуется APC. В некоторых воплощениях полинуклеотид, кодирующий антиген-специфический пептид, представляет собой молекулу ДНК. В других воплощениях полинуклеотид, кодирующий антиген-специфический пептид, представляет собой молекулу РНК, в частности молекулу мРНК. В некоторых воплощениях полинуклеотид содержит дополнительные регуляторные элементы или кодирующие последовательности.

В конкретном воплощении изобретение относится к способу изобретения, где пептид или полинуклеотид, кодирующий пептид, присоединен к соединению, которое улучшает доставку пептида или полинуклеотида, кодирующего пептид, в APC.

Пептид или полинуклеотид, кодирующий пептид, может быть присоединен к любому соединению, которое облегчает доставку пептида или полинуклеотида в APC. То есть, пептид или полинуклеотид может быть присоединен, например, к нацеливающему фрагменту, который направляет пептид или полинуклеотид к APC.

Термин «введение», используемый в данном документе для обозначения доставки материала TCR по изобретению или антигенного пептида объекту, не ограничивается каким-либо конкретным путем, а скорее относится к любому пути, приемлемому для медицинского сообщества. Используемый в данном документе термин «объект» обозначает любое животное, предпочтительно млекопитающее и более предпочтительно человека. Примеры объектов включают людей, не являющихся человеком приматов, грызунов, морских свинок, кроликов, овец, свиней, коз, коров, лошадей, собак и кошек. В рамках настоящего изобретения термин «субъект» используется взаимозаменяемо с термином «пациент».

Используемый в данном документе термин «лечение» относится к любому улучшению заболевания или расстройства, такого как онкологическое или инфекционное заболевание, которое происходит у подвергнутого обработке субъекта по сравнению с необработанным субъектом. Такое улучшение может быть предупреждением обострения или прогрессирования указанного заболевания или нарушения. Более того, такое улучшение также может быть улучшением или излечением заболевания или расстройства или сопутствующих им симптомов. Следует понимать, что лечение может быть неэффективным для 100% объектов, подлежащих лечению. Однако этот термин требует, чтобы лечение было успешным для статистически значимой части объектов (например, когорты в клиническом исследовании). Специалист в данной области техники может определить, является ли часть статистически значимой, с использованием различных хорошо известных инструментов статистической оценки, например, определение доверительных интервалов, определение р-значения, t-критерия Стьюдента, критерия

Манна-Уитни и т.д. Подробности можно найти в Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983. Предпочтительные доверительные интервалы составляют не менее 90%, не менее 95%, не менее 97%, не менее 98% или не менее 99%. Значения  $p$  предпочтительно составляют 0,05, 0,01, 0,005 или 0,0001.

V1. Химерная молекула, содержащая белок корцептора CD4, LAG3 или CD8 и пептид, присоединенный к N-концу корцептора.

V2. Химерная молекула по воплощению V1, отличающаяся тем, что пептид присоединен к N-концу корцептора через линкер.

V3. Химерная молекула согласно воплощению V1 или воплощению V2, отличающаяся тем, что пептид кодируется данной молекулой кДНК или ДНК.

V4. Химерная молекула по согласно воплощению V3, где кДНК или ДНК получена из фрагментированной молекулы кДНК или ДНК.

V5. Химерная молекула по любому из воплощений изобретения от V1 до V4, отличающаяся тем, что пептид представляет собой случайный пептид.

V6. Химерная молекула по любому из воплощений от V1 до V5, отличающаяся тем, что пептид получен из библиотеки пептидов.

V7. Химерная молекула по любому из воплощений от V1 до V6, отличающаяся тем, что пептид имеет от 6 до 200 аминокислотных остатков.

V8. Химерная молекула по любому из воплощений V1-V7, отличающаяся тем, что пептид кодируется ДНК, содержащей SNP, присутствующий в опухолевой ДНК.

V9. Конструкция химерной ДНК, включающая ДНК, кодирующую химерную молекулу любого из воплощений V1-V8.

V10. Библиотека химерных молекул, содержащая одну или несколько молекул, определенных в любом из воплощений V1-V8.

V11. Способ одновременного обнаружения и обогащения антиген-специфических Т-клеток и пептидов, специфически распознаваемых их Т-клеточными рецепторами (TCR), который включает:

а) получение представляющих интерес поликлональных Т-клеток, сверхэкспрессирующих химерную конструкцию ДНК, кодирующую химерную молекулу любого из воплощений V1-V8.

б) культивирование Т-клеток, сверхэкспрессирующих химерную ДНК-конструкцию стадии а) в присутствии антигенпрезентирующих клеток (АРС), экспрессирующих главный комплекс гистосовместимости (МНС), содержащий пептид-связывающую бороздку, так что комплекс образуется между присоединенным к N-концу корцепторного белка CD4, LAG-3 или CD8 пептидом и пептид-связывающей бороздкой

МНС, которая при распознавании TCR приводит к активации Т-клеток;

с) выделение Т-клеток, активированных и размноженных на стадии совместного культивирования b); и, не обязательно;

d) секвенирование ДНК выделенных Т-клеток для получения информации о последовательностях TCR и пептидных последовательностях, присоединенных к корецепторам CD4, LAG-3 или CD8, присутствующим в этих Т-клетках.

B12. Способ по воплощению B11, отличающийся тем, что активированная Т-клетка включает TCR, который распознает пептидный комплекс МНС, образованный на стадии b).

B13. Способ идентификации антиген-специфических последовательностей TCR, который включает

a) получение представляющих интерес поликлональных Т-клеток, сверхэкспрессирующих химерную конструкцию ДНК, кодирующую химерную молекулу любого из воплощений B1-B8;

b) культивирование Т-клеток, сверхэкспрессирующих химерную ДНК-конструкцию стадии a) в присутствии антигенпрезентирующих клеток (АРС), экспрессирующих главный комплекс гистосовместимости (МНС), содержащий пептид-связывающую бороздку, так что комплекс образуется между пептидом, присоединенным к N-концу корецепторного белка CD4, LAG-3 или CD8, и пептид-связывающей бороздкой МНС, которая при распознавании TCR приводит к активации Т-клеток;

с) идентификацию и сортировку Т-клеток, активированных и размноженных на стадии совместного культивирования b) посредством экспрессии маркеров активации или репортерных белков;

d) секвенирование локусов TCR Т-клеток, идентифицированных и отсортированных на стадии с).

B14. Способ идентификации специфических для Т-клеток антигенов, который включает:

a) получение представляющих интерес моноклональных Т-клеток, сверхэкспрессирующих химерную конструкцию ДНК, кодирующую химерную молекулу любого из воплощений B1-B8;

b) культивирование Т-клеток, сверхэкспрессирующих химерную ДНК-конструкцию стадии a) в присутствии антигенпрезентирующих клеток (АРС), экспрессирующих главный комплекс гистосовместимости (МНС), содержащий пептид-связывающую бороздку, так что комплекс образуется между пептидом, присоединенным к N-концу корецепторного белка CD4, LAG-3 или CD8, и пептид-связывающей бороздкой

МНС, которая при распознавании ТСР приводит к активации Т-клеток;

с) идентификацию и сортировку Т-клеток, активированных при совместном культивировании на стадии b) посредством экспрессии маркеров активации или репортерных белков;

d) выделение ДНК/РНК, присутствующих в Т-клетках, идентифицированных и отсортированных на стадии с);

e) амплификацию (с помощью ПЦР или ОТ-ПЦР) фрагмента, кодирующего химерный корцептор и

f) секвенирование части, кодирующей пептид, присоединенный к N-концу корцепторного белка CD4, LAG-3 или CD8.

B15. Способ по любому из воплощений B11-B14, отличающийся тем, что APC представляет собой аутологичную APC.

B16. Способ по любому из воплощений B11-B14, отличающийся тем, что APC представляет собой гетерологичную APC.

B17. Способ по любому из воплощений изобретения B11-B14, отличающийся тем, что APC представляет собой генетически модифицированную аутологичную или гетерологичную клетку или линию клеток, сверхэкспрессирующую мутированную молекулу МНС.

B18. Способ по любому из воплощений изобретения B11-B17, отличающийся тем, что на стадии a) химерные конструкции ДНК, сверхэкспрессируемые в представляющих интерес Т-клетках, кодируют библиотеку пептидов.

B19. Способ согласно воплощению B18, отличающийся тем, что пептидная библиотека представляет собой библиотеку, определенную в воплощении B10.

B20. Способ по любому из воплощений B11-B19, отличающийся тем, что корцептор представляет собой CD8, а молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса I.

B21. Способ по любому из воплощений B11-B19, отличающийся тем, что корцептор представляет собой CD4 или LAG-3, а молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса II.

B22. Способ по любому из воплощений B17-B21, отличающийся тем, что мутированная молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса II, содержащую внеклеточную альфа-цепь МНС класса II и нативный или гетерологичный трансмембранный домен, а также внеклеточную бета-цепь МНС класса II и нативный или гетерологичный трансмембранный домен.

B23. Способ по любому из воплощений изобретения B17-B21, отличающийся тем,

что мутированная молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса I, содержащую внеклеточную альфа-цепь МНС класса I и нативный или гетерологичный трансмембранный домен, а также бета-2-микроглобулин.

Настоящее изобретение обеспечивает способы одновременного обнаружения и обогащения антиген-специфических Т-клеток и пептидов, специфически распознаваемых их Т-клеточными рецепторами (TCR), и идентификации Т-клеточно-специфических антигенов для вмешательств *in vivo* и/или *in vitro*, включая вакцинацию, индукцию иммунологической толерантности, блокирование TCR и МНС-опосредованной доставки токсинов, тестирование иммуногенности и других тестов реактивности Т-клеток *in vitro*. Настоящее изобретение также относится к химерным молекулам, используемым в указанных способах.

В частности, способ включает стадии:

а) получения представляющих интерес поликлональных или моноклональных Т-клеток, сверхэкспрессирующих химерную конструкцию ДНК, содержащую химерную молекулу любого из воплощений В1-В4;

б) культивирования Т-клеток, сверхэкспрессирующих химерную ДНК-конструкцию стадии а) в присутствии антигенпрезентирующей клетки (АРС), экспрессирующей главный комплекс гистосовместимости (МНС), включающий пептид-связывающую бороздку, так что комплекс образуется между пептидом, присоединенным к N-концу корцепторного белка CD4, LAG-3 или CD8, и пептид-связывающей бороздкой МНС, который при распознавании TCR приводит к активации Т-клеток;

с) выделения Т-клеток, активированных в совместной культуре на стадии б), в частности, с помощью проточной цитометрии и FACS-сортировки Т-клеток по экспрессии маркеров активации, таких как CD69, CD44 или CD25, или репортерных белков, таких как GFP, mCherry, mTomato, dsRed, и т.д.; и

д) выделения ДНК/РНК, присутствующих в Т-клетках, идентифицированных и отсортированных на стадии с);

е) амплификации (с помощью ПЦР или ОТ-ПЦР) фрагмента, кодирующего химерный корцептор, и

ф) секвенирования части, кодирующей пептид, присоединенный к N-концу корцепторного белка CD4, LAG-3 или CD8.

В различных конкретных воплощениях изобретения Т-клетки, активированные в совместной культуре на стадии б), могут быть выделены с помощью проточной цитометрии и FACS-сортировки Т-клеток посредством экспрессии маркеров активации, таких как, например, CD69, CD44 или CD25 и/или репортерных белков, таких как,

например, GFP, mCherry, mTomato, dsRed или других подходящих маркеров активации или репортерных белков.

Известные в данной области способы сильно ограничены, поскольку речь идет о параллельной обработке, поскольку они не позволяют одновременный скрининг многих TCR против многих эпитопов. Представляющие интерес TCR должны быть подвергнуты скринингу против библиотек эпитопов один за другим. И наоборот, обнаружение TCR, реактивных по отношению к интересующим эпитопам, требует, чтобы эпитопы подвергались скринингу против библиотек TCR один за другим.

В настоящем изобретении предлагается способ, который позволяет одновременно обнаруживать и обогащать антиген-специфические Т-клетки и идентифицировать TCR и их когнатные эпитопы.

Это достигается путем экспрессии химерных молекул, содержащих корцепторные белки CD4, LAG-3 или CD8, и библиотеку пептидов, прикрепленных к N-концу этих корцепторов в представляющих интерес Т-клетках. Также можно использовать TCR-отрицательные линии Т-клеток, сверхэкспрессирующие библиотеки TCR.

В частности, представляющая интерес Т-клетка может быть Т-клеткой, выделенной из крови, селезенки, лимфатических узлов или опухолевой ткани или из любого другого подходящего источника.

В частности, описанные выше химерные молекулы содержатся в рекомбинантном экспрессирующем векторе.

Корцепторные белки CD4, LAG-3 или CD8 представляют собой, в частности, полноразмерные корцепторные белки CD4, LAG-3 или CD8.

Связывание пептида с N-концом корцепторов CD4, LAG-3 или CD8 можно осуществлять с помощью линкерной молекулы.

В частности, линкерная молекула содержит примерно от 5 до 30 аминокислот.

Подходящими линкерными молекулами являются (G4S)<sub>1</sub>, (G4S)<sub>2</sub>, (G4S)<sub>3</sub>, (G4S)<sub>5</sub> и т.д.

В частности, можно использовать GS-линкер, содержащий от 5 до 28 аминокислот.

Пептид, присоединенный к N-концу корцептора, является, в частности, (i) случайным пептидом; (ii) пептидом, полученным из данной молекулы кДНК или ДНК; (iii) пептидом, кодируемым фрагментированной молекулой кДНК или ДНК.

Фрагментированные молекулы кДНК или ДНК могут быть получены путем случайного выделения или гидролиза кДНК или ДНК, полученных из представляющих интерес биоптатов тканей, клеток или патогенов.

Например, пептид, присоединенный к N-концу корцептора, может кодироваться

молекулой ДНК или фрагментированной молекулой ДНК, содержащей SNP, присутствующей в опухолевой ДНК.

Другие пептиды, которые можно использовать в химерной конструкции, включают, например, без ограничения указанным:

- TSA, полученный секвенированием экзона, используемый для идентификации TSA, которые однозначно присутствуют в опухоли;

- опухолеспецифический пептид, несущий индивидуальную(ые) мутацию(ии) опухолевого происхождения, такой как однонуклеотидный вариант (SNV), SNV, включающий различные мутации p53, KRAS и BRAF;

- антиген, вызывающий иммунный ответ, например, пептиды могут происходить из патогенов;

- соединение, подвергаемое тестированию на иммуногенность;

- библиотеку кандидатных пептидов, где библиотека включает мутантные формы нативного(ых) пептида(ов).

В частности, в раскрытых в данном документе способах можно использовать библиотеку пептидов-кандидатов, при этом библиотека включает пептиды, полученные путем случайного удаления или расщепления кДНК или ДНК, полученных из представляющих интерес клеток или патогенов. Такая библиотека будет охватывать все пептиды, присутствующие в таких клетках.

Химерная молекула, содержащая белок корцептора CD4, LAG-3 или CD8 и пептид, присоединенный к N-концу корцептора, экспрессируется в представляющих интерес Т-клетках.

В частности, могут использоваться рекомбинантные экспрессирующие векторы, которые представляют собой реплицируемые конструкции ДНК, содержащие набор (1) агента(ов), играющих регуляторную роль в экспрессии генов, например, промоторов, операторов или энхансеров, функционально связанных с (2) нуклеотидной последовательностью, кодирующей искомым белок (такой как CD4, Lag-3 или CD8 с привязанными пептидами), который транскрибируется в мРНК и транслируется в белок, и (3) соответствующие последовательности инициации и терминации транскрипции и трансляции. Выбор промотора и других регуляторных элементов обычно варьирует в зависимости от предполагаемой линии репортерных клеток. Экспрессирующие векторы часто имеют форму «плазмид», которые относятся к кольцевым двухцепочечным петлям ДНК, которые в своей векторной форме не связаны с хромосомой.

Экспрессирующие векторы эукариот, эписомно реплицирующиеся, такие как pCER4 или BKV, или могут быть использованы другие векторы, полученные из вирусов,

такие как ретровирусы, например, рMY, рMX, рSIR, аденовирусы, например, рAd и т.п. В экспрессирующих векторах регуляторные элементы, контролирующие транскрипцию или трансляцию, обычно могут происходить из генов млекопитающих, микробов, вирусов или насекомых. Дополнительно могут быть включены способность к репликации, обычно обеспечиваемая точкой начала репликации (например, латентная точка начала репликации ДНК вируса Эпштейна-Барр), и ген отбора для облегчения распознавания трансформантов. Экспрессионные векторы, содержащие регуляторные элементы из эукариотических вирусов, обычно используются в эукариотических экспрессионных векторах, например, векторах SV40, векторах на основе вируса папилломы и векторах, полученных из вируса Эпштейна-Барра. Другие примерные эукариотические векторы включают рMSG, рAV009/A+, рMTO10/A+, рMAMneo-5, бакуловиром рDSVE и любой другой вектор, допускающий экспрессию белков под управлением промотора CMV, раннего промотора SV40, более позднего промотора SV40, промотора металлотионеина, мышиногo промотора вируса опухоли молочной железы, промотора вируса саркомы Рауса, промотора полиэдрина или других промоторов, эффективных для экспрессии в эукариотических клетках.

«Промотор» определяется как набор контрольных последовательностей нуклеиновых кислот, которые направляют транскрипцию нуклеиновой кислоты. В данном контексте промотор включает необходимые последовательности нуклеиновой кислоты рядом с сайтом начала транскрипции, например, в случае промотора типа полимеразы II, элемент ТАТА. Промотор также необязательно включает дистальные элементы энхансера или репрессора, которые могут располагаться на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от сайта начала транскрипции. Промоторы для применения в эукариотических клетках-хозяевах известны специалистам в данной области. Иллюстративные примеры таких промоторов включают, без ограничения указанным, промоторы из обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), такие как промотор длинного концевго повтора (LTR) HIV, промоторы вируса Молони, промоторы ALV, промоторы цитомегаловируса (CMV), такие как немедленно-ранний промотор CMV, промотор вируса Эпштейна-Барр (EBV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), а также промоторы из генов человека, таких как актин человека, миозин человека, гемоглобин человека, мышечный креатин человека и металлотионеин человека. Дополнительные другие примеры подходящих промоторов включают промотор CAG (гибридный промотор, включающий энхансер CMV, промотор  $\beta$ -актина курицы и акцептор сплайсинга  $\beta$ -глобина кролика, а также последовательность поли(A)).

Термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между последовательностью контроля экспрессии нуклеиновой кислоты (такой как промотор или массив сайтов связывания факторов транскрипции) и второй последовательностью нуклеиновой кислоты, где последовательность контроля экспрессии направляет транскрипцию нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

Химерная молекула ДНК, включающая белок корецептора CD4, LAG-3 или CD8 и пептид, присоединенный к N-концу корецептора, как описано в данном документе, в частности химерная молекула ДНК, содержащаяся в экспрессирующем векторе, может быть введена в представляющие интерес Т-клетки путем трансдукции химерной молекулой ДНК, в частности экспрессионного вектора, включающего химерную молекулу ДНК, в клетку-хозяин с использованием стандартных методов, известных в данной области. Подходящие способы описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989). Для получения псевдоретровирусов для трансдукции упаковочные клеточные линии, постоянно экспрессирующие ретровирусные белки GAG, POL и ENV (например, линия клеток Phoenix), временно трансфицируют конструкциями, содержащими вирусный геном, состоящий из LTR, сигналов упаковки и генов интерес (в данном случае пептид, несущий цепи МНС). В ином случае, подходящие клеточные линии, такие как НЕК, 3Т3 или другие, временно трансфицируют смесью векторов, кодирующих отдельно ретровирусные белки GAG, POL и ENV, а также вирусный геном, состоящий из LTR, сигналов упаковки и представляющих интерес генов. Эти обычно используемые стратегии обеспечивают производство дефектных псевдоретровирусов, которые способны инфицировать клетки-мишени и вводить представляющие интерес гены в их геномную ДНК. Однако инфицированные клетки-мишени не способны продуцировать ретровирусы, поскольку псевдоретровирусы не несут в своем геноме гены gag, pol и env.

В ином случае, химерная молекула ДНК, в частности экспрессионный вектор, включающий химерную молекулу ДНК, может быть введена в представляющие интерес Т-клетки путем трансфекции реагентами на основе липидов, фосфата кальция, катионных полимеров или DEAE-декстрана или путем электропорации.

Т-клетки, которые можно использовать в раскрытом в данном документе способе, представляют собой, без ограничения, Т-клетки, выделенные из крови, селезенки, лимфатических узлов или опухолевой ткани.

В частности, можно использовать CD4- или CD8-отрицательные Т-клеточные гибридомы, в частности CD4- или CD8-отрицательные Т-клеточные гибридомы, несущие флуоресцентный репортер. Однако это не является обязательным условием, поскольку

также можно использовать CD4+ клетки (Фигура 2).

Подходящим флуоресцентным репортером для активации Т-клеток является, например, флуоресцентный репортер *nuG77*, флуоресцентный репортер NFAT или любая другая подходящая репортерная молекула.

Эффективная экспрессия гибридной конструкции, содержащей корцепторный белок CD4, LAG-3 или CD8 и пептид, присоединенный к N-концу корцепторного белка на поверхности клетки, может быть определена с помощью CD4-, LAG-3 или CD8-специфического окрашивания антителами. Антитело можно напрямую конъюгировать с детектируемой меткой. В ином случае, вторичное антитело, конъюгированное с детектируемой меткой и специфичное к первому антителу, может контактировать с клетками. Детектируемые метки, подходящие для применения, включают любое соединение, обнаруживаемое спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунохимическими, электрическими, оптическими или химическими средствами. Полезные метки в настоящем изобретении включают биотин, магнитные гранулы (например, Dynabeads™), флуоресцентные метки (например, флуоресцеин, тexasский красный, родамин, зеленый флуоресцентный белок, дансил, умбеллиферон, PE, APC, Cy5, Cy7, PerCP, красители Alexa и т.п.), ферменты (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и другие) и колориметрические метки, такие как коллоидное золото или цветное стекло или пластмассовые гранулы (например, полистирол, полипропилен, латекс и т.д.). Разнообразные подходящие флуоресцентные метки дополнительно описаны, например, в *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11th Edition.

Когда Т-клетки, сверхэкспрессирующие химерную молекулу, как определено в данном документе, культивируют в присутствии аутологичных антигенпредставляющих клеток (APC), пептиды, прикрепленные к N-концу корцепторного белка CD4, LAG-3 или CD8, вставляются в бороздки молекул МНС экспрессируемых на поверхности APC, так что они могут быть презентированы Т-клеткам.

Если пептиды распознаются TCR, Т-клетки активируются и размножаются.

Соответственно, трансфекция (ретровирусной трансдукцией или электропорацией) конструкции, содержащей описанную в данном документе химерную молекулу, кодирующую данный пептид, в поликлональные Т-клетки, приводит исключительно к пролиферации и обогащению Т-клеток, содержащих TCR, специфичных к этому пептиду.

Конструкции, используемые для трансдукции, могут кодировать не только один пептид, но и библиотеку пептидов.

Трансфекция (посредством ретровирусной трансдукции или электропорации)

конструкций, кодирующих библиотеку пептидов, в поликлональные Т-клетки приводит исключительно к пролиферации и обогащению Т-клеток, несущих пептиды, которые специфически распознаются их TCR.

Поскольку стимулирующие пептиды присоединены к N-концу корецепторного белка CD4, LAG-3 или CD8 и, таким образом, содержатся в Т-клетках, по прошествии достаточного времени в культуре останутся только Т-клетки, несущие когнатные им пептиды.

Активированные и обогащенные Т-клетки можно идентифицировать с помощью проточной цитометрии и FACS-сортировки по экспрессии маркеров активации, таких как CD69, CD44 или CD25, и/или репортерных белков, таких как GFP, mCherry, mTomato, dsRed или других подходящих маркеров активации репортерных белков, управляемых, например, промоторами NFAT или Nur77;

в частности, активацию можно измерить с помощью сортировки клеток, активируемых флуоресценцией (FACS).

FACS относится к способу разделения популяции клеток на одну или несколько субпопуляций на основе присутствия, отсутствия или уровня одного или нескольких конкретных полипептидов, экспрессируемых этими клетками. Для разделения клеток на субпопуляции в FACS используют оптические свойства, включая флуоресценцию, отдельных клеток. Сортировщики клеток, подходящие для осуществления описанного в данном документе способа, хорошо известны в данной области и коммерчески доступны. Примеры сортировщиков клеток включают сортировщик MoFlo (DakoCytomation, Форт-Коллинс, Колорадо), FACSAria™, FACSArray™, FACS Vantage™, BD™ LSR II и FACSCalibur™ (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) и другие аналогичные сортировщики клеток, производимые другими коммерческими поставщиками, такими как Sony, Bio-Rad и Beckman Coulter.

В качестве альтернативы, Т-клетки, содержащие пептиды, эффективно презентированные МНС, могут быть обогащены сортировкой клеток на основе MACS.

«MACS» относится к способу разделения популяции клеток на одну или несколько субпопуляций на основе присутствия, отсутствия или уровня одного или нескольких выбираемых MACS полипептидов, экспрессируемых этими клетками. MACS полагается на свойства магнитной восприимчивости помеченных отдельных клеток, чтобы отсортировать клетки на субпопуляции. Для MACS в качестве этикеток можно использовать магнитные гранулы (например, доступные у Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Германия; 130-048-402). Сортировщики клеток MACS, подходящие для осуществления описанного в данном документе способа, хорошо известны в данной

области техники и коммерчески доступны. Примеры сортировщиков клеток MACS включают autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec).

В результате сортировки получают популяцию нефлуоресцентных клеток и по меньшей мере одну популяцию флуоресцентных клеток, в зависимости от того, сколько флуоресцентных меток было использовано. Присутствие по меньшей мере одной клеточной популяции с флуоресцентными клетками указывает на то, что по меньшей мере один пептид-кандидат эффективно презентуется APC. Таким образом, FACS позволяет сортировать популяцию клеток для получения популяции клеток, обогащенных T-клетками, содержащими пептиды, эффективно презентуемые с помощью МНС.

Последовательность TCR и соответствующих когнатных пептидов может быть получена путем секвенирования РНК/ДНК одной клетки такой популяции обогащенных T-клеток.

Способы выделения и секвенирования ДНК известны специалистам в данной области.

В общем, цель состоит в том, чтобы отделить ДНК, присутствующую в ядре клетки, от других клеточных компонентов. Выделение ДНК обычно начинается с лизиса или разрушения клеток. Этот процесс необходим для разрушения белковых структур и позволяет высвободить нуклеиновые кислоты из ядра. Лизис проводится в солевом растворе, содержащем детергенты для денатурирования белков или протеазы (ферменты, гидролизующих белки), такие как протеиназа К, или, в некоторых случаях, содержащих и то, и другое. Это приводит к разрушению клеток и растворению мембран. Способы выделения ДНК включают, без ограничения указанным, экстракцию фенол:хлороформом, преципитацию в присутствии высокого содержания солей, щелочную денатурацию, ионообменную колоночную хроматографию, связывание со смолой и связывание с парамагнитными шариками.

Способы получения кДНК известны специалистам в данной области. В общем, цель состоит в том, чтобы преобразовать выделенную РНК, присутствующую в клетках, в ДНК, так называемую ДНК-копию, чтобы использовать ее в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделение РНК обычно начинается с лизиса или разрушения клеток. Этот процесс необходим для разрушения белковых структур и позволяет высвободить из них нуклеиновые кислоты. Лизис обычно проводят в растворе, содержащем фенол (например, TRIzol™). Это приводит к разрушению клеток и растворению мембран и позволяет отделить РНК от других клеточных компонентов. Затем выделенная РНК преобразуется в кДНК с помощью обратной транскриптазы (например, Superscript™, Goscript™).

Последовательность пептидов-кандидатов, переносимых активированными Т-клетками (которые связываются с комплексами МНС, презентированными на поверхности антигенпрезентирующих клеток), затем амплифицируют с помощью ПЦР и могут секвенировать любым способом, известным в данной области.

Последовательность пептидов-кандидатов может быть определена с помощью цифровой ПЦР. Цифровая полимеразная цепная реакция (цифровая ПЦР, DigitalPCR, dPCR или dePCR) - это усовершенствование традиционных способов полимеразной цепной реакции, которые можно использовать для прямого количественного определения и клональной амплификации нуклеиновых кислот, включая ДНК, кДНК или РНК.

Секвенирование также может быть выполнено с использованием микрогидродинамики. Микрогидродинамика включает микромасштабные устройства, которые работают с небольшими объемами жидкостей. Поскольку микрогидродинамика может точно и воспроизводимо контролировать и распределять небольшие объемы жидкости, в частности объемы менее 1 мкл, применение микрогидродинамики обеспечивает значительную экономию средств. Применение технологии микрогидродинамики сокращает время цикла, сокращает время получения результатов и увеличивает пропускную способность. Кроме того, внедрение технологии микрогидродинамики улучшает интеграцию и автоматизацию системы. Микрогидродинамические реакции обычно проводят в микрокаплях.

Секвенирование также может быть выполнено с использованием технологии секвенирования второго поколения (или следующего поколения или Next-Gen), третьего поколения (или Next-Next-Gen) или четвертого поколения (или N3-Gen), включая, без ограничения указанным, пиросеквенирование, секвенирование путем лигирования, секвенирование одиночной молекулы, секвенирование путем синтеза (SBS), массовое параллельное клональное секвенирование, массовое параллельное SBS одиночной молекулы, массовое параллельное секвенирование одиночной молекулы в реальном времени, массовое параллельное секвенирование одиночной молекулы в реальном времени по нанопоровой технологии. Magozova и Magga предоставляют обзор некоторых таких технологий в *Genomics*, 92: 255 (2008).

До, после или одновременно с секвенированием нуклеиновые кислоты могут амплифицироваться. Иллюстративные неограничивающие примеры методов амплификации нуклеиновых кислот включают, без ограничения указанным, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), транскрипционно-опосредованную амплификацию (ТМА), лигазную цепную реакцию (LCR), амплификация с замещением цепей (SDA) и

амплификацию, основанную на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA). Специалисты в данной области поймут, что некоторые методы амплификации (например, ПЦР) требуют обратной транскрипции РНК в ДНК перед амплификацией (например, ОТ-ПЦР), тогда как другие методы амплификации непосредственно амплифицируют РНК (например, TMA и NASBA).

Пептид, идентифицированный и обогащенный описанным в данном документе способом, может использоваться во вмешательствах *in vivo*, таких как вакцинация, индукция иммунологической толерантности, блокирование TCR и МНС-опосредованная доставка токсина, для тестирования иммуногенности и других тестов на реактивность Т-клеток *in vitro*.

В одном воплощении вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе опухоль-специфичного антигена (TSA).

Термин «вакцинация» или его эквиваленты хорошо известны специалистам. Например, термин вакцинация можно понимать как процесс, который увеличивает иммунную реакцию объекта на антиген и, следовательно, способность противостоять или преодолевать болезнь.

Под «вакциной» следует понимать композицию для создания иммунитета для профилактики и/или лечения заболеваний (например, рака). Соответственно, вакцины представляют собой лекарственные средства, которые содержат антигены и предназначены для использования у людей или животных для создания специфической защиты и защитного вещества путем вакцинации. Термин «противоопухолевая вакцина на основе TSA» предназначен для обозначения вакцины, содержащей объединенный образец опухолеспецифических антигенов, например, по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или более опухолеспецифичных пептидов.

Рецидивирующие опухолевые мутации могут служить общедоступными опухолеспецифическими антигенами, позволяющими разрабатывать противоопухолевые вакцины на основе TSA, применимые к более широким когортам пациентов. Соответственно, способ настоящего изобретения можно использовать для идентификации пациентов, эффективно представляющих эти общие/общедоступные TSA иммунной системе и потенциально приводящих к эффективным иммунным ответам. Однако многие мутации опухолевого происхождения, по-видимому, происходят из-за изменений, характерных для пациента. Таким образом, способ настоящего изобретения можно также использовать для идентификации специфичных для пациента пептидов-кандидатов для персонализированных вакцин.

Используемый в данном документе термин «иммунологическая толерантность» относится к снижению иммунологической реактивности хозяина по отношению к конкретному антигену или антигенам. Антигены содержат иммунные детерминанты, которые при отсутствии толерантности вызывают нежелательный иммунный ответ. Иммунологическая толерантность может быть индуцирована для предотвращения или уменьшения отторжения трансплантата, аутоиммунитета, аллергической реакции или другого нежелательного иммунного ответа.

«Блокирование TCR» относится к любому агенту, который включает комплекс пептид-MHC или p-MHC-специфическое антитело, которое блокирует естественные взаимодействия TCR-MHC. «Опосредованная MHC доставка токсина» относится к способам ковалентного связывания токсичных агентов (белков или других) с тетрамером пептид-MHC или другими мультимерами MHC для доставки указанного токсина в клетку, чтобы вызвать гибель клетки.

Используемый в данном документе термин «тестирование иммуногенности» относится к измерению потенциальных иммунных ответов на биотерапевтические средства. Биотерапевтические средства могут вызывать иммунный ответ, который может повлиять на их безопасность и эффективность. Тестирование иммуногенности используется для мониторинга и оценки гуморальных (антитела) или клеточных (Т-клетки) ответов во время клинических и доклинических исследований. Обычно тестирование иммуногенности биотерапевтических средств включает измерение антител, специфически генерируемых против биотерапевтических средств. С помощью способа по настоящему изобретению можно идентифицировать пептиды, которые эффективно презентированы молекулами MHC и распознаются Т-клетками, поэтому потенциально могут вызывать иммунный ответ. Это может помочь получить более полную картину общего иммуногенного профиля соединения.

Используемый в данном документе термин «реактивность Т-клеток» относится к способности вещества вызывать активацию Т-клеток. Более конкретно, «реактивность Т-клеток» означает способность пептида индуцировать пролиферацию или продукцию цитокинов Т-клетками.

Способы настоящего изобретения также могут применяться для высокопроизводительного скрининга. Технология высокопроизводительного скрининга (HTS) обычно используется для определения быстрой обработки клеток в больших масштабах. В некоторых воплощениях множество скринингов можно проводить параллельно с различными библиотеками пептидов-кандидатов. Системы скрининга с высокой пропускной способностью коммерчески доступны и обычно автоматизируют все

процедуры, включая пипетирование всех образцов и реагентов, дозирование жидкости, инкубацию по времени и окончательные показания микропланшета в детекторе(ах), подходящем(их) для анализа. Эти конфигурируемые системы обеспечивают высокопроизводительный и быстрый запуск, а также высокую степень гибкости и настройки.

Под термином «пептид» в контексте настоящего описания подразумеваются, по меньшей мере, две ковалентно связанные аминокислоты. Обычно пептиды, присоединенные к N-концу корцептора, могут варьировать от 7 аминокислот до 30 аминокислот или более, в частности, от 15 до 24 аминокислот в длину, в частности, от 7 до 10 аминокислот в длину.

Используемый в данном документе термин «антиген» относится ко всему пептиду или белку или его частям, способным вызывать иммунный ответ против самого себя или их частей. Этот иммунный ответ может включать либо продуцирование антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, либо и то, и другое.

Термин «библиотека» или эквиваленты в контексте настоящего описания означает множество молекул. В случае пептидов, которые должны быть присоединены к белку корцептора CD4, LAG-3 или CD8, библиотека обеспечивает достаточно структурно разнообразную популяцию пептидов для осуществления вероятно достаточного диапазона клеточных ответов для обеспечения одной или нескольких клеток, демонстрирующих искомый отклик. В предпочтительном воплощении, по меньшей мере, 7, предпочтительно, по меньшей мере, 50, более предпочтительно, по меньшей мере, 200 и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 1000 пептидов одновременно анализируются в способе изобретения. Библиотеки могут быть спроектированы так, чтобы максимально увеличить размер и разнообразие библиотек.

Термин «рекомбинантный» при использовании со ссылкой, например, на клетку или нуклеиновую кислоту, белок или вектор, указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы введением гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка или изменение нативной нуклеиновой кислоты или белка, или что клетка получена из клетки, модифицированной таким образом. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не обнаруживаются в нативной (нерекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые иначе экспрессируются аномально, недостаточно экспрессируются или не экспрессируются вообще. Рекомбинантная нуклеиновая кислота первоначально образуется *in vitro*, как правило, при манипуляциях с нуклеиновой кислотой, например, с использованием полимераз и эндонуклеаз, в форме, обычно не встречающейся в природе.

Таким образом, достигается функциональное связывание различных последовательностей. Таким образом, выделенная нуклеиновая кислота в линейной форме или экспрессионный вектор, образованный *in vitro* путем лигирования молекул ДНК, которые обычно не соединяются, считаются рекомбинантными для целей настоящего изобретения. Понятно, что как только рекомбинантная нуклеиновая кислота получена и повторно введена в клетку-хозяин или организм, она будет реплицироваться нерекомбинантно, то есть с использованием клеточного аппарата клетки-хозяина *in vivo*, а не манипуляций *in vitro*; однако, такие нуклеиновые кислоты, однажды полученные рекомбинантно, хотя впоследствии реплицированные нерекомбинантно, все еще считаются рекомбинантными для целей изобретения. Точно так же рекомбинантный белок, такой как комплекс МНС-пептид по изобретению, представляет собой белок, полученный с использованием рекомбинантных методов, то есть путем экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как показано выше.

Термин «гетерологичный», когда он используется в отношении частей нуклеиновой кислоты, указывает, что нуклеиновая кислота включает две или более подпоследовательностей, которые обычно не находятся в тех же самых взаимоотношениях друг с другом в природе. Например, нуклеиновую кислоту обычно получают рекомбинантно, имея две или более последовательностей, например, из неродственных генов, расположенных так, чтобы образовывать новую функциональную нуклеиновую кислоту, например, промотор из одного источника и кодирующую область из другого источника. Точно так же гетерологичный белок часто будет относиться к двум или более подпоследовательностям, которые не находятся в таких же взаимоотношениях друг с другом в природе (например, в гибридном белке).

Используемый в данном документе термин «рак» («онкологическое заболевание») определяется как заболевание, характеризующееся быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Злокачественные опухолевые клетки могут распространяться локально или через кровотоки и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных видов онкологических заболеваний включают, без ограничения указанным, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почек, рак печени, рак мозга, лимфома, лейкоз, рак легкого и т.п.

Кроме того, в формуле изобретения слово «содержащий» не исключает других элементов или стадий, а неопределенный артикль «a», «an» и «the» (прим.: в оригинальном тексте на английском языке) включает ссылки во множественном числе, если контекст явно не указывает иное.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится это изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать на практике или при тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. В случае противоречий, настоящее описание, включая определения, будет приоритетным. Кроме того, материалы, способы и примеры представлены только для иллюстрации, и не предназначены для ограничения.

Конкретные воплощения настоящего изобретения дополнительно проиллюстрированы следующими примерами. Однако следует понимать, что изобретение не ограничивается конкретными деталями этих примеров. Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных воплощений изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, раскрытые в примерах, которые следуют ниже, представляют методы, используемые в настоящем изобретении, чтобы хорошо функционировать при практическом применении изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как составляющие предпочтительные режимы для его применения. Однако специалисты в данной области техники должны понимать, в свете настоящего раскрытия, что многие изменения могут быть сделаны в конкретных воплощениях, которые раскрыты, и все же получить аналогичный или аналогичный результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

Фигура, представленная ниже, иллюстрирует структуру химерных рецепторов и обеспечивает подтверждение концепции на мышах. Способ по настоящему изобретению и описанный в данном документе способ беспристрастной и эффективной идентификации природных эпитопов Т-клеток. Это многообещающе для фундаментальных исследований и клинических приложений, позволяющих проводить многомерную высокопроизводительную персонализированную идентификацию Т-клеточных антигенов у пациентов.

Фигура 1: Подтверждение концепции на PEP4. а) Показаны: структура химерного рецептора PEP4 и схема его взаимодействия с МНС, приводящего к распознаванию комплекса пептид-МНС TCR. б) CD4-отрицательные Т-клеточные гибридомы, несущие флуоресцентный репортер *nuc77*, были получены из Т-клеток *Smarta2* (специфичных для *gp61*) или *2D2* Т-клеток (специфичных к *NFM*) и трансдуцированы конструкцией, кодирующей GFP и PEP4, несущей пептид *gp61* (PEP4gp61iresGFP). PEP4gp61 эффективно экспрессировался на поверхности клетки, что было измерено по окрашиванию CD4-специфических антител, показанному на точечной диаграмме. с, d)

Гибридому Smarta2 трансдуцировали gp61, связанным с CD4 или CD3, с помощью GS-линкера в диапазоне от 12 до 28 аминокислот и культивировали с BMDC из C57BL/6 (с, d) или BALB/c (d). е) Гибридомы Smarta2 и 2D2 трансдуцировали конструкциями, кодирующими рецепторы PEP4, несущие пептиды gp61, OVA или NFM и GFP, и культивировали с BMDC из C57BL/6. с, d, е) Активацию (сигнал *puG77*-репортера) измеряли с помощью FACS. Пептиды распознавались специфическим и ограниченным по МНС образом, и только те, которые были присоединены к CD4, но не к CD3, могли эффективно презентироваться МНС. f) CD4 + Smarta2 или B6 Т-клетки стимулировали анти-CD3/CD28 в течение 24 часов, трансдуцировали PEP4gp61iresGFP, отбирали анти-CD3/CD28 и 48 часов после инфицирования совместно культивировали с B6 BMDC в течение нескольких дней. На графике показана фракция GFP-положительных (экспрессирующих PEP4gp61) клеток, нормализованная по эффективности трансдукции. День 2 совместного культивирования соответствует дню 4 после трансдукции. Smarta2 Т-клетки, но не поликлональные B6 Т-клетки, несущие PEP4gp61, постепенно обогащали в культуре, в то время как в случае клеток, трансдуцированных контрольным пептидом *invNFM*, этого не происходило.

Фигура 2: Подтверждение концепции на CD4-положительных клетках. Клетки гибридомы CD4+ Sm2 инфицировали pMY-CD4gp61iresGFP или pMY-CD4OVAiresGFP. Двумя днями позже клетки совместно культивировали в течение 9 часов с B6 BMDC (n = 4 лунки). После окрашивания анти-TCR, анти-CD4 и анти-CD69 антителами, активацию клеток гибридомы Sm2 измеряли посредством экспрессии CD69, определенной с помощью анализа FACS. Точечные диаграммы на А) показывают экспрессию TCR, CD4 и GFP в трансдуцированных клетках, гистограмма на В) показывает экспрессию CD69 на клетках TCR+ CD4+ GFP+, несущих PEP4-gp61 или PEP4-OVA, или TCR+ CD4+ GFP- в результате трансдукции gp61, С) показывает сводку экспрессии CD69 (MFI). Указаны результаты критерия Стьюдента, \*\* = 0,0019. \*\*\*\* <0,0001.

#### Пример 1

##### Материалы и методы

##### Клетки

CD4 + Т-клетки выделяли из мышей C57BL/6J, Smarta и 2D2 с помощью FACS.

##### Проточная цитометрия

Были использованы следующие антитела: Fc-блок (анти-CD16/CD32; 2.4G2; самодельные); CD4-APC (GK1.5), CD4-PE (GK1.5). Клетки анализировали на FACSCanto II или LSRFortessa (BD Bioscience), а данные анализировали в программном обеспечении FlowJo (Tree Star).

### Получение гибридом

Отсортированные Т-клетки активировали связанными с пластиком анти-CD3ε и анти-CD28 антителами в присутствии IL-2 мыши в течение 2-3 дней. Равное количество активированных Т-клеток и партнера слияния TCRαβ<sup>-</sup> BW5147 объединяли с использованием PEG-1500 и высевали при предельном разведении в присутствии 100 мМ гипоксантина, 400 нМ аминокперина и 16 мМ тимидина (НАТ).

### Клонирование конструкций PEP4 и PEP3

Фрагменты ДНК, кодирующие пептиды gp61 или NFM, вставляли между лидерным пептидом и GS-линкером (в диапазоне от 12 до 28 аминокислот), соединенными с остальной частью полноразмерных молекул CD4 или CD3, и клонировали в ретровирусный вектор pMYsiresGFP.

Ретровирусная трансдукция репортерных клеточных линий и отсортированных тимоцитов

Надосадочные жидкости, содержащие ретровирус, продуцировали в экотропной линии упаковывающих клеток Phoenix и использовали для инфицирования линий репортерных клеток и сортировали клетки, активированные анти-CD3/CD28, в течение 24 часов. Для трансдукции с помощью конструкций *puG77*-репортера и PEP4 были отобраны CD4-варианты гибридом.

### Стимуляция гибридом PEP4<sup>+</sup> и PEP3<sup>+</sup> дендритными клетками костного мозга

Клетки GFP<sup>+</sup> совместно культивировали с >3-кратным избытком дендритных клеток костного мозга в течение 8-12 часов, и активацию репортера не измеряли без FACS.

Результаты представлены на фигурах. То есть показано доказательство концепции на основе PEP4. В частности, структура химерного рецептора PEP4 и схема его взаимодействия с МНС, приводящего к распознаванию комплекса пептид-МНС с помощью TCR, показаны в части а). Как видно из части б) фигуры CD4-отрицательные Т-клеточные гибридомы, несущие флуоресцентный репортер *puG77*, были получены из Т-клеток Smarta2 (специфичных для gp61) или 2D2 Т-клеток (специфичных для NFM) и трансдуцированных с помощью конструкции, кодирующей GFP и PEP4, несущей пептид gp61 (PEP4gp61iresGFP). PEP4gp61 эффективно экспрессировался на поверхности клетки, что было измерено по окрашиванию CD4-специфических антител, показанному на точечной диаграмме. Гибридому Smarta2 трансдуцировали gp61, связанным с CD4 или CD3, с помощью GS-линкера в диапазоне от 12 до 28 аминокислот и культивировали с BMDC из C57BL/6 (с, d) или BALB/c (d). Гибридомы Smarta2 и 2D2 трансдуцировали конструкциями, кодирующими рецепторы PEP4, несущие пептиды gp61, OVA или NFM и

GFP, и культивировали с BMDC из C57BL/6. с, d, e) Активацию (сигнал pur77-репортера) измеряли с помощью FACS.

Очевидно, что пептиды распознаются специфическим и ограниченным по MHC образом, и только те, которые присоединены к CD4, но не к CD3, могут быть эффективно презентированы с помощью MHC. Более того, CD4<sup>+</sup> Smarta2 или T-клетки В6 стимулировали анти-CD3/CD28 в течение 24 часов, трансдуцировали PEP4gp61iresGFP, отбирали анти-CD3/CD28 и 48 часов после инфицирования совместно культивировали с В6 BMDC в течение нескольких дней (часть f). На графике показана фракция GFP-положительных (экспрессирующих PEP4gp61) клеток, нормализованная по эффективности трансдукции. День 2 совместного культивирования соответствует дню 4 после трансдукции. Smarta2 T-клетки, но не поликлональные В6 T-клетки, несущие PEP4gp61, постепенно обогащались в культуре, в то время как в случае клеток, трансдуцированных контрольным пептидом invNFM, этого не происходило. Соответственно, удивительным образом и неожиданно было показано, что химерная молекула, содержащая корецептор CD4, LAG3 или CD8 и пептид, присоединенный к N-концу корецептора, может быть использована для идентификации антигенов, специфичных для T-клеток, как заявлено.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерная молекула, содержащая белок корцептора CD4, LAG3 или CD8 и пептид, присоединенный к N-концу корцептора.
2. Химерная молекула по п. 1, отличающаяся тем, что пептид или часть пептида могут быть презентированы главным комплексом гистосовместимости.
3. Химерная молекула по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что пептид имеет длину от 6 до 200 аминокислотных остатков.
4. Химерная молекула по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что пептид имеет длину от 7 до 30 аминокислотных остатков.
5. Химерная молекула по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что пептид представляет собой случайный пептид.
6. Химерная молекула по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что пептид представляет собой пептид, который кодируется данной молекулой ДНК или кДНК.
7. Химерная молекула по п. 6, отличающаяся тем, что молекула ДНК или кДНК, кодирующая пептид, получена путем фрагментации более крупной молекулы ДНК или кДНК.
8. Химерная молекула по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что пептид получен из опухолевой клетки или из клетки, инфицированной патогеном.
9. Химерная молекула по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что пептид включает эпитоп опухолевого антигена.
10. Химерная молекула по п. 9, отличающаяся тем, что опухолевый антиген представляет собой неоантиген.
11. Химерная молекула по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что пептид включает аминокислотную последовательность с по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% идентичности по последовательности эпитопу опухолевого антигена.
12. Химерная молекула по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что пептид включает эпитоп МНС класса I, когда корцепторный белок представляет собой CD8.
13. Химерная молекула по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что пептид включает эпитоп МНС класса II, когда корцепторный белок представляет собой CD4 или LAG3.
14. Химерная молекула по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что белок корцептора CD4 представляет собой белок корцептора CD4 человека, белок корцептора LAG3 представляет собой белок корцептора LAG3 человека, а белок

корцептора CD8 представляет собой белок корцептора CD8 человека.

15. Химерная молекула по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что пептид присоединен к N-концу корцептора через линкер.

16. Химерная молекула по п. 15, отличающаяся тем, что линкер имеет длину от 5 до 30 аминокислот.

17. Химерная молекула по п. 15 или 16, отличающаяся тем, что по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% аминокислотных остатков в линкере представляют собой глицин или остатки серина.

18. Химерная молекула по любому из пп. 15-17, отличающаяся тем, что линкер включает аминокислотную последовательность (GGGGS)<sub>x</sub>, где G представляет собой глицин, S представляет собой серин и x представляет собой количество повторов, где x может быть любым числом от 1 до 5.

19. Полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу по любому из пп. 1-18.

20. Библиотека полинуклеотидов, содержащая множество полинуклеотидов по п. 19.

21. Библиотека полинуклеотидов по п. 20, отличающаяся тем, что по меньшей мере два полинуклеотида библиотеки кодируют идентичный корцепторный белок, присоединенный к другому пептиду.

22. Клетка, включающая полинуклеотид по п. 19.

23. Способ одновременной идентификации антиген-специфических Т-клеточных рецепторов и пептидов, специфически распознаваемых указанными Т-клеточными рецепторами (TCR), включающий стадии:

(а) предоставления представляющих интерес поликлональных Т-клеток, экспрессирующих библиотеку полинуклеотидов по пп. 20 или 21;

(b) контакта Т-клеток стадии (а) с антигенпрезентирующими клетками (APC), содержащими главный комплекс гистосовместимости (MHC);

(с) выделения по меньшей мере одной Т-клетки, которая активируется при контакте с APC на стадии (b);

(d) секвенирования ДНК выделенных Т-клеток на стадии (с) для получения информации о последовательностях TCR и пептидных последовательностях, присоединенных к корцепторам CD4, LAG-3 или CD8, присутствующим в этих Т-клетках; и

(е) идентификации когнатных пар Т-клеточный рецептор - пептид на основе данных секвенирования, полученных на стадии (d).

24. Способ идентификации по меньшей мере одного антигенспецифического Т-клеточного рецептора, включающий следующие стадии:

(а) предоставления представляющих интерес поликлональных Т-клеток, экспрессирующих полинуклеотид по п. 19;

(b) контакта Т-клеток стадии (а) с антигенпрезентирующими клетками (АРС), содержащими главный комплекс гистосовместимости (МНС);

(с) выделения по меньшей мере одной Т-клетки, которая активируется при контакте с АРС на стадии (b);

(d) секвенирования локусов TCR по меньшей мере одной Т-клетки, выделенной на стадии (с); и

(е) идентификации по меньшей мере одного Т-клеточного рецептора, кодируемого локусами TCR по меньшей мере одной Т-клетки, как антиген-специфического.

25. Способ идентификации по меньшей мере одного Т-клеточно-специфического антигена, включающий следующие стадии:

(а) предоставления представляющих интерес моноклональных Т-клеток, экспрессирующих полинуклеотид по п. 19 или библиотеку полинуклеотидов по пп. 20 или 21;

(b) контакта Т-клеток стадии (а) с антигенпрезентирующими клетками (АРС), содержащими главный комплекс гистосовместимости (МНС);

(с) выделения по меньшей мере одной Т-клетки, которая активируется при контакте с АРС на стадии (b);

(d) секвенирования части полинуклеотида, кодирующего пептид, присоединенный к N-концу корецепторного белка CD4, LAG-3 или CD8 по меньшей мере одной Т-клетки, выделенной на стадии (с); и

(е) идентификации по меньшей мере одного пептида, кодируемого полинуклеотидом, содержащимся по меньшей мере в одной Т-клетке, как Т-клеточно-специфического антигена.

26. Способ по любому из пп. 23-25, отличающийся тем, что АРС представляет собой аутологичную или гетерологичную АРС.

27. Способ по любому из пп. 23-26, отличающийся тем, что АРС представляет собой генетически модифицированную аутологичную или гетерологичную клетку или линию клеток, экспрессирующую мутантную молекулу МНС.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что мутированная молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса II, включающую внеклеточную альфа-цепь МНС класса II и нативный или гетерологичный трансмембранный домен, а также

внутриклеточную бета-цепь МНС класса II и нативный или гетерологичный трансмембранный домен.

29. Способ по п. 27, отличающийся тем, что мутантная молекула МНС представляет собой молекулу МНС класса I, содержащую внутриклеточную альфа-цепь МНС класса I и нативный или гетерологичный трансмембранный домен, а также бета-2-микроглобулин.

30. Способ по пп. 23-29, отличающийся тем, что корецепторный белок, кодируемый полинуклеотидом или библиотекой полинуклеотидов, представляет собой CD8, если молекула МНС, содержащаяся в APC, является молекулой МНС класса I.

31. Способ по пп. 23-29, отличающийся тем, что белок корецептора, кодируемый полинуклеотидом, представляет собой CD4 или LAG-3, если молекула МНС, экспрессируемая APC, является молекулой МНС класса II.

32. Способ лечения объекта, страдающего от онкологического заболевания, включающий стадии:

(а) идентификацию по меньшей мере одного антигенспецифического Т-клеточного рецептора и/или по меньшей мере одного Т-клеточного антигена способами по пп. 23-31;

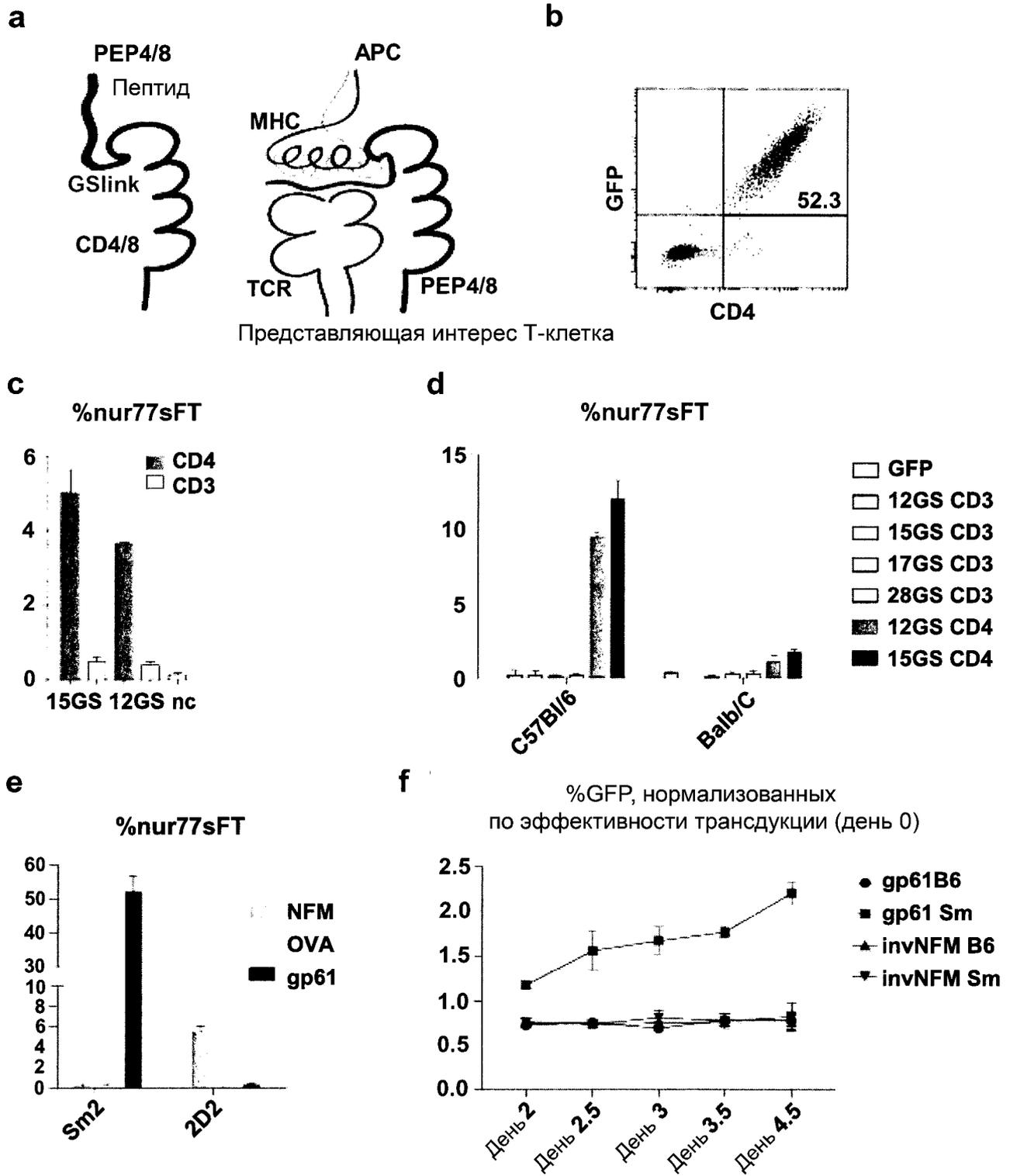
(b) введение объекту, страдающему от онкологического заболевания по меньшей мере одного Т-клеточного рецептора и/или Т-клеточно-специфического антигена, идентифицированного на стадии (а).

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что антиген-специфический Т-клеточный рецептор вводят объекту посредством доставки гена, опосредованной вирусом.

34. Способ по п. 32, отличающийся тем, что Т-клеточно-специфичный антиген вводят объекту в форме пептида или в форме полинуклеотида, кодирующего пептид.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что пептид или полинуклеотид, кодирующий пептид, присоединен к соединению, которое улучшает доставку пептида или полинуклеотида, кодирующего пептид, в APC.

ФИГ. 1



## Фиг. 2

