

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192252 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.12.21

(51) Int. Cl. C07K 14/725 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.03.10

(54) ВЫСОКОАВИДНЫЕ Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К WT1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/816,746

(32) 2019.03.11

(33) US

(86) PCT/US2020/021916

(87) WO 2020/185796 2020.09.17

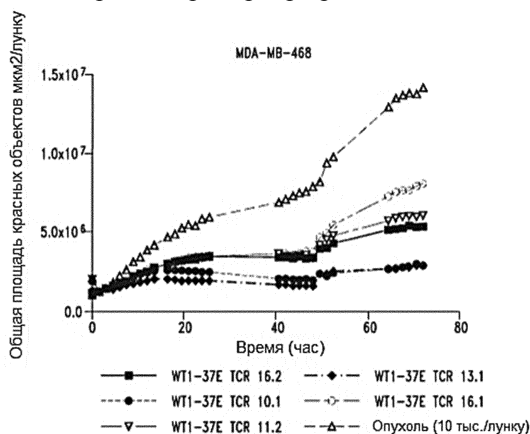
(88) 2020.10.15

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

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

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

(57) Изобретение относится к Т-клеточным рецепторам (TCR) и родственным связывающим белкам с высокой функциональной авидностью против ассоциированного с опухолью антигена р37 из опухолевого белка Вильмса 1 (WT1), Т-клеткам, экспрессирующим такие WT1-специфические TCR с высокой аффинностью, нуклеиновым кислотам, кодирующим их, и композициям для применения при лечении заболеваний или расстройств, при которых клетки сверхэкспрессируют WT1 и/или продуцируют антиген р37, например, при раке.



A1

202192252

202192252

A1

ВЫСОКОАВИДНЫЕ Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К WT1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, связанный с настоящей заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии, и настоящим включен в описание посредством ссылки. Текстовый файл, содержащий перечень последовательностей, называется 360056_466WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Текстовый файл имеет размер 243 КБ, был создан 8 марта 2020 г. и подается в электронном виде через EFS-Web.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Адоптивная Т-клеточная иммунотерапия с применением генно-инженерных Т-клеток показала многообещающие результаты в многочисленных испытаниях, где антигенный рецептор с достаточной аффинностью применяли для направленного воздействия на опухолеассоциированный антиген, включая химерные рецепторы на основе антител¹⁻³ и TCR (Т-клеточный рецептор) с высокой аффинностью⁴⁻⁸. В то время как при естественном процессе генерации разнообразия в тимусе используются перестройки генов TCR, опосредованные RAG (ген, активирующий рекомбинацию), для генерации высоко разнообразных CDR3, различающихся по длине, а также по аминокислотному составу, выделение эффективного высокоаффинного TCR в пределах аффинности, установленных центральной толерантностью, остается существенным препятствием к внедрению адоптивной Т-клеточной иммунотерапии для разнообразных злокачественных новообразований, в которых были идентифицированы кандидатные внутриклеточные собственные/опухолевые антигены^{9,10}. Кроме того, с помощью адоптивной иммунотерапии TCR можно обнаружить внутриклеточные антигены, которые представлены на клеточной поверхности с помощью МНС (главный комплекс гистосовместимости) класса I.

Белок WT1 (опухолевый белок Вильмса 1) является привлекательной мишенью для клинической разработки из-за своих иммунных характеристик (Cheever et al., Clin. Cancer Res. 15:5323, 2009) и экспрессии во многих агрессивных типах опухолей, связанных с плохим прогнозом. WT1 участвует в регуляции экспрессии генов, которая способствует пролиферации и онкогенности (Oji et al., Jpn. J. Cancer Res. 90:194, 1999), сверхэкспрессируется при большинстве лейкозов высокого риска (Menssen et al., Leukemia 9:1060, 1995), вплоть до 80 % случаев немелкоклеточного рака легких (HMPЛ) (Oji et al., Int. J. Cancer 100:297, 2002), 100 % случаев мезотелиом (Tsuta et al., App. Immunohistochem. Mol. Morphol. 17:126, 2009) и не менее 80 % гинекологических злокачественных новообразований (Coosemans and Van Gool, Expert Rev. Clin. Immunol. 10: 705, 2014).

Известно, что несколько пептидов белка WT1 представляют собой пептиды опухолеассоциированного антигена, которые представляют собой антигены, рестриктивные по HLA-A*0201.

Существует очевидная потребность в альтернативных высокоспецифичных к антигену WT1 иммунотерапиях TCR, направленных против различных видов рака, таких как лейкоз и опухоли. Раскрытые в настоящем документе варианты осуществления удовлетворяют указанные потребности и обеспечивают другие связанные преимущества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигурах 1A и 1B показано, как WT1₃₇-специфичные TCR определяли с помощью способа на основе высокопроизводительного секвенирования. (A) Показана схема первоначального способа на основе секвенирования для определения клонотипов TCR, связанных с высоким связыванием тетрамера пептида WT1₃₇₋₄₅/MHC. (B) Показано обогащение сортируемых популяций по сравнению с процентом от общей популяции с выделенным выбранным TCR. Все TCR, обозначенные черными кружками, были синтезированы и оценены на антиген-специфичность (всего 27).

На фигуре 2 показаны результаты функциональной оценки TCR, которые связывают высокие уровни CD8-независимого (CD8i) тетрамера. Конструкции TCR экспрессируются в клетках Юркат (Jurkat), в которых отсутствуют эндогенные цепи TCR α/β . Показано окрашивание тетрамера в сравнении с экспрессией CD3 для каждого TCR (экспрессия CD3 прямо коррелирует с экспрессией трансгенного TCR на поверхности).

На фигурах 3A-3C показано, что дополнительные WT1₃₇-специфичные TCR определяли с помощью модифицированного способа на основе высокопроизводительного секвенирования с применением CD8-независимого (CD8i) тетрамера. (A) Показана схема модифицированного способа на основе секвенирования для определения клонотипов TCR, связанных с высоким CD8-независимым связыванием тетрамера пептида WT1₃₇/MHC. (B) Показано обогащение исходных сортируемых популяций по сравнению с процентом от общей популяции по сравнению с (C) аналогичным анализом при использовании тетрамера CD8i. Дополнительно 14 TCR были отобраны на основании пониженных уровней CD3 на поверхности и связывания тетрамера CD8i. Все TCR, обозначенные закрашенными кружками (диагональная линия), были синтезированы и оценены на антиген-специфичность.

На фигуре 4 показано связывание тетрамера CD8i выбранных TCR WT1₃₇. Конструкции TCR экспрессируются в клетках Юркат, в которых отсутствуют эндогенные цепи TCR α/β . Показано окрашивание тетрамера в сравнении с экспрессией CD3 для

каждого TCR (экспрессия CD3 прямо коррелирует с экспрессией трансгенного TCR на поверхности).

На фигурах 5A и 5B показано вычисление значения EC_{50} пептида для выбранных TCR в анализе $IFN\gamma$ (интерферон гамма) при трансдукции в первичные $CD8^+$ МКПК (моноклеональные клетки периферической крови). (A) Отобранные TCR трансдуцировали в $CD8^+$ Т-клетки, выделенные из донорских МКПК. Через 1 неделю клетки сортировали на тетрамер⁺ $CD8^+$ Т-клетки и размножали. Размноженные антигенспецифические клетки культивировали в течение от 4 до 6 часов с активированными пептидами Т2 клетками-мишенями, и продукцию $IFN\gamma$ определяли с помощью проточной цитометрии. (B) Процент клеток, продуцирующих $IFN\gamma$, согласовывали с кривыми доза-ответ методом нелинейной регрессии для расчета значения EC_{50} пептида для каждого TCR.

На фигуре 6 показано, что первичные $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие WT1₃₇-специфичные TCR, эффективно уничтожают WT1⁺ HLA-A2⁺ клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-468. Первичные Т-клетки $CD8^+$, очищенные для определения высокого связывания тетрамера, трансдуцировали с TCR и смешивали в соотношении 8:1 (в трех повторях) с линией клеток рака молочной железы MDA-MB-468, окрашенной красителем CytoLight® Rapid Red. Общую площадь красных объектов (которая коррелирует с общим количеством живых клеток-мишеней) рассчитывали в моменты времени, указанные для каждой TCR-трансдуцированной популяции Т-клеток в течение периода 72 часа. Для оценки текущей чувствительности Т-клеток, трансдуцированных TCR к персистентному антигену, через 48 часов добавляли дополнительные клетки MDA-MB-468.

На фигуре 7 показано, что как $CD4^+$, так и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие TCR 10.1, могут элиминировать WT1⁺ A2⁺ линии клеток аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1 после повторного заражения *in vitro*. Как $CD4^+$, так $CD8^+$ Т-клетки трансдуцировали для экспрессии WT1₃₇ TCR 10.1. $CD4^+$ Т-клетки дополнительно трансдуцировали для экспрессии генов $CD8\alpha$ и $CD8\beta$. Через 8 дней трансдуцированные клетки сортировали для очистки $CD8^+$ тетрамер⁺ и $CD4^+/CD8^+$ тетрамер⁺ Т-клеток. Антигенспецифические клетки, которые были либо $CD4^+/CD8^+$, $CD8^+$, либо смесью этих двух популяций ($CD4$ и $CD8$), смешивали в соотношении 8:1 (в трех повторях) с клеточной линией аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1, которая ранее была трансдуцирована для экспрессии красителя NucLight® Red. Общую площадь красных объектов (которая коррелирует с общим количеством живых клеток-мишеней) рассчитывали в моменты времени, указанные для каждой популяции Т-клеток, трансдуцированных TCR. Для оценки текущей чувствительности Т-клеток,

трансдуцированных TCR, к персистентному антигену через 48 часов добавляли дополнительные клетки PANC-1.

На фигурах 8A-8D показано сравнение гибели линии опухолевых клеток от Т-клеток, трансдуцированных специфичным С4 TCR к пептиду WT1 p126 из публикации Schmitt et al. (Nat. Biotechnol. 35:1188, 2017), по сравнению с гибелью от Т-клеток, трансдуцированных специфичным TCR к пептиду WT1 p37 по настоящему изобретению (WT1₃₇₋₄₅ TCR15.1). Следует отметить, что С4 TCR имеет более низкую аффинность к своему комплексу пептида и МНС по сравнению с специфичным TCR к пептиду WT1 p37 по настоящему изобретению.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к Т-клеточным рецепторам (TCR), обладающим высокой функциональной авидностью к антигенному пептиду из WT1, состоящему из аминокислот 37-45 (также называемому пептидом WT1₃₇₋₄₅ или пептидным антигеном p37; например, VLDFAPPGA, SEQ ID NO: 59), который связан с основным комплексом гистосовместимости (МНС) (например, человеческий лейкоцитарный антиген, HLA). Такие TCR, специфичные к пептидному антигену p37, пригодны, например, для адоптивной иммунотерапии для лечения рака, такого как рак, сверхэкспрессирующий WT1.

В качестве пояснения, большинство опухолей-мишеней для иммунотерапии на основе Т-клеток являются аутоантигенами, поскольку опухоли возникают из ранее нормальной ткани. Например, такие опухолеассоциированные антигены (ТАА) могут экспрессироваться на высоких уровнях в раковой клетке, но могут и не экспрессироваться или минимально экспрессироваться в других клетках. Во время развития Т-клеток в тимусе, Т-клетки, которые слабо связываются с аутоантигенами, могут выживать в тимусе и могут подвергаться дальнейшему развитию и созреванию, в то время как Т-клетки, которые прочно связываются с аутоантигенами, устраняются иммунной системой, поскольку такие клетки вызывают нежелательный аутоиммунный ответ. Следовательно, Т-клетки сортируются по их относительной способности связываться с антигенами, чтобы подготовить иммунную систему к ответу против чужеродного агента (то есть распознаванию чужеродного антигена), в то же время предотвращая аутоиммунный ответ (то есть распознавание аутоантигена). Этот механизм толерантности ограничивает встречающиеся в природе Т-клетки, которые могут распознавать опухолевые (собственные) антигены с высокой аффинностью, и, следовательно, устраняет Т-клетки, которые могли бы эффективно уничтожать опухолевые клетки. Следовательно, выделение Т-клеток, имеющих TCR с высокой аффинностью, специфичных к опухолевым антигенам,

затруднено, поскольку большинство таких клеток по существу устраняется иммунной системой.

В настоящем изобретении к иммунным клеткам от приблизительно 15 здоровых доноров был применен подход, основанный на высокопроизводительном секвенировании, для идентификации TCR, имеющих высокую функциональную авидность для комплекса p37 и МНС. Такой подход также позволяет отобрать TCR, даже если они экспрессируются на низких уровнях на поверхности Т-клеток. Обогащение сортируемых популяций по сравнению с процентом от общей популяции применяли для выбора TCR с высокой аффинностью и высокой функциональной авидностью (т. е. с наибольшей противоопухолевой эффективностью), специфичных к p37, и их композиций по настоящему изобретению. Такие TCR с высокой функциональной авидностью, специфичные к p37, были идентифицированы в Т-клетках, которые: (а) связывали тетрамеры пептид p37/МНС независимо от CD8, (b) меньше подвергались *in vitro* размножению, стимулированному пептидами, и (с) в некоторых случаях экспрессировали такие TCR на относительно низких уровнях на поверхности Т-клеток по сравнению с другими TCR в Т-клетках, не имеющих таких характеристик. Всего 27 TCR были синтезированы и оценены на p37 антиген-специфичность (см. фиг. 1B).

В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный рецептор (TCR), специфичный к пептиду WT1, содержит α -цепь TCR и β -цепь TCR, где α -цепь TCR содержит домен V_α , содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 253-263 и 34-44, и константный домен α -цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и β -цепь TCR содержит домен V_β , содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 253-263 и 23-33, и константный домен β -цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 или 46, и такие TCR специфически связываются с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) на поверхности Т-клеток и способствуют продукции $IFN\gamma$ со значением pEC_{50} 8,5 или выше. В некоторых вариантах осуществления выбранные TCR специфически связываются с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) со значением K_D менее или равным приблизительно 10^{-8} М, или где TCR с высокой аффинностью диссоциирует из комплекса VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и HLA с пониженным значением скорости диссоциации k_{off} по сравнению с TCR, раскрытым в публикации Schmitt et al., Nat. Biotechnol. 35:1188, 2017.

Композиции и способы, описанные в настоящем документе, в определенных вариантах осуществления будут иметь терапевтическую применимость для лечения

заболеваний и состояний, связанных с экспрессией или сверхэкспрессией WT1 (например, обнаруживаемая экспрессия WT1 на уровне, который по величине статистически значимо выше, чем уровень экспрессии WT1, обнаруживаемый в нормальной или здоровой клетке). Такие заболевания включают различные формы гиперпролиферативных заболеваний или пролиферативных заболеваний, такие как гематологические злокачественные опухоли и солидные раки. Неограничивающие примеры таких и связанных применений описаны в настоящем документе и включают стимуляцию *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* антигенспецифических Т-клеточных ответов в отношении WT1, например, путем применения рекомбинантных Т-клеток, экспрессирующих специфические TCR с повышенной аффинностью к пептиду WT1 (например, VLDFAPPGA, SEQ ID NO: 59, также известный как пептид WT1₃₇₋₄₅ или пептид p37).

Прежде чем перейти к более подробному описанию настоящего изобретения для лучшего понимания может быть полезно предоставить определения некоторых терминов, применяемых в настоящем документе. Дополнительные определения приведены в тексте настоящего документа.

В настоящем описании любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений или диапазон целых чисел следует понимать, как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, при необходимости, его долей (например, одну десятую и одну сотую целого числа), если не указано иное. Кроме того, следует понимать, что любой диапазон чисел, приведённый в настоящем документе, относящийся к любому физическому признаку, такому как полимерные субъединицы, размер или толщина, включает любое целое число в пределах указанного диапазона, если не указано иное. Термин "приблизительно" в контексте настоящего документа подразумевает отклонения на $\pm 10\%$ от указанного диапазона, значения или структуры, если не указано иное. Следует понимать, что в контексте настоящего документа формы единственного числа слов включают "один или более" перечисленных компонентов. Использование альтернативы (например, "или") следует понимать, как обозначение одной, обеих либо любой комбинации альтернатив. В контексте настоящего документа термины "включать", "иметь" и "содержать" применяются как синонимы, и такие термины и их варианты рассматриваются как неограничивающие.

Кроме того, следует понимать, что отдельные соединения или группы соединений, полученные из различных комбинаций структур и заместителей, описанных в настоящем документе, раскрыты в настоящей заявке в той же степени, как если бы каждое соединение или группа соединений были бы изложены отдельно. Таким образом, выбор конкретных структур или конкретных заместителей находится в пределах объема настоящего

изобретения.

Термин "состоящий по существу из" не эквивалентен термину "содержащий" и относится к определённым материалам или стадиям пункта формулы изобретения или к тем материалам или стадиям, которые не оказывают существенного влияния на основные характеристики заявленного объекта изобретения. Например, домен, область или модуль белка (например, связывающий домен, шарнирная область, линкерный модуль) или белок (который может иметь один или более доменов, областей или модулей) "состоит по существу из" конкретной аминокислотной последовательности, когда аминокислотная последовательность домена, области, модуля или белка включает удлинения, делеции, мутации или их комбинацию (например, аминокислоты на амино- или карбоксиконце или между доменами), которые в комбинации составляют не более 20 % (например, не более 15 %, 10 %, 8 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % или 1 %) от длины домена, области, модуля или белка и не оказывают существенного влияния (т. е. не снижают активность более чем на 50 %, например, не более чем на 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % или 1 %) на активность домена(ов), области(ей), модуля(ей) или белка (например, аффинность связывания с мишенью у связывающего белка).

В контексте настоящего документа термин "клетка иммунной системы" в некоторых аспектах означает любую клетку иммунной системы, которая происходит от гемопоэтической стволовой клетки в костном мозге, которая дает начало двум основным линиям: миелоидной клетке-предшественнику (которая дает начало миелоидным клеткам, таким как моноциты, макрофаги, дендритные клетки, мегакариоциты и гранулоциты) и лимфоидной клетке-предшественнику (которая дает начало лимфоидным клеткам, таким как Т-клетки, В-клетки и естественные киллерные (NK) клетки). Примеры клеток иммунной системы включают $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^- CD8^-$ двойную негативную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, регуляторную Т-клетку, стволовую Т-клетку памяти, естественную киллерную клетку (например, NK-клетка или NK-Т-клетка), В-клетку и дендритную клетку. Макрофаги и дендритные клетки могут называться "антигенпрезентирующими клетками" или "АПК", которые представляют собой специализированные клетки, которые могут активировать Т-клетки, когда рецептор главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности АПК в комплексе с пептидом взаимодействует с TCR на поверхности Т-клетки.

"Главный комплекс гистосовместимости" (МНС) в некоторых аспектах может относиться к гликопротеинам, которые доставляют пептидные антигены на клеточную поверхность. Молекулы МНС I класса представляют собой гетеродимеры, имеющие трансмембранную α -цепь (с тремя α -доменами) и нековалентно связанный $\beta 2$ -

микроглобулин. Молекулы МНС II класса состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β , оба из которых пронизывают мембрану. Каждая цепь имеет два домена. Молекулы МНС I класса доставляют пептиды, продуцируемые в цитозоле, на клеточную поверхность, где комплекс пептида и МНС распознается $CD8^+$ Т-клетками. Молекулы МНС II класса доставляют пептиды, продуцируемые в везикулярной системе, на клеточную поверхность, где они распознаются $CD4^+$ Т-клетками. МНС человека называют человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA).

"Т-клетка" или "Т-лимфоцит" представляет собой клетку иммунной системы, которая созревает в тимусе и продуцирует Т-клеточные рецепторы (TCR). Т-клетки могут проявлять фенотипы или маркеры, связанные с наивными Т-клетками (например, не подвергнутыми воздействию антигена; повышенная экспрессия $CD62L$, $CCR7$, $CD28$, $CD3$, $CD127$ и $CD45RA$ и пониженная экспрессия $CD45RO$ по сравнению с T_{CM}), Т-клетками памяти (T_M) (например, коммитированными и долгоживущими) и эффекторными клетками (коммитированными, цитотоксическими). T_M можно дополнительно разделить подгруппы, демонстрирующие фенотипы или маркеры, связанные с Т-клетками центральной памяти (T_{CM} , например, повышенная экспрессия $CD62L$, $CCR7$, $CD28$, $CD127$, $CD45RO$ и $CD95$ и пониженная экспрессия $CD54RA$ по сравнению с наивными Т-клетками) и Т-клетками эффекторной памяти (T_{EM} , например, пониженная экспрессия $CD62L$, $CCR7$, $CD28$, $CD45RA$ и повышенная экспрессия $CD127$ по сравнению с наивными Т-клетками или T_{CM}). Эффекторные Т-клетки (T_E) могут относиться к коммитированным $CD8^+$ цитотоксическим Т-лимфоцитам, которые имеют пониженную экспрессию $CD62L$, $CCR7$, $CD28$ и являются положительными в отношении гранзима и перфорина по сравнению с T_{CM} . Т-хелперы (T_H) могут включать $CD4^+$ клетки, которые влияют на активность других иммунных клеток, высвобождая цитокины. $CD4^+$ Т-клетки могут активировать и подавлять адаптивный иммунный ответ, и то, какая из этих двух функций индуцируется, будет зависеть от присутствия других клеток и сигналов. Т-клетки можно собирать с применением известных способов, и различные субпопуляции или их комбинации могут быть обогащены или истощены известными способами, такими как аффинное связывание с антителами, проточная цитометрия или иммуномагнитное разделение. Другие иллюстративные Т-клетки включают регуляторные Т-клетки, такие как регуляторные Т-клетки $CD4^+ CD25^+$ ($Foxp3^+$) и клетки $Treg17$, а также Т-клетки, рестриктированные по $Tr1$, $Th3$, $CD8^+CD28^-$ и $Qa-1$.

"Т-клеточный рецептор" (TCR) в некоторых аспектах относится к члену суперсемейства иммуноглобулинов (имеющему переменный связывающий домен, константный домен, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост; см.,

например, Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997), способному специфически связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором МНС. В некоторых аспектах TCR относится к связывающему белку, содержащему два переменных домена TCR (V_α и V_β) по настоящему изобретению. В некоторых аспектах TCR включает одноцепочечный TCR (т. е. одноцепочечный слитый белок, содержащий переменные домены TCR по настоящему изобретению, или CAR (химерный антигенный рецептор), содержащий переменные домены TCR по настоящему изобретению (описано в настоящем документе). В некоторых аспектах TCR может быть обнаружен на клеточной поверхности или в растворимой форме и обычно состоит из гетеродимера, имеющего α - и β -цепи (также известные как $TCR\alpha$ и $TCR\beta$, соответственно) или γ - и δ -цепи (также известные как $TCR\gamma$ и $TCR\delta$, соответственно).

Подобно иммуноглобулинам, внеклеточная часть цепей TCR (например, α -цепь, β -цепь) содержит два домена иммуноглобулина, переменный домен (например, переменный домен α -цепи или V_α , переменный домен β -цепи или V_β ; обычно аминокислоты с 1 по 116 на основе нумерации Кабата (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) на N-конце и один константный домен (например, константный домен α -цепи или C_α , обычно аминокислоты с 81 по 259 на основе нумерации Кабата, константный домен β -цепи или C_β , обычно аминокислоты с 81 по 295 на основе нумерации Кабата), прилегающий к клеточной мембране. Также, как и иммуноглобулины, переменные домены содержат области, определяющие комплементарность (CDR), разделенные каркасными областями (FR) (см., например, Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; см. также Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления TCR представлен на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов) и связан с комплексом CD3. Источник TCR, применяемый в настоящем документе, может происходить от различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса, кролик или другое млекопитающее.

Термин "переменная область" или "переменный домен" относится к домену связывающего белка суперсемейства иммуноглобулинов (например, α -цепь или β -цепь TCR (или γ -цепь и δ -цепь для $\gamma\delta$ TCR)), который участвует в связывании связывающего белка суперсемейства иммуноглобулинов (например, TCR) с антигеном. Переменные домены α -цепи и β -цепи (V_α и V_β , соответственно) нативного TCR обычно имеют сходные структуры, причем каждый домен содержит четыре обычно консервативных каркасных области (FR) и три CDR. Домен V_α кодируется двумя отдельными сегментами ДНК,

вариабельным генным сегментом и соединительным генным сегментом (V-J); домен V_β кодируется тремя отдельными сегментами ДНК, вариабельным генным сегментом, генным сегментом разнообразия и соединительным генным сегментом (V-D-J). Одного домена V_α или V_β может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, TCR, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с применением домена V_α или V_β из TCR, который связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V_α или V_β соответственно.

Термины "область, определяющая комплементарность" и "CDR" являются синонимами "гипервариабельной области" или "HVR" и, как известно в данной области техники, относятся к последовательностям аминокислот в вариабельных областях иммуноглобулина (например, TCR), которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания и отделены друг от друга в первичной аминокислотной последовательности каркасными областями. Обычно в каждой вариабельной области α -цепи TCR имеется три CDR (α CDR1, α CDR2, α CDR3) и в каждой вариабельной области β -цепи TCR имеется три CDR (β CDR1, β CDR2, β CDR3). В случае TCR полагают, что CDR3 является основной CDR, ответственной за распознавание процессированного антигена. Как правило, CDR1 и CDR2 взаимодействуют в основном или исключительно с МНС.

CDR1 и CDR2 кодируются внутри вариабельного генного сегмента последовательности, кодирующей вариабельную область TCR, тогда как CDR3 кодируется областью, охватывающей вариабельный и соединительный сегменты для V_α , или областью, охватывающей вариабельный, обеспечивающий разнообразия и соединительный сегменты для V_β . Таким образом, если идентичность вариабельного генного сегмента V_α или V_β известна, можно вывести последовательности их соответствующих CDR1 и CDR2; например, согласно описанной в настоящем документе схеме нумерации. По сравнению с CDR1 и CDR2, CDR3 обычно значительно более разнообразен из-за добавления и потери нуклеотидов в процессе рекомбинации.

Последовательности вариабельного домена TCR могут быть выровнены по схеме нумерации (например, по Кабату, системе нумерации Чотиа, EU, международной информационной система по иммуногенетике (IMGT), улучшенной системе нумерации Чотиа и Aho), что позволяет аннотировать эквивалентные положения остатков и сравнивать различные молекулы с применением, например, инструментального программного обеспечения Antigen receptor Numbering And Receptor Classification (ANARCI) (2016, Bioinformatics 15: 298-300). Схема нумерации обеспечивает стандартизированное разграничение каркасных областей и CDR в вариабельных доменах TCR. В некоторых вариантах осуществления CDR по настоящему изобретению идентифицируют согласно

схеме нумерации IMGT (Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003; imgt.org/IMGIndex/V-QUEST.php). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность CDR3 по настоящему изобретению содержит одну или более аминокислот соединения; например, такую, которая может возникнуть во время (RAG)-опосредованной перестройки, как описано в настоящем документе.

В контексте настоящего документа термин "корцептор CD8" или "CD8" относится к гликопротеину CD8 клеточной поверхности, либо в виде альфа-альфа-гомодимера, либо в виде альфа-бета-гетеродимера. Корцептор CD8 способствует функционированию цитотоксических Т-клеток (CD8⁺) и функционирует посредством передачи сигналов через свой цитоплазматический путь фосфорилирования тирозина (Gao and Jakobsen, Immunol. Today 21:630-636, 2000; Cole and Gao, Cell. Mol. Immunol. 1:81-88, 2004). У человека существует пять (5) известных изоформ бета-цепей CD8 (см. идентификатор UniProtKB P10966) и одна известная изоформа альфа-цепи CD8 (см. идентификатор UniProtKB P01732).

"CD4" представляет собой корцепторный гликопротеин иммуноглобулина, который помогает TCR взаимодействовать с антигенпрезентирующими клетками (см. Campbell & Reece, Biology 909 (Benjamin Cummings, Sixth Ed., 2002); идентификатор UniProtKB P01730). CD4 находится на поверхности иммунных клеток, таких как Т-хелперные клетки, моноциты, макрофаги и дендритные клетки, и включает четыре домена иммуноглобулина (от D1 до D4), которые экспрессируются на клеточной поверхности. Во время презентации антигена CD4 рекрутируется вместе с комплексом TCR для связывания с различными участками молекулы МНСII (CD4 связывает МНСII $\beta 2$, а комплекс TCR связывает МНСII $\alpha 1/\beta 1$). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что близость к комплексу TCR позволяет молекулам CD4-ассоциированной киназы фосфорилировать иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM), присутствующие в цитоплазматических доменах CD3. Полагают, что такая активность усиливает сигнал, генерируемый активированным TCR, чтобы продуцировать или рекрутировать различные типы клеток иммунной системы, включая Т-хелперные клетки, и иммунные ответы.

В контексте настоящего документа термин "область D/N/P" в некоторых аспектах относится к нуклеотидам или аминокислотам, кодируемым нуклеотидами, которые, как предполагается, находятся в генном сегменте разнообразия (D), который может включать нематричные (N) нуклеотиды и палиндромные (P) нуклеотиды, которые вставляются (или удаляются) в процессе рекомбинации V(D)J, что приводит к разнообразию Т-клеточных рецепторов. Перестройка, опосредованная геном, активирующим рекомбинацию (RAG),

вариабельных (V), обеспечивающих разнообразие (D) и соединительных (J) генных сегментов представляет собой неточный процесс, который приводит к вариабельному добавлению или вычитанию нуклеотидов (называемых палиндромными или P нуклеотидами), за которым следует активность терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT), которая дополнительно добавляет случайные нематричные (N) нуклеотиды. Наконец, экзонуклеазы удаляют неспаренные нуклеотиды, а гэпы заполняются ферментами синтеза и репарации ДНК. Такой механизм обрезки и репарации приводит к разнообразию соединений, которое лежит в основе эффективного и специфического распознавания разных антигенов разными TCR. Генные сегменты D можно идентифицировать с помощью системы аннотаций международной информационной системы по иммуногенетике (IMGT; на сайте imgt.org).

В некоторых аспектах "CD3" представляет собой мультибелковый комплекс из шести цепей (см. Abbas and Lichtman, 2003; Janeway et al., P172 and 178, 1999). У млекопитающих комплекс включает цепь CD3 γ , цепь CD3 δ , две цепи CD3 ϵ и гомодимер цепей CD3 ζ . Цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ являются родственными белкам клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащих единственный иммуноглобулиновый домен. Трансмембранные области цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ заряжены отрицательно, что является характеристикой, позволяющей таким цепям связываться с положительно заряженными участками цепей рецепторов Т-клеток. Внутриклеточные хвосты каждой из цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ содержат один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM, тогда как каждая цепь CD3 ζ имеет три таких мотива. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что ITAM важны для сигнальной способности комплекса TCR. CD3, применяемый в настоящем изобретении, может происходить от различных видов животных, включая человека, мышь, крысу или других млекопитающих.

В контексте настоящего документа термин "комплекс TCR" в некоторых аспектах относится к комплексу, образованному посредством ассоциации CD3 с TCR. Например, комплекс TCR может состоять из цепи CD3 γ , цепи CD3 δ , двух цепей CD3 ϵ , гомодимера цепей CD3 ζ , цепи TCR α и цепи TCR β . Альтернативно, комплекс TCR может состоять из цепи CD3 γ , цепи CD3 δ , двух цепей CD3 ϵ , гомодимера цепей CD3 ζ , цепи TCR γ и цепи TCR δ .

В некоторых аспектах термин "компонент комплекса TCR", в контексте настоящего документа, относится к цепи TCR (т. е. TCR α , TCR β , TCR γ или TCR δ), цепи CD3 (т. е. CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ или CD3 ζ) или комплексу, образованному двумя или более цепями TCR или цепями CD3 (например, комплексу TCR α и TCR β , комплексу TCR γ и TCR δ , комплексу CD3 ϵ и CD3 δ , комплексу CD3 γ и CD3 ϵ или субкомплексу TCR из TCR α , TCR β , CD3 γ , CD3 δ

и двух цепей CD3ε).

В контексте настоящего документа термин "антиген" или "АГ" относится к иммуногенной молекуле, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может включать выработку антител, активацию конкретных иммунологически компетентных клеток (например, Т-клеток) или и то, и другое. Антиген (иммуногенная молекула) может представлять собой, например, пептид, гликопептид, полипептид, гликополипептид, полинуклеотид, полисахарид, липид или т. п. Очевидно, что антиген можно синтезировать, получать рекомбинантным путем или получать из биологического образца. Примеры биологических образцов, которые могут содержать один или более антигенов, включают образцы тканей, образцы опухолей, клетки, биологические жидкости или их комбинации. Антигены могут быть продуцированы клетками, которые были модифицированы или генетически сконструированы для экспрессии антигена или которые эндогенно (например, без модификации или генной инженерии путем вмешательства человека) экспрессируют мутацию или полиморфизм, который является иммуногенным.

"Неоантиген" в контексте настоящего документа относится к клеточному продукту хозяина, содержащему структурную перестройку, изменение или мутацию, которые приводят к созданию нового антигена или антигенного эпитопа, который ранее не наблюдался в геноме субъекта (т. е. в образце здоровой ткани от субъекта) или был "обнаружен" или распознан иммунной системой хозяина, который: (а) процессирован клеточными антигенпрезентирующими и транспортными механизмами и презентируется на клеточной поверхности связанным с молекулой МНС (например, HLA); и (b) вызывает иммунный ответ (например, клеточный (Т-клеточный) ответ). Неоантигены могут происходить, например, от кодирующих полинуклеотидов с изменениями (заменой, добавлением, делецией), которые приводят к измененному или мутированному продукту, или в результате вставки экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты или белка в клетку, или в результате воздействия факторов окружающей среды (например, химических, радиологических), приводящих к генетическим изменениям. Неоантигены могут возникать отдельно от опухолевого антигена или могут возникать из или быть связаны с опухолевым антигеном. "Опухолевый неоантиген" (или "опухолеспецифический неоантиген") относится к белку, содержащему неоантигенную детерминанту, связанную с, возникающую из или возникающую внутри опухолевой клетки или множества клеток внутри опухоли. Детерминанты опухолевых неоантигенов обнаружены, например, на антигенных опухолевых белках или пептидах, которые содержат одну или более соматических мутаций или хромосомных перестроек, кодируемых ДНК опухолевых клеток (например, рака поджелудочной железы, рака легких, колоректального рака), а также на

белках или пептидах из вирусных открытых рамок считывания, связанных с вирус-ассоциированными опухолями.

Термин "эпитоп" или "антигенный эпитоп" включает любую молекулу, структуру, аминокислотную последовательность или белковую детерминанту, которые распознаются и специфически связываются родственной связывающей молекулой, такой как иммуноглобулин, Т-клеточный рецептор (TCR), химерный антигенный рецептор, или другую связывающую молекулу, домен или белок. Эпитопные детерминанты обычно содержат химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда.

В контексте настоящего документа термины "специфически связывает" или "специфично к" в некоторых аспектах относятся к ассоциации или объединению Т-клеточного рецептора (TCR) или его связывающего домена (например, scTCR или его слитого белка) с молекулой-мишенью с кажущейся аффинностью или K_a (т. е. равновесной константой ассоциации для конкретного связывающего взаимодействия с единицами $1/M$) равной или большей $10^9 M^{-1}$ (что равно отношению скорости ассоциации [k_{on}] к скорости диссоциации [k_{off}] для данной реакции ассоциации), или функциональной авидностью или значением EC_{50} , равным или большим $10^{-9} M$, при этом не происходит значительной ассоциации или объединения с любыми другими молекулами или компонентами в образце. TCR могут быть классифицированы как "высокоаффинные" связывающие белки или связывающие домены (или их слитые белки) или как "низкоаффинные" связывающие белки или связывающие домены (или их слитые белки). "Высокоаффинные" TCR или связывающие домены относятся к TCR или их связывающим доменам, имеющим K_a по меньшей мере $10^9 M^{-1}$, по меньшей мере $10^{10} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{11} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{12} M^{-1}$ или по меньшей мере $10^{13} M^{-1}$. "Низкоаффинные" связывающие белки или связывающие домены относятся к связывающим белкам или связывающим доменам, которые имеют K_a вплоть до $10^7 M^{-1}$, вплоть до $10^6 M^{-1}$ или вплоть до $10^5 M^{-1}$. В качестве альтернативы, аффинность может быть определена как равновесная константа диссоциации (K_d) для конкретного связывающего взаимодействия с единицами M (например, от $10^{-9} M$ до $10^{-13} M$ или менее).

Термин "функциональная авидность" относится к биологической мере или порогу активации ответа Т-клеток *in vitro* на заданную концентрацию лиганда, причем биологические меры могут включать продукцию цитокинов (например, продукцию $IFN\gamma$, продукцию IL-2 и т. д.), цитотоксическую активность и пролиферацию. Например, Т-клетки, которые биологически (иммунологически) реагируют *in vitro* на очень низкую дозу

антигена, продуцируя цитокины, будучи цитотоксичными или пролиферирующими, считаются имеющими высокую функциональную avidность, в то время как Т-клетки, имеющие более низкую функциональную avidность, требуют большего количества антигена для того, чтобы вызывать иммунный ответ, подобный Т-клеткам высокой avidности. Следует понимать, что функциональная avidность отличается от аффинности и avidности. Аффинность относится к силе любой данной связи между связывающим белком и его антигеном/лигандом. Некоторые связывающие белки мультивалентны и связываются с множеством антигенов, в этом случае сила общей связи является avidностью.

В контексте настоящего документа термин "функциональная avidность" относится к количественному детерминанту порога активации TCR, экспрессируемого Т-клеткой. *In vivo* Т-клетки подвергаются воздействию аналогичных доз антигена независимо от avidности TCR (высокой или низкой), но существуют многочисленные корреляции между функциональной avidностью и эффективностью иммунного ответа. Некоторые исследования *ex vivo* показали, что различные функции Т-клеток (например, пролиферация, продукция цитокинов и т. д.) могут запускаться при разных порогах (см., например, Betts et al., J. Immunol. 172:6407, 2004; Langenkamp et al., Eur. J. Immunol. 32:2046, 2002). Факторы, которые влияют на функциональную avidность, включают (а) аффинность TCR к комплексу pMHC, то есть силу взаимодействия между TCR и pMHC (Cawthon et al., J. Immunol. 167:2577, 2001), (b) уровни экспрессии TCR и корецепторов CD4 или CD8 и (c) распределение и состав сигнальных молекул (Viola and Lanzavecchia, Science 273:104, 1996), а также уровни экспрессии молекул, которые ослабляют функцию Т-клеток и передачу сигнала TCR.

Концентрация антигена, необходимая для индуцирования полумаксимального ответа между исходным уровнем и максимальным ответом после определенного времени воздействия, называется "полумаксимальной эффективной концентрацией" или "EC₅₀". Значение EC₅₀ обычно представлено в виде молярного количества (моль/литр), но его часто преобразуют в логарифмическое значение следующим образом $\log_{10}(\text{EC}_{50})$, что дает сигмоидальный график (см., например, фигура 5A). Например, если значение EC₅₀ равно 1 мкМ (10^{-6} M), значение $\log_{10}(\text{EC}_{50})$ равно минус 6. Другое применяемое значение pEC₅₀, которое определяется как отрицательный логарифм EC₅₀ ($-\log_{10}(\text{EC}_{50})$). В приведенном выше примере значение EC₅₀, равное 1 мкМ, имеет значение pEC₅₀, равное 6. В некоторых вариантах осуществления функциональная avidность TCR по настоящему изобретению будет мерой их способности стимулировать продукцию IFN γ Т-клетками, которую можно измерить с применением способов, описанных в настоящем документе. TCR с "высокой функциональной avidностью" или их связывающие домены относятся к тем TCR или их

связывающим доменам, имеющим значение EC_{50} по меньшей мере 10^{-9} М, по меньшей мере приблизительно 10^{-10} М, по меньшей мере приблизительно 10^{-11} М, по меньшей мере приблизительно 10^{-12} М или по меньшей мере приблизительно 10^{-13} М. В некоторых вариантах осуществления ответ включает продукцию IFN- γ ; например, продукция IFN- γ иммунной клеткой (такой как Т-клетка, NK-клетка или NK-Т-клетка), экспрессирующей TCR в ответ на антиген.

В некоторых аспектах каждый термин "антиген WT1₃₇₋₄₅", или "пептид WT1₃₇₋₄₅", или "пептидный антиген WT1₃₇₋₄₅", или "пептид p37", или "антиген p37", или "пептидный антиген p37" относится к части, полученной естественным или синтетическим путем, белка WT1 длиной от приблизительно 9 до приблизительно 15 аминокислот, и содержащего аминокислотную последовательность VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59), который может образовывать комплекс с молекулой МНС (например, HLA), и такой комплекс может связываться с TCR, специфичным к комплексу пептида WT1 и МНС (например, HLA). Поскольку WT1 является внутренним белком-хозяином, пептиды антигена WT1 будут представлены в контексте МНС I класса. В конкретных вариантах осуществления пептид WT1 VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) способен связываться с аллелем HLA класса I человека HLA-A*201.

В некоторых аспектах выражения "пептид WT1₃₇₋₄₅-специфичный связывающий белок" или "пептид WT1₃₇₋₄₅-специфичный TCR", или "антиген WT1₃₇₋₄₅-специфичный TCR", или "пептидный антиген WT1₃₇₋₄₅-специфичный TCR" или "пептид WT1 p37-специфичный связывающий белок", или "пептид WT1 p37-специфичный TCR", или "антиген WT1 p37-специфичный TCR", или "пептидный антиген WT1 p37-специфичный TCR", применяемые взаимозаменяемо в настоящем документе, относятся к белку или полипептиду, который специфически связывается с пептидом WT1 p37 в комплексе с молекулой МНС или HLA, например, на клеточной поверхности, приблизительно или по меньшей мере приблизительно с определенной аффинностью или функциональной авидностью, предпочтительно высокой функциональной авидностью, как определено в настоящем документе. Такой связывающий белок или полипептид содержит переменные домены TCR, как определено в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления WT1-специфический связывающий белок связывает комплекс WT1-производного пептида и HLA (или комплекс WT1-производный пептид и МНС) имеет значение функциональной авидности $\log[EC_{50}]$ от приблизительно -2,5 мкМ до приблизительно -3,75 мкМ (что равно от -8,5 М до приблизительно -9,8 М). Значение EC_{50} для указанных значений составляет от приблизительно $3,16 \times 10^{-9}$ М до приблизительно $1,58 \times 10^{-10}$ М, как измерено, например, способом, описанным далее в описании и в примере

1 настоящего документа.

Известны способы оценки аффинности, кажущейся аффинности, относительной аффинности или функциональной avidности. Как описано в настоящем документе, кажущуюся аффинность или функциональную avidность TCR по настоящему изобретению измеряют путем оценки связывания с различными концентрациями тетрамеров, связанных с пептидом p37, например, с помощью проточной цитометрии с применением меченых тетрамеров. В некоторых примерах кажущуюся K_D или EC_{50} TCR измеряют с применением 2-кратных разведений меченых тетрамеров в диапазоне концентраций с последующим определением кривых связывания с помощью нелинейной регрессии. Например, кажущуюся K_D определяют, как концентрацию лиганда, которая дает полумаксимальное связывание, тогда как EC_{50} определяют, как концентрацию лиганда, которая дает полумаксимальную продукцию, например, цитокина (например, $IFN\gamma$, IL-2).

"Окрашивание тетрамера МНС-пептид" в некоторых аспектах относится к способу, применяемому для обнаружения антигенспецифических Т-клеток, который включает тетрамер молекул МНС, каждый из которых содержит идентичный пептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая является когнатной (например, идентичной или связанной с) по меньшей мере одному антигену (например, WT1), где комплекс способен связывать Т-клеточные рецепторы, специфичные для когнатного антигена. Каждая из молекул МНС может быть помечена молекулой биотина. Биотинилированные МНС/пептиды тетрамеризуются добавлением стрептавидина, который может быть помечен флуоресцентной меткой. Тетрамер может быть обнаружен проточной цитометрией по флуоресцентной метке. В некоторых вариантах осуществления анализ тетрамера МНС-пептид применяют для обнаружения или отбора TCR с высокой аффинностью или высокой функциональной avidностью по настоящему изобретению.

Уровни цитокинов можно определять в соответствии со способами, описанными в настоящем документе и применяемыми на практике в данной области техники, включая, например, ELISA, ELISPOT, внутриклеточное окрашивание цитокинов и проточную цитометрию и их комбинации (например, окрашивание внутриклеточных цитокинов и проточная цитометрия). Пролиферацию иммунных клеток и клональную экспансию (размножение) в результате антигенспецифической активации или стимуляции иммунного ответа можно определить путем выделения лимфоцитов, таких как циркулирующие лимфоциты в образцах клеток периферической крови или клеток из лимфатических узлов, стимуляции клеток антигеном и измерения продукции цитокинов, пролиферации клеток и/или жизнеспособности клеток, например, путем включения меченного тритием тимидина или нерадиоактивных анализов, таких как МТТ-тест и т. п. Влияние иммуногена,

описанного в настоящем документе, на баланс между иммунным ответом Th1 и иммунным ответом Th2 может быть исследовано, например, путем определения уровней цитокинов Th1, таких как IFN- γ , IL-12, IL-2 и TNF- β и цитокинов 2 типа, таких как IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 и IL-13.

В некоторых аспектах термин "WT1 p37-специфичный связывающий домен", или "WT1₃₇₋₄₅-специфичный связывающий домен", или "WT1 p37-специфичный связывающий фрагмент", или "WT1₃₇₋₄₅-специфичный связывающий фрагмент" относится к домену или части WT1-специфичного TCR, ответственного за специфическое связывание с антигеном WT1 p37 в комплексе с молекулой МНС или HLA. WT1 p37 антигенспецифический связывающий домен только TCR (т. е. без какой-либо другой части WT1-специфического TCR) может быть растворим и может связываться с комплексом пептид WT1 p37 и МНС со значением K_D менее 10^{-9} М, приблизительно менее 10^{-10} М, приблизительно менее 10^{-11} М, приблизительно менее 10^{-12} М или приблизительно менее 10^{-13} М. В других вариантах осуществления пептид WT1 p37-специфичный TCR имеет высокую функциональную avidность и специфически связывается с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) на поверхности Т-клеток и способствует продукции IFN γ при значении pEC_{50} 8,5 или выше (например, вплоть до приблизительно 9, вплоть до приблизительно 9,5, вплоть до приблизительно 10, приблизительно 10,5, приблизительно 11, приблизительно 11,5, приблизительно 12, приблизительно 12,5 или приблизительно 13). Иллюстративные пептид WT1 p37-специфичные связывающие домены, включают пептид WT1 p37-специфичные scTCR (например, одноцепочечные белки $\alpha\beta$ TCR, такие как $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ -C α -L- $V\alpha$ или $V\alpha$ -L- $V\beta$ -C β , где $V\alpha$ и $V\beta$ представляют собой переменные домены TCR α и β соответственно, C α и C β представляют собой константные домены TCR α и β , соответственно, и L представляет собой линкер), которые представляют собой или могут происходить от TCR к пептиду WT1 p37 по настоящему изобретению.

Принципы процессинга антигена антигенпрезентирующими клетками (АПК) (такими как дендритные клетки, макрофаги, лимфоциты или другие типы клеток) и презентации антигена АПК Т-клеткам, включая представление, рестриктированное по главному комплексу гистосовместимости (МНС), между иммуносовместимыми (например, разделяющими по меньшей мере одну аллельную форму гена МНС, которая имеет отношение к презентации антигена) АПК и Т-клетками, хорошо известны (см., например, Murphy, Janeway's Immunobiology (8th Ed.) 2011 Garland Science, NY; chapters 6, 9 and 16). Например, процессированные антигенные пептиды, продуцируемые в цитозоле (например, опухолевый антиген, внутриклеточный патоген), обычно имеют длину от приблизительно

7 до приблизительно 11 аминокислот и будут связаны с молекулами МНС I класса, тогда как длина пептидов, продуцируемых в везикулярной системе (например, бактериальный, вирусный), будет составлять от приблизительно 10 до приблизительно 25 аминокислот, и они будут связаны с молекулами МНС II класса.

"Трансмембранный домен" в контексте настоящего описания означает любую аминокислотную последовательность, имеющую трехмерную структуру, которая является термодинамически стабильной в клеточной мембране и обычно имеет длину от приблизительно 15 до приблизительно 30 аминокислот. Структура гидрофобного трансмембранного домена может включать альфа-спираль, бета-цилиндр, бета-лист, бета-спираль или любую их комбинацию. Иллюстративные трансмембранные домены представляют собой трансмембранные домены от CD4, CD8, CD28 или CD27.

В контексте настоящего документа "иммунный эффекторный домен" представляет собой внутриклеточную часть слитого белка scTCR или CAR, который может прямо или косвенно стимулировать иммунологический ответ в клетке при получении соответствующего сигнала. В некоторых вариантах осуществления иммунный эффекторный домен является частью белка или белкового комплекса, который получает сигнал при связывании, или он связывается непосредственно с молекулой-мишенью, что запускает сигнал от иммунного эффекторного домена. Иммунный эффекторный домен может непосредственно способствовать ответу иммунных клеток, если он содержит один или более сигнальных доменов или мотивов, таких как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В других вариантах осуществления эффекторный домен косвенно способствует клеточному ответу, связываясь с одним или более другими белками, которые непосредственно стимулируют клеточный ответ. Примеры иммунных эффекторных доменов включают внутриклеточные сигнальные домены из 4-1BB, CD3ε, CD3δ, CD3ζ, CD27, CD28, CD79A, CD79B, CARD11, DAP10, FcRα, FcRβ, FcRγ, Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NOTCH1, Wnt, NKG2D, OX40, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76, pTα, TCRα, TCRβ, TRIM, Zap70, PTCH2 или любую комбинацию двух или трех таких доменов.

"Линкер" в некоторых аспектах относится к аминокислотной последовательности, которая соединяет два белка, полипептида, пептида, домена, области или мотива. Иллюстративный линкер представляет собой "линкер варибельного домена", который конкретно относится к последовательности от 5 до приблизительно 35 аминокислот, которая соединяет цепи $V_{\alpha/\beta}$ и $C_{\alpha/\beta}$ Т-клеточного рецептора (например, V_{α} - C_{α} , V_{β} - C_{β} , V_{α} - V_{β}) или соединяет каждую пару V_{α} - C_{α} , V_{β} - C_{β} , V_{α} - V_{β} с шарнирным или трансмембранным доменом, что обеспечивает спейсерную функцию и гибкость, достаточную для

взаимодействия двух субсвязывающих доменов, так что полученный одноцепочечный полипептид сохраняет специфическую связывающую аффинность или функциональную avidность к той же молекуле-мишени, что и Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления линкер варибельного домена содержит от приблизительно десяти до приблизительно 30 аминокислот или от приблизительно 15 до приблизительно 25 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления линкерный пептид варибельного домена содержит от одного до десяти повторов Gly_xSer_y , где x и y независимо представляют собой целые числа от 0 до 10, при условии, что x и y оба не равны 0 (например, Gly_4Ser (SEQ ID NO:171), Gly_3Ser (SEQ ID NO:172), Gly_2Ser или $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n(\text{Gly}_4\text{Ser})_1$ (SEQ ID NO:173), $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n(\text{Gly}_2\text{Ser})_n$, (SEQ ID NO:174) $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO:175) или $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO:171), где n представляет собой целое число 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10), и где связанные варибельные домены образуют функциональный связывающий домен (например, scTCR).

В некоторых аспектах термины "соединительные аминокислоты" или "соединительные аминокислотные остатки" относятся к одному или более (например, приблизительно от 2 до 10) аминокислотным остаткам между двумя смежными мотивами, областями или доменами полипептида, например, между связывающим доменом и смежным константным доменом или между цепью TCR и соседним саморасщепляющимся пептидом. Соединительные аминокислоты могут быть результатом моделирования конструкции слитого белка (например, аминокислотные остатки, полученные в результате применения сайта рестрикционного фермента при конструировании молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок) или генетической рекомбинации или перестройки (например, RAG-опосредованная перестройка).

В некоторых аспектах "измененный домен" или "измененный белок" относится к мотиву, области, домену, пептиду, полипептиду или белку с неидентичной последовательностью, которая идентична мотиву, области, домену, пептиду, полипептиду или белку дикого типа (например, цепи $\text{TCR}\alpha$, цепи $\text{TCR}\beta$, константному домену $\text{TCR}\alpha$ или константному домену $\text{TCR}\beta$ дикого типа) по меньшей мере на 85 % (например, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %), предпочтительно где или где CDR3 из каждого из варибельных доменов TCR α и β не изменены.

В любом из раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления константный домен TCR может быть модифицирован для улучшения объединения желаемых цепей TCR. Например, улучшенное объединение в Т-клетке-хозяине между гетерологичной α -цепью TCR и гетерологичной β -цепью TCR из-за модификации приводит

к предпочтительной сборке TCR, содержащему две гетерологичные цепи, по сравнению с нежелательным ошибочным объединением гетерологичной цепи TCR с эндогенной цепью TCR (см., например, Govers et al., *Trends Mol. Med.* 16(2):77 (2010), модификации TCR включены в настоящий документ посредством ссылки). Иллюстративные модификации для улучшения объединения гетерологичных цепей TCR включают введение комплементарных остатков цистеина в каждую из гетерологичных α -цепи и β -цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий гетерологичную α -цепь TCR, кодирует цистеин в положении аминокислоты 48 (соответствует полноразмерной последовательности α -цепи зрелого TCR человека), а полинуклеотид, кодирующий гетерологичную β -цепь TCR, кодирует цистеин в положении аминокислоты 57 (соответствует полноразмерной последовательности β -цепи зрелого TCR человека).

"Химерный антигенный рецептор" (CAR) относится к слитому белку, сконструированному так, чтобы он содержал две или более встречающихся в природе аминокислотных последовательностей, доменов или мотивов, связанных вместе таким образом, который не встречается в природе или не встречается в природе в клетке-хозяине, причем такой слитый белок может функционировать как рецептор, когда присутствует клеточной поверхности. CAR могут содержать внеклеточную часть, содержащую антигенсвязывающий домен (например, полученный или происходящий от иммуноглобулина или иммуноглобулиноподобной молекулы, такой как TCR-связывающий домен, полученный или происходящий от TCR, специфичного к раковому антигену, scFv, полученный или происходящий от антитела, или антигенсвязывающий домен, полученный или происходящий от иммунорецептора-киллера из NK-клетки), связанный с трансмембранным доменом и одним или более внутриклеточными сигнальными доменами (необязательно содержащими костимулирующий домен(ы)) (см., например, Sadelain et al., *Cancer Discov.*, 3(4):388 (2013); см. также Harris and Kranz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 37(3):220 (2016), Stone et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 63(11):1163 (2014), и Walseng et al., *Scientific Reports* 7:10713 (2017), где конструкции CAR и способы их получения включены в настоящий документ посредством ссылки). CAR по настоящему изобретению, которые специфически связываются с антигеном WT1 (например, в контексте комплекса пептида и HLA) содержат домен V α TCR и домен V β .

В контексте настоящего описания "нуклеиновая кислота", или "молекула нуклеиновой кислоты", или "полинуклеотид" в некоторых аспектах относится к любой из дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), рибонуклеиновой кислоты (РНК), олигонуклеотидов, фрагментов, образуемых, например, при полимеразной цепной реакции (ПЦР) или путем трансляции *in vitro*, а также фрагментов, полученных в результате

лигирования, расщепления, эндонуклеазного или экзонуклеазного действия. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению получают с помощью ПЦР. Нуклеиновые кислоты могут состоять из мономеров, которые являются встречающимися в природе нуклеотидами (такими как дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды), аналогами встречающихся в природе нуклеотидов (например, α -энантиомерные формы встречающихся в природе нуклеотидов) или их комбинацией. Модифицированные нуклеотиды могут иметь модификации или замену сахарных фрагментов или фрагментов пиримидиновых или пуриновых оснований. Момеры нуклеиновых кислот могут быть связаны фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают фосфоротриат, фосфородитриат, фосфороселенат, фосфородиселенат, фосфороанилатриат, фосфоранилат, фосфорамидат и т. п. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными.

В некоторых аспектах термин "выделенный" означает, что материал удален из своей исходной среды (например, из природной среды, если он встречается в природе). Например, встречающаяся в природе нуклеиновая кислота или полипептид, присутствующие в живом животном, не являются выделенной, но та же самая нуклеиновая кислота или полипептид, отделенная от некоторых или всех сосуществующих материалов в природной системе является выделенной. Такая нуклеиновая кислота может быть частью вектора, и/или такая нуклеиновая кислота или полипептид может быть частью композиции (например, клеточного лизата) и при этом быть выделенной, поскольку такой вектор или композиция не является частью природной среды для нуклеиновой кислоты или полипептида. Термин "ген" относится к сегменту ДНК, участвующему в продуцировании полипептидной цепи; он включает области, предшествующие и следующие за "лидерной и трейлерной последовательностями" кодирующей области, а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами).

В контексте настоящего описания термин "рекомбинантный" в некоторых аспектах относится к клетке, микроорганизму, молекуле нуклеиновой кислоты или вектору, которые были генетически сконструированы путем вмешательства человека, то есть модифицированы введением экзогенной или гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, или относится к клетке или микроорганизму, которые были изменены таким образом, что экспрессия эндогенной молекулы или гена нуклеиновой кислоты является контролируемой, регулируемой или конститутивной. Генетические изменения, генерируемые человеком, могут включать, например, модификации, при которых происходит введение молекул нуклеиновой кислоты (которые могут включать элемент

контроля экспрессии, такой как промотор), кодирующих один или более белков или ферментов, или другие добавления, делеции, замены молекул нуклеиновой кислоты, или другие функциональные нарушения генетического материала клетки или его дополнения. Примеры модификаций включают модификации в кодирующих областях или их функциональных фрагментах гетерологичных или гомологичных полипептидов из эталонной или исходной молекулы.

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

"Консервативная замена" в некоторых аспектах относится в данной области техники к замене одной аминокислоты на другую аминокислоту, которая имеет аналогичные свойства. Примеры консервативных замен хорошо известны в данной области техники (см., например, WO 97/09433 на странице 10; Lehninger, Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc., NY, NY, pp.71-77, 1975; Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY and Cell Press, Cambridge, MA, p. 8, 1990).

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

Иллюстративные вирусные векторы включают ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированный вирус), коронавирусы, вирусы с отрицательной цепью РНК, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус

бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, вирус кори и Сендай), вирусы с положительной цепью РНК, такие как пикорнавирус и альфавирус, и вирусы с двухцепочечной ДНК, включая аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейн-Барра, цитомегаловирус) и поксвирус (например, коревой оспы, птичьей оспы и оспы канареек). Другие вирусы включают, например, вирус Норуолк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают лейкоз-саркому птиц, вирусы С-типа, В-типа, D-типа млекопитающих, группу HTLV (Т-лимфотропный вирус человека)-BLV (вирус лейкоза крупного рогатого скота), лентивирус, спумавирус (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

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

Термин "функционально связанный" в некоторых аспектах относится к ассоциации двух или более молекул нуклеиновой кислоты на одном фрагменте нуклеиновой кислоты, так что на функцию одной влияет другая. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, когда он способен влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т. е. кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора). "Несвязанный" относится к генетическим элементам, которые не связаны друг с другом тесно, и функция одного не влияет на другого.

В контексте настоящего документа термин "вектор экспрессии" в некоторых аспектах относится к конструкции ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, которая функционально связана с подходящей контрольной последовательностью, способной влиять на экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине. Такие контрольные последовательности включают промотор для осуществления транскрипции, необязательную последовательность оператора для контроля такой

транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие сайты связывания рибосом мРНК, и последовательности, которые контролируют завершение транскрипции и трансляции. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу, вирус или просто потенциальную геномную вставку. После введения в подходящего хозяина вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина или, в некоторых случаях, может интегрироваться в сам геном. В настоящем документе термины "плазида", "плазида экспрессии", "вирус" и "вектор" часто представляют собой взаимозаменяемые.

Термин "экспрессия", в контексте настоящего документа, в некоторых аспектах относится к процессу, посредством которого полипептид продуцируется на основе кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, такой как ген. Процесс может включать транскрипцию, посттранскрипционный контроль, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционный контроль, посттрансляционную модификацию или любую их комбинацию.

Термин "введенный" в контексте встраивания молекулы нуклеиновой кислоты в клетку в некоторых аспектах означает "трансфекцию", или "трансформацию", или "трансдукцию" и включает ссылку на включение молекулы нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, в которой молекула нуклеиновой кислоты может быть включена в геном клетки (например, хромосомную, плазмидную, пластидную или митохондриальную ДНК), преобразована в автономный репликон или временно экспрессирована (например, трансфицированная мРНК).

В контексте настоящего документа термин "гетерологичная" или "экзогенная" молекула, конструкция или последовательность нуклеиновой кислоты в некоторых аспектах относится к молекуле нуклеиновой кислоты или части молекулы нуклеиновой кислоты, которая не является нативной для клетки-хозяина, но может быть гомологичной молекуле нуклеиновой кислоты или части молекулы нуклеиновой кислоты из клетки-хозяина. Источник гетерологичной или экзогенной молекулы, конструкции или последовательности нуклеиновой кислоты может быть из другого рода или вида. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты добавляется (т. е. не является эндогенной или нативной) к клетке-хозяину или геному-хозяину, например, конъюгацией, трансформацией, трансфекцией, электропорацией и т. п., при этом добавленная молекула может интегрироваться в геном хозяина или существовать в виде внехромосомного генетического материала (например, в виде плазмиды или другой формы самореплицирующегося вектора) и может присутствовать во множестве копий. Кроме того, "гетерологичный" относится к

ненативному ферменту, белку или другой активности, кодируемой экзогенной молекулой нуклеиновой кислоты, введенной в клетку-хозяин, даже если клетка-хозяин кодирует гомологичный белок или активность. Более того, клетка, содержащая "модификацию" или "гетерологичный" полинуклеотид или связывающий белок, включает потомство этой клетки, независимо от того, трансдуцировалось ли, трансфицировалось ли или подвергалось иным манипуляциям или изменению это потомство.

Как описано в настоящем документе, более одной гетерологичной или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты можно ввести в клетку-хозяина как отдельные молекулы нуклеиновой кислоты, как множество индивидуально контролируемых генов, как молекулу полицистроновой нуклеиновой кислоты, как одну молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую слитый белок или любую их комбинацию. Например, как описано в настоящем документе, клетка-хозяин может быть модифицирована для экспрессии двух или более гетерологичных или экзогенных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих желаемый TCR, специфичный к антигенному пептиду WT1 (например, TCR α и TCR β). Когда две или более молекулы экзогенной нуклеиновой кислоты вводят в клетку-хозяина, подразумевается, что две или более молекулы экзогенной нуклеиновой кислоты могут быть введены как одна молекула нуклеиновой кислоты (например, в одном векторе), на отдельных векторах, интегрированных в хромосому хозяина в одном или более сайтах, или в любой их комбинации. Количество указанных гетерологичных молекул нуклеиновых кислот или активности белков относится к количеству кодирующих молекул нуклеиновых кислот или количеству активностей белка, а не к количеству отдельных молекул нуклеиновых кислот, введенных в клетку-хозяина.

В контексте настоящего документа термины "эндогенный" или "нативный" в некоторых аспектах относятся к гену, белку или активности, которые в норме присутствуют в клетке-хозяине. Более того, ген, белок или активность, которые мутированы, сверхэкспрессированы, перетасованы, дублированы или изменены иным образом по сравнению с исходным геном, белком или активностью, по-прежнему считаются эндогенными или нативными для этой конкретной клетки-хозяина. Например, эндогенную контрольную последовательность из первого гена (например, промотор, последовательности аттенуации трансляции) можно применять для изменения или регуляции экспрессии второго нативного гена или молекулы нуклеиновой кислоты, где экспрессия или регуляция второго нативного гена или молекулы нуклеиновой кислоты отличается от нормальной экспрессии или регуляции в родительской клетке.

В некоторых аспектах термин "гомологичный" или "гомолог" относится к молекуле или активности, обнаруженной или полученной из клетки-, вида- или штамма-хозяина.

Например, гетерологичная или экзогенная молекула нуклеиновой кислоты может быть гомологичной нативному гену клетки-хозяина и может необязательно иметь измененный уровень экспрессии, другую последовательность, измененную активность или любую их комбинацию.

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

В контексте настоящего документа термин "гемопозитическая клетка-предшественник" в некоторых аспектах может представлять собой клетку, которая может происходить из гемопозитических стволовых клеток или ткани плода и способна к дальнейшей дифференцировке в зрелые типы клеток (например, клетки иммунной системы). Иллюстративные гемопозитические клетки-предшественники включают клетки с фенотипом CD24^{Lo} Lin⁻ CD81⁺ или клетки, обнаруженные в тимусе (называемые предшественники тимоцитов).

В контексте настоящего документа термин "хозяин" в некоторых аспектах относится к клетке (например, Т-клетке) или микроорганизму, выбранному в качестве мишени для генетической модификации с помощью гетерологичной или экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты для получения полипептида, представляющего интерес (например, TCR к WT1 с высокой или повышенной аффинностью). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может необязательно уже обладать или быть модифицированной для включения других генетических модификаций, которые придают целевые свойства, связанные или не связанные с биосинтезом гетерологичного или экзогенного белка (например, включение детектируемого маркера; удаленный, измененный или усеченный эндогенный TCR; повышенная экспрессия костимулирующего фактора). В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяин генетически модифицированы для экспрессии белка или слитого белка, который модулирует передачу иммунных сигналов в клетке-хозяине, например, чтобы способствовать выживанию и/или расширению

преимущества модифицированной клетки (например, см. иммуномодулирующие слитые белки в патенте WO 2016/141357, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). В других вариантах осуществления клетки-хозяин генетически модифицированы для введения TCR, как определено в настоящем документе, или для нокдауна или минимизации иммуносупрессивных сигналов в клетке (например, в ингибиторе контрольной точки), эти модификации могут быть выполнены с применением, например, системы CRISPR/Cas (см., например, US 2014/0068797, патент США № 8,697,359; WO 2015/071474). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую клетку-предшественника человека, трансдуцированную гетерологичной или экзогенной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей цепь TCR α , специфичную к антигенному пептиду WT1.

В контексте настоящего документа термин "гиперпролиферативное расстройство" в некоторых аспектах относится к чрезмерному росту или пролиферации по сравнению с нормальной или здоровой клеткой. Примеры гиперпролиферативных расстройств включают опухоли, раки, неопластическую ткань, карциному, саркому, злокачественные клетки, предраковые клетки, а также неопухолевые или доброкачественные гиперпролиферативные расстройства (например, аденому, фиброму, липому, лейомиому, гемангиому, фиброз, рестеноз, а также аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, остеоартрит, псориаз, воспалительное заболевание кишечника и т. п.). Определенные заболевания, которые связаны с аномальным или чрезмерным ростом, который происходит медленнее, чем в контексте гиперпролиферативного заболевания, могут называться "пролиферативными заболеваниями" и включают определенные опухоли, виды рака, опухолевую ткань, карциному, саркому, злокачественные клетки, предраковые клетки, а также неопухолевые или доброкачественные расстройства.

Кроме того, "рак" может относиться к любой ускоренной пролиферации клеток, включая солидные опухоли, асцитные опухоли, опухоли крови или лимфы или другие злокачественные опухоли; злокачественные новообразования соединительной ткани; метастатическое заболевание; минимальное остаточное заболевание после трансплантации органов или стволовых клеток; рак с множественной лекарственной устойчивостью, первичные или вторичные злокачественные новообразования, ангиогенез, связанный со злокачественными новообразованиями, или другие формы рака.

TCR, специфичные к антигенным пептидам WT1 p37

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к Т-клеточному рецептору (TCR), специфичному к пептиду WT1 p37, содержащему (а) переменный домен α -цепи (V_α) Т-клеточного рецептора (TCR) и переменный домен β -цепи (V_β) TCR, имеющий

аминокислотную последовательность CDR3, указанную в любой из SEQ ID NO: 1-11, 181, 187, 193, 199, 205, 211, 217, 223, 229, 235 и 241, (b) домен V_{α} TCR, имеющий аминокислотную последовательность CDR3, указанную в любой из SEQ ID NO: 12-22, 178, 184, 190, 196, 202, 208, 214, 220, 226, 232 и 238, и домен V_{β} TCR, или (c) домен V_{α} TCR, имеющий аминокислотную последовательность CDR3, указанную в любой из SEQ ID NO: 12-22, 178, 184, 190, 196, 202, 208, 214, 220, 226, 232 и 238, и домен V_{β} TCR, имеющий аминокислотную последовательность CDR3, указанную в любой из SEQ ID NO: 1-11, 181, 187, 193, 199, 205, 211, 217, 223, 229, 235 и 241. Например, любой из TCR или их связывающих доменов по настоящему изобретению может специфически связываться с комплексом пептида WT1 p37 и HLA на поверхности клетки (например, Т-клетки) и/или может способствовать продукции $IFN\gamma$ при значении pEC_{50} 8,5 или выше (например, вплоть до приблизительно 8,6, вплоть до приблизительно 8,65, вплоть до приблизительно 8,7, вплоть до приблизительно 8,72, вплоть до приблизительно 8,75, вплоть до приблизительно 8,8, вплоть до приблизительно 9, вплоть до приблизительно 9,1, вплоть до приблизительно 9,2, вплоть до приблизительно 9,3, вплоть до приблизительно 9,4, приблизительно 9,5, вплоть до приблизительно 9,6, вплоть до приблизительно 9,68, вплоть до приблизительно 9,7, вплоть до приблизительно 9,75, вплоть до приблизительно 10, вплоть до приблизительно 10,5, вплоть до приблизительно 11, вплоть до приблизительно 11,5, вплоть до приблизительно 12, вплоть до приблизительно 12,5 или вплоть до приблизительно 13). В некоторых вариантах осуществления TCR по настоящему изобретению может специфически связываться с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) с продукцией $IFN\gamma$ при значении pEC_{50} 9,0 или выше, или с продукцией $IFN\gamma$ при значении pEC_{50} 9,0 или выше. В некоторых вариантах осуществления TCR или его связывающий домен (например, scTCR или его слитый белок) по настоящему изобретению может специфически связываться с комплексом пептида WT1 p37 и HLA и способствовать продукции $IFN\gamma$ при значении pEC_{50} от 8,5 до приблизительно 9,9 или от 8,6 до приблизительно 9,8, или от 8,7 до приблизительно 9,7, или от 8,75 до приблизительно 9,65, или тому подобное. Значение EC_{50} может составлять от приблизительно $1,1 \times 10^{-9}$ М до приблизительно $3,0 \times 10^{-10}$ М или любое промежуточное значение. В дополнительных примерах любой из TCR по настоящему изобретению может специфически связываться с комплексом пептида WT1 и HLA на поверхности клетки независимо от CD8 или в отсутствие CD8. В дополнительных вариантах осуществления TCR специфически связывается с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) с K_D менее или равной приблизительно 10^{-9} М. В некоторых вариантах осуществления HLA включает HLA-A*201. Пептидный антиген

VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) представляет собой пептидный антиген WT1 и соответствует аминокислотам 37-45 белка WT1.

В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, настоящее изобретение относится к Т-клеточному рецептору (TCR), содержащему α -цепь и β -цепь, где TCR связывается с комплексом WT1 и HLA-A*201 на поверхности Т-клеток и способствует (а) продукции IFN γ при значении EC_{50} 8,5 или выше (например, вплоть до приблизительно 9, вплоть до приблизительно 9,5, вплоть до приблизительно 10, приблизительно 10,5, приблизительно 11, приблизительно 11,5, приблизительно 12, приблизительно 12,5 или приблизительно 13) или (б) связывает клеточную поверхность независимо от CD8 или в его отсутствие.

В некоторых вариантах осуществления домен V_{β} содержит или происходит от TRBV7-6*01/TRBJ2-7*01, TRBV20-1*02/TRBJ2-7*01, TRBV15*02/TRBJ1-5*01, TRBV13*01/TRBJ2-5*01, TRAJ50*01/TRBJ2-7*01, TRBV11-3*01/TRBJ1-1*01, TRBV19*01/TRBJ1-6*02, TRBV27*01/TRBJ2-7*01, TRBV13*01/TRBJ2-7*01, TRBV11-1*01/TRBJ1 4*01 или TRBV4-3*01/TRBJ1-3*01. В дополнительных вариантах осуществления домен V_{α} содержит или происходит от TRAV21*02/TRAJ58*01, TRAV38-1*01/TRAJ40*01, TRAV29/DV5*01/TRAJ6*01, TRAV29/DV5*01/TRAJ20*01, TRAV41*01/TRAJ50*01, TRAV12-2*01/TRAJ11*01, TRAV1-2*01/TRAJ20*01, TRAV20*02/TRAJ8*01, TRAV26-1*02/TRAJ26*01, TRAV24*01/TRAJ48*01 или TRAV20*02/TRAJ37*02. В конкретных вариантах осуществления TCR содержит (а) домен V_{β} , содержащий или происходящий от TRBV7-6*01/TRBJ2-7*01, и домен V_{α} содержит или происходит от TRAV21*02/TRAJ58*01, (б) домен V_{β} содержит или происходит от TRBV27*01/TRBJ2-7*01, и домен V_{α} содержит или происходит от TRAV20*02/TRAJ8*01, или (с) домен V_{β} содержит или происходит от TRBV13*01/TRBJ2-5*01, и домен V_{α} содержит или происходит от TRAV29/DV5*01/TRAJ20*01.

В некоторых вариантах осуществления TCR по настоящему изобретению дополнительно содержит: (i) аминокислотную последовательность CDR1 α , указанную в любой из SEQ ID NO: 194, 176, 182, 188, 200, 206, 212, 218, 224, 230 и 236, или ее вариант, содержащий одну или две аминокислотные замены, где необязательно одна или две аминокислотные замены включают консервативную аминокислотную замену, и/или (ii) аминокислотную последовательность CDR2 α , указанную в любой из SEQ ID NO: 195, 177, 183, 189, 201, 207, 213, 219, 225, 231 и 237, или ее вариант, содержащий одну или две аминокислотные замены, где необязательно одна или две аминокислотные замены включают консервативную аминокислотную замену.

В некоторых вариантах осуществления TCR по настоящему изобретению

дополнительно содержит: (i) аминокислотную последовательность CDR1 β , указанную в любой из SEQ ID NO: 197, 179, 185, 191, 197, 203, 209, 215, 221, 227, 233 и 239, или ее вариант, содержащий одну или две аминокислотные замены, где необязательно одна или две аминокислотные замены включают консервативную аминокислотную замену, и/или (ii) аминокислотную последовательность CDR2 β , указанную в любой из SEQ ID NO: 198, 180, 186, 192, 204, 210, 216, 222, 228, 234 и 240, или ее вариант, содержащий одну или две аминокислотные замены, где необязательно одна или две аминокислотные замены включают консервативную аминокислотную замену.

В некоторых вариантах осуществления TCR по настоящему изобретению содержит аминокислотные последовательности CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β и CDR3 β , указанные в: (i) SEQ ID NO: 194, 195, 196 или 12, 197, 198 и 199 или 1 соответственно, (ii) SEQ ID NO: 176, 177, 178 или 18, 179, 180 и 181 или 7 соответственно, (iii) SEQ ID NO: 182, 183, 184 или 20, 185, 186 и 187 или 9 соответственно, (iv) SEQ ID NO: 188, 189, 190 или 21, 191, 192 и 193 или 10 соответственно, (v) SEQ ID NO: 200, 201, 202 или 13, 203, 204 и 205 или 2 соответственно, (vi) SEQ ID NO: 206, 207, 208 или 14, 209, 210 и 211 или 3 соответственно, (vii) SEQ ID NO: 212, 213, 214 или 15, 215, 216 и 217 или 4 соответственно, (viii) SEQ ID NO: 218, 219, 220 или 17, 221, 222 и 223 или 6 соответственно, (ix) SEQ ID NO: 224, 225, 226 или 19, 227, 228 и 229 или 8 соответственно, (x) SEQ ID NO: 230, 231, 232 или 22, 233, 234 и 235 или 11 соответственно, или (xi) SEQ ID NO: 236, 237, 238 или 16, 238, 240 и 241 или 5 соответственно.

Любой полипептид по настоящему изобретению может, как кодируемый полинуклеотидной последовательностью, содержать "сигнальный пептид" (также известный как лидерная последовательность, лидерный пептид или транзитный пептид). Сигнальные пептиды нацелены на вновь синтезированные полипептиды в их подходящее место внутри или вне клетки. Сигнальный пептид может быть удален из полипептида во время или после завершения локализации или секреции. Полипептиды, которые имеют сигнальный пептид, обозначены в настоящем документе как "белок-предшественник", а полипептиды, у которых удален сигнальный пептид, обозначены в настоящем документе как "зрелые" белки или полипептиды. В любом из вариантов осуществления связывающий белок или слитый белок включает или представляет собой зрелый белок, или представляет собой или включает белок-предшественник.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-19 SEQ ID NO: 23 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен V β TCR представляет собой домен V β зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23 с удаленными

состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29 с удаленными аминокислотными остатками 1-19 SEQ ID NO: 29 (т. е. домен V β TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 248).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-19 SEQ ID NO: 30 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен V β TCR представляет собой домен V β зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30 с удаленными аминокислотными остатками 1-19 SEQ ID NO: 30 (т. е. домен V β TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 249).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-29 SEQ ID NO: 31 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен V β TCR представляет собой домен V β зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31 с удаленными аминокислотными остатками 1-29 SEQ ID NO: 31 (т. е. домен V β TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 250).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-19 SEQ ID NO: 32 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен V β TCR представляет собой домен V β зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32 с удаленными аминокислотными остатками 1-19 SEQ ID NO: 32 (т. е. домен V β TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 251).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-19 SEQ ID NO: 33 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен V β TCR представляет собой домен V β зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33 с удаленными аминокислотными остатками 1-19 SEQ ID NO: 33 (т. е. домен V β TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 252).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-19 SEQ ID NO: 34 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен V α TCR представляет собой домен V α зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34 с удаленными аминокислотными остатками 1-19 SEQ ID NO: 34 (т. е. домен V α TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 253).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-20 SEQ ID NO: 35 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах

осуществления домен $V\alpha$ TCR представляет собой домен $V\alpha$ зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35 с удаленными аминокислотными остатками 1-20 SEQ ID NO: 35 (т. е. домен $V\alpha$ TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 254).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-26 SEQ ID NO: 36 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен Va TCR представляет собой домен Va зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36 с удаленными аминокислотными остатками 1-26 SEQ ID NO: 36 (т. е. домен Va TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 255).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-26 SEQ ID NO: 37 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен Va TCR представляет собой домен Va зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37 с удаленными аминокислотными остатками 1-26 SEQ ID NO: 37 (т. е. домен Va TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 256).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-22 SEQ ID NO: 38 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен Va TCR представляет собой домен Va зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38 с удаленными аминокислотными остатками 1-22 SEQ ID NO: 38 (т. е. домен Va TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 257).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-21 SEQ ID NO: 39 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен Va TCR представляет собой домен Va зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39 с удаленными аминокислотными остатками 1-21 SEQ ID NO: 39 (т. е. домен Va TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 258).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-17 SEQ ID NO: 40 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен Va TCR представляет собой домен Va зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40 с удаленными аминокислотными остатками 1-17 SEQ ID NO: 40 (т. е. домен Va TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 259).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-21 SEQ ID NO:

41 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен V α TCR представляет собой домен V α зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41 с удаленными аминокислотными остатками 1-21 SEQ ID NO: 41 (т. е. домен V α TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 260).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-17 SEQ ID NO: 42 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен V α TCR представляет собой домен V α зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42 с удаленными аминокислотными остатками 1-17 SEQ ID NO: 42 (т. е. домен V α TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 261).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-22 SEQ ID NO: 43 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен V α TCR представляет собой домен V α зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43 с удаленными аминокислотными остатками 1-22 SEQ ID NO: 43 (т. е. домен V α TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 262).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки 1-21 SEQ ID NO: 44 представляют собой или содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления домен V α TCR представляет собой домен V α зрелого TCR и содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44 с удаленными аминокислотными остатками 1-21 SEQ ID NO: 44 (т. е. домен V α TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 263).

В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный рецептор (TCR), специфичный к комплексу пептида WT1 и HLA, имеет домен V α , который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 253-263 и 34-33, имеет домен V β , который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 242-252 и 23-33, или любой их комбинации. В конкретных вариантах осуществления домен V α содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34, и домен V β содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23. В дополнительных конкретных вариантах осуществления (а) домен V α содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41, и домен V β содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30, (б) домен V α содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37, и домен V β содержит или состоит из аминокислотной последовательности

SEQ ID NO: 26, или (с) домен V_{α} содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42, и домен V_{β} содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31. В дополнительных конкретных вариантах осуществления домен V_{α} содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, и домен V_{β} содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления домен V_{α} и домен V_{β} содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO: (i) 253 и 242 соответственно, (ii) 259 и 248 соответственно, (iii) 261 и 250 соответственно, (iv) 262 и 251 соответственно, (v) 257 и 246 соответственно, (vi) 254 и 243 соответственно, (vii) 255 и 244 соответственно, (viii) 256 и 245 соответственно, (ix) 258 и 247 соответственно, (x) 260 и 249 соответственно, (xi) 263 и 252 соответственно, (xii) 34 и 23 соответственно, (xiii) 40 и 29 соответственно, (xiv) 42 и 31 соответственно, (xv) 43 и 32 соответственно, (xvi) 35 и 24 соответственно, (xvii) 36 и 25 соответственно, (xviii) 37 и 26 соответственно, (xix) 39 и 28 соответственно, (xx) 41 и 30 соответственно, (xxi) 44 и 33 соответственно или (xxii) 38 и 27 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный TCR с высокой функциональной авидностью, специфичный к пептиду WT1 p37, как определено в настоящем документе, включает разновидности варианта полипептида, которые имеют одну или более аминокислотных замен, вставок или делеций в аминокислотной последовательности относительно аминокислотных последовательностей любой одной или более из SEQ ID NO: 48-58, как определено в настоящем документе, при условии, что CDR3 не изменены и TCR сохраняет или по существу сохраняет свою специфическую функцию связывания WT1 p37.

Консервативные замены аминокислот хорошо известны и могут происходить естественным путем или могут быть введены при рекомбинантном продуцировании TCR. Аминокислотные замены, делеции и добавления могут быть введены в белок с применением способов мутагенеза, известных в данной области техники (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001). Олигонуклеотид-направленные сайт-специфические (или сегментоспецифические) способы мутагенеза можно применять для получения измененного полинуклеотида, имеющего определенные кодоны, измененные в соответствии с желаемой заменой, делецией или вставкой. В качестве альтернативы, способы случайного или насыщающего мутагенеза, такие как мутагенез с аланиновым сканированием, мутагенез с использованием полимеразной цепной реакции сниженной

точности и олигонуклеотид-направленный мутагенез, можно применять для получения вариантов полипептидов иммуногена (см., например, Sambrook et al., выше).

Множество критериев, известных специалистам в данной области техники, показывают, является ли аминокислота, которая замещена в конкретном положении в пептиде или полипептиде, консервативной (или подобной). Например, подобная аминокислота или консервативная аминокислотная замена представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. Подобные аминокислоты могут быть включены в следующие категории: аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), аминокислоты с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), аминокислоты с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, гистидин), аминокислоты с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), аминокислоты с бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и аминокислоты с ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан). Пролин, который считается более сложным для классификации, имеет общие свойства с аминокислотами, имеющими алифатические боковые цепи (например, лейцин, валин, изолейцин и аланин). В определенных обстоятельствах замена глутамин на глутаминовую кислоту или аспарагин на аспарагиновую кислоту может считаться подобной заменой в том смысле, что глутамин и аспарагин являются амидными производными глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты соответственно. Как известно в данной области техники, "сходство" между двумя полипептидами определяется путем сравнения аминокислотной последовательности и консервативных аминокислотных замен полипептида с последовательностью второго полипептида (например, с применением GENWORKS, Align, алгоритма BLAST или других алгоритмов, описанных в настоящем документе и практикуемых в данной области техники).

Варианты TCR дикого типа или его связывающего домена, специфичных к комплексу антигена WT1 p37 и MHC могут включать TCR, имеющий по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или 100% идентичность аминокислотной последовательности с любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей по настоящему изобретению (например, SEQ ID NO: 23-58), при условии, что ни CDR3 домена V_{β} , ни CDR3 домена V_{α} не содержат изменений, и изменения в других частях не снижают функциональную avidность (или относительную аффинность) более чем на 10 %, 15 % или 20 % по

сравнению с TCR дикого типа. В некоторых необязательных вариантах осуществления вариант TCR дополнительно не содержит изменений в аминокислотной последовательности CDR1 домена V_α , CDR2 домена V_α , CDR1 домена V_β , CDR2 домена V_β или любой их комбинации, как указано в любой из SEQ ID NO: 34-44 (исходный домен V_α) или как указано в любой из SEQ ID NO: 23-33 (исходный домен V_β). В каждом из этих вариантов осуществления TCR сохраняет свою способность специфически индуцировать продукцию $IFN\gamma$ при значении pEC_{50} 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или выше, или TCR сохраняет свою способность специфически связываться с комплексом пептидного антигена и HLA (например, комплекс VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и HLA) с K_D менее или равной приблизительно 10^{-9} М, и специфически связывает в 1,5 раза, в 2 раза, в 2,5 раза, в 3 раза, в 3,3 раза, в 3,5 раза, вплоть до 5 раз лучше, чем TCR дикого типа, состоящий из любой из SEQ ID NO: 48-58.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к р37-специфическому TCR или его связывающему домену, содержащему (а) вариабельный домен α -цепи (V_α) TCR, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 34-35 и 38-44, и вариабельный домен β -цепи (V_β) TCR, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 23-25, 27, 28, 30, 32 и 33, (b) домен V_α TCR, имеющий по меньшей мере 92% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 или 37, и домен V_β TCR, имеющий по меньшей мере 90%, например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, как указано в любой из SEQ ID NO: 23-25, 27, 28, 30, 32 и 33, или (c) домен V_α TCR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34-44, и домен V_β TCR, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, как указано в любой из SEQ ID NO: 23-25, 27, 28, 30, 32 и 33.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к р37-специфическому TCR или его связывающему домену, содержащему (а) домен V_α TCR, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 34-35 и 38-44, и домен V_β , имеющий по меньшей мере 92% (например, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29, (b) домен V_α TCR, имеющий по меньшей мере 92% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 или 37, и

домен V_{β} TCR, имеющий по меньшей мере 92% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29, или (с) домен V_{α} TCR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34-44, и домен V_{β} TCR, имеющий по меньшей мере 92% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29.

В еще дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к р37-специфическому TCR или его связывающему домену, содержащему (а) домен V_{α} TCR, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 34-35 и 38-44, и домен V_{β} , имеющий по меньшей мере 93% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31, (b) домен V_{α} TCR, имеющий по меньшей мере 92% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 или 37, и домен V_{β} TCR, имеющий по меньшей мере 93% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31, или (с) домен V_{α} TCR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34-44, и домен V_{β} TCR, имеющий по меньшей мере 93% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к р37-специфическому TCR или его связывающему домену, содержащему (а) домен V_{α} TCR, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 34-35 и 38-44, и домен V_{β} , имеющий по меньшей мере 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26, (b) домен V_{α} TCR, имеющий по меньшей мере 92% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 или 37, и домен V_{β} TCR, имеющий по меньшей мере 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26, или (с) домен V_{α} TCR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34-44, и домен V_{β} TCR, имеющий по меньшей мере 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к р37-специфическому TCR или его связывающему домену, содержащему (а) домен V_{α} TCR, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 34-35 и 38-44, и домен V_{β} , содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 23-33, (b) домен V_{α} TCR, имеющий по меньшей мере 92% идентичность

последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 или 37, и домен V_{β} TCR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 23-33, или (с) домен V_{α} TCR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34-44, и домен V_{β} TCR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 23-33.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления TCR обладает способностью связываться с комплексом пептида WT1 p37 VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и HLA на клеточной (например, Т-клеточной) поверхности и специфически индуцировать продукцию $IFN\gamma$ при значении pEC_{50} 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или выше, и/или TCR обладает способностью специфически связываться с комплексом пептида WT1 VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и HLA на клеточной поверхности независимо от или в отсутствии CD8. В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления домен V_{β} не содержит изменений в аминокислотной последовательности CDR1 и/или CDR2 по сравнению с CDR1 и/или CDR2, соответственно, представленными в любой из SEQ ID NO: 23-33.

В некоторых вариантах осуществления любой из вышеупомянутых Т-клеточных рецепторов (TCR), специфичных к пептиду WT1 p37, может представлять собой антигенсвязывающий фрагмент TCR. В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR включает одноцепочечный TCR (scTCR), который может содержаться в химерном антигенном рецепторе (CAR). В некоторых вариантах осуществления изобретения WT1 p37-специфический TCR представляет собой многоцепочечный связывающий белок, например, содержащий α -цепь TCR, содержащую домен V_{α} и константный домен α -цепи, где константный домен α -цепи TCR имеет по меньшей мере приблизительно 90% идентичность последовательности (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47, и β -цепь TCR, содержащую домен V_{β} и константный домен β -цепи, где константный домен β -цепи TCR имеет по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 45 или 46. В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к WT1 p37-специфическому TCR, содержащему или состоящему из константного домена α -цепи, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и/или содержащему или состоящему из константного домена β -цепи, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 или 46.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

WT1 p37-специфическому TCR, содержащему α -цепь TCR, содержащую домен V_α и константный домен α -цепи, где: (а) домен V_α имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 34-35 и 38-44, и константный домен α -цепи имеет по меньшей мере приблизительно 98% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47, или (б) домен V_α имеет по меньшей мере 92% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 или 37, и константный домен α -цепи имеет по меньшей мере 98% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47.

В некоторых вариантах осуществления TCR содержит α -цепь TCR, содержащую домен V_α и константный домен α -цепи, где: (а) домен V_α содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 242-252 и 34-44, а константный домен α -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, или (б) домен V_α состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 242-252 и 34-44, и константный домен α -цепи имеет по меньшей мере 90% идентичность с (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%), содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47.

В некоторых вариантах осуществления представлен константный домен α -цепи, а домен V_α и константный домен α -цепи вместе образуют α -цепь TCR. В некоторых вариантах осуществления представлен константный домен β -цепи, а домен V_β и константный домен β -цепи вместе образуют β -цепь TCR.

В некоторых вариантах осуществления TCR содержит scTCR, или обеспечен scTCR, который является производным от TCR по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит CAR, или обеспечен CAR, который является производным (например, содержит один или более вариабельных доменов) от TCR по настоящему изобретению.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей WT1-специфичный рекомбинантный TCR с высокой функциональной авидностью или его связывающий домен в соответствии с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Способы, пригодные для выделения и очистки рекомбинантно продуцируемого растворимого TCR, в качестве примера, могут включать получение супернатантов из подходящих систем клетка-хозяин/вектор, которые секретируют рекомбинантный

растворимый TCR в культуральную среду, а затем концентрирование среды с применением коммерчески доступного фильтра. После концентрирования концентрат можно наносить на единственную подходящую очищающую матрицу или на ряд подходящих матриц, таких как аффинная матрица или ионообменная смола. Для дополнительной очистки рекомбинантного полипептида можно использовать одну или более стадий обращенно-фазовой ВЭЖХ. Такие способы очистки также можно применять при выделении иммуногена из его естественной среды. Способы крупномасштабного производства одного или более выделенных/рекомбинантных растворимых TCR, описанных в настоящем документе, включают периодическую подпитку культуры клеток, которую отслеживают и контролируют для поддержания соответствующих условий культивирования. Очистку растворимого TCR можно проводить в соответствии со способами, описанными в настоящем документе и известными в данной области техники, которые соответствуют законам и руководящим принципам национальных и зарубежных регулирующих органов.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие TCR с высокой аффинностью или высокой функциональной авидностью, специфичные к пептиду WT1 p37 в комплексе с МНС, применяли для трансфекции/трансдукции клетки-хозяина (например, Т-клеток) для применения в адоптивной трансферной терапии. В уровне техники описаны достижения в секвенировании TCR (например, Robins et al., Blood 114:4099, 2009; Robins et al., Sci. Translat. Med. 2:47ra64, 2010; Robins et al., (Sept. 10) J. Imm. Meth. Epub ahead of print, 2011; Warren et al., Genome Res. 21:790, 2011), и их можно применять при практической реализации вариантов осуществления по настоящему изобретению. Точно так же были описаны способы трансфекции/трансдукции Т-клеток желаемыми нуклеиновыми кислотами (например, патентная заявка US 2004/0087025), а также способы адоптивного переноса с применением Т-клеток с желаемой антигенной специфичностью (например, Schmitt et al., Hum. Gen. 20:1240, 2009; Dossett et al., Mol. Ther. 17:742, 2009; Till et al., Blood 112:2261, 2008; Wang et al., Hum. Gene Ther. 18:712, 2007; Kuball et al., Blood 109:2331, 2007; US 2011/0243972; US 2011/0189141; Leen et al., Ann. Rev. Immunol. 25:243, 2007), таким образом предполагается адаптация указанных способов к раскрытым в настоящей заявке вариантам осуществления, на основе сведений, приведенных в настоящем документе, включая относящиеся к TCR с повышенной аффинностью, специфичным к пептидным антигенам WT1, образующих комплекс с рецептором HLA.

WT1-специфичные TCR или их связывающие домены, описанные в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 23-58 и их варианты, не относящиеся к CDR3), могут быть функционально охарактеризованы в соответствии с любым из большого числа

принятых в данной области техники способов для анализа активности Т-клеток, включая определение связывания, активации или индукции Т-клеток, а также определение антигенспецифических ответов Т-клеток. Примеры включают определение пролиферации Т-клеток, высвобождения цитокинов Т-клетками, антигенспецифической стимуляции Т-клеток, стимуляции Т-клеток, рестриктированных по МНС, активности цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (например, путем обнаружения высвобождения ^{51}Cr из клеток-мишеней с предварительной нагрузкой), изменений в экспрессии фенотипических маркеров Т-клеток и других показателей функций Т-клеток. Процедуры проведения указанных и подобных им анализов можно найти, например, в публикации Lefkovits (*Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*, 1998). См. также *Current Protocols in Immunology*; Weir, *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986); Mishell and Shigii (eds.) *Selected Methods in Cellular Immunology*, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979); Green and Reed, *Science* 281:1309 (1998) и цитируемые в них источники.

Полинуклеотиды, кодирующие TCR, специфичные к антигенным пептидам WT1 p37

Гетерологичные, выделенные или рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) с высокой аффинностью или высокой функциональной авидностью или его связывающий домен (например, scTCR или его слитый белок), специфичный к пептиду WT1 p37, как описано в настоящем документе, могут быть получены и приготовлены в соответствии с различными способами и методами, описанным в настоящем документе (см. Примеры). Конструирование вектора экспрессии, применяемого для рекомбинантного получения сконструированного TCR с высокой аффинностью или высокой функциональной авидностью или его связывающего домена, специфичного к пептиду WT1 p37, представляющему интерес, может быть выполнено с применением любых подходящих способов генной инженерии в области молекулярной биологии, известных в данной области техники, включая применение расщепления рестрикционной эндонуклеазой, лигирования, трансформации, очистки плазмиды и секвенирования ДНК, например, как описано в Sambrook, et al. (1989 and 2001 editions; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) и Ausubel, et al. (*Current Protocols in Molecular Biology* (2003)). Для обеспечения эффективной транскрипции и трансляции полинуклеотид в каждой рекомбинантной конструкции экспрессии включает по меньшей мере одну подходящую последовательность контроля экспрессии (также называемую регуляторной последовательностью), такую как лидерная последовательность и, в частности, промотор, функционально (то есть эффективно) связанный с нуклеотидной последовательностью,

кодирующей иммуноген.

Некоторые варианты осуществления относятся к нуклеиновым кислотам, которые кодируют полипептиды, описанные в настоящем документе, например, сконструированные TCR с высокой аффинностью или высокой функциональной авидностью или их связывающий домен, специфичные к комплексу пептида WT1 p37 и МНС. Как будет понятно специалисту в данной области техники, нуклеиновая кислота может относиться к одноцепочечной или двухцепочечной ДНК, кДНК или РНК в любой форме и может включать положительную и отрицательную цепи нуклеиновой кислоты, которые дополняют друг друга, включая антисмысловые ДНК, кДНК и РНК. Также включены миРНК, микроРНК, гибриды РНК-ДНК, рибозимы и другие различные природные или синтетические формы ДНК или РНК.

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе представлены выделенные полинуклеотиды, кодирующие сконструированный (например, кодон-оптимизированный) TCR с высокой функциональной авидностью или его связывающий домен по настоящему изобретению, специфичный к пептиду WT1 p37, где домен V_{α} может кодироваться полинуклеотидом, по меньшей мере на 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 % или 100 % идентичным нуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 97, 98 и 101-107. В конкретных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует домен V_{α} , содержащий или состоящий из нуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 97-107. В дополнительных вариантах осуществления в настоящем документе представлены полинуклеотиды, кодирующие сконструированный TCR с высокой функциональной авидностью или его связывающий домен по настоящему изобретению, специфичный к пептиду WT1 p37, где домен V_{β} кодируется полинуклеотидом, по меньшей мере на 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 % или 100 % идентичным нуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 75-77, 79, 82, 84 и 85. В конкретных вариантах осуществления домен V_{β} кодируется полинуклеотидом, содержащим или состоящим из нуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 75-85.

В некоторых вариантах осуществления TCR или его связывающий домен, представленный в настоящем документе, содержит домен V_{α} , кодируемый полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 75% (75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или 100%) идентичность последовательности с полинуклеотидной

последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 97, 98 и 101-107, или домен V_{α} , кодируемый полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 94% идентичность последовательности с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 99 или 100, или домен V_{α} , кодируемый полинуклеотидом, содержащим или состоящим из последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 97-107, и домен V_{β} , кодируемый полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 75% идентичность последовательности с полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 75-77, 79, 82, 84 и 85, или домен V_{β} , кодируемый полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 95% идентичность последовательности с полинуклеотидной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 78, 80, 81 и 83, или домен V_{β} , кодируемый полинуклеотидом, содержащим или состоящим из нуклеотидной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 75-85.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления полинуклеотид, кодирующий домен V_{α} , домен V_{β} или оба эти домена, может дополнительно кодировать константный домен α -цепи или константный домен β -цепи соответственно. В некоторых вариантах осуществления TCR по настоящему изобретению содержит константный домен α -цепи TCR, где константный домен α -цепи кодируется полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере от 98 до 100 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 110. В конкретных вариантах осуществления константный домен α -цепи кодируется полинуклеотидом, содержащим или состоящим из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 110. В дополнительных вариантах осуществления, представленных в настоящем документе, константный домен β -цепи, кодируемый полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере от 99,9 до 100 % идентичности последовательности с SEQ ID NO: 108 или 109. В конкретных вариантах осуществления константный домен β -цепи кодируется полинуклеотидом, содержащим или состоящим из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 108 или 109.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления полинуклеотид, кодирующий TCR, содержит α -цепь TCR, β -цепь TCR или обе эти цепи. В некоторых вариантах осуществления TCR по настоящему изобретению кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидной последовательностью, кодирующей α -цепь TCR, и полинуклеотидной последовательностью, кодирующей β -цепь TCR. Иллюстративные саморасщепляющиеся пептиды содержат аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 60-63, или состоят из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 60-63. Такие саморасщепляющиеся пептиды

могут кодироваться полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 166-170, или кодироваться полинуклеотидом, состоящим из полинуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 166-170.

В некоторых вариантах осуществления α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR кодируются полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 95% (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичность с любой из SEQ ID NO: 155-165. В дополнительных вариантах осуществления α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 155-165, или кодируются полинуклеотидом, состоящим из последовательности любого из полинуклеотидов SEQ ID NO: 155-165. В других вариантах осуществления кодируемая α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичность с любым из полипептидов с SEQ ID NO: 48-58, или кодируемая α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR содержит или состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 48-58.

В любом из вариантов осуществления полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, может дополнительно содержать: (i) полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит внеклеточную часть α -цепи корецептора CD8, где необязательно кодируемый полипептид представляет собой или содержит α -цепь корецептора CD8, (ii) полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит внеклеточную часть β -цепи корецептора CD8, где необязательно кодируемый полипептид представляет собой или содержит β -цепь корецептора CD8, или (iii) полинуклеотид (i) и полинуклеотид (ii). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, в некоторых вариантах осуществления ко-экспрессия или одновременная экспрессия связывающего белка и белка корецептора CD8 или его части, функциональной для связывания с молекулой HLA, может улучшить одну или более желаемых активностей клетки-хозяина (например, иммунной клетки, такой как Т-клетка, необязательно CD4⁺ Т-клетка) по сравнению с экспрессией только связывающего белка. Следует понимать, что полинуклеотид, кодирующий связывающий белок, и полинуклеотид, кодирующий полипептид корецептора CD8, могут присутствовать на одной молекуле нуклеиновой кислоты (например, в одном векторе экспрессии) или могут присутствовать на отдельных молекулах нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления полинуклеотид содержит: (a) полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть α -цепи корецептора CD8, (b) полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий

внеклеточную часть β -цепи корецептора CD8, и (с) полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом (а) и полинуклеотидом (b). В дополнительных вариантах осуществления полинуклеотид содержит полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, и расположен между: (1) полинуклеотидом, кодирующим связывающий белок (например, TCR по настоящему изобретению), и полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий внеклеточную часть α -цепи корецептора CD8, и/или (2) полинуклеотидом, кодирующим связывающий белок, и полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий внеклеточную часть β -цепи корецептора CD8.

В других вариантах осуществления полинуклеотид может содержать функционально связанные внутри рамки считывания: (i) (pnCD8 α)-(pnSCP1)-(pnCD8 β)-(pnSCP2)-(pnTCR); (ii) (pnCD8 β)-(pnSCP1)-(pnCD8 α)-(pnSCP2)-(pnTCR); (iii) (pnTCR)-(pnSCP1)-(pnCD8 α)-(pnSCP2)-(pnCD8 β); (iv) (pnTCR)-(pnSCP1)-(pnCD8 β)-(pnSCP2)-(pnCD8 α); (v) (pnCD8 α)-(pnSCP1)-(pnTCR)-(pnSCP2)-(pnCD8 β) или (vi) (pnCD8 β)-(pnSCP1)-(pnTCR)-(pnSCP2)-(pnCD8 α), где pnCD8 α представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит внеклеточную часть α -цепи корецептора CD8, где pnCD8 β представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит внеклеточную часть α -цепи корецептора CD8, где pnTCR представляет собой полинуклеотид, кодирующий TCR, и где каждый pnSCP1 и pnSCP2 независимо представляют собой полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, где полинуклеотиды и/или кодируемые саморасщепляющиеся пептиды необязательно являются одинаковыми или различными (например, P2A, T2A, F2A, E2A).

В некоторых вариантах осуществления кодируемый TCR содержит цепь TCR α и цепь TCR β , где полинуклеотид содержит полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом, кодирующим цепь TCR α , и полинуклеотидом, кодирующим цепь TCR β . В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит функционально связанные внутри рамки считывания: (i) (pnCD8 α)-(pnSCP1)-(pnCD8 β)-(pnSCP2)-(pnTCR β)-(pnSCP3)-(pnTCR α); (ii) (pnCD8 β)-(pnSCP1)-(pnCD8 α)-(pnSCP2)-(pnTCR β)-(pnSCP3)-(pnTCR α); (iii) (pnCD8 α)-(pnSCP1)-(pnCD8 β)-(pnSCP2)-(pnTCR α)-(pnSCP3)-(pnTCR β); (iv) (pnCD8 β)-(pnSCP1)-(pnCD8 α)-(pnSCP2)-(pnTCR α)-(pnSCP3)-(pnTCR β); (v) (pnTCR β)-(pnSCP1)-(pnTCR α)-(pnSCP2)-(pnCD8 α)-(pnSCP3)-(pnCD8 β); (vi) (pnTCR β)-(pnSCP1)-(pnTCR α)-(pnSCP2)-(pnCD8 β)-(pnSCP3)-(pnCD8 α); (vii) (pnTCR α)-(pnSCP1)-(pnTCR β)-(pnSCP2)-(pnCD8 α)-(pnSCP3)-(pnCD8 β) или (viii) (pnTCR α)-(pnSCP1)-(pnTCR β)-(pnSCP2)-(pnCD8 β)-(pnSCP3)-(pnCD8 α), где pnCD8 α представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид,

который содержит внеклеточную часть α -цепи ко-рецептора CD8, где $\text{pnCD8}\beta$ представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит внеклеточную часть α -цепи корецептора CD8, где $\text{pnTCR}\alpha$ представляет собой полинуклеотид, кодирующий α -цепь TCR, где $\text{pnTCR}\beta$ представляет собой полинуклеотид, кодирующий β -цепь TCR, и где каждый из pnSCP_1 , pnSCP_2 и pnSCP_3 независимо представляет собой полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, где полинуклеотиды и/или кодируемые саморасщепляющиеся пептиды необязательно являются одинаковыми или различными.

В дополнительных вариантах осуществления связывающий белок экспрессируется как часть трансгенной конструкции, которая кодирует, и/или клетка-хозяин по настоящему изобретению может кодировать: один или более дополнительных аксессуарных белков, таких как белок-предохранитель, метка, маркер отбора, β -цепь корецептора CD8, α -цепь корецептора CD8 или обе цепи, или любую их комбинацию. Полинуклеотиды и трансгенные конструкции, пригодные для кодирования и экспрессии связывающих белков и аксессуарных компонентов (например, одного или более из белков-предохранителей, маркера отбора, β -цепи корецептора CD8 или α -цепи корецептора CD8), описаны в РСТ заявке PCT/US2017/053112, описанные в которой полинуклеотиды, трансгенные конструкции и аксессуарные компоненты, включая нуклеотидные и аминокислотные последовательности, настоящим включены посредством ссылки. Специалисту в данной области техники будет ясно, что любой или все связывающие белки по настоящему изобретению, белок-предохранитель, метка, маркер отбора, β -цепь корецептора CD8 или α -цепь корецептора CD8 могут кодироваться единственной молекулой нуклеиновой кислоты или могут кодироваться полинуклеотидными последовательностями, которые представляют собой или присутствуют на отдельных молекулах нуклеиновых кислот.

Примеры белков-предохранителей включают, например, усеченный полипептид рецептора EGF (huEGFRt) (EGF - эпидермальный фактор роста), который лишен внеклеточных N-концевых лигандсвязывающих доменов и активности внутриклеточной рецепторной тирозинкиназы, но который сохраняет свою нативную аминокислотную последовательность, имеет трансмембранную локализацию на клеточной поверхности типа I и конформационно интактный связывающий эпитоп для моноклонального антитела к EGFR фармацевтической категории, tEGF рецептор цетуксимаба (Erbix) (tEGFr , Wang et al., Blood 118:1255-1263, 2011), полипептид каспазы (например, iCasp9, Straathof et al., Blood 105:4247-4254, 2005, Di Stasi et al., N. Engl. J. Med. 365: 1673-1683, 2011, Zhou and Brenner, Exp. Hematol. pii:S0301-472X(16)30513-6. doi:10.1016/j.exphem.2016.07.011), RQR8 (Philip et al., Blood 124:1277-1287, 2014), метку из 10 аминокислот, полученную из человеческого белка c-мус (Myc) (Kieback et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 623-628, 2008), и

полипептид маркера/предохранителя, такой как RQR (CD20 + CD34, Philip et al., 2014).

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

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

Дополнительные иллюстративные маркеры отбора также включают несколько усеченных трансмембранных белков I типа, в норме не экспрессируемых на Т-клетках: усеченный низкоаффинный фактор роста нервов, усеченный CD19 и усеченный CD34 (см., например, Di Stasi et al., N. Engl. J. Med. 365:1673-1683, 2011, Mavilio et al., Blood 83:1988-1997, 1994, Fehse et al., Mol. Ther. 1:448-456, 2000, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Полезным признаком CD19 и CD34 является наличие готовой системы отбора Miltenyi CliniMACs™, которая может осуществлять направленное воздействие таких маркеров для сортировки клинического уровня. Однако CD19 и CD34 представляют собой относительно большие поверхностные

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

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

В отношении полипептидов RQR, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, расстояние эпитопа или последовательности-мишени от поверхности клетки-хозяина может быть важным для полипептидов RQR для функционирования в качестве маркеров отбора/предохранителей (Philip et al., 2010 (см. выше)). В некоторых вариантах осуществления кодируемый полипептид RQR содержится в β -цепи, α -цепи или в обеих цепях, или в фрагменте или варианте одной или обеих цепей кодируемого корцептора CD8. В конкретных вариантах осуществления модифицированная клетка-хозяин содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий iCasp9, и гетерологичный полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный белок корцептора CD8, который содержит β -цепь, содержащую полипептид RQR, и дополнительно содержит α -цепь CD8.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления полинуклеотид, кодирующий, например, TCR или его связывающий домен, или корцептор CD8, или его внеклеточную часть по настоящему изобретению, представляет собой кодон, оптимизированный для эффективной экспрессии в целевой клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин включает клетку иммунной системы человека, такую как Т-клетка, NK-клетка или NK-T-клетка (Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135,

2006). Оптимизацию кодонов можно осуществлять с применением известных способов и инструментов, например, с помощью инструмента GenScript® OptimumGene™ или GeneArt (Life Technologies). Кодон-оптимизированные последовательности включают последовательности, которые являются частично кодон-оптимизированными (т. е. один или более кодонов, но менее, чем все кодоны, оптимизированы для экспрессии в клетке-хозяине), и последовательности, которые являются полностью кодон-оптимизированными. Следует принимать во внимание, что в вариантах осуществления, где полинуклеотид кодирует более одного полипептида (например, α -цепь TCR, β -цепь TCR, α -цепь корецептора CD8, β -цепь корецептора CD8 и один или более саморасщепляющихся пептидов), каждый полипептид может независимо быть полностью кодон-оптимизированным, частично кодон-оптимизированным или быть не кодон-оптимизированным.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей гетерологичный полинуклеотид, кодирующий любой один или более TCR или их связывающих доменов по настоящему изобретению, где модифицированная или рекомбинантная клетка-хозяин экспрессирует на своей клеточной поверхности TCR или его связывающий домен, кодируемый гетерологичным полинуклеотидом.

Можно применять различные методики для синтеза рекомбинантной (т. е. сконструированной) ДНК, пептидов и олигонуклеотидов, иммуноанализа, а также культивирования и трансформации тканей (например, электропорации, липофекции). Ферментативные реакции и способы очистки могут быть выполнены в соответствии с рекомендациями производителя или в соответствии с обычными способами, применяемыми в данной области техники или описанными в настоящем документе. Такие и связанные с ними методики и процедуры могут обычно выполняться в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных публикациях в области микробиологии, молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики, клеточной биологии, вирусологии и иммунологии, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985); *Current Protocols in Immunology* (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY,

NY); Real-Time PCR: Current Technology and Applications, Edited by Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK; Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press, New York, 1991); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, Ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, Ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Next-Generation Genome Sequencing (Janitz, 2008 Wiley-VCH); PCR Protocols (Methods in Molecular Biology) (Park, Ed., 3rd Edition, 2010 Humana Press); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and CC Blackwell, eds., 1986); Roitt, Essential Immunology, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2002); Embryonic Stem Cell Protocols: Volume I: Isolation and Characterization (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006); Embryonic Stem Cell Protocols: Volume II: Differentiation Models (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006); Human Embryonic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen Ed., 2006); Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, and Bruce A. Bunnell Eds., 2008); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Medicine) (Christopher A. Klug, and Craig T. Jordan Eds., 2001); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kevin D. Bunting Ed., 2008) Neural Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Leslie P. Weiner Ed., 2008).

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению содержатся в клетке-хозяине или, в некоторых вариантах осуществления, содержатся в векторе, и вектор, содержащий полинуклеотид, может находиться в клетке-хозяине. Соответственно, настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим полинуклеотид по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид функционально связан с последовательностью контроля экспрессии. Подходящие векторы для применения, раскрытые в определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению, известны и могут быть выбраны для конкретной цели или клетки. Иллюстративный вектор может содержать молекулу

нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты, с которой она была связана, или которая способна реплицироваться в организме хозяина. Некоторые примеры векторов включают плазмиды, вирусные векторы, космиды и другие. Некоторые векторы могут быть способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомальные векторы млекопитающих), тогда как другие векторы могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина или способствовать интеграции вставки полинуклеотида при введении в клетку-хозяин и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина (например, лентивирусный вектор). Кроме того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны (такие векторы могут называться "векторами экспрессии"). В соответствии со связанными вариантами осуществления также следует понимать, что, если один или более агентов (например, полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантные TCR с высокой аффинностью или высокой функциональной авидностью или их связывающий домен, специфичные к WT1 p37, как описано в настоящем документе), совместно вводят субъекту, то каждый агент может находиться в отдельных или одинаковых векторах, и несколько векторов (каждый из которых содержит другой агент и один и тот же агент) могут быть введены в клетку или популяцию клеток или введены субъекту.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный TCR с высокой аффинностью или высокой функциональной авидностью или его связывающий домен, специфичный к комплексу пептида WT1 p37 и МНС по настоящему изобретению, может быть функционально связан с определенными элементами контроля экспрессии вектора. Например, полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы, могут быть функционально связаны. Последовательности контроля экспрессии могут включать подходящие последовательности инициации, терминации, промотора и энхансера транскрипции, эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования, последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК, последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т. е. консенсусные последовательности Козака), последовательности, повышающие стабильность белка, и необязательно последовательности, которые усиливают секрецию белка. Последовательности контроля экспрессии могут быть функционально связаны, если они являются смежными с геном, представляющим интерес, и последовательностями контроля экспрессии, которые являются транс-активными или действуют на расстоянии, чтобы

контролировать ген, представляющий интерес. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие TCR или их связывающие домены по настоящему изобретению, содержатся в векторе экспрессии, который представляет собой вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, или γ -ретровирусный вектор, или аденовирусный вектор.

В конкретных вариантах осуществления доставку рекомбинантного вектора экспрессии выполняют в подходящую клетку, например, Т-клетку или антигенпрезентирующую клетку, то есть клетку, которая представляет комплекс пептид/МНС на своей клеточной поверхности (например, дендритная клетка) и не содержит CD8. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека. Например, клетка иммунной системы может представлять собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную негативную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, естественную киллерную клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию, где необязательно комбинация, если она присутствует, включает CD4⁺ Т-клетку и CD8⁺ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, где Т-клетка является хозяином, Т-клетка может представлять собой наивную Т-клетку, Т-клетку центральной памяти, Т-клетку эффекторной памяти или любую их комбинацию. Поэтому рекомбинантные экспрессирующие векторы могут также включать, например, специфичные к лимфоидной ткани регуляторные элементы транскрипции (TRE), такие как В-лимфоциты, Т-лимфоциты или TRE, специфичные к дендритным клеткам. TRE, специфичные к лимфоидной ткани, известны в данной области техники (см., например, Thompson et al., *Mol. Cell. Biol.* 12:1043, 1992); Todd et al., *J. Exp. Med.* 177:1663, 1993); Penix et al., *J. Exp. Med.* 178:1483, 1993).

Помимо векторов, определенные варианты осуществления относятся к клеткам-хозяин, содержащим гетерологичный полинуклеотид или вектор по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин экспрессирует на своей клеточной поверхности TCR, кодируемый полинуклеотидом, и при этом полинуклеотид является гетерологичным по отношению к клетке-хозяин. Специалисту в данной области техники будет понятно, что многие подходящие клетки-хозяин доступны в данной области техники. Клетка-хозяин может включать любую отдельную клетку или культуру клеток, с помощью которых можно получать вектор или включать нуклеиновые кислоты и/или белки, а также любые клеток-потомки. Термин также охватывает потомство клетки-хозяина, генетически или фенотипически одинаковое или различное. Подходящие клетки-хозяин могут зависеть от вектора и могут включать клетки млекопитающих, клетки животных, клетки человека, клетки обезьян, клетки насекомых, клетки дрожжей и клетки

бактерий. Такие клетки можно индуцировать для включения вектора или другого материала с применением вирусного вектора, трансформации посредством преципитации фосфатом кальция, DEAE-декстрана, электропорации, микроинъекции или других способов. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

В некоторых вариантах осуществления домен V_{α} TCR, экспрессируемый клеткой-хозяином, кодируется полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичность последовательности с любым из полинуклеотидов SEQ ID NO: 97, 98 и 101-107, или по меньшей мере 94% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 99 или 100. В некоторых вариантах осуществления домен V_{α} кодируется полинуклеотидом: (a) содержащим последовательность любого из полинуклеотидов SEQ ID NO: 97-107, или (b) состоящим из последовательности любого из полинуклеотидов SEQ ID NO: 97-107.

В некоторых вариантах осуществления домен V_{β} клетки-хозяина кодируется полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 75% идентичность последовательности с любым из полинуклеотидов SEQ ID NO: 75-77, 79, 82, 84 и 85 или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с любым из полинуклеотидов SEQ ID NO: 78, 80, 81 и 83. В некоторых вариантах осуществления домен V_{β} кодируется полинуклеотидом: (a) содержащим последовательность любого из полинуклеотидов SEQ ID NO: 75-85, или (b) состоящим из последовательности любого из полинуклеотидов SEQ ID NO: 75-85.

В некоторых вариантах осуществления α -цепь TCR содержит константный домен α -цепи, кодируемый полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 98% идентичность с SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления α -цепь TCR содержит константный домен α -цепи, кодируемый полинуклеотидом: (a) содержащим полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 110, или (b) состоящим из полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления β -цепь TCR содержит константный домен β -цепи, кодируемый полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 99,9% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 108 или 109. В некоторых вариантах осуществления β -цепь TCR содержит константный домен β -цепи, кодируемый полинуклеотидом: (a) содержащим полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 108 или 109, или (b) состоящим из полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 108 или 109.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидной последовательностью, кодирующей α -цепь TCR, и полинуклеотидной

последовательностью, кодирующей β -цепь TCR.

В некоторых вариантах осуществления кодируемый саморасщепляющийся пептид: (a) содержит аминокислотную последовательность любого из полипептидов SEQ ID NO: 60-63, или (b) состоит из последовательности любого из полипептидов SEQ ID NO: 60-63.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид: (a) содержит последовательность любого из полинуклеотидов SEQ ID NO: 166-170, или (b) состоит из последовательности любого из полинуклеотидов SEQ ID NO: 166-170.

В некоторых вариантах осуществления α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR кодируются полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 95% идентичность с любой из SEQ ID NO: 155-165.

В некоторых вариантах осуществления α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR кодируются полинуклеотидом, который: (a) содержит последовательность любого из полинуклеотидов SEQ ID NO: 155-165, или (b) состоит из последовательности любого из полинуклеотидов SEQ ID NO: 155-165.

В некоторых вариантах осуществления кодируемая α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,5%, 99,9 % или 100% идентичность с любым из полипептидов SEQ ID NO: 48-58. В некоторых вариантах осуществления кодируемая α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR: (a) содержит аминокислотную последовательность любого из полипептидов SEQ ID NO: 48-58, или (b) состоит из аминокислотной последовательности любого из полипептидов SEQ ID NO: 48-58.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека. В некоторых вариантах осуществления клетка иммунной системы представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную негативную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, естественную киллерную клетку, естественную киллерную Т-клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию, где необязательно комбинация включает CD4⁺ Т-клетку и CD8⁺ Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка иммунной системы хозяина представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, Т-клетку центральной памяти, Т-клетку эффекторной памяти или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления TCR имеет более высокую экспрессию на

поверхности Т-клетки по сравнению с эндогенным TCR (например, когда экспрессия эндогенного TCR не подавлена искусственно или не предотвращена).

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин дополнительно содержит: (i) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть α -цепи корцептора CD8, где, кодируемый полипептид необязательно представляет собой или содержит α -цепь корцептора CD8, (ii) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть β -цепи корцептора CD8, где кодируемый полипептид необязательно представляет собой или содержит β -цепь корцептора CD8, или (iii) полинуклеотид (i) и полинуклеотид (ii), где необязательно клетка-хозяин включает CD4⁺ Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит: (a) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть α -цепи корцептора CD8, (b) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть β -цепи корцептора CD8, и (c) полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом (a) и полинуклеотидом (b).

В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин (например, иммунная клетка, такая как Т-клетка человека) способна уничтожить: (i) опухолевую клетку клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-468, (ii) опухолевую клетку клеточной линии аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1, (iii) опухолевую клетку клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231, (iv) опухолевую клетку клеточной линии миелогенного лейкоза K562, экспрессирующую HLA-A2, где необязательно HLA-A2 включает HLA-A*201, (v) опухолевую клетку клеточной линии карциномы толстой кишки RKO, экспрессирующую HLA-A2, где необязательно HLA-A2 включает HLA-A*201, или (vi) любую комбинацию опухолевых клеток (i)-(v), когда в образце присутствуют и клетка-хозяин, и опухолевая клетка.

В конкретных вариантах осуществления клетка-хозяин способна уничтожить опухолевую клетку, когда клетка-хозяин и опухолевая клетка присутствуют в образце в соотношении клетка-хозяин:опухолевая клетка 32:1, 16:1, 8:1, 4:1, 2:1 или 1,5:1. Уничтожение клетки-мишени можно определить, например, с помощью платформы биовизуализации Incucyte® (Essen Bioscience). В некоторых вариантах осуществления в данной платформе применяются активированная каспаза и меченые (например, RapidRed или NucRed) сигналы опухолевых клеток, при этом измеряется перекрытие, и увеличенная площадь перекрытия равна гибели опухолевых клеток в результате апоптоза. Уничтожение также можно определить с помощью 4-часового анализа, при котором клетки-мишени

нагружают меченым хромом (^{51}Cr), а ^{51}Cr в супернатанте измеряют после 4-часовой совместной инкубации с иммунной клеткой, экспрессирующей связывающий белок по настоящему изобретению.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления клетка-хозяин (например, иммунная клетка) может быть модифицирована для снижения или устранения экспрессии одного или более эндогенных генов, которые кодируют полипептид, участвующий в сигналинге иммунной системы или других связанных действиях. Иллюстративные нокауты генов включают те, которые кодируют PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3, TIGIT, FasL, молекулу HLA, молекулу TCR и т. п. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, определенные эндогенно экспрессируемые белки иммунных клеток могут распознаваться как чужеродные аллогенным хозяином, получающим модифицированные иммунные клетки, что может приводить к элиминации модифицированных иммунных клеток (например, аллеля HLA) или может подавлять регуляцию иммунной активности модифицированных иммунных клеток (например, PD-1, LAG-3, CTLA4, FasL, TIGIT, TIM3) или может влиять на активность связывания гетерологически экспрессируемого связывающего белка по настоящему изобретению (например, эндогенного TCR модифицированной Т-клетки, которая связывается с антигеном, отличным от Ras, и тем самым препятствует связыванию модифицированной иммунной клетки с клеткой, которая экспрессирует антиген Ras).

Соответственно, снижение или устранение экспрессии или активности таких эндогенных генов или белков может улучшить активность, толерантность или устойчивость модифицированных клеток в условиях аутологичного или аллогенного хозяина и может позволить универсальное введение клеток (например, любому реципиенту, независимо от типа HLA). В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка представляет собой донорскую клетку (например, аллогенную) или аутологичную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин по настоящему изобретению содержит нокаут хромосомного гена одного или более генов, кодирующих PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3, TIGIT, FasL, компонент HLA (например, ген, кодирующий макроглобулин $\alpha 1$, макроглобулин $\alpha 2$, макроглобулин $\alpha 3$, микроглобулин $\beta 1$ или микроглобулин $\beta 2$) или компонент TCR (например, ген, кодирующий переменную область TCR или константную область TCR) (см., например, Torikai et al., Nature Sci. Rep. 6:21757 (2016), Torikai et al., Blood 119(24):5697 (2012), и Torikai et al., Blood 122(8):1341 (2013), описанные средства генной инженерии, композиции и адоптивные клеточные способы лечения настоящим полностью включены посредством ссылки).

В контексте настоящего документа термин "нокаут хромосомного гена" относится к

генетическому изменению или введенному ингибирующему агенту в клетку-хозяина, которые предотвращают (например, снижают, задерживают, подавляют или нейтрализуют) продуцирование клеткой-хозяином функционально активного эндогенного полипептидного продукта. Изменения, приводящие к нокауту хромосомного гена, могут включать, например, введенные нонсенс-мутации (включая образование преждевременных стоп-кодонов), миссенс-мутации, делеции гена и разрывы цепей, а также гетерологичную экспрессию ингибирующих молекул нуклеиновых кислот, которые ингибируют экспрессию эндогенного гена в клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления нокаут хромосомного гена или нокина гена осуществляется путем хромосомного редактирования клетки-хозяина. Хромосомное редактирование можно проводить, например, с помощью эндонуклеаз. В контексте настоящего документа термин "эндонуклеаза" относится к ферменту, способному катализировать расщепление фосфодиэфирной связи в полинуклеотидной цепи. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза способна расщеплять целевой ген путем инактивации или "нокаута" целевого гена. Эндонуклеаза может быть природной, рекомбинантной, генетически модифицированной или гибридной эндонуклеазой. Разрывы цепи нуклеиновой кислоты, вызванные эндонуклеазой, обычно восстанавливаются с помощью различных механизмов гомологичной рекомбинации или нехомологичного соединения концов (NHEJ). Во время гомологичной рекомбинации молекула донорной нуклеиновой кислоты может быть применена для "нокина" донорного гена, для "нокаута" целевого гена и необязательно для инактивации целевого гена посредством нокина донорного гена или нокаута целевого гена. NHEJ представляет собой склонный к ошибкам процесс репарации, который часто приводит к изменениям последовательности ДНК в месте расщепления, например, замене, делеции или добавлению по меньшей мере одного нуклеотида. NHEJ можно применять для "нокаута" целевого гена. Примеры эндонуклеаз включают нуклеазы с цинковыми пальцами, нуклеазы TALE, нуклеазы CRISPR-Cas, мегануклеазы и мегаTAL.

В контексте настоящего документа "нуклеаза с цинковыми пальцами" (ZFN) относится к слитому белку, содержащему ДНК-связывающий домен с цинковыми пальцами, слитый с неспецифическим доменом расщепления ДНК, таким как эндонуклеаза FokI. Каждый мотив цинковый палец из приблизительно 30 аминокислот связывается приблизительно с 3 парами оснований ДНК, и аминокислоты в определенных остатках могут быть изменены для изменения специфичности триплетной последовательности (см., например, Desjarlais et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 2256-2260, 1993, Wolfe et al., J. Mol. Biol. 285:1917-1934, 1999). Несколько мотивов цинковых пальцев могут быть связаны в тандеме

для создания специфичности связывания с желаемыми последовательностями ДНК, такими как области, имеющие длину от приблизительно 9 до приблизительно 18 пар оснований. В качестве пояснения, ZFN опосредуют редактирование генома, катализируя образование сайт-специфического двухцепочечного разрыва ДНК (DSB) в геноме, а направленная интеграция трансгена, содержащего фланкирующие последовательности, гомологичные геному в сайте DSB, облегчается за счет гомологичной репарации. Альтернативно, DSB, образуемый ZFN, может приводить к нокауту целевого гена посредством репарации вследствие нехомологичного соединения концов (NHEJ), представляющего собой склонный к ошибкам путь клеточной репарации, который приводит к вставке или делеции нуклеотидов в сайте расщепления. В некоторых вариантах осуществления нокаут гена включает вставку, делецию, мутацию или их комбинацию, сделанные с применением молекулы ZFN.

В контексте настоящего документа термин "эффекторная нуклеаза, подобная активатору транскрипции" (TALEN) относится к слитому белку, содержащему ДНК-связывающий домен TALE и домен расщепления ДНК, такой как эндонуклеаза FokI. "ДНК-связывающий домен TALE" или "TALE" состоит из одного или более повторяющихся доменов/единиц TALE, каждый из которых обычно имеет высококонсервативную аминокислотную последовательность от 33 до 35 аминокислот с дивергированными 12-ой и 13-ой аминокислотами. Домены повторов TALE участвуют в связывании TALE с целевой последовательностью ДНК. Дивергированные аминокислотные остатки, называемые парой переменных аминокислотных остатков (RVD), коррелируют со специфическим распознаванием нуклеотидов. Естественный (канонический) код распознавания ДНК таких TALE был определен таким образом, что последовательность HD (гистидин-аспарагиновая кислота) в положениях 12 и 13 TALE приводит к связыванию TALE с цитозином (C), NG (аспарагин-глицин) связывается с нуклеотидом T, NI (аспарагин-изолейцин) с A, NN (аспарагин-аспарагин) связывается с нуклеотидом G или A, и NG (аспарагин-глицин) связывается с нуклеотидом T. Также известны неканонические (атипичные) RVD (см., например, патент US 2011/0301073, раскрытые в котором атипичные RVD полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). TALEN можно применять для управления сайт-специфическими двухцепочечными разрывами (DSB) в геноме Т-клеток. Нехомологичное соединение концов (NHEJ) приводит к лигированию ДНК с обеих сторон двухцепочечного разрыва, в котором существует небольшое перекрытие последовательностей для отжига или оно отсутствует, тем самым вводя ошибки, инактивирующие экспрессию гена. Альтернативно, с помощью гомологичной репарации можно вводить трансген в сайт DSB, обеспечивая присутствие в трансгене гомологичных

фланкирующих последовательностей. В некоторых вариантах осуществления нокаут гена включает вставку, делецию, мутацию или их комбинацию и осуществляется с применением молекулы TALEN.

В контексте настоящего документа нуклеазная система "кластерные короткие палиндромные повторы, разделённые регулярными промежутками/Cas" (CRISPR/Cas) относится к системе, в которой применяется нуклеаза Cas, направляемая CRISPR-РНК (crРНК), для распознавания целевых сайтов в геноме (известные в качестве протоспейсеров) посредством комплементарности спаривания оснований, а затем расщепления ДНК, если короткий консервативный мотив, связанный с протоспейсером (PAM), следует сразу за 3' комплементарной целевой последовательностью. Системы CRISPR/Cas подразделяют на три типа (т. е. тип I, тип II и тип III) в зависимости от последовательности и структуры нуклеаз Cas. Контрольные комплексы, направляемые crРНК, в типах I и III нуждаются в нескольких субъединицах Cas. Система типа II, наиболее изученная, содержит по меньшей мере три компонента: РНК-направляемую нуклеазу Cas9, crРНК и транс-активную crРНК (tracrРНК). tracrРНК включает дуплекс-образующую область. crРНК и tracrРНК образуют дуплекс, способный взаимодействовать с нуклеазой Cas9 и направлять комплекс Cas9/crРНК:tracrРНК к определенному сайту на целевой ДНК посредством образования спаривания оснований по Уотсону-Крику между спейсером на crРНК и протоспейсером на целевой ДНК выше PAM. Нуклеаза Cas9 расщепляет двухцепочечный разрыв в области, определяемой спейсером crРНК. Репарация с помощью NHEJ приводит к вставкам и/или делециям, которые нарушают экспрессию целевого локуса. Альтернативно, трансген с гомологичными фланкирующими последовательностями может быть введен в сайт DSB посредством гомологичной репарации. crРНК и tracrРНК могут быть сконструированы в одиночную гидовую РНК (sgРНК или gРНК) (см., например, Jinek et al., Science 337:816-21, 2012). Кроме того, область гидовой РНК, комплементарная целевому сайту, может быть изменена или запрограммирована для нацеливания на желаемую последовательность (Xie et al., PLOS One 9:e100448, 2014; заявка на патент США № US 2014/0068797, заявка на патент США № US 2014/0186843; патент США № 8697359 и PCT № WO 2015/071474; содержание каждого из которых включено посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления нокаут гена включает вставку, делецию, мутацию или их комбинацию и выполняется с применением системы нуклеаз CRISPR/Cas. Иллюстративные последовательности gРНК и способы их применения для нокаута эндогенных генов, кодирующих белки иммунных клеток, включают описанные в публикации Ren et al., Clin. Cancer Res. 23(9):2255-2266 (2017), раскрытые в которой gRNA, ДНК CAS9, векторы и способы нокаута генов

настоящим полностью включены посредством ссылки.

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

В некоторых вариантах осуществления природные мегануклеазы можно применять для стимуляции сайт-специфической модификации генома мишени, выбранной из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA4, TIGIT, FasL, гена, кодирующего HLA, или гена, кодирующего компонент TCR. В других вариантах осуществления сконструированная мегануклеаза, обладающая новой специфичностью связывания с целевым геном, используется для сайт-специфической модификации генома (см., например, Porteus et al., *Nat. Biotechnol.* 23:967-73, 2005; Sussman et al., *J. Mol. Biol.* 342:31-41, 2004; Epinat et al., *Nucleic Acids Res.* 31:2952-62, 2003; Chevalier et al., *Molec. Cell* 10:895-905, 2002; Ashworth et al., *Nature* 441:656-659, 2006; Paques et al., *Curr. Gene Ther.* 7:49-66, 2007; публикации заявок на патент США № 2007/0117128; 2006/0206949; 2006/0153826; 2006/0078552 и 2004/0002092). В дополнительных вариантах осуществления нокаут хромосомного гена осуществляют с применением хоминг-эндонуклеазы, модифицированной модульными ДНК-связывающими доменами TALEN, для получения слитого белка, известного как мегаTAL. МегаTAL можно применять не только для нокаута одного или более генов-мишеней, но также для введения (нокина) гетерологичных или экзогенных полинуклеотидов при применении в сочетании с экзогенной донорной матрицей, кодирующей полипептид, представляющий интерес.

В некоторых вариантах осуществления нокаут хромосомного гена включает ингибирующую молекулу нуклеиновой кислоты, которую вводят в клетку-хозяин (например, иммунную клетку), содержащую гетерологичный полинуклеотид, кодирующий антигенспецифический рецептор, который специфически связывается с опухолеассоциированным антигеном, где ингибирующая молекула нуклеиновой кислоты кодирует мишень-специфический ингибитор, и где кодируемый мишень-специфический

ингибитор ингибирует экспрессию эндогенного гена (например, PD-1, TIM3, LAG3, CTLA4, TIGIT, FasL, компонента HLA или компонента TCR, или любой их комбинации) в клетке-хозяин.

Нокаут хромосомного гена можно подтвердить непосредственно путем секвенирования ДНК иммунной клетки-хозяина после применения способа нокаута или агента. Сделать вывод о нокауте хромосомного гена можно также при отсутствии экспрессии гена (например, отсутствии продукта мРНК или полипептида, кодируемого геном) после нокаута.

В некоторых вариантах осуществления нокаут хромосомного гена включает нокаут гена компонента HLA, выбранного из гена макроглобулина $\alpha 1$, гена макроглобулина $\alpha 2$, гена макроглобулина $\alpha 3$, гена микроглобулина $\beta 1$ или гена микроглобулина $\beta 2$.

В некоторых вариантах осуществления нокаут хромосомного гена включает нокаут гена компонента TCR, выбранного из гена варибельной области TCR α , гена варибельной области TCR β , гена константной области TCR или их комбинации.

Кроме того, следует понимать, что любой из раскрытых в настоящем документе способов и инструментов генной инженерии можно применять для введения полинуклеотида, кодирующего TCR и/или кодирующего корецептор CD8, по настоящему изобретению в геном клетки-хозяина.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композициям и однократным дозам, которые содержат модифицированную клетку-хозяин по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления композиция клетки-хозяин или однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 30 %, по меньшей мере приблизительно 40 %, по меньшей мере приблизительно 50 %, по меньшей мере приблизительно 60 %, по меньшей мере приблизительно 70 %, по меньшей мере приблизительно 80 %, по меньшей мере приблизительно 85 %, по меньшей мере приблизительно 90 % или по меньшей мере приблизительно 95 % модифицированных CD4⁺ Т-клеток в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 30 %, по меньшей мере приблизительно 40 %, по меньшей мере приблизительно 50 %, по меньшей мере приблизительно 60 %, по меньшей мере приблизительно 70 %, по меньшей мере приблизительно 80 %, по меньшей мере приблизительно 85 %, по меньшей мере приблизительно 90 % или по меньшей мере приблизительно 95 % модифицированных CD8⁺ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток (т. е. имеет менее приблизительно 50 %, менее приблизительно 40 %, менее приблизительно 30 %, менее

приблизительно 20 %, менее приблизительно 10 %, менее приблизительно 5 % или менее приблизительно 1 % популяции наивных Т-клеток, присутствующих в однократной дозе, по сравнению с образцом пациента, имеющим сопоставимое количество МКПК).

В некоторых вариантах осуществления композиция клетки-хозяин или однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 50 % модифицированных $CD4^+$ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 50 % модифицированных $CD8^+$ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где композиция клетки-хозяин или однократная доза содержат сниженное количество или по существу не содержат наивных Т-клеток. В дополнительных вариантах осуществления композиция клетки-хозяин или однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 60 % модифицированных $CD4^+$ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 60 % модифицированных $CD8^+$ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В других вариантах осуществления композиция клетки-хозяин или однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 70 % сконструированных $CD4^+$ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере около 70 % сконструированных $CD8^+$ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где однократная доза содержит сниженное количество или по существу не содержит наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция клетки-хозяин или однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 80 % модифицированных $CD4^+$ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 80 % модифицированных $CD8^+$ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где композиция клеток-хозяин или однократная доза содержат сниженное количество или по существу не содержат наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция клетки-хозяин или однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 85 % модифицированных $CD4^+$ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 85 % модифицированных $CD8^+$ Т-клеток, в соотношении приблизительно 1:1, где композиция клетки-хозяин или однократная доза содержат сниженное количество или по существу не содержат наивных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция клетки-хозяин или однократная доза содержит (i) композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 90 % модифицированных $CD4^+$ Т-клеток, в комбинации с (ii) композицией, содержащей по меньшей мере приблизительно 90 % модифицированных $CD8^+$ Т-клеток, в соотношении приблизительно

1:1, где композиция клетки-хозяин или однократная доза содержат сниженное количество или по существу не содержат наивных Т-клеток.

Следует понимать, что композиция клетки-хозяин или однократная доза по настоящему изобретению может содержать любую клетку-хозяин, как описано в настоящем документе, или любую комбинацию клеток-хозяин. В некоторых вариантах осуществления, например, композиция клетки-хозяина или однократная доза содержит модифицированные CD8⁺ Т-клетки, модифицированные CD4⁺ Т-клетки или и то, и другое, причем такие Т-клетки модифицированы для кодирования связывающего белка, специфичного к комплексу пептида Ras и HLA-A*02:01, и дополнительно содержит модифицированные CD8⁺ Т-клетки, модифицированные CD4⁺ Т-клетки или и те, и другие, где указанные Т-клетки модифицированы для кодирования связывающего белка, специфичного к комплексу пептида WT1 и HLA-A*02:01. В дополнение или альтернативно, композиция клетки-хозяина или однократная доза по настоящему изобретению может содержать любую клетку-хозяин или комбинацию клеток-хозяин, как описано в настоящем документе, и может дополнительно содержать модифицированную клетку (например, иммунную клетку, такую как Т-клетка), экспрессирующую связывающий белок, специфичный к другому антигену (например, другому антигену WT1 или антигену другого белка или мишени, такого как, например, BCMA, CD3, CEACAM6, c-Met, EGFR, EGFRvIII, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EphA2, IGF1R, GD2, О-ацетил GD2, О-ацетил GD3, GHRHR, GHR, FLT1, KDR, FLT4, CD44v6, CD151, CA125, CEA, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, Lewis A, Lewis Y, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, HVEM, MAGE-A (например, включая MAGE-A1, MAGE-A3 и MAGE-A4), мезотелин, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, CD40, CD137, TWEAK-R, HLA, пептид, связанный с опухолью или патогеном, связанный с HLA, пептид hTERT, связанный с HLA, пептид тирозиназы, связанный с HLA, пептид WT-1, связанный с HLA, LTβR, LIFRβ, LRP5, MUC1, OSMRβ, TCRα, TCRβ, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD52, CD56, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86, CD123, CD171, CD276, B7H4, TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, HA1-H, Robo1, α-фетопроtein (AFP), Frizzled, OX40, PRAME и SSX-2 или тому подобное). Например, однократная доза может содержать модифицированные CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие связывающий белок, который специфически связывается с комплексом WT1 и HLA, и модифицированные CD4⁺ Т-клетки (и/или модифицированные CD8⁺ Т-клетки), экспрессирующие связывающий белок (например, CAR), который специфически связывается с антигеном HER2. Также будет понятно, что любую из раскрытых в настоящем документе клеток-хозяин можно вводить в комбинированной терапии.

В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе,

композиция клетки-хозяин или однократная доза содержит равное или приблизительно равное количество сконструированных CD45RA- CD3⁺ CD8⁺ и модифицированных CD45RA- CD3⁺ CD4⁺ ТМ клеток.

Применение и способы лечения

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения гиперпролиферативного или пролиферативного расстройства или состояния, характеризующегося экспрессией или сверхэкспрессией опухолевого белка Вильмса 1 (WT1), путем введения человеку, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей рекомбинантный TCR с высокой аффинностью или высокой функциональной авидностью или его связывающий домен, специфичный к WT1 человека в соответствии с любым из вышеупомянутых TCR или любых связывающих доменов, описанных в настоящем документе, или клетку-хозяин, такую как Т-клетка, сконструированную для их экспрессии, или композиций, содержащих любой из TCR или его связывающий домен, или клетки-хозяин, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления TCR экспрессируется клеткой-хозяином, такой как гемопоэтическая клетка-предшественник или клетка иммунной системы человека. В некоторых вариантах осуществления клетка иммунной системы представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную негативную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, естественную киллерную клетку, естественную киллерную Т-клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию.

Наличие гиперпролиферативного расстройства, или пролиферативного расстройства, или злокачественного состояния у субъекта относится к наличию диспластических, раковых и/или трансформированных клеток у субъекта, включая, например, неопластические, опухолевые, бесконтактно ингибированные или онкогенно трансформированные клетки, или тому подобное (например, солидный рак, гематологические злокачественные опухоли, включая лимфомы и лейкозы, такой как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и т. д.), которые известны в данной области техники и для которых установлены критерии диагностики и классификации (например, Hanahan and Weinberg, Cell 144:646, 2011; Hanahan and Weinberg, Cell 100:57, 2000; Cavallo et al., Canc. Immunol. Immunother. 60:319, 2011; Kyrigideis et al., J. Carcinog. 9:3, 2010). В некоторых вариантах осуществления такие раковые клетки могут представлять собой клетки острого миелоидного лейкоза, В-клеточного лимфобластного лейкоза, Т-клеточного лимфобластного лейкоза или миеломы, включая раковые стволовые клетки, которые способны инициировать и серийно трансплантировать любой из указанных типов рака (см., например, Park et al., Molec. Therap. 17: 219, 2009).

В некоторых вариантах осуществления представлены способы лечения гиперпролиферативного или пролиферативного расстройства, такого как гематологическая злокачественная опухоль или солидный рак (см., например, Nakatsuka et al., *Modern Pathology* 19:804-714 (2006)). Примеры гематологических злокачественных опухолей включают острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический эозинофильный лейкоз (ХЭЛ), миелодиспластический синдром (МДС), неходжкинскую лимфому (НХЛ), множественную миелому (ММ).

В дополнительных вариантах осуществления представлены способы лечения гиперпролиферативного или пролиферативного расстройства, такого как солидный рак, выбранный из рака желчных путей, рака мочевого пузыря, карциномы костей и мягких тканей, опухоли головного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректальной аденокарциномы, колоректального рака, десмоидной опухоли, эмбрионального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, гинекологической опухоли, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака печени, рака легких, мезотелиомы, злокачественной меланомы, остеосаркомы, рака яичников (см., например, Hylander et al., *Gynecologic Oncology* 101:12-17 (2006), рака поджелудочной железы, аденокарциномы протоков поджелудочной железы, первичной астроцитарной опухоли, первичного рака щитовидной железы, рака предстательной железы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, опухоли половых клеток яичка, рака уротелия, саркомы матки или рака матки.

В некоторых вариантах осуществления TCR способен стимулировать рестриктивный по HLA класса I антигенспецифический Т-клеточный ответ против WT1 человека. В некоторых вариантах осуществления рестриктивный по HLA класса I ответ не зависит от транспортера, связанного с процессингом антигена (ТАР). В некоторых вариантах осуществления антигенспецифический Т-клеточный ответ включает по меньшей мере один из ответа $CD4^{+}$ хелперных Т-лимфоцитов (Th) и ответа $CD8^{+}$ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). В некоторых вариантах осуществления ответ ЦТЛ направлен против клетки, сверхэкспрессирующей WT1.

В настоящем изобретении также представлены любые из TCR, полинуклеотидов, композиций, векторов и клеток-хозяев (в том числе в любой комбинации) для применения в способе лечения пролиферативного или гиперпролиферативного расстройства, связанного с экспрессией или сверхэкспрессией опухолевого белка Вильмса 1 (WT1).

В настоящем изобретении также представлены любые из TCR, полинуклеотидов,

композиций, векторов и клеток-хозяев (в том числе в любой комбинации) для применения в способе получения лекарственного средства для лечения пролиферативного или гиперпролиферативного расстройства, связанного с экспрессией или сверхэкспрессией опухолевого белка Вильмса 1 (WT1).

Как будет понятно специалисту в данной области техники, термины "лечить" и "лечение" относятся к медицинскому лечению заболевания, расстройства или состояния субъекта (т. е. пациента, хозяина, который может представлять собой человека или животное, не относящееся к человеку) (см., например, Stedman's Medical Dictionary). Как правило, подходящую дозу и схему лечения, обеспечивающую один или более рекомбинантных TCR с высокой функциональной авидностью или их связывающие домены, специфичных к WT1 человека (например, SEQ ID NO: 23-58 и их варианты, представленные в настоящем документе), или клетку-хозяин, экспрессирующую их, и необязательно дополнительное лечение (например, цитокин, такой как IL-2, IL-15, IL-21 или любую их комбинацию) вводят в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического или профилактического эффекта. Терапевтический или профилактический эффект, являющийся результатом терапевтического лечения или профилактических или предупредительных способов, включает, например, улучшение клинического исхода, цель которого состоит в том, чтобы предотвратить, замедлить или иным образом уменьшить (например, снижение статистически значимым образом по сравнению с необработанным контролем) нежелательное физиологическое изменение или нарушение, или предотвратить, замедлить или иным образом уменьшить распространение или тяжесть такого заболевания или расстройства. Благоприятные или желаемые клинические результаты лечения субъекта включают ослабление, уменьшение или облегчение симптомов, которые возникают в результате или связаны с заболеванием или расстройством, подлежащим лечению, уменьшение проявления симптомов, улучшение качества жизни, более длительный статус без признаков заболевания (т. е. уменьшение вероятности или предрасположенности к проявлению у субъекта симптомов, на основании которых ставится диагноз заболевания), уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. не ухудшающуюся) состояния болезни, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение течения заболевания, и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемую или необнаруживаемую, или общую выживаемость.

"Лечение" также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если бы субъект не получал лечения. Субъекты, нуждающиеся в описанных в настоящем документе способах и композициях, включают тех, у кого уже есть заболевание или расстройство, а также субъектов, склонных к заболеванию или риску

развития заболевания или расстройства. Субъекты, нуждающиеся в профилактическом лечении, включают субъектов, у которых необходимо предотвратить заболевание, состояние или расстройство (т. е. уменьшить вероятность возникновения или рецидива заболевания или расстройства). Клинический эффект, обеспечиваемый композициями (и препаратами, включающими композиции) и способами, описанными в настоящем документе, может быть оценен путем разработки и выполнения анализов *in vitro*, доклинических исследований и клинических исследований у субъектов, которым введение композиций должно принести пользу, как описано в примерах.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения гиперпролиферативного расстройства или пролиферативного расстройства или состояния, характеризующегося сверхэкспрессией или экспрессией опухолевого белка Вильмса 1 (WT1), путем введения человеку, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей выделенный полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный TCR с высокой аффинностью или высокой функциональной авидностью или его связывающий домен, специфичный к WT1 человека, в соответствии с любым вышеупомянутым кодируемым TCR или его связывающим доменом, или клетку-хозяин, такую как Т-клетку, содержащую их, или композиции, содержащей любой из TCR или его связывающий домен, или клетки-хозяин, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TCR или его связывающий домен, специфичный к комплексу пептида WT1 p37 и МНС человека, является кодон-оптимизированным для клетки-хозяина, представляющей интерес. В дополнительных вариантах осуществления любой из вышеупомянутых полинуклеотидов функционально связан с последовательностью контроля экспрессии и необязательно содержится в векторе экспрессии, таком как вирусный вектор. Примеры вирусных векторов включают лентивирусные векторы и γ-ретровирусные векторы. В связанных вариантах осуществления вектор способен доставлять полинуклеотид в клетку-хозяин, такую как гемопоэтическая клетка-предшественник или клетка иммунной системы (например, гемопоэтическая клетка-предшественник человека или клетка иммунной системы человека). Иллюстративные клетки иммунной системы включают CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную негативную Т-клетку, γδ Т-клетку, естественную киллерную клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию (например, человеческие). В некоторых вариантах осуществления клетка иммунной системы представляет собой Т-клетку, такую как наивная Т-клетка, Т-клетка центральной памяти, Т-клетка эффекторной памяти или любая их комбинация, все из которых необязательно являются человеческими.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения

гиперпролиферативного расстройства или пролиферативного расстройства или состояния, характеризующегося сверхэкспрессией опухолевого белка Вильмса 1 (WT1), путем введения человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества клетки-хозяина, содержащей гетерологичный полинуклеотид или вектор экспрессии по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому из описанных в настоящем документе, где сконструированная или рекомбинантная клетка-хозяин экспрессирует на своей клеточной поверхности TCR, кодируемый гетерологичным полинуклеотидом, специфичным к комплексу WT1 p37 и МНС человека. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения гиперпролиферативного расстройства, или пролиферативного расстройства, или состояния, характеризующегося продукцией пептида p37 опухолевого белка Вильмса 1 (WT1) или присутствием комплекса пептида WT1 p37 и МНС, путем введения человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества клетки-хозяина, содержащей гетерологичный полинуклеотид или вектор экспрессии в соответствии с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления или любым описанным в настоящем документе, где сконструированная или рекомбинантная клетка-хозяин экспрессирует на своей клеточной поверхности TCR, кодируемый гетерологичным полинуклеотидом, специфичным к комплексу WT1 p37 и МНС человека.

Также настоящее изобретение относится к способу адоптивной иммунотерапии для лечения состояния, характеризующегося сверхэкспрессией WT1 в клетках субъекта, страдающего гиперпролиферативным или пролиферативным расстройством, включающему введение субъекту эффективного количества клетки-хозяина или композиции по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин модифицирована *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой аллогенную клетку, сингенную клетку или аутологичную клетку для субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека. В некоторых вариантах осуществления клетка иммунной системы представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную негативную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, естественную киллерную клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, Т-клетку центральной памяти, Т-клетку эффекторной памяти или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное или

пролиферативное расстройство представляет собой гематологическую злокачественную опухоль или солидный рак.

В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль выбрана из острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), хронического эозинофильного лейкоза (ХЭЛ), миелодиспластического синдрома (МДС), неходжкинской лимфомы (НХЛ) или множественной миеломы (ММ).

В некоторых вариантах осуществления изобретения солидный рак выбран из рака молочной железы, рака яичников, рака легких, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, карциномы костей и мягких тканей, опухоли головного мозга, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректальной аденокарциномы, колоректального рака, десмоидной опухоли, эмбрионального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, гинекологической опухоли, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака печени, мезотелиомы, злокачественной меланомы, остеосаркомы, рака поджелудочной железы, аденокарциномы протоков поджелудочной железы, первичной астроцитарной опухоли, первичного рака щитовидной железы, рака предстательной железы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, опухоли половых клеток яичка, рака уротелия, саркомы матки или рака матки.

В некоторых вариантах осуществления клетку-хозяина вводят парентерально.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту множества доз клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления множество доз вводят с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель.

Клетки, экспрессирующие рекомбинантный TCR (например, с высокой аффинностью или высокой функциональной авидностью) или его связывающий домен, специфичный к пептиду WT1 p37 человека, как описано в настоящем документе, можно вводить субъекту в фармацевтически или физиологически приемлемом или подходящем эксципиенте или носителе. Фармацевтически приемлемые эксципиенты представляют собой биологически совместимые носители, например, физиологический раствор, которые более подробно описаны в настоящем документе, которые подходят для введения человеку или другому млекопитающему, не относящемуся к человеку.

Терапевтически эффективная доза представляет собой количество клеток-хозяев (экспрессирующих рекомбинантный TCR с высокой аффинностью или высокой функциональной авидностью или его связывающий домен, специфичный к комплексу

пептида WT1 p37 и МНС человека), применяемых при адоптивном переносе, способное обеспечивать желаемый клинический результат (т. е. достаточное количество для индукции или усиления специфического Т-клеточного иммунного ответа против клеток, сверхэкспрессирующих WT1 или продуцирующих пептид WT1 p37 (например, цитотоксический Т-клеточный ответ), статистически значимым образом) у человека или млекопитающего, не являющегося человеком, получивших лечение. Как хорошо известно в области медицины, дозировка для любого пациента зависит от многих факторов, включая размер, массу тела, площадь поверхности тела, возраст пациента, конкретную терапию, которую необходимо назначить, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья, и другие лекарственные средства, вводимые одновременно. Дозы будут варьироваться, но предпочтительная доза введения клетки-хозяина, содержащей рекомбинантный вектор экспрессии, как описано в настоящем документе, составляет приблизительно 10^4 клеток/ м^2 , приблизительно 5×10^4 клеток/ м^2 , приблизительно 10^5 клеток/ м^2 , приблизительно 5×10^5 клеток/ м^2 , приблизительно 10^6 клеток/ м^2 , приблизительно 5×10^6 клеток/ м^2 , приблизительно 10^7 клеток/ м^2 , приблизительно 5×10^7 клеток/ м^2 , приблизительно 10^8 клеток/ м^2 , приблизительно 5×10^8 клеток/ м^2 , приблизительно 10^9 клеток/ м^2 , приблизительно 5×10^9 клеток/ м^2 , приблизительно 10^{10} клеток/ м^2 , приблизительно 5×10^{10} клеток/ м^2 или приблизительно 10^{11} клеток/ м^2 . В некоторых вариантах осуществления доза содержит приблизительно 10^7 клеток/ м^2 , приблизительно 5×10^7 клеток/ м^2 , приблизительно 10^8 клеток/ м^2 , приблизительно 5×10^8 клеток/ м^2 , приблизительно 10^9 клеток/ м^2 , приблизительно 5×10^9 клеток/ м^2 , приблизительно 10^{10} клеток/ м^2 , приблизительно 5×10^{10} клеток/ м^2 или приблизительно 10^{11} клеток/ м^2 .

Фармацевтические композиции можно вводить способом, соответствующим заболеванию или состоянию, подлежащему лечению (или предупреждению), как определено специалистами в области медицины. Подходящая доза, подходящая продолжительность и частота введения композиций будут определяться такими факторами, как состояние здоровья пациента, параметры пациента (т. е. вес, масса или площадь тела), тип и тяжесть заболевания пациента, конкретная форма активного ингредиента и способ введения. Как правило, подходящая доза и схема лечения обеспечивают композицию(и) в количестве, достаточном для достижения терапевтического и/или профилактического действия (такого, как описано в настоящем документе, включая улучшенный клинический исход, такой как более частые ремиссии, полные или частичные, или более длительные периоды без признаков болезни и/или общую выживаемость или уменьшение выраженности симптомов). Для профилактического применения доза должна быть достаточной для предотвращения, отсрочки начала или уменьшения тяжести заболевания,

связанного с заболеванием или расстройством. Профилактический эффект иммуногенных композиций, вводимых в соответствии с описанными в настоящем документе способами, может быть определен путем проведения доклинических (включая исследования на животных *in vitro* и *in vivo*) и клинических исследований и анализа данных, полученных на их основе, с помощью соответствующих статистических, биологических и клинических способов и приемов, все из которых может легко осуществить специалист в данной области техники.

Состояние, связанное со сверхэкспрессией WT1 (или, в некоторых вариантах осуществления, экспрессией), включает любое расстройство или состояние, при котором присутствует клеточная или молекулярная пониженная активность, избыточная активность или неправильная активность WT1, и обычно возникает в результате необычно высокого (со статистической значимостью) уровня экспрессии WT1 в пораженных клетках (например, лейкозных клетках) по сравнению с нормальными клетками. Субъект, страдающий таким расстройством или состоянием, получит пользу от лечения композицией или способом в соответствии с описанными в настоящем документе вариантами осуществления. Некоторые состояния, связанные со сверхэкспрессией WT1, таким образом, могут включать как острые, так и хронические расстройства и заболевания, такие как те патологические состояния, которые служат для субъекта предрасполагающим фактором к определенному расстройству.

Некоторые примеры состояний, связанных со сверхэкспрессией WT1, включают гиперпролиферативные расстройства, которые в некоторых аспектах относятся к состояниям активированных и/или пролиферирующих клеток (которые также могут быть транскрипционно сверхактивными) у субъекта, включая опухоли, новообразования, рак, злокачественные новообразования и т. д. Дополнительно для активированных или пролиферирующих клеток гиперпролиферативное расстройство может также включать аберрацию или нарушение регуляции процессов гибели клеток вследствие некроза или апоптоза. Такая аберрация процессов гибели клеток может быть связана с множеством состояний, включая рак (включая первичные, вторичные злокачественные новообразования, а также метастазы) или другими состояниями.

Согласно определенным вариантам осуществления, с помощью описанных в настоящем документе композиций и способов можно лечить практически любой тип рака, который характеризуется сверхэкспрессией WT1, включая гематологические злокачественные опухоли (например, лейкоз, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), Т- или В-клеточные лимфомы, миелому и другие). Кроме того, "рак" может относиться к любой ускоренной пролиферации клеток, включая солидные опухоли, асцитные опухоли,

опухоли крови или лимфы или другие злокачественные опухоли; злокачественные новообразования соединительной ткани; метастатическое заболевание; минимальное остаточное заболевание после трансплантации органов или стволовых клеток; рак с множественной лекарственной устойчивостью, первичные или вторичные злокачественные новообразования, ангиогенез, связанный со злокачественными новообразованиями, или другие формы рака. Также представлены конкретные варианты осуществления, где включен только один из вышеуказанных типов заболевания или где могут быть исключены конкретные состояния, независимо от того, характеризуются ли они сверхэкспрессией WT1 или нет.

Некоторые способы лечения или предупреждения, описанные в настоящем документе, включают введение клетки-хозяин (которая может быть аутологичной, аллогенной или сингенной), содержащей желаемую молекулу нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, которая стабильно интегрирована в хромосому клетки. Например, такая клеточная композиция может быть создана *ex vivo* с применением аутологичных, аллогенных или сингенных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, антигенпрезентирующих клеток, естественных киллерных клеток) для введения желаемой композиции Т-клеток, направленной на WT1, субъекту в качестве адоптивной иммунотерапии.

В контексте настоящего описания введение композиции или терапии в некоторых аспектах относится к их доставке субъекту, независимо от пути или способа доставки. Введение может осуществляться непрерывно или периодически, а также парентерально. Введение может быть предназначено для лечения субъекта с уже подтвержденным выявленным состоянием, заболеванием или патологическим состоянием, или для лечения субъекта, склонного к или подверженного риску развития такого состояния, заболевания или патологического состояния. Совместное введение с дополнительной терапией может включать одновременную и/или последовательную доставку нескольких агентов в любом порядке и по любой схеме дозирования (например, специфически модифицированные WT1 (т. е. рекомбинантные или сконструированные) клетки-хозяева с одним или более цитокинами, иммуносупрессивная терапия, такая как ингибиторы кальциневрина, кортикостероиды, ингибиторы микротрубочек, низкая доза пролекарства микофеноловой кислоты или любая их комбинация). Например, терапия по настоящему изобретению может быть объединена со специфическими ингибиторами или модуляторами компонентов иммуносупрессии, такими как ингибиторы или модуляторы молекул иммунных контрольных точек (например, антитела к PD-1, к PD-L1 или к CTLA-4, см., например, Pardoll, *Nature Rev. Cancer* 12: 252, 2012, Chen and Mellman, *Immunity* 39: 1, 2013).

В некоторых вариантах осуществления клетку-хозяина вводят субъекту в дозе от приблизительно 10^7 клеток/ m^2 до приблизительно 10^{11} клеток/ m^2 . В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение цитокина. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-2, IL-15, IL-21 или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-2 и его вводят одновременно или последовательно с клеткой-хозяин. В некоторых вариантах осуществления цитокин вводят последовательно при условии, что субъекту вводили клетку-хозяин по меньшей мере три или четыре раза перед введением цитокина.

В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-2 и его вводят подкожно.

В некоторых вариантах осуществления субъект дополнительно получает иммуносупрессивную терапию.

В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивная терапия выбрана из ингибиторов кальциневрина, кортикостероидов, ингибиторов микротрубочек, низкой дозы пролекарства микофеноловой кислоты или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления субъект получил трансплантацию немиелоаблативных или миелоаблативных гемопоэтических клеток.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят клетку-хозяин по меньшей мере через три месяца после трансплантации немиелоаблативных гемопоэтических клеток.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят клетку-хозяин по меньшей мере через два месяца после трансплантации миелоаблативных гемопоэтических клеток. Способы и схемы проведения трансплантации гемопоэтических клеток (НСТ) известны в данной области техники и могут включать трансплантацию любой подходящей донорской клетки, такой как клетка, полученная из пуповинной крови, костного мозга или периферической крови, гемопоэтическая стволовая клетка, мобилизованная стволовая клетка или клетка из околоплодных вод. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку по настоящему изобретению можно вводить вместе с гемопоэтическими стволовыми клетками или вскоре после их введения в составе модифицированной терапии НСТ. В некоторых вариантах осуществления НСТ включает донорскую гемопоэтическую клетку, содержащую нокаут хромосомного гена, кодирующего компонент HLA, нокаут хромосомного гена, кодирующего компонент TCR, или оба таких нокаута.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения субъект ранее получал противолимфоцитарную химиотерапию до приема композиции или НСТ. В некоторых вариантах осуществления противолимфоцитарная химиотерапия включает режим

кондиционирования, включающий циклофосфамид, флударабин, антитимоцитарный глобулин или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят множество доз рекомбинантной клетки-хозяина, как описано в настоящем документе, которые можно вводить с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель. В дополнительных вариантах осуществления последовательно вводят цитокин при условии, что субъекту вводили рекомбинантную клетку-хозяина по меньшей мере три или четыре раза перед введением цитокина. В некоторых вариантах осуществления цитокин вводят подкожно (например, IL-2, IL-15, IL-21).

В других вариантах осуществления субъект, получающий лечение, дополнительно получает иммуносупрессивную терапию, такую как антитело, специфичное к PD-1 (например, пидилизумаб, ниволумаб или пембролизумаб), антитело, специфичное к PD-L1 (например, MDX-1105, BMS-936559, MEDI4736, MPDL3280A или MSB0010718C), антитело, специфичное к CTLA4 (например, тремелизумаб или ипилизумаб), ингибиторы кальциневрина, кортикостероиды, ингибиторы микротрубочек, низкую дозу пролекарства микофеноловой кислоты или любую их комбинацию. В других вариантах осуществления субъект, получающий лечение, получил трансплантацию немиелоаблативных или миелоаблативных гемопоэтических клеток, при этом лечение можно вводить через от по меньшей мере двух до по меньшей мере трех месяцев после трансплантации немиелоаблативных гемопоэтических клеток.

Эффективное количество терапевтической или фармацевтической композиции в некоторых аспектах относится к количеству, достаточному, при режимах дозирования и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемых клинических результатов или лечения, оказывающего положительное действие, как описано в настоящем документе. Эффективное количество может быть доставлено за одно или более введений. Если введение выполняют субъекту, у которого уже известно или подтверждено наличие заболевания или патологического состояния, термин "терапевтическое количество" может относиться к лечению, тогда как "профилактически эффективное количество" может означать введение эффективного количества субъекту, который предрасположен к или подвержен риску развития заболевания или патологического состояния (например, рецидива), в качестве профилактического курса.

Уровень иммунного ответа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) может быть определен любым из многочисленных иммунологических способов, описанных в настоящем документе и обычно применяемых в данной области техники. Уровень иммунного ответа ЦТЛ может быть определен до и после введения любого из описанных в

настоящем документе WT1-специфичных TCR, экспрессируемых, например, Т-клеткой. Анализы цитотоксичности для определения активности ЦТЛ могут быть выполнены с применением любого из нескольких способов, обычно применяемых в данной области техники (см., например, Henkart, et al., "Cytotoxic T-Lymphocytes" in *Fundamental Immunology*, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), pages 1127–50, и цитируемые в данной публикации ссылки).

Антигенспецифические Т-клеточные ответы обычно определяют путем сравнения наблюдаемых Т-клеточных ответов в соответствии с любыми из описанных в настоящем документе функциональных параметров Т-клеток (например, пролиферацией, высвобождением цитокинов, активностью ЦТЛ, измененным фенотипом маркера клеточной поверхности и т.д.), которые могут формироваться между Т-клетками, которые подвергаются действию когнатного антигена в соответствующем контексте (например, антигена, используемого для праймирования или активации Т-клеток, при презентировании иммуносовместимыми антигенпрезентирующими клетками), и Т-клетками из той же исходной популяции, которые вместо этого подвергаются воздействию структурно отличного или нерелевантного контрольного антигена. Ответ на когнатный антиген, статистически значимо превышающий ответ на контрольный антиген, означает антигенную специфичность.

Биологический образец может быть получен от субъекта для определения наличия и уровня иммунного ответа на антигенный пептид, производный от WT1, как описано в настоящем документе. В контексте настоящего документа "биологический образец" может представлять собой образец крови (из которого может быть получена сыворотка или плазма), биоптат, биологические жидкости (например, лаваж легких, асцит, смывы со слизистой оболочки, синовиальная жидкость), костный мозг, лимфатические узлы, эксплантат ткани, культуру органа или любую другую ткань или препарат клеток от субъекта или биологического источника. Биологические образцы также могут быть получены от субъекта перед получением какой-либо иммуногенной композиции, и такой биологический образец является пригодным в качестве контроля для установления исходных данных (т. е. до иммунизации).

Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть представлены в контейнерах для однократной или многократной дозы, таких как запечатанные ампулы или флаконы. Такие контейнеры могут быть заморожены для сохранения стабильности препарата перед применением. В некоторых вариантах осуществления однократная доза включает рекомбинантную клетку-хозяин, как описано в настоящем документе, в дозе от приблизительно 10^7 клеток/м² до приблизительно 10^{11}

клеток/м². Разработка подходящих схем дозирования и лечения для применения конкретных композиций, описанных в настоящем документе, в различных схемах лечения, включая, например, парентеральное или внутривенное введение или препарат.

Если композицию субъекту вводят парентерально, то композиция также может включать стерильный водный или масляный раствор или суспензию. Подходящие нетоксичные разбавители или растворители, подходящие для парентерального введения, включают воду, раствор Рингера, изотонический солевой раствор, 1,3-бутандиол, этанол, пропиленгликоль или полиэтиленгликоли в смесях с водой. Водные растворы или суспензии могут дополнительно содержать один или более буферных агентов, таких как ацетат натрия, цитрат натрия, борат натрия или тартрат натрия. Конечно, любой материал, применяемый для получения любой единичной дозированной формы, должен быть фармацевтически чистым и по существу нетоксичным в применяемых количествах. Кроме того, активные соединения могут быть включены в препараты и композиции с замедленным высвобождением. Однократная дозированная форма, в контексте настоящего документа, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению, каждая единица может содержать заранее определенное количество рекомбинантных клеток или активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с подходящим фармацевтическим носителем.

Как правило, подходящая дозировка и схема лечения обеспечивает активные молекулы или клетки в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического или профилактического эффекта. Такой ответ можно контролировать путем установления улучшенного клинического исхода (например, более частых ремиссий, полной или частичной, или более длительной выживаемости без признаков заболевания) у субъектов, получивших лечение, по сравнению с субъектами, не получившими лечение. Увеличение ранее существовавших иммунных ответов на опухолевый белок обычно коррелирует с улучшением клинического исхода. Такие иммунные ответы обычно можно оценить с помощью стандартных анализов пролиферации, цитотоксичности или цитокинов, которые являются стандартными в данной области техники и могут выполняться с применением образцов, полученных от субъекта до и после лечения.

Способы по настоящему изобретению могут дополнительно включать введение одного или более дополнительных агентов для лечения заболевания или расстройства в составе комбинированной терапии. Например, в некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение композиции по настоящему изобретению вместе с (в одно время, одновременно или последовательно) ингибитором иммунных

контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение композиции по настоящему изобретению (например, TCR, полинуклеотида, вектора или клетки-хозяина, или их комбинации) с агонистом агента, стимулирующего иммунную контрольную точку. В дополнительных вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение композиции по настоящему изобретению со вспомогательной терапией, такой как химиотерапевтический агент, лучевая терапия, хирургическое вмешательство, антитела или любая их комбинация.

В контексте настоящего документа термин "агент подавления иммунного ответа" или "иммуносупрессирующий агент" относится к одной или более клеткам, белкам, молекулам, соединениям или комплексам, обеспечивающим ингибирующие сигналы для помощи в управлении или подавлении иммунного ответа. Например, иммуносупрессирующие агенты включают те молекулы, которые частично или полностью блокируют иммунную стимуляцию, уменьшают, предотвращают или откладывают активацию иммунной системы, или увеличивают, активируют или повышающе регулируют подавление иммунитета. Примеры иммуносупрессирующих агентов для направленного воздействия (например, с помощью ингибитора иммунной контрольной точки) включают PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, CTLA4, B7-H3, B7-H4, CD244/2B4, HVEM, BTLA, CD160, TIM3, GAL9, KIR, PVR1G (CD112R), PVRL2, аденозин, A2aR, иммуносупрессивные цитокины (например, IL-10, IL-4, IL-1RA, IL-35), IDO, аргиназу, VISTA, TIGIT, L AIR1, CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5, клетки Treg или любую их комбинацию.

Способы и схемы проведения НСТ известны в данной области техники и могут включать трансплантацию любой подходящей донорской клетки, такой как клетка, полученная из пуповинной крови, костного мозга или периферической крови, гемопоэтическая стволовая клетка, мобилизованная стволовая клетка или клетка из окоплодных вод. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления модифицированную иммунную клетку по настоящему изобретению можно вводить вместе с гемопоэтическими стволовыми клетками или вскоре после их введения в составе модифицированной терапии НСТ. В некоторых вариантах осуществления НСТ включает донорскую гемопоэтическую клетку, содержащую нокаут хромосомного гена, кодирующего компонент HLA, нокаут хромосомного гена, кодирующего компонент TCR, или оба таких нокаута.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения субъект ранее получал противолимфоцитарную химиотерапию перед приемом композиции или НСТ. В некоторых вариантах осуществления противолимфоцитарная химиотерапия включает режим кондиционирования, включающий циклофосфамид, флударабин, антитимоцитарный

глобулин или их комбинацию.

Способы по настоящему изобретению могут дополнительно включать введение одного или более дополнительных агентов для лечения заболевания или расстройства в составе комбинированной терапии. Например, в некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение композиции по настоящему изобретению с ингибитором иммунных контрольных точек (в одно время, одновременно или последовательно). В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение композиции по настоящему изобретению с агонистом агента, стимулирующего иммунную контрольную точку. В дополнительных вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение композиции по настоящему изобретению со вспомогательной терапией, такой как химиотерапевтический агент, лучевая терапия, хирургическое вмешательство, антитела или любая их комбинация.

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

Ингибитор иммуносупрессирующего агента (также называемый ингибитором иммунной контрольной точки) может представлять собой соединение, антитело, фрагмент антитела или слитый полипептид (например, слитый с Fc, такой как CTLA4-Fc или LAG3-Fc), бессмысловую молекулу, молекулу рибозима или РНКи или низкомолекулярную органическую молекулу. В любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, способ может включать композицию по настоящему изобретению с одним или более ингибиторами любого из следующих иммуносупрессирующих компонентов, по отдельности или в любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором PD-1, например, PD-1-специфичным антителом

или его связывающим фрагментом, таким как пидилизумаб, ниволумаб, пембролизумаб, MEDI0680 (ранее AMP-514), AMP-224, BMS-936558 или любую их комбинацию. В дополнительных вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с PD-L1-специфичным антителом или его связывающим фрагментом, таким как BMS-936559, дурвалумаб (MEDI4736), атезолизумаб (RG7446), авелумаб (MSB0010718C), MPDL3280A или любой их комбинацией. Также представлены цемиплимаб, IBI-308, ниволумаб плюс релатлимаб, BCD-100, камрелизумаб, JS-001, спартализумаб, тислелизумаб, AGEN-2034, BGBA-333 плюс тислелизумаб, CBT-501, достарлимаб, дурвалумаб плюс MEDI-0680, JNJ-3283, пазопаниба гидрохлорид плюс пембролизумаб, пидилизумаб, REGN-1979 плюс цемиплимаб, ABBV-181, ADUS-100 плюс спартализумаб, AK-104, AK-105, AMP-224, BAT-1306, BI-754091, CC-90006, цемиплимаб плюс REGN-3767, CS-1003, GLS-010, LZM-009, MEDI-5752, MGD-013, PF-06801591, Sym-021, тислелизумаб плюс памипариб, XmAb-20717, AK-112, ALPN-202, AM-0001, антитело в качестве антагониста PD-1 при болезни Альцгеймера, BH-2922, BH-2941, BH-2950, BH-2954, биологическое лекарственное средство в качестве антагониста CTLA-4 и PD-1 при солидной опухоли, биспецифическое моноклональное антитело для нацеливания против PD-1 и LAG-3 при онкологическом заболевании, BLSM-101, CB-201, CB-213, CBT-103, CBT-107, клеточная иммунотерапия плюс ингибитор PD-1, CX-188, HAB-21, HEISCOIII-003, IKT-202, JTX-4014, MCLA-134, MD-402, mDX-400, MGD-019, моноклональное антитело в качестве антагониста PDCD1 при онкологическом заболевании, моноклональное антитело в качестве антагониста PD-1 при онкологическом заболевании, онколитический вирус для ингибирования PD-1 при онкологическом заболевании, OT-2, антагонист PD-1 плюс ропегинтерферон альфа-2b, PEGMP-7, PRS-332, RXI-762, STIA-1110, TSR-075, вакцина для нацеливания против HER2 и PD-1 при онкологическом заболевании, вакцина для нацеливания против PD-1 при онкологическом заболевании и аутоиммунных расстройствах, XmAb-23104, антисмысловый олигонуклеотид для ингибирования PD-1 при онкологическом заболевании, AT-16201, биспецифическое моноклональное антитело для ингибирования PD-1 при онкологическом заболевании, IMM-1802, моноклональные антитела в качестве антагонистов PD-1 и CTLA-4 при солидной опухоли и гематологической опухоли, биоаналог ниволумаба, рекомбинантный белок в качестве агониста CD278 и CD28 и антагониста PD-1 при онкологическом заболевании, рекомбинантный белок в качестве агониста PD-1 при аутоиммунных и воспалительных расстройствах, SNA-01, SSI-361, YBL-006, AK-103, JY-034, AUR-012, BGB-108, лекарственное средство для ингибирования PD-1, Gal-9 и TIM-3 при солидной опухоли, ENUM-244C8, ENUM-388D4, MEDI-0680, моноклональные антитела в качестве

антагонистов PD-1 при метастатической меланоме и метастатическом раке легкого, моноклональное антитело для ингибирования PD-1 при онкологическом заболевании, моноклональные антитела для нацеливания против CTLA-4 и PD-1 при онкологическом заболевании, моноклональное антитело в качестве антагониста PD-1 при НМРЛ (немелкоклеточный рак легких), моноклональные антитела для ингибирования PD-1 и TIM-3 при онкологическом заболевании, моноклональное антитело для ингибирования PD-1 при онкологическом заболевании, рекомбинантный белок для ингибирования PD-1 и VEGF-A при гематологических злокачественных новообразованиях и солидной опухоли, низкомолекулярный антагонист PD-1 при онкологическом заболевании, Sym-016, инебилизумаб плюс MEDI-0680, вакцина для нацеливания против PDL-1 и IDO при метастатической меланоме, моноклональное антитело против PD-1 плюс клеточная иммунотерапия при глиобластоме, антитело в качестве антагониста PD-1 при онкологическом заболевании, моноклональные антитела для ингибирования PD-1/PD-L1 при гематологических злокачественных новообразованиях и бактериальных инфекциях, моноклональное антитело для ингибирования PD-1 при ВИЧ и/или низкомолекулярный ингибитор PD-1 при солидной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором LAG3, таким как LAG525, IMP321, IMP701, 9H12, BMS-986016 или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CTLA4. В конкретных вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации со специфическим антителом против CTLA4 или его связывающим фрагментом, таким как ипилимумаб, тремелимуаb, слитые белки CTLA4-Ig (например, абатацепт, белатацепт) или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации со специфическим антителом против B7-H3 или его связывающим фрагментом, таким как эноблитузумаб (MGA271), 376,96 или с обоими. Связывающий фрагмент антитела против B7-H4 может представлять собой scFv или его слитый белок, как описано, например, в Dangaj et al., Cancer Res. 73: 4820, 2013, а также описано в патенте США № 9574000 и публикациях PCT WO/201640724A1 и WO 2013/025779A1.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CD244.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению

применяют в комбинации с ингибитором BLTA, HVEM, CD160 или любой их комбинацией. Антитела против CD-160 описаны, например, в публикации PCT № WO 2010/084158.

В некоторых вариантах осуществления композицию клетки по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором TIM3.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором Gal9.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором передачи сигнала аденозина, таким как аденозиновый рецептор-ловушка.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором A2aR.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором KIR, таким как лирилумаб (BMS-986015).

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором ингибирующего цитокина (обычно цитокина, отличного от TGF β) или развития или активности Treg.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором IDO, таким как лево-1-метилтриптофан, эпакадостат (INCB024360; Liu et al., Blood 115: 3520-30, 2010), эбселен (Terentis et al., Biochem.49: 591-600, 2010), индоксимод, NLG919 (Mautino et al., American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013; Apr 6-10, 2013), 1-метилтриптофан (1-MT)-тирапазамин или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором аргиназы, таким как метиловый эфир N(омега)-нитро-L-аргинина (L-NAME), N-омега-гидрокси-нор-1-аргинин (нор-NOHA), L-NOHA, 2(S)-амино-6-бороногексановая кислота (ABH), S-(2-бороноэтил)-L-цистеин (BEC) или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором VISTA, таким как CA-170 (Curis, Лексингтон, Массачусетс).

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором TIGIT, таким как, например, COM902 (CompuGen, Торонто, Онтарио, Канада), ингибитором CD155, таким как, например, COM701 (CompuGen) или с обоими.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению

применяют в комбинации с ингибитором PVRIG, PVRL2 или с обоими. Антитела против PVRIG описаны, например, в публикации заявки PCT WO 2016/134333. Антитела против PVRL2 описаны, например, в публикации заявки PCT WO 2017/021526.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором LAIR1.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5 или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с агентом, увеличивающим активность (т. е. являющимся агонистом) молекулы стимулятора иммунной контрольной точки. Например, композицию по настоящему изобретению можно применять в комбинации с агонистом CD137 (4-1BB) (таким как, например, урелумаб), агонистом CD134 (OX-40) (таким как, например, MEDI6469, MEDI6383 или MEDI0562), леналидомидом, помалидомидом, агонистом CD27 (таким как, например, CDX-1127), агонистом CD28 (таким как, например, TGN1412, CD80 или CD86), агонистом CD40 (таким как, например, CP-870,893, rhuCD40L или SGN-40), агонистом CD122 (таким как, например, IL-2), агонистом GITR (таким как, например, гуманизированные моноклональные антитела, описанные в публикации заявки PCT WO 2016/054638), агонистом ICOS (CD278) (таким как, например, GSK3359609, mAb 88.2, JTX-2011, Icos 145-1, Icos 314-8 или любой их комбинацией). В любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, способ может включать введение композиции по настоящему изобретению с одним или более агонистами молекулы стимулятора иммунной контрольной точки, включая любой из вышеперечисленных, по отдельности или в любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает композицию по настоящему изобретению и вспомогательную терапию, включающую одно или более из следующего: антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфичные к раковому антигену, экспрессируемому солидной опухолью без воспаления, лучевое лечение, хирургическое вмешательство, химиотерапевтический агент, цитокин, РНКи или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления способ комбинированной терапии включает введение композиции по настоящему изобретению и дополнительное проведение лучевого лечения или хирургического вмешательства. Лучевая терапия хорошо известна в данной области техники и включает терапию рентгеновским излучением, такую как гамма-облучение, и радиофармацевтическую терапию. Операции и хирургические способы,

подходящие для лечения данного рака у субъекта, хорошо известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления способ комбинированной терапии включает введение композиции по настоящему изобретению и дополнительное введение химиотерапевтического агента. Химиотерапевтический агент включает, но не ограничивается ими, ингибитор функции хроматина, ингибитор топоизомеразы, лекарственное средство, ингибирующее микротрубочки, агент, повреждающий ДНК, антиметаболит (например, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и аналоги с модифицированным сахаром), ингибитор синтеза ДНК, агент, взаимодействующий с ДНК (такой как интеркалирующий агент) и ингибитор репарации ДНК. Иллюстративные химиотерапевтические агенты включают, но не ограничиваются ими, следующие группы: антиметаболиты/противораковые агенты, такие как аналоги пиримидина (5-фторурацил, флоксуридин, капецитабин, гемцитабин и цитарабин) и аналоги пурина, антагонисты фолиевой кислоты и родственные ингибиторы (меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и 2-хлордезоксиаденозин (кладрибин)); антипролиферативные/антимитотические агенты, включая натуральные продукты, такие как алкалоиды барвинка (винбластин, винкристин и винорелбин), разрушители микротрубочек, такие как таксан (паклитаксел, доцетаксел), винкристин, винбластин, нокодазол, эпотилоны и навелбин, эпидиподофиллотоксины (этопозид, тенипозид), агенты, повреждающие ДНК (актиномицин, амсакрин, антрациклины, блеомицин, бусульфан, камптотецин, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид, цитоксан, дактиномицин, даунорубин, доксорубин, эпирубин, гексаметилмеламиноксалиплатин, ифосфамид, мелфалан, мерхлорэтамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевина, пликамицин, прокарбазин, таксол, таксотер, темозоламид, тенипозид, триэтилентioфосфорамид и этопозид (VP 16)); антибиотики, такие как дактиномицин (актиномицин D), даунорубин, доксорубин (адриамицин), идарубин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин) и митомицин; ферменты (L-аспарагиназа, системно метаболизирующая L-аспарагин и удаляющая клетки, неспособные синтезировать собственный аспарагин); антиагрегантные агенты; антипролиферативные/антимитотические алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (мехлорэтамин, циклофосфамид и его аналоги, мелфалан, хлорамбуцил), этиленимины и метилмеламины (гексаметилмеламин и тиотепа), алкилсульфонаты-бусульфан, нитрозомочевины (кармустин (BCNU) и аналоги, стрептозоцин), триазены – дакарбазин (DTIC); антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат); координационные комплексы платины

(цисплатин, карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевина, митотан, аминоклутетимид; гормоны, аналоги гормонов (эстроген, тамоксифен, гозерелин, бикалутамид, нилутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол, анастрозол); антикоагулянты (гепарин, синтетические соли гепарина и другие ингибиторы тромбина); фибринолитические агенты (такие как тканевой активатор плазминогена, стрептокиназа и урокиназа), аспирин, дипиридамол, тиклопидин, клопидогрел, абциксимаб; антимиграционные агенты; антисекреторные средства (бравелдин); иммуносупрессанты (циклоспорин, такролимус (FK-506), сиролимус (рапамицин), азатиоприн, микофенолата мофетил); антиангиогенные соединения (TNP470, генистеин) и ингибиторы фактора роста (ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ингибиторы фактора роста фибробластов (FGF)); блокатор рецепторов ангиотензина; доноры оксида азота; антисмысловые олигонуклеотиды; антитела (трастузумаб, ритуксимаб); химерные антигенные рецепторы; ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки (третиноин); ингибиторы mTOR, ингибиторы топоизомеразы (доксорубин (адриамицин), амсакрин, камптотецин, даунорубин, дактиномицин, энипозид, эпирубин, этопозид, идарубин, иринотекан (CPT-11) и митоксантрон, топотекан, иринотекан), кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и пренизолон); ингибиторы трансдукции сигнала киназы фактора роста; индукторы митохондриальной дисфункции, токсины, такие как холерный токсин, рицин, экзотоксин *Pseudomonas*, токсин аденилатциклазы *Bordetella pertussis* или дифтерийный токсин, и активаторы каспаз; и разрушители хроматина.

Цитокины можно применять для управления иммунным ответом хозяина в отношении противораковой активности. См., например, Floros & Tarhini, *Semin. Oncol.* 42(4):539-548, 2015. Цитокины, пригодные для стимуляции иммунного противоракового или противоопухолевого ответа, включают, например, IFN- α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-24 и GM-CSF, по отдельности или в любой комбинации с композицией по настоящему изобретению.

В настоящем документе также представлены способы модуляции адаптивной иммунотерапии, включающие введение субъекту, который ранее получил модифицированную клетку-хозяин по настоящему изобретению, содержащую гетерологичный полинуклеотид, кодирующий белок-предохранитель, когнатное соединение белка-предохранителя в количестве, эффективном для удаления у субъекта ранее введенной модифицированной клетки-хозяин.

В некоторых вариантах осуществления белок-предохранитель содержит tEGFR, и когнатное соединение представляет собой цетуксимаб, или белок-предохранитель содержит iCasp9, а когнатное соединение представляет собой AP1903 (например,

димеризованный AP1903), или белок-предохранитель содержит полипептид RQR, и когнатное соединение представляет собой ритуксимаб, или белок-предохранитель содержит домен связывания тус, а когнатное соединение представляет собой антитело, специфичное к домену связывания тус.

В дополнительных аспектах представлены способы получения композиции или однократной дозы по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способы включают объединение (i) аликвоты клетки-хозяина, трансдуцированной вектором по настоящему изобретению, с (ii) фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению применяют для трансфекции/трансдукции клетки-хозяина (например, Т-клетки) для применения в адоптивной трансферной терапии (например, нацеливание на раковый антиген).

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают перед аликвотированием культивирование трансдуцированной клетки-хозяина и отбор трансдуцированной клетки как содержащей (т. е. экспрессирующей) вектор. В дополнительных вариантах осуществления способы включают после культивирования и отбора и перед аликвотированием размножение трансдуцированной клетки-хозяина. В любом из вариантов осуществления способов по настоящему изобретению, полученную композицию или однократную дозу можно заморозить для последующего применения. Любая подходящая клетка-хозяин может быть применена для получения композиции или однократной дозы в соответствии с настоящими способами, включая, например, гемопоэтическую стволовую клетку, Т-клетку, первичную Т-клетку, Т-клеточную линию, НК-клетку или НК-Т-клетку. В конкретных вариантах осуществления способы включают клетку-хозяина, которая представляет собой CD8⁺ Т-клетку, CD4⁺ Т-клетку или обе такие клетки.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором LAG3, таким как LAG525, IMP321, IMP701, 9H12, BMS-986016 или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CTLA4. В конкретных вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации со специфическим антителом против CTLA4 или его связывающим фрагментом, таким как ипилимумаб, тремелиумаб, слитые белки CTLA4-Ig (например, абатацепт, белатацепт) или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации со специфическим антителом против B7-H3 или его

связывающим фрагментом, таким как эноблитузумаб (MGA271), 376,96 или с обоими. Связывающий фрагмент антитела против В7-Н4 может представлять собой scFv или его слитый белок, как описано, например, в Dangaj et al., Cancer Res. 73: 4820, 2013, а также описано в патенте США № 9574000 и публикациях PCT WO/201640724A1 и WO 2013/025779A1.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CD244.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором BLTA, HVEM, CD160 или любой их комбинацией. Антитела против CD-160 описаны, например, в публикации PCT WO 2010/084158.

В некоторых вариантах осуществления композицию клетки по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором TIM3.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором Gal9.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором передачи сигнала аденозина, таким как аденозиновый рецептор-ловушка.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором A2aR.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором KIR, таким как лирилумаб (BMS-986015).

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором ингибирующего цитокина (обычно цитокина, отличного от TGFβ) или развития или активности Treg.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором IDO, таким как лево-1-метилтриптофан, эпакдостат (INCB024360; Liu et al., Blood 115: 3520-30, 2010), эбселен (Terentis et al., Biochem. 49: 591-600, 2010), индоксимод, NLG919 (Mautino et al., American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013; Apr 6-10, 2013), 1-метилтриптофан (1-MT)-тирапазамин или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором аргиназы, таким как метиловый эфир N(омега)-нитро-L-аргинина (L-NAME), N-омега-гидрокси-нор-1-аргинин (нор-NOHA), L-NOHA, 2(S)-амино-6-бороногексановая кислота (ABH), S-(2-бороноэтил)-L-цистеин (BEC) или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором VISTA, таким как CA-170 (Curis, Лексингтон, Массачусетс).

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором TIGIT, таким как, например, COM902 (CompuGen, Торонто, Онтарио, Канада), ингибитором CD155, таким как, например, COM701 (CompuGen), или с обоими.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором PVRIG, PVRL2 или с обоими. Антитела против PVRIG описаны, например, в публикации заявки PCT WO 2016/134333. Антитела против PVRL2 описаны, например, в публикации заявки PCT WO 2017/021526.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором LAIR1.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с ингибитором CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5 или любой их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в комбинации с агентом, увеличивающим активность (т. е. являющимся агонистом) молекулы стимулятора иммунной контрольной точки. Например, композицию можно применять в комбинации с агонистом CD137 (4-1BB) (таким как, например, урелумаб), агонистом CD134 (OX-40) (таким как, например, MEDI6469, MEDI6383 или MEDI0562), леналидомидом, помалидомидом, агонистом CD27 (таким как, например, CDX-1127), агонистом CD28 (таким как, например, TGN1412, CD80 или CD86), агонистом CD40 (таким как, например, CP-870,893, rhuCD40L или SGN-40), агонистом CD122 (таким как, например, IL-2), агонистом GITR (таким как, например, гуманизированные моноклональные антитела, описанные в публикации заявки PCT WO 2016/054638), агонистом ICOS (CD278) (таким как, например, GSK3359609, mAb 88.2, JTX-2011, Icos 145-1, Icos 314-8 или любой их комбинацией). В любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, способ может включать введение композиции по настоящему изобретению с одним или более агонистами молекулы стимулятора иммунной контрольной точки, включая любой из вышеперечисленных, по отдельности или в любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает композицию по настоящему изобретению и вспомогательную терапию, включающую одно или более из следующего: антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфичные к раковому антигену, экспрессируемому солидной опухолью без воспаления, лучевое

лечение, хирургическое вмешательство, химиотерапевтический агент, цитокин, РНКи или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления способ комбинированной терапии включает введение композиции по настоящему изобретению и дополнительное проведение лучевого лечения или хирургического вмешательства. Лучевая терапия хорошо известна в данной области техники и включает терапию рентгеновским излучением, такую как гамма-облучение, и радиофармацевтическую терапию. Операции и хирургические способы, подходящие для лечения данного рака у субъекта, хорошо известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления способ комбинированной терапии включает введение композиции по настоящему изобретению и дополнительное введение химиотерапевтического агента. Химиотерапевтический агент включает, но не ограничивается ими, ингибитор функции хроматина, ингибитор топоизомеразы, лекарственное средство, ингибирующее микротрубочки, агент, повреждающий ДНК, антиметаболит (например, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и аналоги с модифицированным сахаром), ингибитор синтеза ДНК, агент, взаимодействующий с ДНК (такой как интеркалирующий агент) и ингибитор репарации ДНК. Иллюстративные химиотерапевтические агенты включают, но не ограничиваются ими, следующие группы: антиметаболиты/противораковые агенты, такие как аналоги пиримидина (5-фторурацил, флоксуридин, капецитабин, гемцитабин и цитарабин) и аналоги пурина, антагонисты фолиевой кислоты и родственные ингибиторы (меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и 2-хлордезоксиаденозин (кладрибин)); антипролиферативные/антимитотические агенты, включая натуральные продукты, такие как алкалоиды барвинка (винбластин, винкристин и винорелбин), разрушители микротрубочек, такие как таксан (паклитаксел, доцетаксел), винкристин, винбластин, нокодазол, эпителины и навелбин, эпидиподофиллотоксины (этопозид, тенипозид), агенты, повреждающие ДНК (актиномицин, амсакрин, антрациклины, блеомицин, бусульфан, камптотецин, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид, цитоксан, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, гексаметилмеламиноксалиплатин, ифосфамид, мелфалан, мерхлорэтамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевина, пликамицин, прокарбазин, таксол, таксотер, темозоламид, тенипозид, триэтилентифосфорамида и этопозид (VP 16)); антибиотики, такие как дактиномицин (актиномицин D), даунорубицин, доксорубицин (адриамицин), идарубицин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин) и митомицин; ферменты (L-аспарагиназа, системно метаболизирующая L-аспарагин и

удаляющая клетки, неспособные синтезировать собственный аспарагин); антиагрегантные агенты; антипролиферативные/антимитотические алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (мехлорэтамин, циклофосфамид и его аналоги, мелфалан, хлорамбуцил), этиленимины и метилмеламины (гексаметилмеламин и тиотепа), алкилсульфонаты-бусульфан, нитрозомочевины (кармустин (BCNU) и аналоги, стрептозоцин), триазены – дакарбазин (DTIC); антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат); координационные комплексы платины (цисплатин, карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевина, митотан, аминоклутетимид; гормоны, аналоги гормонов (эстроген, тамоксифен, гозерелин, бикалутамид, нилутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол, анастрозол); антикоагулянты (гепарин, синтетические соли гепарина и другие ингибиторы тромбина); фибринолитические агенты (такие как тканевой активатор плазминогена, стрептокиназа и урокиназа), аспирин, дипиридамол, тиклопидин, клопидогрел, абциксимаб; антимиграционные агенты; антисекреторные средства (бревелдин); иммуносупрессанты (циклоспорин, такролимус (FK-506), сиролимус (рапамицин), азатиоприн, микофенолата мофетил); антиангиогенные соединения (TNP470, генистеин) и ингибиторы фактора роста (ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ингибиторы фактора роста фибробластов (FGF)); блокатор рецепторов ангиотензина; доноры оксида азота; антисмысловые олигонуклеотиды; антитела (трастузумаб, ритуксимаб); химерные антигенные рецепторы; ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки (третиноин); ингибиторы mTOR, ингибиторы топоизомеразы (доксорубицин (адриамицин), амсакрин, камптотецин, даунорубицин, дактиномицин, энипозид, эпирубицин, этопозид, идарубицин, иринотекан (CPT-11) и митоксантрон, топотекан, иринотекан), кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и пренизолон); ингибиторы трансдукции сигнала киназы фактора роста; индукторы митохондриальной дисфункции, токсины, такие как холерный токсин, рицин, экзотоксин *Pseudomonas*, токсин аденилатциклазы *Bordetella pertussis* или дифтерийный токсин, и активаторы каспаз; и разрушители хроматина.

Цитокины можно применять для управления иммунным ответом хозяина в отношении противораковой активности. См., например, Floros & Tarhini, *Semin. Oncol.* 42(4):539-548, 2015. Цитокины, пригодные для стимуляции иммунного противоракового или противоопухолевого ответа, включают, например, IFN- α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-24 и GM-CSF, по отдельности или в любой комбинации с композицией по настоящему изобретению.

В настоящем документе также представлены способы модуляции адаптивной иммунотерапии, включающие введение субъекту, который ранее получил

модифицированную клетку-хозяина по настоящему изобретению, содержащую гетерологичный полинуклеотид, кодирующий белок-предохранитель, когнатное соединение белка-предохранителя в количестве, эффективном для удаления у субъекта ранее введенной модифицированной клетки-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления белок-предохранитель содержит tEGFR, и когнатное соединение представляет собой цетуксимаб, или белок-предохранитель содержит iCasp9, а когнатное соединение представляет собой AP1903 (например, димеризованный AP1903), или белок-предохранитель содержит полипептид RQR, и когнатное соединение представляет собой ритуксимаб, или белок-предохранитель содержит домен связывания тус, а когнатное соединение представляет собой антитело, специфичное к домену связывания тус.

В дополнительных аспектах представлены способы получения композиции или однократной дозы по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способы включают объединение (i) аликвоты клетки-хозяина, трансдуцированной вектором по настоящему изобретению, с (ii) фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению применяют для трансфекции/трансдукции клетки-хозяина (например, Т-клетки) для применения в адоптивной трансферной терапии (например, нацеливание на раковый антиген).

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают перед аликвотированием культивирование трансдуцированной клетки-хозяина и отбор трансдуцированной клетки как содержащей (т. е. экспрессирующей) вектор. В дополнительных вариантах осуществления способы включают после культивирования и отбора и перед аликвотированием размножение трансдуцированной клетки-хозяина. В любом из вариантов осуществления способов по настоящему изобретению, полученную композицию или однократную дозу можно заморозить для последующего применения. Любая подходящая клетка-хозяин может быть применена для получения композиции или однократной дозы в соответствии с настоящими способами, включая, например, гемопоэтическую стволовую клетку, Т-клетку, первичную Т-клетку, Т-клеточную линию, НК-клетку или НК-Т-клетку. В конкретных вариантах осуществления способы включают клетку-хозяин, которая представляет собой CD8⁺ Т-клетку, CD4⁺ Т-клетку или обе такие клетки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Способы

Клеточные линии

T2 представляет собой TAP-дефицитную линию гибридных клеток Т-клеточного лейкоза/B-LCL, экспрессирующую только HLA A*02:01¹¹, и 293T/17 представляет собой высокотрансфицируемую клеточную линию, приобретенную в ATCC (Американская коллекция типовых культур). Клетки Юркат76 являются производными родительской клеточной линии Юркат с дефицитом TCR α /TCR β и не экспрессируют CD8 в природе¹². Клетки Юркат76 предварительно трансдуцировали для экспрессии CD8 $\alpha\beta$ (Юркат-CD8). Клеточные линии поддерживали в среде RPMI 1640 с HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин этансульфоновая кислота) (Invitrogen, GIBCO) с добавлением 10% инактивированного нагреванием FBS (фетальная бычья сыворотка) (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Культура Т-клеток человека:

Образцы лейкофереза собирали у здоровых доноров в Онкологическом альянсе Сизтла после письменного информированного согласия в соответствии с Хельсинкской декларацией и с одобрения наблюдательного совета учреждения в соответствии с протоколом 868.01. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из крови HLA-типированных доноров, и создавали 10 HLA-A*02:01-рестриктированных Т-клеточных линий для каждого донора, специфичных к пептиду WT1₃₇₋₄₅, VLDFAPPGA (всего 10 доноров), как описано ранее^{13,14}. Кратко, CD8⁺ Т клетки очищали с применением набора для выделения CD8⁺ Т-клеток EasySepTM Human (StemCell Technologies), и ДК получали из аутологичных МКПК путем адгезии к пластику и культивирования с 1000 ед/мл IL-4 и 800 ед/мл GMCSF в течение 2 дней с добавлением коктейля цитокинов созревания в последний день перед снятием клеток. ДК нагружали 1 мкг/мл пептида в течение 90 минут, а затем промывали для удаления избытка пептида и облучали при 4000 рад. Приблизительно 5×10^6 CD8⁺ Т-клеток совместно культивировали в соотношении 2,5:1 с активированными пептидом ДК плюс 30 нг/мл IL-21. Т-клетки поддерживали в среде RPMI 1640 с HEPES (Invitrogen, GIBCO) с добавлением 5% инактивированной нагреванием объединенной сыворотки человека (Bloodworks Northwest), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 55 мкМ 2- β -меркаптоэтанола. Культуры подпитывали каждые 2-3 дня, заменяя половину среды и добавляя 12,5 ед/мл IL-2, 2250 ед/мл IL-7 и IL-15. Т-клетки повторно стимулировали каждые 10 дней путем культивирования в соотношении 1:2 с облученными, активированными пептидом аутологичными МКПК.

Сортировка клеток на основе проточной цитометрии

Т-клеточные линии от всех доноров объединяли на льду в конце антигенспецифического размножения. Объединенный образец разделяли и окрашивали

тетрамером пептид/HLA-A2 в 3 условиях: (1) концентрация тетрамера дикого типа, определенная эмпирически для обеспечения максимального разделения положительных и отрицательных популяций, как описано в разделе "Измерение связывания и аффинности тетрамера"; (2) 100-кратное разведение оптимальной дозы тетрамера; и (3) отдельный модифицированный тетрамер, полученный путем мутации молекулы HLA-A2 в положениях D227K и T228A $\alpha 3$ -домена, которые взаимодействуют с CD8¹⁵. Было показано, что такой тетрамер избирательно связывает CD8-независимые TCR с высокой аффинностью^{16,17}. Для каждого образца, окрашенного тетрамером, клетки с наивысшими уровнями связывания тетрамера (верхние приблизительно 2 % меченых клеток) сортировали методом проточной цитометрии. Отсортированные популяции анализировали с помощью иммунологического анализа Adaptive Biotechnologies для количественной оценки относительной численности каждого клонотипа. Дополнительный образец, содержащий всю тетрамер-положительную популяцию, также отсортировывали из образца, окрашенного оптимальным тетрамером, и данные объединения TCR $\alpha\beta$ получали с помощью Adaptive Biotechnologies pairSeq Assay¹⁸.

Анализ данных

Расчеты обогащения

Оценку обогащения для каждого клонотипа рассчитывали как: (частота в отсортированной популяции тетрамера⁺)/(частота в несортированном объединенном образце). Клонотипам, которые не были обнаружены в объединенной выборке, была присвоена частота в объединенной выборке, соответствующая 1 клетке для расчетов обогащения.

Секвенирование TCR и альфа/бета объединение:

Анализ репертуара TCR выполняли с помощью анализа Adaptive Biotechnologies ImmunoSeq. Анализ V(D)J отдельных клеток (альфа/бета объединение TCR) выполняли с применением иммунного анализа отдельных клеток хромом с помощью 10-кратной геномики.

Трансдукция TCR

Кодон-оптимизированные конструкции TCR в ориентации TCR β -p2a-TCR α синтезировали на BioXpTM 3200 (SGI-DNA) и клонировали в лентивирусную плазмиду экспрессии pRRLSIN.cPPT.MSCV.WPRE (подарок д-ра Ричарда Моргана, NCI) компании Gibson Assembly. Затем вектор экспрессии упаковывали в клетки 293T с применением лентивирусной упаковки 3-го поколения. Лентивирусный супернатант собирали через 48 часов и фильтровали для удаления клеточного дебриса. Приблизительно 5×10^5 клеток Юркат76 объединяли с 2 мл лентивирусного супернатанта плюс 5 мкг/мл полибрена.

Клетки центрифугировали при 1000 g в течение 90 мин при 30 °C для облегчения трансдукции. Для TCR-трансдукции первичных CD8⁺ Т-клеток, HLA-A2⁺ МКПК обогащали CD8⁺ Т-клетками с применением набора для выделения CD8⁺ Т-клеток EasySep™ Human (StemCell Technologies) и активировали в течение 4 часов с помощью Dynabeads™ Human T-Expander CD3/CD28 (Gibco). Приблизительно 2×10⁶ CD8⁺ Т-клеток объединяли с 2 мл лентивирусного супернатанта плюс 5 мкг/мл сульфата протамина и 50 ед/мл IL-2. Трансгенные TCR⁺ клетки отсортировывали с помощью FACSorted с применением тетрамеров пептид/HLA-A*02:01 для получения чистых популяций антигенспецифических клеток для последующих анализов.

Данные связывания TCR

Оценка правильного объединения TCR

Клетки Юркат76 трансдуцировали каждой конструкцией TCR и анализировали на связывание тетрамера относительно поверхностной экспрессии CD3, что отражает общую поверхностную экспрессию трансгенного TCR в этих клетках, лишенных эндогенного TCR.

Измерение связывания и аффинности тетрамера

Оптимальную дозу тетрамера определяли путем титрования тетрамера на положительной популяции Т-клеток и выбора концентрации, которая наилучшим образом разделяла положительную и отрицательную популяции без увеличения фонового окрашивания отрицательной популяции.

Функциональные данные TCR

Продукция IFN-γ

Первичным CD8⁺ Т-клеткам проводили лентивирусную трансдукцию каждой конструкцией экспрессии TCR и сортировали для получения однородной тетрамер-положительной популяции клеток, затем смешивали в соотношении 1:1 с клетками-мишенями T2, активированными уменьшающимися дозами пептида (от 1 до 10⁻⁵ мкМ). В качестве альтернативы, где указано, в качестве АПК применяли аутологичные МКПК. После 4 часов инкубации в присутствии ингибиторов Гольджи (BD GolgiPlug и GolgiStop), клеткам окрашивали поверхность с помощью анти-CD8, а затем фиксировали (BD Cytofix/Cytoperm) перед внутриклеточной маркировкой с помощью анти-IFN-γ в BD Perm/Промывочный буфер. Клетки анализировали проточной цитометрией для определения процентного содержания IFN-γ⁺ клеток в каждом образце. Эти данные были согласованы с кривой доза-ответ с помощью нелинейной регрессии с применением Graphpad Prism (наклон четырех переменных параметров, нижняя и верхняя часть кривой ограничены значениями 0 и 100 соответственно).

На фигурах 1 (А) и 1 (В) показано, как TCR, специфичные к пептиду WT1₃₇₋₄₅,

идентифицировали с помощью способа на основе высокопроизводительного секвенирования. Клонотипы TCR, которые обогащены высоким связыванием тетрамера по сравнению с общей тетрамер-положительной популяцией, были определены как имеющие высокую аффинность или высокую функциональную avidность в отношении лиганда пептида/HLA-A2. (A) Схема первоначального способа на основе секвенирования для идентификации клонотипов TCR, связанных с высоким связыванием тетрамера пептида WT1₃₇₋₄₅/MHC. (B) Показано обогащение сортируемых популяций по сравнению с процентом от общей популяции с выделенным выбранным TCR. Все TCR, обозначенные черными кружками, были синтезированы и оценены на антиген-специфичность (всего 27).

На Фигуре 2 показаны результаты исследований связывания тетрамера, оценивающих специфичность и относительную аффинность связывания тетрамера отобранных TCR. Конструкции TCR экспрессируются в клетках Юркат, в которых отсутствуют эндогенные цепи TCR α/β . Показано окрашивание тетрамера в сравнении с экспрессией CD3 для каждого TCR (экспрессия CD3 прямо коррелирует с экспрессией трансгенного TCR на поверхности).

Пример 2. Идентификация высокой функциональной avidности TCR

Поскольку было показано, что некоторые TCR с высокой аффинностью связываются с тетрамером независимо от CD8, провели второй эксперимент для идентификации дополнительных TCR, которые специфически обогащены в сортируемой популяции с высоким связыванием тетрамера, при применении CD8-независимого (CD8i) тетрамера. На фигурах 3A-3C показано, как дополнительные WT1₃₇₋₄₅ пептид-специфичные TCR были идентифицированы с помощью модифицированного способа на основе высокопроизводительного секвенирования, с применением CD8-независимого (CD8i) тетрамера. Схема модифицированного способа на основе секвенирования для идентификации клонотипов TCR, связанных с высоким CD8-независимым связыванием тетрамера пептида WT1₃₇/MHC, показана на фигуре 3A. Обогащение исходных сортируемых популяций по сравнению с процентом от общей популяции по сравнению с аналогичным анализом при применении тетрамера CD8i показано на фиг. 3B и 3C. Дополнительно 14 TCR отобрали на основании уровней CD3 на поверхности и связывания тетрамера CD8i. Все названные клонотипы TCR на фиг. 3B и 3C были синтезированы и оценены на антигенспецифичность. Все TCR, обозначенные закрашенными кружками (диагональная линия) на фиг. 3C, представляют дополнительные TCR, идентифицированные с применением тетрамера CD8i.

Пример 3. Окрашивание тетрамера в сравнении с экспрессией CD3

Связывание тетрамера CD8i дополнительных отобранных по тетрамеру CD8i пептид WT1₃₇₋₄₅-специфичных TCR, показано на фиг. 4. Конструкции TCR экспрессировались в клетках Юркат, которые лишены эндогенных цепей TCR α/β (а также лишены экспрессии CD8). Окрашивание тетрамера в сравнении с экспрессией CD3 для каждого TCR показано на фигуре 4 (экспрессия CD3 напрямую коррелирует с экспрессией поверхностного трансгенного TCR). TCR, которые наиболее прочно связывались с тетрамером, что приводило к высоким уровням окрашивания тетрамера по сравнению с окрашиванием анти-CD3, были отобраны для дальнейшего анализа.

Пример 4. Анализ IFN γ для измерения функциональной avidности (EC₅₀)

Способность TCR сигнализировать об активации Т-клеток при предельных концентрациях антигена измеряли с помощью значения EC₅₀ пептида, которое представляет собой количество пептида, необходимое клеткам-мишеням для активации, чтобы вызвать Т-клеточный ответ (например, продукцию IFN γ) от 50 % присутствующих TCR-трансдуцированных Т-клеток. Это значение напрямую коррелирует со способностью Т-клеток, экспрессирующих данный TCR, уничтожать антиген-экспрессирующие клетки-мишени. Чтобы определить значение EC₅₀ пептида для выбранных TCR, каждый TCR трансдуцировали в CD8⁺ Т-клетки, выделенные из МКПК доноров (фиг. 5А). Через 1 неделю клетки отсортировывали на тетрамер⁺ CD8⁺ Т-клетки и размножали. Размноженные антигенспецифические клетки культивировали в течение от 4 до 6 часов с активированными пептидами Т2 клетками-мишенями, и продукцию IFN γ определяли с помощью проточной цитометрии (фиг. 5А). Процент клеток, продуцирующих IFN γ , согласовывали с кривым доза-ответ с помощью нелинейной регрессии для расчета значения EC₅₀ пептида для каждого TCR (фиг. 5В).

Пример 5. Уничтожение in vitro клеток HLA-A2⁺ WT1⁺ MDA-MB-468 первичными CD8⁺ Т-клетками, экспрессирующими WT1₃₇₋₄₅ пептид-специфичные TCR

Для непосредственной оценки лизиса опухолевых клеток, опосредованного TCR-трансдуцированными CD8⁺ Т-клетками, которые естественным образом экспрессируют и представляют антиген WT1 p37 на HLA-A2, CD8⁺ Т-клетки от доноров трансдуцировали одним из выбранных TCR и очищали сортировкой для высокого связывания тетрамера. Трансдуцированные TCR Т-клетки затем смешивали в соотношении 8:1 (в трех повторях) с клеточной линией рака молочной железы MDA-MB-468, которые были окрашены красителем CytoLight® Rapid Red. Общую площадь красных объектов (которая

коррелирует с общим количеством живых клеток-мишеней) рассчитывали в моменты времени, указанные для каждой TCR-трансдуцированной популяции Т-клеток в течение периода 72 часа. Наиболее активные опухолереактивные Т-клетки будут оставаться чувствительными к опухолевым антигенам в течение долгих периодов времени после передачи *in vivo* пациентам. Таким образом, для оценки текущей чувствительности Т-клеток, трансдуцированных TCR, к персистентному антигену, через 48 часов добавляли дополнительные клетки MDA-MB-468. См. фигуру 6.

Пример 6. Уничтожение *in vitro* клеток HLA-A2⁺ WT1⁺ PANC-1 первичными CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, экспрессирующими WT1₃₇₋₄₅ пептид-специфичные TCR

Как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клетки могут играть роль в очищении опухоли *in vivo*. Таким образом, TCR, рестриктированный по МНС I класса, который также может сигнализировать об антигенспецифическом ответе в CD4⁺ Т-клетках, будет предпочтительнее TCR, который может активировать только CD8⁺ Т-клетки. Способность TCR, рестриктированных по МНС I класса, функционировать в CD4⁺ Т-клетках, по-видимому, частично зависит от аффинности TCR к пептиду МНС. Во многих случаях трансдукция CD4⁺ Т-клеток генами, кодирующими CD8α и CD8β, помогает эффективно вызвать антигенспецифический ответ. Следовательно, для оценки способности CD4 (трансдуцированных CD8α/CD8β) по сравнению с CD8 Т-клетками, экспрессирующими TCR10.1, направленно воздействовать на опухолевые клетки HLA-A2⁺ WT1⁺, Т-клетки как CD4⁺, так и CD8⁺ трансдуцировали для экспрессии WT1₃₇₋₄₅ TCR10.1. CD4⁺ Т-клетки дополнительно трансдуцировали для экспрессии генов CD8α и CD8β. Через 8 дней трансдуцированные клетки сортировали для очистки Т-клеток CD8⁺ тетрамер⁺ и CD4⁺/CD8⁺ тетрамер⁺. Антигенспецифические клетки, представляющие собой CD4⁺, CD8⁺ или смесь этих двух популяций (CD4 и CD8), были смешаны 8:1 (в трех повторях) с клеточной линией аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1, которая ранее была трансдуцирована для экспрессии красителя NucLight® Red dye. Общую площадь красных объектов (которая коррелирует с общим количеством живых клеток-мишеней) рассчитывали в моменты времени, указанные для каждой популяции Т-клеток, трансдуцированных TCR. Для оценки текущей чувствительности Т-клеток, трансдуцированных TCR, к персистентному антигену, через 48 часов добавляли дополнительные клетки PANC-1. На фигуре 7 показано, что как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие WT1₃₇₋₄₅ TCR10.1, могут уничтожать клеточную линию аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1 WT1⁺ A2⁺ после повторного заражения *in vitro*.

Эпитоп WT1 p126 не всегда эффективно процессируется/презентируется клетками, экспрессирующими WT1 и HLA-A2 (Jaigirdar et al., J. Immunother. 39:105, 2017). В

частности, несколько клеточных линий, происходящих от солидной опухоли, которые экспрессируют WT1 и HLA-A2, не являются эффективной мишенью для WT1-p126-специфичных TCR, с или без предварительного культивирования с IFN γ для усиления экспрессии иммунопротеасом. В некоторых аспектах, в настоящем изобретении частично обнаружено, что эпитоп WT1-p37 более широко процессируется и презентуется большим количеством типов опухолей по сравнению с эпитопом WT1-p126. На фигурах 8A-8D показан лизис различных линий опухолевых клеток WT1⁺ A2⁺ WT1-p126 пептид-специфичным TCR по сравнению с WT1-p37 пептид-специфичным TCR. Эти данные подчеркивают тот факт, что WT1-p37 пептид-специфичные TCR, по-видимому, в целом более надежно способны воздействовать на широкий набор опухолей WT1⁺ A2⁺.

Различные варианты осуществления, описанные в настоящем документе, могут быть объединены для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. Содержание всех патентов, публикаций заявок на патенты, заявок на патенты и непатентных публикаций, упомянутых в настоящем описании и/или перечисленных в информационном листке заявки, включая предварительную заявку на патент США № 62/816746, поданную 11 марта, 2019 г., полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В общем, в нижеследующей формуле изобретения термины не ограничивают формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в настоящем документе, но включают все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется формула настоящего изобретения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kalos, M. et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced Leukemia. *Sci. Transl. Med.* 3, 95ra73–95ra73 (2011).
2. Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C. H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365, 725–733 (2011).
3. Kochenderfer, J. N. et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 116, 4099–4102 (2010).
4. Chapuis, A. G. et al. Transferred WT1-reactive CD8⁺ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med* 5, 174ra27 (2013).
5. Chapuis, A. G. et al. Transferred melanoma-specific CD8⁺ T cells persist, mediate tumor regression, and acquire central memory phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012).

doi:10.1073/pnas.1113748109

6. Morgan, R. et al. Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science* 314, 126–129 (2006).
7. Dudley, M. et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26, 5233–5239 (2008).
8. Robbins, P. F. et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of Clinical Oncology* 29, 917–924 (2011).
9. Stromnes, I. M. et al. Abrogation of SRC homology region 2 domain-containing phosphatase 1 in tumor-specific T cells improves efficacy of adoptive immunotherapy by enhancing the effector function and accumulation of short-lived effector T cells in vivo. *The Journal of Immunology* 189, 1812–1825 (2012).
10. Schmitt, T. M., Ragnarsson, G. B. & Greenberg, P. D. T Cell Receptor Gene Therapy for Cancer. *Hum Gene Ther* 20, 1240–1248 (2009).
11. Salter, R.D. & Cresswell, P. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO. J.* 5, 943-949 (1986).
12. Heemskerk, M.H. et al. Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of minor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region. *Blood* 102, 3530-3540 (2003).
13. Ho, W.Y., Nguyen, H.N., Wolfl, M., Kuball, J. & Greenberg, P.D. In vitro methods for generating CD8⁺ T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire. *J Immunol Methods* 310, 40-52 (2006).
14. Chapuis, A.G. et al. Transferred WT1-reactive CD8⁺ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients. *Sci Transl Med* 5, 174ra127 (2013).
15. Luescher, I.F. et al. CD8 modulation of T-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 373, 353-356 (1995).
16. Stone, J.D. & Kranz, D.M. Role of T cell receptor affinity in the efficacy and specificity of adoptive T cell therapies. *Front Immunol* 4, 244 (2013).
17. Pittet, M.J. et al. $\alpha 3$ Domain Mutants of Peptide/MHC Class I Multimers Allow the Selective Isolation of High Avidity Tumor-Reactive CD8 T Cells. *The Journal of Immunology* 171, 1844-1849 (2003).
18. Howie, B. et al. High-throughput pairing of T cell receptor alpha and beta sequences. *Sci Transl Med* 7, 301ra131 (2015).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий:

(a) вариабельный домен α -цепи (V_α) TCR и вариабельный домен β -цепи (V_β) TCR, имеющий аминокислотную последовательность CDR3 (CDR - область, определяющая комплементарность), указанную в любой из SEQ ID NO: 199, 1-11, 181, 187, 193, 205, 211, 217, 223, 229, 235 и 241,

(b) домен V_α TCR, имеющий аминокислотную последовательность CDR3, указанную в любой из SEQ ID NO: 196, 12-22, 178, 184, 190, 202, 208, 214, 220, 226, 232 и 238, и домен V_β TCR, или

(c) домен V_α TCR, имеющий аминокислотную последовательность CDR3, указанную в любой из SEQ ID NO: 199, 1-11, 181, 187, 193, 205, 211, 217, 223, 229, 235 и 241, и домен V_β TCR, содержащий аминокислотную последовательность CDR3, указанную в любой из SEQ ID NO: 196, 12-22, 178, 184, 190, 202, 208, 214, 220, 226, 232 и 238,

где TCR специфически связывается с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) с продукцией IFN γ (интерферон гамма) при значении pEC_{50} 8,5 или выше.

2. TCR по п. 1, специфически связывающийся с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) с продукцией IFN γ при значении pEC_{50} 9,0 или выше.

3. TCR по п. 1 или п. 2, специфически связывающийся с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) с продукцией IFN γ при значении pEC_{50} 9,5 или выше.

4. TCR по любому из пп. 1-3, дополнительно специфически связывающийся с комплексом VLDFAPPGA (SEQ ID NO: 59) и человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) на клеточной поверхности независимо от CD8 или в отсутствие CD8.

5. TCR по любому из пп. 1-4, где HLA включает HLA-A*201.

6. TCR по любому из пп. 1-5, где домен V_α содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере:

(a) приблизительно 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 34-35 и 38-44, или

(b) 92% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 или 37.

7. TCR по любому из пп. 1-6, где домен V_α не содержит изменений в аминокислотной последовательности CDR1 и/или CDR2 по сравнению с CDR1 и/или CDR2, соответственно,

представленными в любой из SEQ ID NO: 34-44.

8. TCR по любому из пп. 1-7, дополнительно содержащий:

(i) аминокислотную последовательность CDR1 α , указанную в любой из SEQ ID NO: 194, 176, 182, 188, 200, 206, 212, 218, 224, 230 и 236, или ее вариант, содержащий одну или две аминокислотные замены, где необязательно одна или две аминокислотные замены включают консервативную аминокислотную замену, и/или

(ii) аминокислотную последовательность CDR2 α , указанную в любой из SEQ ID NO: 195, 177, 183, 189, 201, 207, 213, 219, 225, 231 и 237, или ее вариант, содержащий одну или две аминокислотные замены, где необязательно одна или две аминокислотные замены включают консервативную аминокислотную замену.

9. TCR по любому из пп. 1-8, где домен V β содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере:

(a) 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 23-25, 27, 28, 30, 32 и 33,

(b) 92% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29,

(c) 93% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31, или

(d) 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26.

10. TCR по любому из пп. 1-9, где домен V β не содержит изменений в аминокислотной последовательности CDR1 и/или CDR2 по сравнению с CDR1 и/или CDR2, соответственно, представленными в любой из SEQ ID NO: 23-33.

11. TCR по любому из пп. 1-10, дополнительно содержащий:

(i) аминокислотную последовательность CDR1 β , указанную в любой из SEQ ID NO: 197, 179, 185, 191, 197, 203, 209, 215, 221, 227, 233 и 239, или ее вариант, содержащий одну или две аминокислотные замены, где необязательно одна или две аминокислотные замены включают консервативную аминокислотную замену, и/или

(ii) аминокислотную последовательность CDR2 β , указанную в любой из SEQ ID NO: 198, 180, 186, 192, 204, 210, 216, 222, 228, 234 и 240, или ее вариант, содержащий одну или две аминокислотные замены, где необязательно одна или две аминокислотные замены включают консервативную аминокислотную замену.

12. TCR по любому из пп. 1-11, содержащий аминокислотные последовательности CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β и CDR3 β , указанные в:

(i) SEQ ID NO: 194, 195, 196 или 12, 197, 198 и 199 или 1 соответственно,

- (ii) SEQ ID NO: 176, 177, 178 или 18, 179, 180 и 181 или 7 соответственно,
- (iii) SEQ ID NO: 182, 183, 184 или 20, 185, 186 и 187 или 9 соответственно,
- (iv) SEQ ID NO: 188, 189, 190 или 21, 191, 192 и 193 или 10 соответственно,
- (v) SEQ ID NO: 200, 201, 202 или 13, 203, 204 и 205 или 2 соответственно,
- (vi) SEQ ID NO: 206, 207, 208 или 14, 209, 210 и 211 или 3 соответственно,
- (vii) SEQ ID NO: 212, 213, 214 или 15, 215, 216 и 217 или 4 соответственно,
- (viii) SEQ ID NO: 218, 219, 220 или 17, 221, 222 и 223 или 6 соответственно,
- (ix) SEQ ID NO: 224, 225, 226 или 19, 227, 228 и 229 или 8 соответственно,
- (x) SEQ ID NO: 230, 231, 232 или 22, 233, 234 и 235 или 11 соответственно, или
- (xi) SEQ ID NO: 236, 237, 238 или 16, 238, 240 и 241 или 5 соответственно.

13. TCR по любому из пп. 1-12, где домен V_α содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 253-263 и 34-44.

14. TCR по любому из пп. 1-13, где домен V_α состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 253-263 и 34-44.

15. TCR по любому из пп. 1-14, где домен V_β содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 242-252 и 23-33.

16. TCR по любому из пп. 1-15, где домен V_β состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 242-252 и 23-33.

17. TCR по любому из пп. 1-16, содержащий константный домен α -цепи TCR, имеющий по меньшей мере приблизительно 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47.

18. TCR по любому из пп. 1-17, содержащий константный домен β -цепи TCR, имеющий по меньшей мере приблизительно 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 45 или 46.

19. TCR по любому из пп. 1-18, содержащий α -цепь TCR, содержащую домен V_α и константный домен α -цепи, где:

(a) домен V_α имеет по меньшей мере приблизительно 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 34-35 и 38-44, и константный домен α -цепи имеет по меньшей мере приблизительно 98% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47, или

(b) домен V_α имеет 92% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 36 или 37, и константный домен α -цепи имеет по меньшей мере приблизительно 98% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47.

20. TCR по любому из пп. 1-19, содержащий α -цепь TCR, содержащую домен V_α и константный домен α -цепи, где:

(a) домен V_α содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 242-252 и 34-44, и константный домен α -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, или

(b) домен V_α состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 242-252 и 34-44, и константный домен α -цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47.

21. TCR по любому из пп. 1-20, содержащий β -цепь TCR, содержащую домен V_β и константный домен β -цепи, где:

(a) домен V_β имеет по меньшей мере приблизительно 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 23-25, 27, 28, 30, 32 и 33, и константный домен β -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 или имеет по меньшей мере приблизительно 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46,

(b) домен V_β имеет 92% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29, и константный домен β -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 или имеет по меньшей мере приблизительно 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46,

(c) домен V_β имеет 93% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31, и константный домен β -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 или имеет по меньшей мере приблизительно 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46, или

(c) домен V_β имеет 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26, и константный домен β -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 или имеет по меньшей мере приблизительно 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46.

22. TCR по любому из пп. 1-21, содержащий β -цепь TCR, содержащую домен V_β и константный домен β -цепи, где:

(a) домен V_β содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 253-263 и 23-33, и константный домен β -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 или 46,

(b) домен V_{β} состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 253-263 и 23-33, и константный домен β -цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45 или 46,

(c) домен V_{β} содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 25, 28, 29, 32 и 33, и константный домен β -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45,

(d) домен V_{β} состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 25, 28, 29, 32 и 33, и константный домен β -цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45,

(e) домен V_{β} содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 23, 24, 26, 27, 30 и 31, и константный домен β -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, или

(f) домен V_{β} состоит из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 23, 24, 26, 27, 30 и 31, и константный домен β -цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46.

23. TCR по любому из пп. 1-22, где домен V_{α} и домен V_{β} содержат или состоят из аминокислотных последовательностей, указанных в SEQ ID NO:

- (i) 253 и 242 соответственно,
- (ii) 259 и 248 соответственно,
- (iii) 261 и 250 соответственно,
- (iv) 262 и 251 соответственно,
- (v) 257 и 246 соответственно,
- (vi) 254 и 243 соответственно,
- (vii) 255 и 244 соответственно,
- (viii) 256 и 245 соответственно,
- (ix) 258 и 247 соответственно,
- (x) 260 и 249 соответственно,
- (xi) 263 и 252 соответственно,
- (xii) 34 и 23 соответственно,
- (xiii) 40 и 29 соответственно,
- (xiv) 42 и 31 соответственно,
- (xv) 43 и 32 соответственно,
- (xvi) 35 и 24 соответственно,
- (xvii) 36 и 25 соответственно,
- (xviii) 37 и 26 соответственно,

- (xix) 39 и 28 соответственно,
- (xx) 41 и 30 соответственно,
- (xxi) 44 и 33 соответственно, или
- (xxii) 38 и 27 соответственно.

24. TCR по п. 23, дополнительно содержащий константный домен α -цепи и/или константный домен β -цепи, где константный домен α -цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 47, и где константный домен β -цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 45 или 46.

25. TCR по п. 24, включающий константный домен α -цепи, и домен V_α и константный домен α -цепи вместе образуют α -цепь TCR.

26. TCR по п. 24 или п. 25, включающий константный домен β -цепи, и домен V_α и константный домен β -цепи вместе образуют β -цепь TCR.

27. TCR по любому из пп. 1-26, содержащий scTCR (одноцепочечный TCR).

28. TCR по любому из пп. 1-26, содержащий CAR (химерный антигенный рецептор).

29. Выделенный полинуклеотид, кодирующий TCR по любому из пп. 1-28.

30. Полинуклеотид по п. 29, который является кодон-оптимизированным для клетки-хозяина, представляющей интерес.

31. Полинуклеотид по п. 29 или п. 30, кодирующий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 48-58.

32. Полинуклеотид по любому из пп. 29-31, содержащий полинуклеотидную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 64-165.

33. Полинуклеотид по любому из пп. 29-32, дополнительно содержащий:

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

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

(iii) полинуклеотид (i) и полинуклеотид (ii).

34. Полинуклеотид по п. 33, содержащий:

(a) полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть α -

цепи корцептора CD8,

(b) полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть β -цепи корцептора CD8, и

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

35. Полинуклеотид по п. 33 или п. 34, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид и расположенный между:

(1) полинуклеотидом, кодирующим связывающий белок, и полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий внеклеточную часть α -цепи корцептора CD8, и/или

(2) полинуклеотидом, кодирующим связывающий белок, и полинуклеотидом, кодирующим полипептид, содержащий внеклеточную часть β -цепи корцептора CD8.

36. Полинуклеотид по любому из пп. 33-35, содержащий функционально связанные внутри рамки считывания:

- (i) (pnCD8 α)-(pnSCP₁)-(pnCD8 β)-(pnSCP₂)-(pnTCR),
- (ii) (pnCD8 β)-(pnSCP₁)-(pnCD8 α)-(pnSCP₂)-(pnTCR),
- (iii) (pnTCR)-(pnSCP₁)-(pnCD8 α)-(pnSCP₂)-(pnCD8 β),
- (iv) (pnTCR)-(pnSCP₁)-(pnCD8 β)-(pnSCP₂)-(pnCD8 α),
- (v) (pnCD8 α)-(pnSCP₁)-(pnTCR)-(pnSCP₂)-(pnCD8 β) или
- (vi) (pnCD8 β)-(pnSCP₁)-(pnTCR)-(pnSCP₂)-(pnCD8 α),

где pnCD8 α представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть α -цепи корцептора CD8,

где pnCD8 β представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть β -цепи корцептора CD8,

где pnTCR представляет собой полинуклеотид, кодирующий TCR,

и где каждый из pnSCP₁ и pnSCP₂ независимо представляет собой полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, где полинуклеотиды и/или кодируемые саморасщепляющиеся пептиды необязательно являются одинаковыми или различными.

37. Полинуклеотид по любому из пп. 33-36, где кодируемый TCR содержит цепь TCR α и цепь TCR β , где полинуклеотид содержит полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидом, кодирующим цепь TCR α , и полинуклеотидом, кодирующим цепь TCR β .

38. Полинуклеотид по п. 37, содержащий функционально связанные внутри рамки считывания:

- (i) (pnCD8 α)-(pnSCP₁)-(pnCD8 β)-(pnSCP₂)-(pnTCR β)-(pnSCP₃)-(pnTCR α),

- (ii) (pnCD8 β)-(pnSCP₁)-(pnCD8 α)-(pnSCP₂)-(pnTCR β)-(pnSCP₃)-(pnTCR α),
- (iii) (pnCD8 α)-(pnSCP₁)-(pnCD8 β)-(pnSCP₂)-(pnTCR α)-(pnSCP₃)-(pnTCR β),
- (iv) (pnCD8 β)-(pnSCP₁)-(pnCD8 α)-(pnSCP₂)-(pnTCR α)-(pnSCP₃)-(pnTCR β),
- (v) (pnTCR β)-(pnSCP₁)-(pnTCR α)-(pnSCP₂)-(pnCD8 α)-(pnSCP₃)-(pnCD8 β),
- (vi) (pnTCR β)-(pnSCP₁)-(pnTCR α)-(pnSCP₂)-(pnCD8 β)-(pnSCP₃)-(pnCD8 α),
- (vii) (pnTCR α)-(pnSCP₁)-(pnTCR β)-(pnSCP₂)-(pnCD8 α)-(pnSCP₃)-(pnCD8 β) или
- (viii) (pnTCR α)-(pnSCP₁)-(pnTCR β)-(pnSCP₂)-(pnCD8 β)-(pnSCP₃)-(pnCD8 α),

где pnCD8 α представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть α -цепи корецептора CD8,

где pnCD8 β представляет собой полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть α -цепи корецептора CD8,

где pnTCR α представляет собой полинуклеотид, кодирующий α -цепь TCR,

где pnTCR β представляет собой полинуклеотид, кодирующий β -цепь TCR,

и где каждый из pnSCP₁, pnSCP₂ и pnSCP₃ независимо представляет собой полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид, где полинуклеотиды и/или кодируемые саморасщепляющиеся пептиды необязательно являются одинаковыми или различными.

39. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 29-38, функционально связанный с последовательностью контроля экспрессии.

40. Вектор экспрессии по п. 39, способный доставлять полинуклеотид в клетку-хозяин.

41. Вектор экспрессии по п. 39, где клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека.

42. Вектор экспрессии по п. 41, где клетка иммунной системы представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную негативную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, естественную киллерную клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию.

43. Вектор экспрессии по п. 42, где Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, Т-клетку центральной памяти, Т-клетку эффекторной памяти или любую их комбинацию.

44. Вектор экспрессии по любому из пп. 39-43, где вектор представляет собой вирусный вектор.

45. Вектор экспрессии по п. 44, где вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор, лентивирусный вектор или γ -ретровирусный вектор.

46. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 29-38 или вектор экспрессии по любому из пп. 29-45, где клетка-хозяин экспрессирует на своей клеточной поверхности TCR, кодируемый полинуклеотидом, и где полинуклеотид гетерологичен по

отношению к клетке-хозяину.

47. Клетка-хозяин по п. 46, где домен V_α кодируется полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 75% идентичность последовательности с любым из полинуклеотидов с SEQ ID NO: 97, 98 и 101-107 или по меньшей мере 94% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 99 или 100.

48. Клетка-хозяин по п. 46 или п. 47, где домен V_α кодируется полинуклеотидом:

(a) содержащим последовательность любого из полинуклеотидов с SEQ ID NO: 97-107, или

(b) состоящим из последовательности любого из полинуклеотидов с SEQ ID NO: 97-107.

49. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-48, где домен V_β кодируется полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 75% идентичность последовательности с любым из полинуклеотидов с SEQ ID NO: 75-77, 79, 82, 84 и 85 или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с любым из полинуклеотидов с SEQ ID NO: 78, 80, 81 и 83.

50. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-49, где домен V_β кодируется полинуклеотидом:

(a) содержащим последовательность любого из полинуклеотидов с SEQ ID NO: 75-85, или

(b) состоящим из последовательности любого из полинуклеотидов с SEQ ID NO: 75-85.

51. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-50, где α -цепь TCR содержит константный домен α -цепи, кодируемый полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 98% идентичность с SEQ ID NO: 110.

52. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-51, где α -цепь TCR содержит константный домен α -цепи, кодируемый полинуклеотидом:

(a) содержащим полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 110, или

(b) состоящим из полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 110.

53. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-52, где β -цепь TCR содержит константный домен β -цепи, кодируемый полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 99,9% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 108 или 109.

54. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-53, где β -цепь TCR содержит константный домен β -цепи, кодируемый полинуклеотидом:

(a) содержащим полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 108 или 109, или

(b) состоящим из полинуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 108 или 109.

55. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-54, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид, расположенный между полинуклеотидной последовательностью, кодирующей α -цепь TCR, и полинуклеотидной последовательностью, кодирующей β -цепь TCR.

56. Клетка-хозяин по п. 55, где кодируемый саморасщепляющийся пептид:

(a) содержит аминокислотную последовательность любого из полипептидов с SEQ ID NO: 60-63, или

(b) состоит из последовательности любого из полипептидов с SEQ ID NO: 60-63.

57. Клетка-хозяин по п. 55 или п. 56, где полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид:

(a) содержит последовательность любого из полинуклеотидов с SEQ ID NO: 166-170, или

(b) состоит из последовательности любого из полинуклеотидов с SEQ ID NO: 166-170.

58. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-57, где α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR кодируются полинуклеотидом, имеющим по меньшей мере 95% идентичность с любой из SEQ ID NO: 155-165.

59. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-58, где α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR кодируются полинуклеотидом, который:

(a) содержит последовательность любого из полинуклеотидов с SEQ ID NO: 155-165, или

(b) состоит из последовательности любого из полинуклеотидов с SEQ ID NO: 155-165.

60. Клетка-хозяин по п. 58 или п. 59, где кодируемая α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность с любым из полипептидов с SEQ ID NO: 48-58.

61. Клетка-хозяин по любому из пп. 58-60, где кодируемая α -цепь TCR, саморасщепляющийся пептид и β -цепь TCR:

(a) содержат аминокислотную последовательность любого из полипептидов с SEQ ID NO: 48-58, или

(b) состоит из аминокислотной последовательности любого из полипептидов с SEQ ID NO: 48-58.

62. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-61, где клетка-хозяин представляет собой

гемопоэтическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека.

63. Клетка-хозяин по п. 62, где клетка иммунной системы представляет собой $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку, $CD4^+ CD8^+$ двойную негативную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, естественную киллерную клетку, естественную киллерную Т-клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию, где необязательно комбинация, если присутствует, включает $CD4^+$ Т-клетку и $CD8^+$ Т-клетку.

64. Клетка-хозяин по п. 62, где клетка иммунной системы представляет собой Т-клетку.

65. Клетка-хозяин по п. 64, где Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, Т-клетку центральной памяти, Т-клетку эффекторной памяти или любую их комбинацию.

66. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-65, где TCR имеет более высокую поверхностную экспрессию на Т-клетке по сравнению с эндогенным TCR.

67. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-66, дополнительно содержащая:

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

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

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

где необязательно клетка-хозяин включает $CD4^+$ Т-клетку.

68. Клетка-хозяин по п. 67, содержащая:

(a) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть α -цепи корцептора CD8,

(b) гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий внеклеточную часть β -цепи корцептора CD8, и

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

69. Клетка-хозяин по любому из пп. 46-68, способная уничтожить:

(i) опухолевую клетку клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-468,

(ii) опухолевую клетку клеточной линии аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1,

(iii) опухолевую клетку клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231,

(iv) опухолевую клетку клеточной линии миелогенного лейкоза K562, экспрессирующую HLA-A2, где необязательно HLA-A2 включает HLA-A*201,

(v) опухолевую клетку клеточной линии карциномы толстой кишки RKO, экспрессирующую HLA-A2, где необязательно HLA-A2 включает HLA-A*201, или

(vi) любую комбинацию опухолевых клеток (i)-(v),

когда в образце присутствуют и клетка-хозяин, и опухолевая клетка.

70. Клетка-хозяин по п. 69, способная уничтожить опухолевую клетку, когда клетка-хозяин и опухолевая клетка присутствуют в образце при соотношении клетка-хозяин:опухолевая клетка равном 32:1, 16:1, 8:1, 4:1, 2:1 или 1,5:1.

71. Композиция, содержащая клетку-хозяин по любому из пп. 46-70 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

72. Композиция по п. 71, содержащая CD4⁺ Т-клетку хозяина и CD8⁺ Т-клетку хозяина.

73. Способ лечения гиперпролиферативного или пролиферативного расстройства, включающий введение человеку, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей TCR, специфичный к человеческому опухолевому белку Вильмса 1 (WT1), по любому из пп. 1-28.

74. Способ по п. 73, где TCR экспрессируется на поверхности клетки-хозяина, где необязательно клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека, где дополнительно необязательно клетка иммунной системы представляет собой CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁻ CD8⁻ двойную негативную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, естественную киллерную клетку, естественную киллерную Т-клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию.

75. Способ по п. 74, где клетка-хозяин включает клетку-хозяина по любому из пп. 46-70.

76. Способ по п. 73, где гиперпролиферативное или пролиферативное расстройство представляет собой гематологическую злокачественную опухоль или солидный рак.

77. Способ по п. 76, где гематологическая злокачественная опухоль выбрана из острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), хронического эозинофильного лейкоза (ХЭЛ), миелодиспластического синдрома (МДС), неходжкинской лимфомы (НХЛ) или множественной миеломы (ММ).

78. Способ по п. 77, где солидный рак выбран из рака молочной железы, рака яичников, рака легких, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, карциномы костей и мягких тканей, опухоли головного мозга, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректальной аденокарциномы, колоректального рака, десмоидной опухоли, эмбрионального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, аденокарциномы

желудка, мультиформной глиобластомы, гинекологической опухоли, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака печени, мезотелиомы, злокачественной меланомы, остеосаркомы, рака поджелудочной железы, аденокарциномы протоков поджелудочной железы, первичной астроцитарной опухоли, первичного рака щитовидной железы, рака предстательной железы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, опухоли половых клеток яичка, рака уротелия, саркомы матки или рака матки.

79. Способ по любому из пп. 73-78, где TCR способен стимулировать рестриктированный по HLA класса I антигенспецифический Т-клеточный ответ против WT1 человека.

80. Способ по п. 79, где рестриктированный по HLA класса I ответ не зависит от транспортера, связанного с процессингом антигена (TAP).

81. Способ по п. 79 или 80, где антигенспецифический Т-клеточный ответ включает по меньшей мере один из ответа $CD4^{+}$ хелперных Т-лимфоцитов (Th) и ответа $CD8^{+}$ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ).

82. Способ по п. 81, где ответ ЦТЛ направлен против клетки, сверхэкспрессирующей WT1.

83. Способ адоптивной иммунотерапии для лечения состояния, характеризующегося сверхэкспрессией WT1 в клетках субъекта, страдающего гиперпролиферативным или пролиферативным расстройством, включающий введение субъекту эффективного количества клетки-хозяина по любому из пп. 46-70 или композиции по п. 71 или п. 72.

84. Способ по п. 83, где клетка-хозяин модифицирована *ex vivo*.

85. Способ по п. 83 или п. 84, где клетка-хозяин представляет собой аллогенную клетку, сингенную клетку или аутологичную клетку для субъекта.

86. Способ по любому из пп. 83-85, где клетка-хозяин представляет собой гемопоэтическую клетку-предшественник или клетку иммунной системы человека.

87. Способ по п. 86, где клетка иммунной системы представляет собой $CD4^{+}$ Т-клетку, $CD8^{+}$ Т-клетку, $CD4^{-}$ $CD8^{-}$ двойную негативную Т-клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, естественную киллерную клетку, естественную киллерную Т-клетку, дендритную клетку или любую их комбинацию.

88. Способ по п. 87, где Т-клетка представляет собой наивную Т-клетку, Т-клетку центральной памяти, Т-клетку эффекторной памяти или любую их комбинацию.

89. Способ по любому из пп. 83-88, где гиперпролиферативное или пролиферативное расстройство представляет собой гематологическую злокачественную опухоль или солидный рак.

90. Способ по п. 89, где гематологическая злокачественная опухоль выбрана из острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), хронического эозинофильного лейкоза (ХЭЛ), миелодиспластического синдрома (МДС), неходжкинской лимфомы (НХЛ) или множественной миеломы (ММ).

91. Способ по п. 89, где солидный рак выбран из рака молочной железы, рака яичников, рака легких, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, карциномы костей и мягких тканей, опухоли головного мозга, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректальной аденокарциномы, колоректального рака, десмоидной опухоли, эмбрионального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, аденокарциномы желудка, мультиформной глиобластомы, гинекологической опухоли, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака печени, мезотелиомы, злокачественной меланомы, остеосаркомы, рака поджелудочной железы, аденокарциномы протоков поджелудочной железы, первичной астроцитарной опухоли, первичного рака щитовидной железы, рака предстательной железы, рака почки, почечно-клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, опухоли половых клеток яичка, рака уротелия, саркомы матки или рака матки.

92. Способ по любому из пп. 83-91, где клетку-хозяин вводят парентерально.

93. Способ по любому из пп. 83-92, включающий введение субъекту множества доз клетки-хозяина.

94. Способ по п. 93, где множество доз вводят с интервалами между введениями от приблизительно двух до приблизительно четырех недель.

95. Способ по любому из пп. 83-94, где клетку-хозяин вводят субъекту в дозе от приблизительно 10^7 клеток/ м^2 до приблизительно 10^{11} клеток/ м^2 .

96. Способ по любому из пп. 83-95, где способ дополнительно включает введение цитокина.

97. Способ по п. 96, где цитокин представляет собой IL-2, IL-15, IL-21 или любую их комбинацию.

98. Способ по п. 97, где цитокин представляет собой IL-2 и который вводят одновременно или последовательно с клеткой-хозяином.

99. Способ по п. 98, где цитокин вводят последовательно при условии, что субъекту вводили клетку-хозяин по меньшей мере три или четыре раза перед введением цитокина.

100. Способ по любому из пп. 97-99, где цитокин представляет собой IL-2 и который вводят подкожно.

101. Способ по любому из пп. 83-100, где субъект дополнительно получает

иммуносупрессивную терапию.

102. Способ по п. 101, где иммуносупрессивная терапия выбрана из ингибиторов кальциневрина, кортикостероидов, ингибиторов микротрубочек, низкой дозы пролекарства микофеноловой кислоты или любой их комбинации.

103. Способ по любому из пп. 83-102, где субъект получил трансплантацию немиелоаблативных или миелоаблативных гемопоэтических клеток.

104. Способ по п. 103, где субъекту вводят клетку-хозяин по меньшей мере через три месяца после трансплантации немиелоаблативных гемопоэтических клеток.

105. Способ по п. 103, где субъекту вводят клетку-хозяин по меньшей мере через два месяца после трансплантации миелоаблативных гемопоэтических клеток.

106. Способ по любому из пп. 73-105, где субъект получил или получает ингибитор иммунных контрольных точек и/или агонист агента, стимулирующего иммунную контрольную точку.

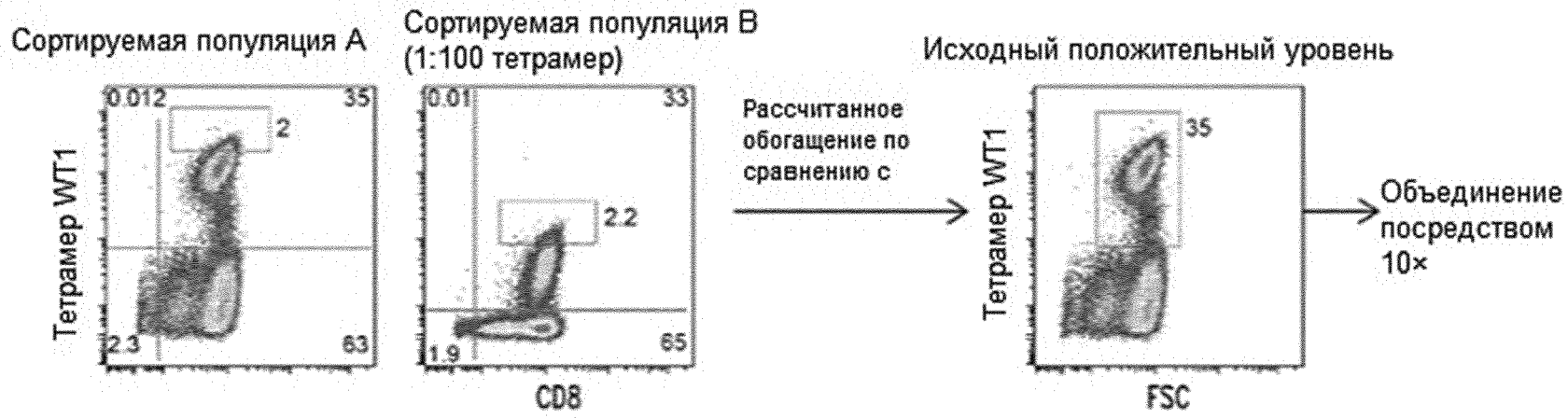
107. Однократная дозированная форма, содержащая клетку-хозяин по любому из пп. 46-70 или композицию по п. 72.

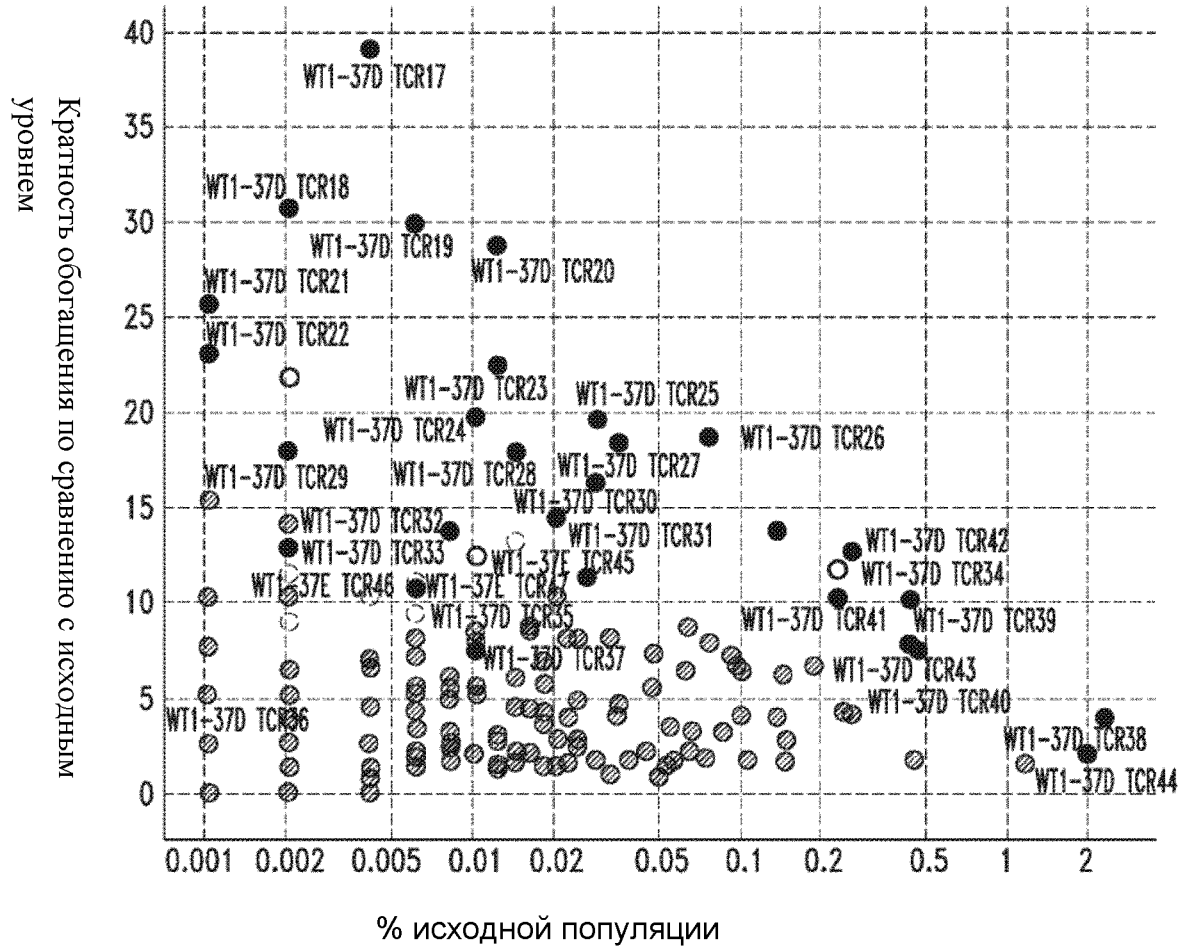
108. Однократная дозированная форма по п. 107, где доза клетки-хозяина составляет от приблизительно 10^7 клеток/ m^2 до приблизительно 10^{11} клеток/ m^2 .

109. TCR по любому из пп. 1-28, полинуклеотид по любому из пп. 29-38, вектор по любому из пп. 39-45, клетка-хозяин по любому из пп. 46-70 или композиция по п. 71 или п. 72 или любая их комбинация для применения в способе лечения пролиферативного или гиперпролиферативного расстройства, связанного с экспрессией или сверхэкспрессией опухолевого белка Вильмса 1 (WT1).

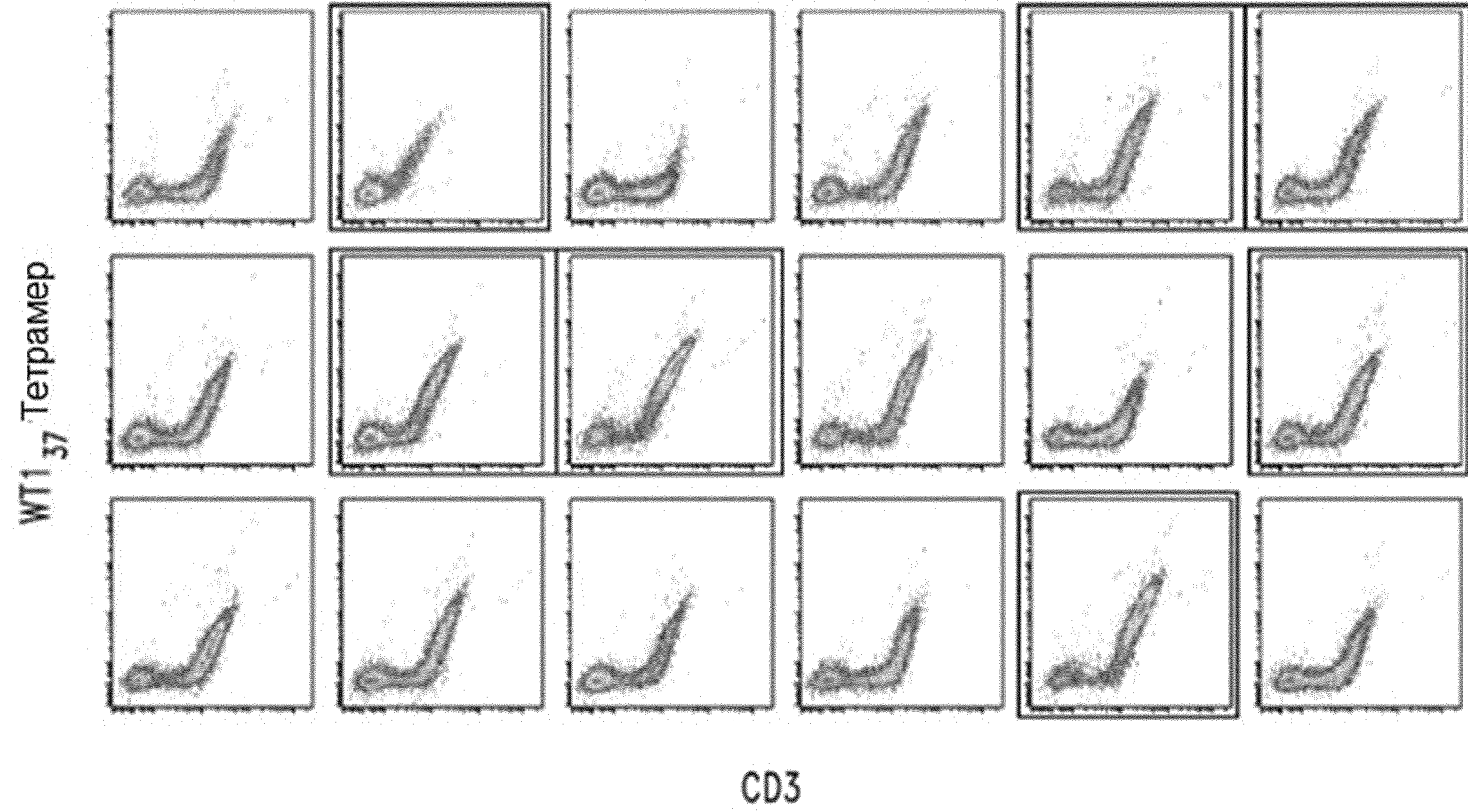
110. TCR по любому из пп. 1-28, полинуклеотид по любому из пп. 29-38, вектор по любому из пп. 39-45, клетка-хозяин по любому из пп. 46-70 или композиция по п. 71 или п. 72 или любая их комбинация для применения в способе получения лекарственного средства для лечения пролиферативного или гиперпролиферативного расстройства, связанного с экспрессией или сверхэкспрессией опухолевого белка Вильмса 1 (WT1).

ФИГУРА 1А





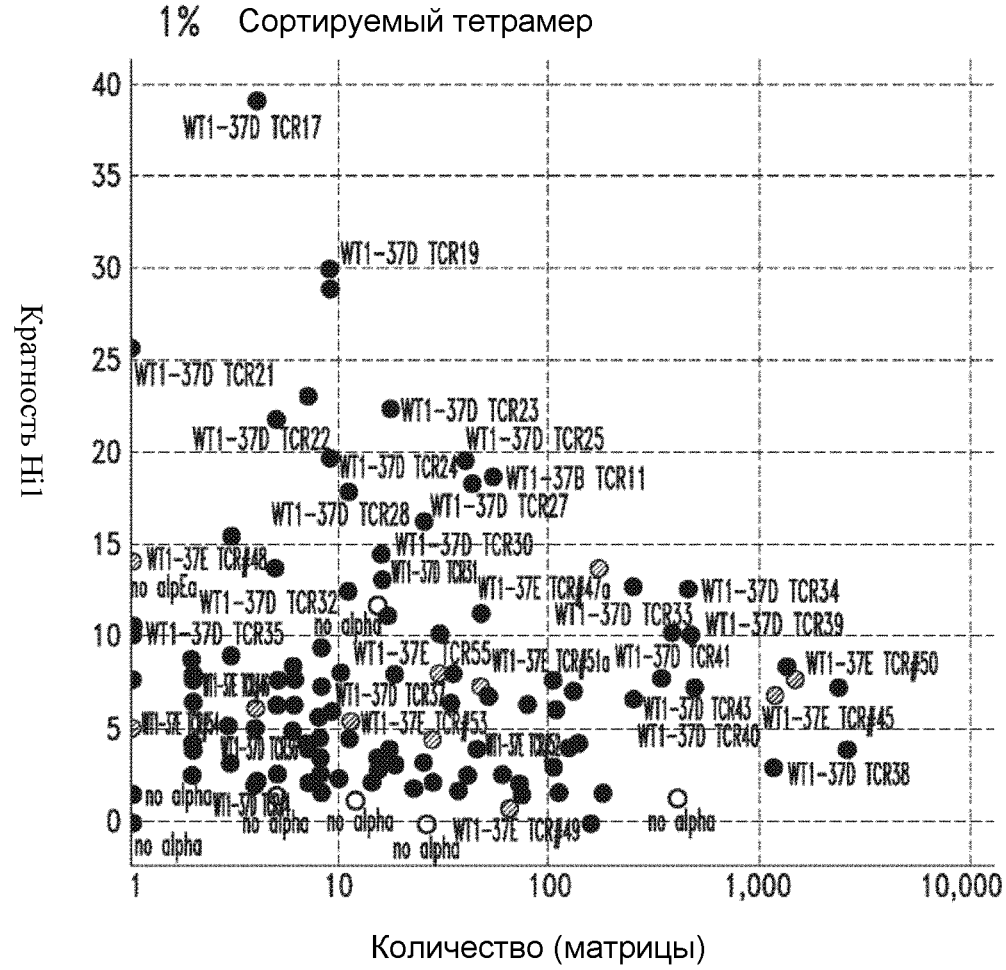
ФИГУРА 1В



ФИГУРА 2

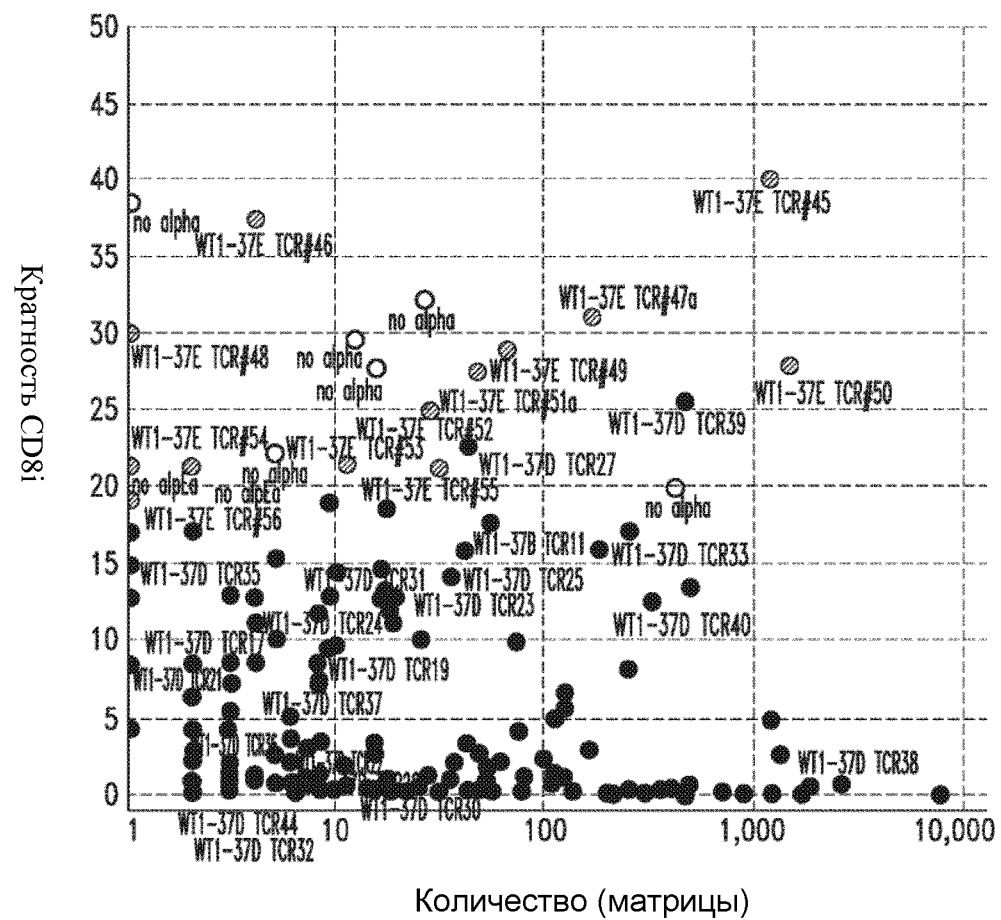


ФИГУРА 3А

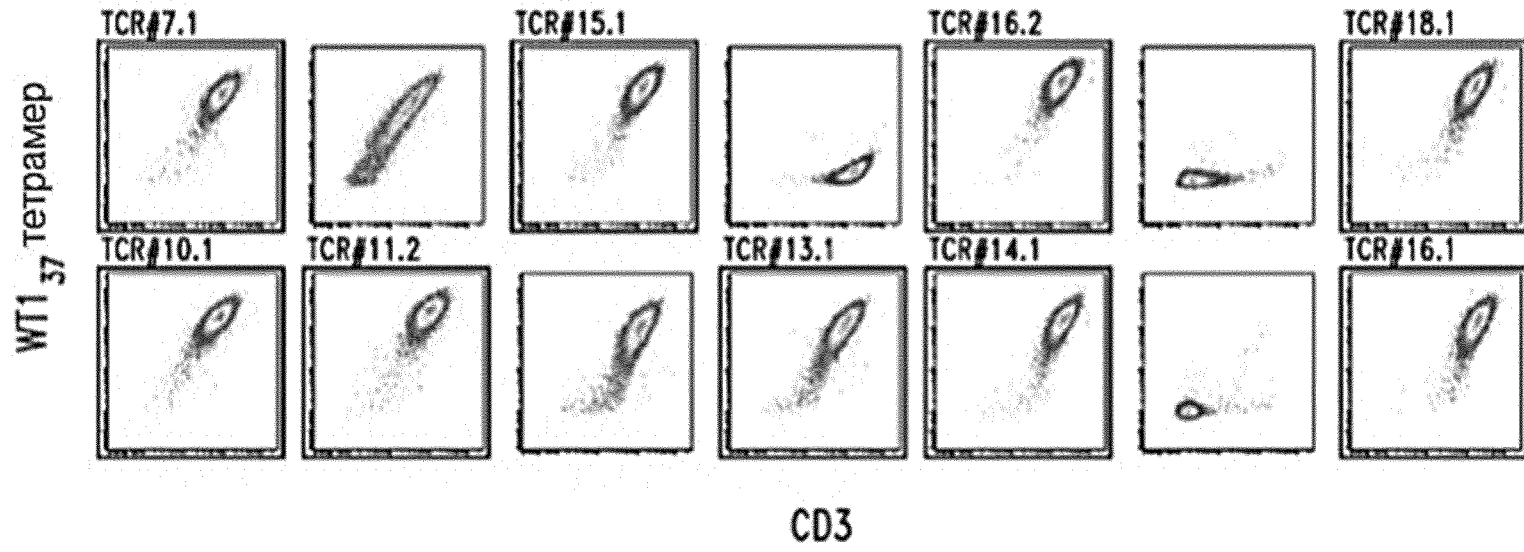


ФИГУРА 3В

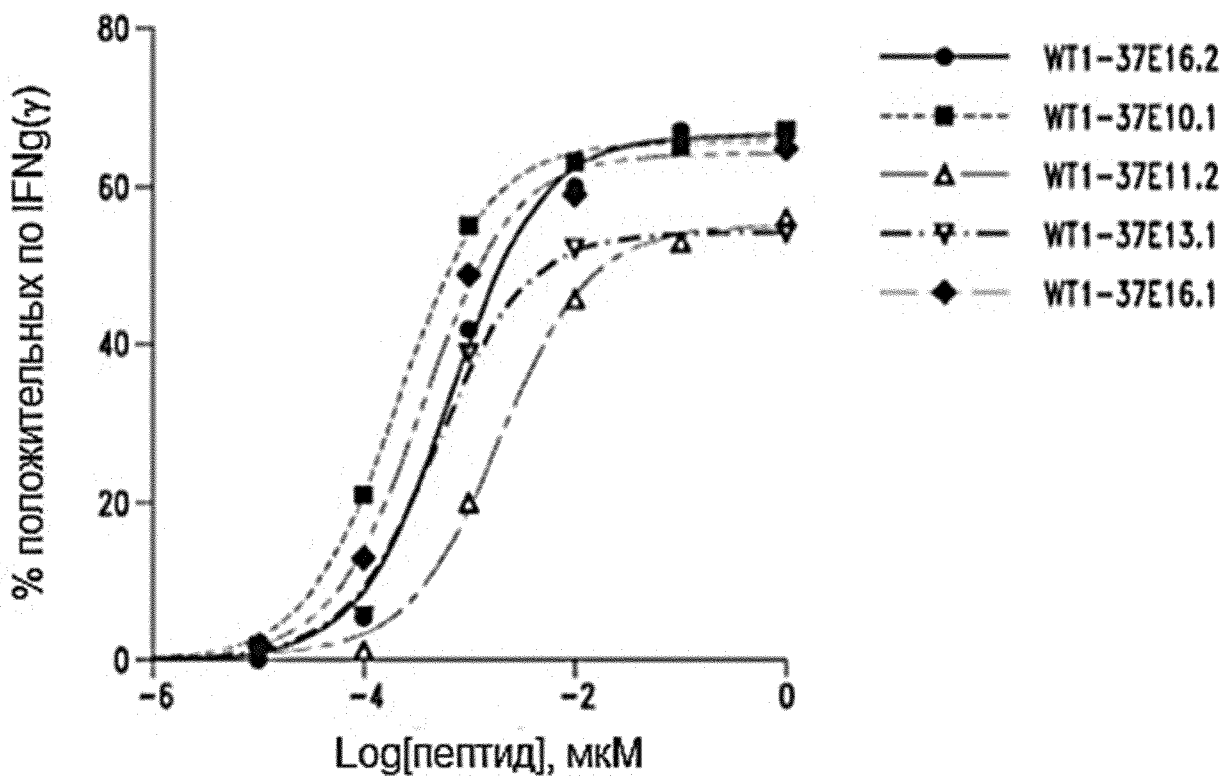
Сортируемый тетрамер CD8i



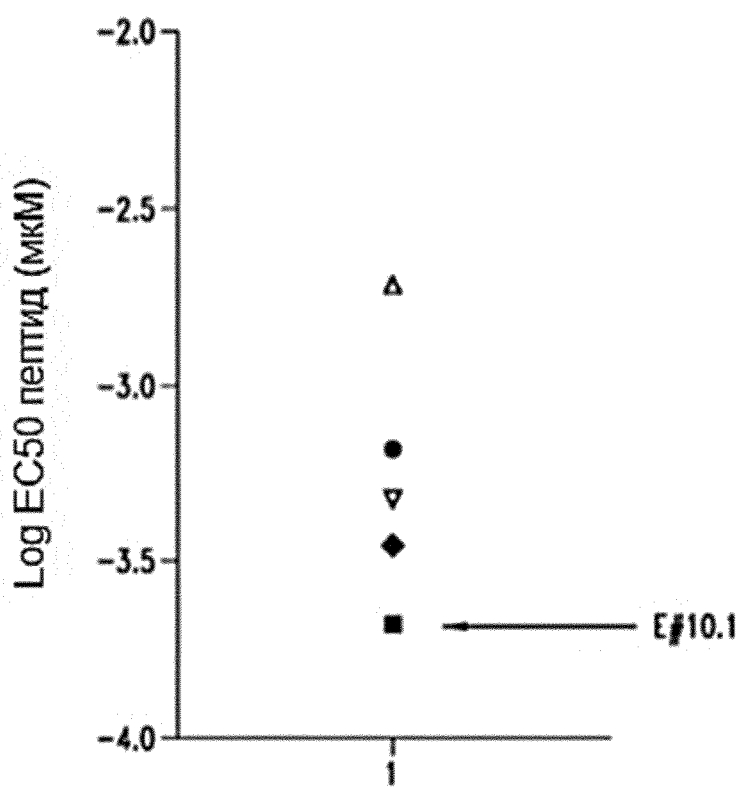
ФИГУРА 3С



ФИГУРА 4



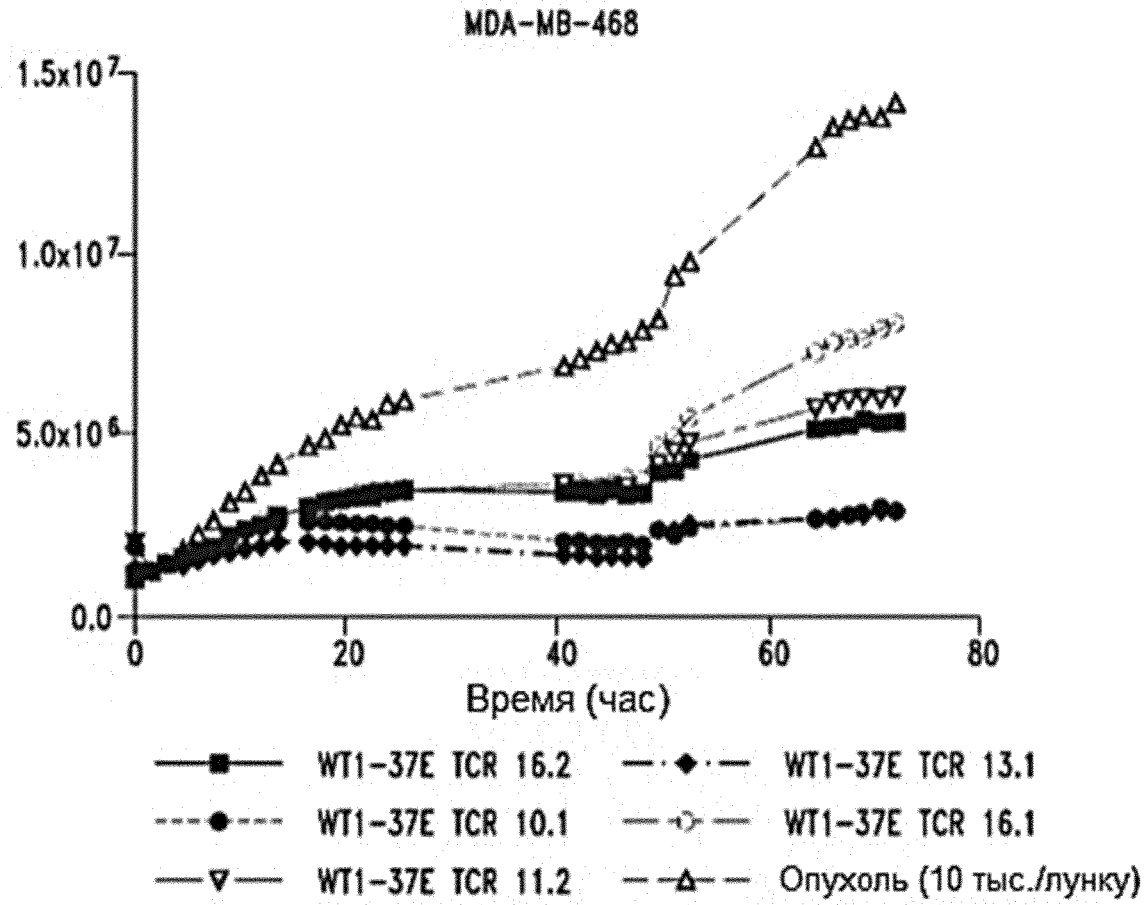
ФИГУРА 5А

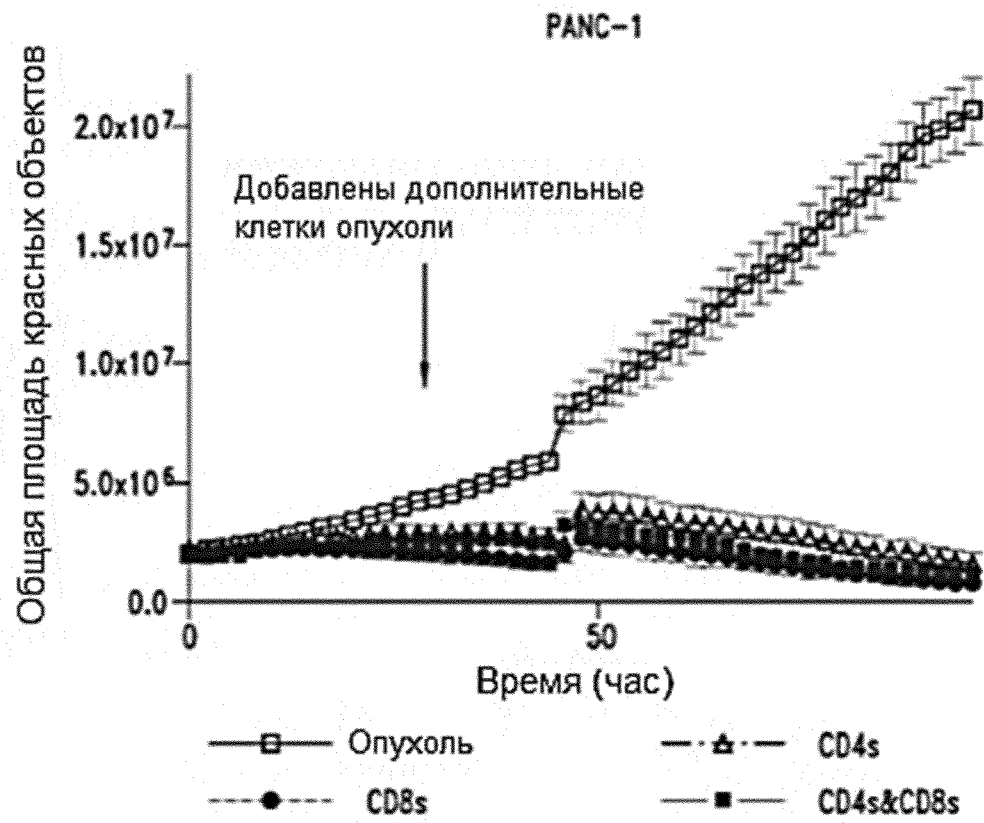


ФИГУРА 5В

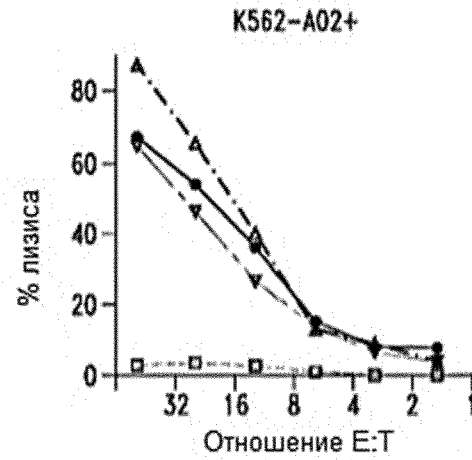
ФИГУРА 6

Общая площадь красных объектов мкм²/пункту

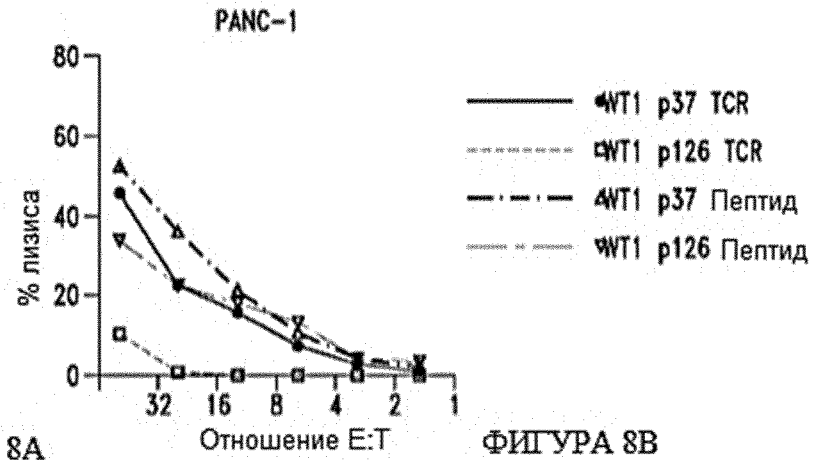




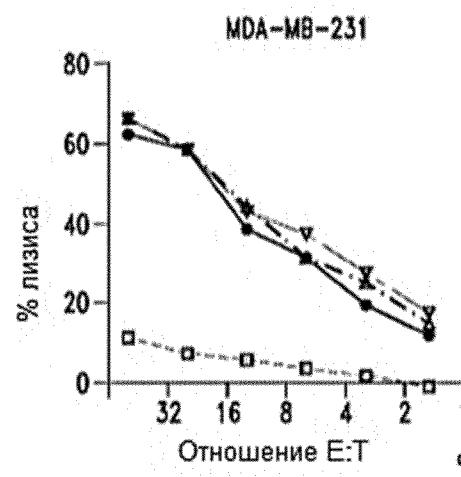
ФИГУРА 7



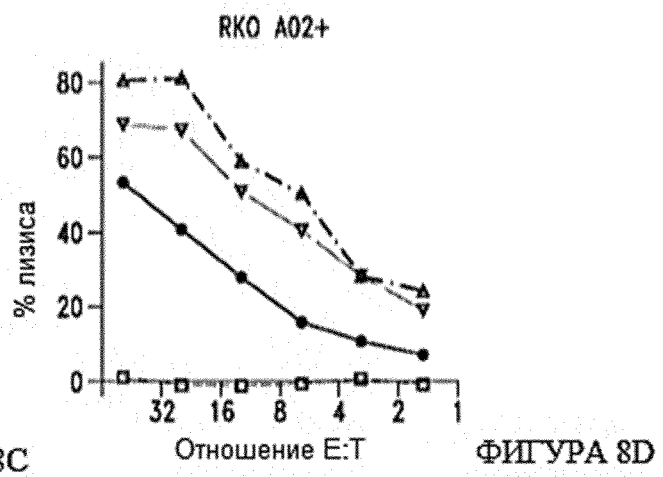
ФИГУРА 8А



ФИГУРА 8В



ФИГУРА 8С



ФИГУРА 8D