



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.15

(21) Номер заявки
201891459

(22) Дата подачи заявки
2016.12.22

(51) Int. Cl. **C12N 5/0783 (2010.01)**
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПРОДУЦИРОВАНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

(31) 15202329.7; 16190399.2

(32) 2015.12.23; 2016.09.23

(33) EP

(43) 2018.11.30

(86) PCT/EP2016/082443

(87) WO 2017/109109 2017.06.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЕДИДЖИН ИММЬЮНОТЕРАПИЗ
ГМБХ; ХЕЛЬМХОЛЬТЦ
ЦЕНТРУМ МЮНХЕН ДОЙЧЕС
ФОРШУНГСЦЕНТРУМ ФЮР
ГЕЗУНДХАЙТ УНД УМВЕЛЪТ
(ГМБХ) (DE)**

(72) Изобретатель:
**Милошевич Славолуб, Эллингер
Кристиан, Венер Карина, Шендель
Долорес (DE)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) CHRISTIAN S. HINRICHS ET AL.: "Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer", IMMUNOLOGICAL REVIEWS, vol. 257, № 1, 13 January 2014 (2014-01-13), p. 56-71, XP055249662, US, ISSN: 0105-2896, DOI: 10.1111/imr.12132, the whole document

ELLINGER ET AL.: "MHC Class-II Expression Targeting (CrossTag) for the Generation of Tumor-Antigen-Specific CD4+", 1 May 2013 (2013-05-01), XP055266213, retrieved from the Internet: URL: http://www.medigene.de/sites/default/files/download/s/12_ellinger_-_mhc_class-ii_expression_targeting_crossta_g_-_cimt_2013.pdf [retrieved on 2016-04-18], the whole document

WU TZYU-CHOU ET AL.: "Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 92, № 25, 5 December 1995 (1995-12-05), p. 11671-11675, XP002180963, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.92.25.11671, the whole document, p. 11672, left-hand column; fig. 1

DANIEL G. KAVANAGH ET AL.: "Expansion of HIV-specific CD4+ and CD8+ T cells by dendritic cells transfected with mRNA encoding cytoplasmic or lysosome-targeted Nef", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 107, № 5, 25 October 2005 (2005-10-25), p. 1963-1969, XP008141565, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2005-04-1513 [retrieved on 2005-10-25], the whole document

ARRUDA L.B. ET AL.: "Dendritic Cell-Lysosomal-Associated Membrane Protein (LAMP) and LAMP-1-HIV-1 Gag Chimeras Have Distinct Cellular Trafficking Pathways and Prime T and B Cell Responses to a Diverse Repertoire of Epitopes", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 177, № 4, 3 August 2006 (2006-08-03), p. 2265-2275, XP055266226, US, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.177.4.2265, the whole document, p. 2266, left-hand column

CARINA WEHNER ET AL.: "Generation of tumor antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells by simultaneous MHC-I and -II epitope presentation in vitro and in vivo", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 2, № Suppl 3, 6 November 2014 (2014-11-06), p. P65, XP021202581, ISSN: 2051-1426, DOI: 10.1186/2051-1426-2-S3-P65, the whole document

US-A1-2005112141

EP-A2-2700708

Anonymous: "Immunomic Therapeutics - 3D animation script - FINAL", 31 August 2015 (2015-08-31), XP055266237, retrieved from the Internet: URL: http://www.immunomix.com/wp-content/uploads/2015/09/IMMUNOMIX_ARKITEK_V4_Script_FINAL_083115.pdf [retrieved on 2016-04-18], the whole document

(57) В настоящем изобретении рассматриваются способы продуцирования человеческих антигенспецифических Т-лимфоцитов. В этих способах используются сигналы, нацеленные на МНС класса II и связанные с антигеном или его фрагментом, для получения МНС этих классов, презентующих белки, кодируемые РНК.

Область, к которой относится изобретение

В настоящем изобретении рассматриваются способы продуцирования человеческих антигенспецифических Т-лимфоцитов. В этих способах используются сигналы, нацеленные на МНС класса II и связанные с антигеном или его фрагментом, для получения МНС класса I и II, презентующих белки, кодируемые РНК. В соответствии с этим настоящее изобретение относится к экспрессионным векторам, содержащим сигналы, нацеленные на МНС класса II, и по меньшей мере один антиген или его фрагмент, и к их применению для *in vitro* продуцирования антигенспецифических Т-лимфоцитов. Также описаны Т-клеточные клоны и Т-клеточные рецепторы (TCR), специфичные к опухолевым антигенам или вирусным антигенам.

Предпосылки создания изобретения

Для борьбы с хроническими вирусными инфекциями и опухолями осуществляют адоптивный перенос Т-клеток, который приводит к Т-клеточным цитотоксическим ответам. Т-клетки, которые обладают природной или рекомбинантной реактивностью на раковое заболевание пациента, продуцируют *in vitro*, в затем переносят обратно пациенту. Адоптивный перенос аутологичных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) был успешно применен для лечения пациентов с прогрессирующими опухолями. Основными недостатками TIL-терапии для широкого применения в клиниках часто являются низкая иммуногенность опухолей, а также появление в тимусе механизмов негативного Т-клеточного отбора, которые активно удаляют Т-клетки с аутоантигенной специфичностью. Поэтому во многих случаях Т-клетки с высокой авидностью к опухолеспецифическим антигенам и Т-клетки с желаемой специфичностью не могут быть выделены из крови пациента или из опухоли, удаленной у пациента. Для устранения этих ограничений был предложен метод переноса генетически перенацеленных лимфоцитов периферической крови (ЛПК).

Кроме того, при раковых и хронических инфекциях Т-лимфоциты теряют свою функцию и истощаются.

С помощью генотерапии и с использованием Т-клеточного рецептора (TCR) из крови пациента могут быть быстро продуцированы миллионы опухолеспецифических Т-клеток. Генотерапия на основное TCR открывает путь к разработке универсального способа передачи опухолевой специфичности к размножающимся и функционально перспективным субпопуляциям Т-клеток. Эта генотерапия включает перенос генов TCR определенных антигенспецифических Т-клеточных клонов, выделенных у доноров, совместимых по человеческому лейкоцитарному антигену HLA, в Т-лимфоциты реципиентов для сообщения им требуемой специфичности к антигену.

Адоптивная Т-клеточная терапия с использованием цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитов (CTL) представляет собой перспективную иммунотерапию для лечения раковых или вирусных заболеваний. Для повышения клинических ответов, комплементарный перенос CD4⁺-Т-клеток-хелперов рассматривается как возможность усиления CD8⁺-CTL-ответов. Известно, что CD4⁺-Т-лимфоциты усиливают главные функции CD8⁺-CTL, а также оказывают большое влияние на процесс генерирования долгоживущих CD8⁺-Т-клеток памяти. Следовательно, важное значение имеет быстрое и эффективное выделение и характеристика опухолевых антигенспецифических CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов.

Многие опухоли экспрессируют молекулы МНС класса II, а поэтому TCR, выделенные из CD4⁺-Т-клеток, являются особенно ценными для непосредственной атаки на эти опухоли.

В целях расширения возможностей использования адоптивной клеточной терапии (АКТ) для лечения пациентов с быстро растущими опухолями или хроническими вирусными заболеваниями осуществляют перенос обогащенных пептид-специфических эффекторных Т-клеток (CD4⁺-Т-клеток-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов), которые были отобраны по их специфичности к лиганду для эффективной атаки на вирусы или опухолевые клетки и при этом не вызывают серьезного воздействия на нормальные ткани. Эти клетки должны быть быстро размножены для получения большого числа клеток *ex vivo* и последующего их использования в АКТ. Альтернативно Т-клеточные рецепторы (TCR) таких лиганд-специфических Т-клеток могут быть клонированы и экспрессированы как TCR-трансгены в активированных лимфоцитах с использованием либо лимфоцитов периферической крови реципиентов, либо активированных Т-клеточных клонов с определенной специфичностью, которые хорошо размножаются и не способны атаковать нормальные ткани хозяина.

Следовательно, необходимость в получении антигенспецифических TCR и разработке эффективных методов выделения этих TCR является очевидной.

Цели и сущность изобретения

Поэтому целью настоящего изобретения является разработка эффективных способов выделения Т-клеток с антигенспецифическими TCR. Было бы желательно разработать способ продуцирования CD4-TCR и/или CD8-TCR. Другой целью настоящего изобретения является получение TCR или их функциональных частей, таких как области CDR3. При этом предпочтительно получить TCR, которые обладали бы высокой и/или оптимальной аффинностью к опухолевым антигенам.

Поэтому в своем первом аспекте настоящее изобретение относится к способу продуцирования человеческих антигенспецифических Т-лимфоцитов, включающему следующие стадии:

А) экспрессии по меньшей мере одного гибридного белка, содержащего

по меньшей мере один антиген или его фрагмент, последовательность сигнала транслокации в эндоплазматический ретикулум (ЭР) перед N-концом антигена, и

трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность за C-концом антигена, в антигенпрезентирующих клетках; и

В) обработки клеточной популяции, содержащей Т-лимфоциты, антигенпрезентирующими клетками стадии А) *in vitro* для активации антигенспецифических Т-лимфоцитов, специфичных к антигену, экспрессируемому антигенпрезентирующей клеткой.

Присоединение нацеливающей последовательности, в частности, в комбинации с последовательностью сигнала транслокации ЭР к нужному антигену или его фрагменту позволяет осуществлять эффективную загрузку комплексов МНС класса II, а также комплексов МНС класса I, которые обычно презентуют клеточные белки. Загрузка комплексов МНС класса I также достигается вышеописанным способом. Поэтому такой способ позволяет продуцировать CD4⁺-TCR, а также CD8⁺-TCR.

Экспрессия по меньшей мере одного гибридного белка (в стадии А) может представлять собой временную экспрессию или стабильную экспрессию, а предпочтительно временную экспрессию, достигаемую, например, путем введения *ivt*-РНК, кодирующей по меньшей мере один гибридный белок. Экспрессия *ivt*-РНК имеет то преимущество, что *ivt*-РНК, служащая в качестве контроля качества, может быть быстро продуцирована и не содержит иммуногенных белковых примесей.

В конкретных вариантах осуществления изобретения гибридный белок может содержать по меньшей мере два антигена или их фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ может также включать стадию обогащения активированных Т-лимфоцитов. Эта стадия обогащения обычно включает следующие стадии:

(а) контактирования клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты, по меньшей мере с одной связывающей молекулой, которая специфически связывается по меньшей мере с одним маркерным белком, специфически экспрессируемым активированными Т-лимфоцитами;

(b) выделения Т-лимфоцитов, с которыми связана по меньшей мере одна связывающая молекула.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один маркерный белок, специфически экспрессируемый активированными Т-лимфоцитами, выбран из группы, включающей Ох40, CD137, CD40L, PD-1, рецептор IL-2, интерферон γ , IL-2, GM-CSF и TNF- α . Кроме того, в стадии (а) клетки могут быть также подвергнуты контактированию со связывающей молекулой, которая специфически связывается с CD4, и/или со связывающей молекулой, которая специфически связывается с CD8.

В конкретных вариантах осуществления изобретения отбор активированных CD4-Т-клеток включает следующие стадии:

(a1) контактирования клеточной популяции стадии В) с антителом против CD40 для блокирования взаимодействия между CD40-CD40L антигенпрезентирующих клеток и антигенспецифических Т-лимфоцитов и для аккумуляции CD40L на поверхности Т-лимфоцитов;

(a2) контактирования клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты, с анти-CD40L антителом;

(b) выделения Т-лимфоцитов, меченных анти-CD40L антителом и анти-CD4 антителом.

Другой вариант изобретения относится к способу по любому из предшествующих пунктов, где указанный способ также включает стадию

C2) идентификации антигенспецифических Т-лимфоцитов, включающей следующие стадии:

а) инкубирования размноженных клеточных клонов клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты,

(i) с антигенпрезентирующими клетками, определенными в стадии А), и

(ii) с контрольными антигенпрезентирующими клетками;

b) сравнения профиля активации при инкубировании (i) и (ii) для каждого клеточного клона;

с) идентификации антигенспецифических клеточных клонов путем сравнения b);

где активация в стадии (i), но не в стадии (ii), указывает на то, что клеточный клон является антигенспецифическим; активация в стадии (i) и (ii) указывает на то, что клеточный клон не является специфичным к антигену; а отсутствие активации в (i) и в (ii) указывает на то, что клеточный клон не является активированным.

В стадии В) антигенпрезентирующие клетки добавляют к клеточной популяции, содержащей Т-лимфоциты, по меньшей мере один раз, или по меньшей мере два раза, или по меньшей мере три раза, или три раза. Временной интервал между повторными добавлениями антигенпрезентирующих клеток может составлять 7-21 день, 12-16 дней или 13-15 дней или 14 дней.

Последовательность сигнала транслокации в ЭР происходит от белка, ассоциированного с эндосомами/лизосомами. Белок, ассоциированный с эндосомами/лизосомами, может быть выбран из группы, состоящей из LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68 или CD1b, а предпочтительно белком, ассоциированным с эндосомами/лизосомами, является LAMP1. Предпочтительно последовательностью сигнала транслокации в ЭР является человеческая последовательность. В конкретных вариантах осуществления изобретения

бретения последовательность сигнала транслокации в ЭР содержит последовательность SEQ ID NO: 33 или ее фрагмент. В более конкретных вариантах осуществления изобретения последовательность сигнала транслокации в ЭР состоит из нижеследующей последовательности SEQ ID NO: 33.

Трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, может происходить от LAMP1 или DC-LAMP, а предпочтительно от DC-LAMP. Предпочтительно трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, представляет собой человеческий домен.

Обычно антигенпрезентирующие клетки выбраны из дендритных клеток, активированных В-клеток, моноцитов, макрофагов, EBV-трансформированных лимфобластоидных клеточных линий, предпочтительно от дендритных клеток, а более предпочтительно от дендритных клеток, происходящих от моноцитов.

Обычно клеточная популяция, содержащая Т-лимфоциты, представляет собой популяцию лимфоцитов периферической крови. Клеточной популяцией, содержащей Т-лимфоциты, может быть популяция неразделенных лимфоцитов периферической крови. Клеточная популяция может быть обогащена Т-лимфоцитами, а предпочтительно CD8⁺- и/или CD4⁺-Т-лимфоцитами, методами, известными специалистам.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу продуцирования антигенспецифических TCR, включающему стадии описанных выше способов, а также стадию выделения TCR из активированных антигенспецифических лимфоцитов, полученных описанными здесь способами.

Описание чертежей

На фиг. 1 показана нацеленная презентация МНС класса II для активации и выделения антигенспецифических CD4⁺-Т-клеток.

(а) Схематически представлены различные конструкции EBNA-3С, используемые для подтверждения функциональных свойств и необходимости передачи CrossTAg-сигнала. Показаны OPC (от ATG до STOP), различные компоненты CrossTAg-сигнала (LAMP1 и DC-LAMP), HLA-DR11-рестриктированный эпитоп EBNA-3С (3Н10) и фрагмент polyA120.

(b) CrossTAg-сигнал облегчает эффективную перекрестную презентацию МНС класса-II. Показана секреция IFN-γ EBNA-3С-специфическим CD4⁺-Т-клеточным клоном 3Н10 после 16-часового совместного культивирования с ivt-РНК-трансфицированными АПК (3-дневными моноцитарными DC (3d-mDC) или с минилимфобластоидными клеточными линиями, трансформированными вирусом Эпштейна-Барра (EBV) (МЛКЛ)). Величины представлены как среднее+ср. кв. откл. для трех повторностей.

(с) Экспрессия маркера активации CD40L является подходящей для выделения антигенспецифических CD4⁺-Т-клеток. Клетки 3Н10, помеченные фиолетовым CellTrace™, смешивали с ЛПК в снижающихся концентрациях и культивировали вместе с EBNA-3С-CrossTAg-ivt-РНК-трансфицированными mDC (АПК) аутологичного донора. Экспрессия CD40L, индуцируемая активацией на CD4⁺-Т-клетках, была оценена после 6-часового совместного культивирования.

На фиг. 2 показаны индуцирование и обогащение CD4⁺-Т-клеток, специфичных к антигену С/Т и выделенных из неразделенных ЛПК.

(а) Индуцированная активацией экспрессия поверхностных CD40L и CD137 на CD4⁺-Т-клетках, выделенных из ЛПК, примированных антигеном С/Т. Экспрессию маркера активации измеряли через 6 ч после специфической повторной стимуляции культуры ЛПК in vitro на дни 13 и 27 соответственно.

(b) Непосредственное сравнение пролиферативной активности всех CD40L^{positive} и CD40L^{negative} CD4⁺-Т-клеточных линий. На день 28 CD4⁺-Т-клетки отделяли от стимулированной культуры ЛПК по экспрессии ими CD40L. Общее число клеток подсчитывали после FACS-разделения (день 0) и по окончании дня 14 после специфической повторной стимуляции (день 14). Представлена x-кратная пролиферация по сравнению с пролиферацией на день 0.

(с) Сравнение индуцированной секреции цитокинов после антигенспецифической повторной стимуляции. Секрецию IFN-γ всеми CD40L^{positive} и CD40L^{negative} CD4⁺-Т-клеточными линиями измеряли после 16-часового совместного культивирования с mDC, трансфицированных конструкцией CrossTAg-антиген-ivt-РНК. Величины представлены как среднее+ср. кв. откл. для трех повторностей.

На фиг. 3 показан скрининг на CD4⁺-Т-клеточные клоны, специфичные к антигену С/Т.

(а) Репрезентативные данные скрининга клонов, происходящих от культуры ЛПК, стимулированной антигеном С/Т. Секрецию IFN-γ оценивали после 16-часового совместного культивирования с mDC, трансфицированными конструкцией CrossTAg-антиген-ivt-РНК (смесью из 4 антигенов). Столбики соответствуют отдельным величинам.

(b) Подтверждение специфичности отобранных Т-клеточных клонов к антигену С/Т. Секрецию цитокинов (IFN-γ и GM-CSF) оценивали после совместного культивирования с ivt-РНК-трансфицированными МЛКЛ (смесью из 4 антигенов). Данные представлены как отдельные величины.

(с) Подтверждение экспрессии ко-рецептора CD4. Показаны репрезентативные клоны.

На фиг. 4 показана оценка специфичности к антигену.

Репрезентативные данные для CD4⁺-Т-клеточных клонов, которые, как было обнаружено, обладают

специфичностью к одному антигену С/Т. Секрецию IFN- γ определяли после совместного культивирования с ivt-РНК-трансфицированными мЛКЛ. Величины представлены как среднее+ср. кв. откл. для дубликатов или отдельные экспериментальные данные, показанные (*).

На фиг. 5 показана необходимость распознавания CrossTAg-сигнала и белка.

(a) Необходимость использования CrossTAg-сигнала для активации CD4⁺-Т-клеточного клона на основе ivt-РНК.

(b) Распознавание физиологически процессированных экзогенных рекомбинантных белков.

Стимулирующую способность АПК, трансфицированных антигеном-CrossTAg-ivt-РНК (мЛКЛ), непосредственно сравнивали с мЛКЛ, трансфицированными антигеном-ivt-РНК без CrossTAg-сигнала (a) или с мЛКЛ, нагруженными рекомбинантным белком (b), и такое сравнение осуществляли по секреции IFN- γ выделенными CD4⁺-Т-клеточными клонами, несущими уникальные TCR. Ложнотрансфицированные АПК и Т-клетки, взятые отдельно, служили в качестве контроля. Величины представлены как среднее+ср. кв. откл. для трех повторностей.

На фиг. 6 показано определение коровых последовательностей эпитопа МНС класса II.

Пептидные фрагменты, обнаруженные посредством прямой идентификации эпитопа МНС класса II (DEPI) (в рамке с пунктирными линиями), подтверждали с использованием коротких конструкций CrossTAg-ivt-РНК. GAGE-1-TCR-2-трансгенные Т-клетки 3Н10 (a) или XAGE-1-TCR-1- и -TCR-2-Т-клетки (b) совместно культивировали с АПК, трансфицированными либо перекрывающейся короткой конструкцией CrossTAg-ivt-РНК (показано черными столбиками), либо полноразмерной конструкцией антиген-CrossTAg-ivt-РНК (мЛКЛ). Секрецию IFN- γ оценивали после 16-часового совместного культивирования, и на этой фигуре представлены распознаваемые коровые последовательности эпитопа (в рамке со сплошной линией). Совместные культуры ложнотрансфицированных АПК или Т-клеток, взятых отдельно, служили в качестве контроля. Величины представлены как среднее+ср. кв. откл. для трех повторностей.

На фиг. 7 показана трансгенная экспрессия CD4⁺-Т-клеточных рецепторов, специфичных к антигену С/Т.

Т-клетки 3Н10 трансфицировали ivt-РНК, кодирующей соответствующие TCR- α - и - β -цепи CD4⁺-Т-клеточных клонов GAGE-1-TCR-1, XAGE-1-TCR-1 или -TCR-2. TCR-трансгенные клетки 3Н10 культивировали вместе с АПК, нагруженными антигеном (мЛКЛ), и секрецию IFN- γ детектировали после 16-часового совместного культивирования. Совместные культуры, содержащие ложнотрансфицированные АПК и Т-клетки, взятые отдельно, служили в качестве контроля. Величины представлены как среднее+ср. кв. откл. для трех повторностей.

На фиг. 8 показано, как CrossTAg-сигнал облегчает загрузку МНС класса II посредством внутренних [эндогенных] путей презентации клеток.

HLA-DRB1*11:01-позитивные и HLA-DRB1*11:01-негативные DC трансфицировали EBNA-3С-CrossTAg-ivt-РНК. Трансфицированные и нетрансфицированные DC совместно инкубировали во всех возможных комбинациях и через 12 ч культивировали вместе с EBNA-3С-специфическим CD4⁺-Т-клеточным клоном 3Н10. Секрецию IFN- γ клетками 3Н10 оценивали после 16-часового совместного культивирования с DC. Величины представлены как среднее+ср. кв. откл. для трех повторностей.

На фиг. 9 показана характеристика 3-дневных mDC для примирования ЛПК.

(a) Экспрессию поверхностного маркера детектировали по окрашиванию моноклональными антителами (незаштрихованные кривые) и контрольными антителами соответствующих изотипов (заштрихованные серым кривые).

(b) Показаны уровни антигенной мРНК в ivt-РНК-трансфицированных mDC. Представлено x-кратное увеличение числа копий антигенной мРНК по сравнению с нетрансфицированными mDC. Число копий антигенной мРНК оценивали с помощью кол.ОТ-ПЦР с использованием антигенспецифических праймеров.

На фиг. 10 показана стратегия дискриминации для сортировки С/Т-антигенспецифических CD4⁺-Т-клеток на основе CD40L.

Лимфоциты отбирали по их прямому рассеянию (FSC; FSC-A: площадь прямого рассеяния; FSC-H: высота прямого рассеяния) и по боковому рассеянию (SSC-A). DAPI использовали для исключения погибших клеток. CD4-позитивные клетки моноклеточной фракции (FSC-A/FSC-H) отсортировывали по уровню экспрессии CD40L и представляли как общие CD40L^{positive} и CD40L^{negative}-CD4⁺-Т-клеточные линии. Кроме того, CD40L^{positive}-CD4⁺-Т-клетки распределяли по 96-луночным планшетам на моноклеточной основе.

На фиг. 11 показаны альтернативные последовательности сигнала транслокации в ЭР.

(a) Схематически представлены векторные конструкции, используемые для продуцирования ivt-РНК. Антиген-мишень охарактеризованного CD4⁺-Т-клеточного клона 3Н10 (EBNA-3С-специфического, HLA-DRB1*11:01-рестриктированного) клонировали в векторную систему pGEM, содержащую комбинацию сигналов транслокации в ЭР для человеческих LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68 или CD1b (от 5' до антигенной последовательности) и эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность че-

ловеческого DC-LAMP (от 3' до антигенной последовательности), эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность человеческого DC-LAMP, взятую отдельно или не содержащую последовательности транслокации и нацеливающей последовательности. Кроме того, представлены аминокислотные последовательности используемых сигнальных пептидов (сигналов транслокации в ЭР), указывающих на наличие предсказанных сайтов расщепления пептидазой.

(b) Клетки CD4⁺-Т-клеточного клона 3H10 культивировали вместе с отдельными *ivt*-РНК-трансфицированными АПК (мЛКЛ). Культуры вместе с ложнотрансфицированными АПК служили в качестве контроля. Секретию IFN- γ детектировали с помощью стандартного ELISA-анализа на IFN- γ через 16 ч после начала совместного культивирования. Величины представлены как среднее \pm ср. кв. откл. для трех повторностей.

На фиг. 12 показана одновременная презентация МНС класса II и МНС класса I с использованием сигнала, нацеленного на CrossTAg.

(a) Схематически представлены векторные конструкции, используемые для продуцирования *ivt*-РНК. Антигены-мишени охарактеризованного CD4⁺-Т-клеточного клона 3H10 (EBNA-3С-специфического, HLA-DRB1*11:01-рестриктированного) и охарактеризованного CD8⁺-Т-клеточного клона IVSB (специфичного к тирозиназе, HLA-A2*01:01- рестриктированного) клонировали в векторную систему pGEM в присутствии или в отсутствии последовательностей, нацеленных на CrossTAg. EBNA-3С был клонирован как 1 т.п.н.-фрагмент (а.к. 421-780) полноразмерной генной последовательности и содержал эпитоп для клона 3H10. Для получения конструкции IVSB-3H10(эпитоп)-CrossTAg вместо полноразмерной антигенной последовательности использовали минигены, содержащие эпитопы клона 3H10 (EBNA-3С, а.к. 628-641, WRMFMRERQLPQS; SEQ ID NO: 36) и клона IVSB (тирозиназа, а.к. 369-377, YMDGTMSQV; SEQ ID NO: 37), которые последовательно клонировали в остов вектора pGEM-CrossTAg. Для облегчения стабилизации транскрибированных молекул *ivt*-РНК в цитоплазме все векторные конструкции pGEM содержали поли-А-хвост, включающий 120 пар адениновых оснований (поли-А120) от 3'-конца до открытой рамки считывания (ОРС).

(b) Отдельные фракции зрелых DC (mDC), взятых у донора, позитивного по HLA-A2*01:01, HLA-DRB1*11:01, трансфицировали отдельными конструкциями *ivt*-РНК, перечисленными в (a). Через семь часов после трансфекции 1×10^5 клеток отдельных популяций mDC культивировали вместе с 1×10^5 клеток CD4⁺-Т-клеточного клона 3H10 или CD8⁺-Т-клеточного клона IVSB (в отношении 1:1). Совместные культуры вместе с ложнотрансфицированными mDC (H₂O) или Т-клетками, взятыми отдельно, служили в качестве контроля. Секретию IFN- γ детектировали с помощью стандартного ELISA-анализа на IFN- γ через 16 ч после начала совместного культивирования. Величины представлены как среднее \pm ср. кв. откл. для трех повторностей.

Подробное описание изобретения

Перед подробным описанием изобретения, представленным со ссылками на некоторые предпочтительные варианты его осуществления, приводятся следующие общие определения.

Настоящее изобретение, проиллюстрированное ниже, может быть соответствующим образом осуществлено на практике в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не раскрытых в настоящей заявке.

Настоящее изобретение описано на конкретных вариантах его осуществления и со ссылкой на некоторые чертежи, но настоящее изобретение не ограничивается этими вариантами, а ограничивается только формулой изобретения.

Используемый в настоящем описании и формуле изобретения термин "содержащий" не рассматривается как исключаящий другие элементы. В соответствии с настоящим изобретением термин "состоящий из" рассматривается как предпочтительный вариант термина "включающий в себя". Если было определено, что группа включает по меньшей мере некоторое количество вариантов осуществления изобретения, то это следует также понимать как то, что такая группа предпочтительно состоит только из этих вариантов осуществления изобретения.

Используемый здесь термин "экспрессия" означает процесс, в котором полипептид продуцируется на основе последовательности нуклеиновой кислоты гена. В соответствии с этим термин "экспрессированный" белок или полипептид включает, но не ограничивается ими, внутриклеточные, трансмембранные и секретируемые белки или полипептиды.

Технические термины используются здесь в их общепринятом смысле. Если некоторые термины имеют конкретное значение, то определение этих терминов будет дано в контексте, в котором используются эти термины.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу продуцирования человеческих антигенспецифических Т-лимфоцитов, включающему следующие стадии:

А) экспрессии по меньшей мере одного гибридного белка, содержащего по меньшей мере один антиген или его фрагмент, последовательность сигнала транслокации в эндоплазматический ретикулум (ЭР) перед N-концом антигена, и

трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность за С-концом антигена, в антигенпрезентирующих клетках; и

В) обработки клеточной популяции, содержащей Т-лимфоциты, антигенпрезентирующими клетками стадии А) для активации *in vitro* антигенспецифических Т-лимфоцитов, специфичных к антигену, экспрессируемому антигенпрезентирующей клеткой.

Фрагмент может представлять собой последовательность антигена, который является специфичным для данного антигена, т.е. не присутствует в другом белке или пептиде млекопитающего, а в частности человека. Фрагмент может быть короче, например, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 90%, чем последовательность антигена. Фрагмент может иметь длину по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15 или более аминокислот.

В одном из вариантов осуществления изобретения гибридный белок содержит по меньшей мере два антигена или их фрагмента. Гибридный белок может содержать по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 антигенов или их фрагментов. Гибридный белок может содержать менее 100, менее 50, менее 40, менее 30, менее 20, менее 10 антигенов или их фрагментов.

Термин "активировать антигенспецифические Т-лимфоциты" относится к активации "необученных" Т-клеток (индуцированных *de novo*) и к активации Т-лимфоцитов памяти (реактивации).

Обычно антигенпрезентирующие клетки и клеточная популяция, содержащая Т-лимфоциты, происходят от одного и того же донора. Кроме того, рассматриваются аллорестриктированные конструкции, описанные в EP1910521, в которых нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу МНС, экспрессируется в антигенпрезентирующих клетках донора, у которого отсутствует ген МНС, соответствующий указанной переносимой молекуле МНС.

Экспрессия по меньшей мере одного гибридного белка в стадии А) может представлять собой временную экспрессию или стабильную экспрессию. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения экспрессией является временная экспрессия, достигаемая, например, путем введения *ivt*-РНК, кодирующей по меньшей мере один гибридный белок. Экспрессия *ivt*-РНК имеет то преимущество, что *ivt*-РНК, служащая в качестве контроля качества, может быть быстро продуцирована и не содержит иммуногенных белковых примесей.

При *in vitro* обработке Т-лимфоцитов, также называемой примированием, появляется ряд различных активированных популяций лимфоцитов. Обычно обработка в стадии В) представляет собой совместное культивирование антигенпрезентирующих клеток с клеточной популяцией, содержащей Т-лимфоциты. Т-клетки, распознающие комплексы МНС:эпитоп в антигенпрезентирующих клетках, активируются, и часть этих клеток является специфичной для комплексов молекул МНС, презентующих эпитоп антигена, экспрессируемого на стадии А). Эти представляющие интерес Т-клетки должны быть отделены от Т-клеток, которые распознают молекулы МНС, независимо от пептида или молекул МНС, которые презентуют эпитопы, не происходящие от антигена, экспрессируемого на стадии А).

Для обработки антигенпрезентирующих клеток в стадии В) антигенпрезентирующие клетки добавляют к популяции, содержащей Т-лимфоциты, по меньшей мере один раз. Первое добавление антигенпрезентирующих клеток также называют примированием. Антигенпрезентирующие клетки могут быть добавлены несколько раз, например по меньшей мере два или по меньшей мере три раза. Второе и каждое последующее добавление антигенпрезентирующих клеток также называют рестимуляцией, поскольку на этих стадиях, уже активированные Т-лимфоциты получают дополнительный стимул для дальнейшей пролиферации. В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие клетки добавляют один раз. В других вариантах осуществления изобретения антигенпрезентирующие клетки добавляют два раза. В другом варианте осуществления изобретения антигенпрезентирующие клетки добавляют три раза. Другие варианты осуществления относятся к способам, в которых антигенпрезентирующие клетки добавляют три или более раз. Новые АПК могут быть добавлены в Т-клеточные культуры через каждые 7-21 день, или через каждые 12-16 дней, или через каждые 13-15 дней, или через каждые 14 дней. Специалисту в данной области понятно, что клетки культивируют в свежей культуральной среде на регулярной основе, которая содержит дополнительные цитокины.

Обработка клеточной популяции, содержащей Т-лимфоциты, антигенпрезентирующими клетками *in vitro* означает, что обработку осуществляют не в организме, таком как млекопитающее, а в клеточной культуре *in vitro*. Условия культивирования клеток известны специалистам и включают добавление цитокинов, например IL-2, IL-4, IL-7 и/или IL-15 и т.п., в зависимости от типа продуцируемых Т-клеток (Schendel, D.J. et al., Human CD8+ T lymphocytes, 1997, in: The Immunology Methods Manual. (I. Lefkowitz, ed.), p. 670-690; Regn, S. et al., 2001, The generation of monospecific and bispecific anti-viral cytotoxic T lymphocytes (CTL) for the prophylaxis of patients receiving an allogeneic bone marrow transplant, Bone Marrow Transplant, 27:53-64; Su, Z. et al., Antigen presenting cells transfected with LMP2a PHK induce CD4+ LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes which kill via a Fas-independent mechanism, Leuk. Lymphoma, 43(8):1651-62).

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ может также включать стадию обогащения активированных и/или антигенспецифических Т-лимфоцитов. Эта стадия обогащения обычно включает следующие стадии:

(а) контактирования клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты по меньшей мере с одной связывающей молекулой, которая специфически связывается с маркерным белком, специфически экспрессируемым активированными Т-лимфоцитами или по меньшей мере с одной молекулой МНС, презентующей эпитоп нужного антигена;

(b) выделения Т-лимфоцитов, с которыми связана по меньшей мере одна связывающая молекула или по меньшей мере одна молекула МНС, презентующая эпитоп нужного антигена.

В конкретных вариантах осуществления изобретения этот способ может включать стадию обогащения активированных Т-лимфоцитов. Эта стадия обогащения обычно включает следующие стадии:

(а) контактирования клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты, по меньшей мере с одной связывающей молекулой, которая специфически связывается с маркерным белком, специфически экспрессируемым активированными Т-лимфоцитами;

(b) выделения Т-лимфоцитов, с которыми связана по меньшей мере одна связывающая молекула.

В других конкретных вариантах осуществления изобретения способ может также включать стадию обогащения Т-лимфоцитов, которые являются специфичными к нужному антигену. Эта стадия обогащения обычно включает следующие стадии:

(а) контактирования клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты, с молекулой МНС, презентующей эпитоп нужного антигена;

(b) выделения Т-лимфоцитов, с которыми связана по меньшей мере одна молекула МНС, презентующая эпитоп нужного антигена.

Обогащение активированных Т-лимфоцитов на основе маркерных белков, специфически экспрессируемых активированными Т-лимфоцитами, позволяет обогащать широкий спектр активированных Т-клеток, независимо от рестрикции и специфического эпитопа.

Связывающая молекула, которая специфически связывается с белком-маркером, может представлять собой, но не ограничивается ими, антитело, производное антитела, фрагмент антитела или конъюгат вышеупомянутых молекул с другой молекулой. Связывающий белок может быть помечен, например, для облегчения процедур сортировки, таких как FACS или MACS.

Маркерный белок, специфически экспрессируемый активированными Т-лимфоцитами, может представлять собой любой поверхностный белок или секретируемый белок, который экспрессируется активированными Т-лимфоцитами и в основном не экспрессируется неактивированными Т-лимфоцитами. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один маркерный белок, специфически экспрессируемый активированными Т-лимфоцитами, выбран из группы, включающей OX40, CD137, CD40L, PD-1, рецептор IL-2, интерферон γ , IL-2, GM-CSF и TNF- α . С помощью этих маркеров может быть осуществлено обогащение активированных Т-лимфоцитов независимо от конкретного эпитопа, презентуемого TCR. Этот способ облегчает выделение Т-клеток, распознающих все потенциальные иммуногенные эпитопы выбранного антигена, и является, например, особенно подходящим для плохо охарактеризованных антигенов.

В стадии обогащения отобранные клетки могут быть объединены в субпопуляции или непосредственно выделены в виде моноклеточных клонов. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки в первой стадии обогащения объединяют, а в последующей стадии обогащения их разделяют на отдельные клоны. Разделение на отдельные клоны может быть осуществлено без каких-либо ограничений путем лимитированного разведения или путем проведения автоматизированного моноклеточного сортировки посредством FACS или MACS. Предпочтительно моноклеточный сортировку осуществляют с помощью FACS.

В конкретных вариантах осуществления изобретения отбор активированных CD4-Т-клеток включает следующие стадии:

(a1) контактирования антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих по меньшей мере один гибридный белок стадии А) с антителом против CD40 для блокирования взаимодействия между CD40-CD40L антигенпрезентирующих клеток и антигенспецифических Т-лимфоцитов и для аккумуляции CD40L на поверхности Т-лимфоцитов;

(a2) контактирования клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты, с анти-CD40L антителом;

(b) выделения Т-лимфоцитов, меченных анти-CD40L антителом и анти-CD4 антителом.

Для отбора активированных Т-клеток с помощью секретируемых белков, например, цитокинов, таких как интерферон- γ , биспецифические молекулы, распознающие маркеры Т-клеточной поверхности и цитокины-мишени, иммобилизуют с секретируемым цитокином на клеточной поверхности, а затем они могут быть детектированы с использованием меченого детектирующего антитела, как описано Becker и др. (Becker, C. et al., 2001, Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN capture assay, Nature Med., 7(10):1159-1162).

Кроме того, в стадии (а) клетки могут быть подвергнуты дополнительному контактированию со связывающей молекулой, которая специфически связывается с CD4, и/или со связывающей молекулой, которая специфически связывается с CD8.

Альтернативно обогащение может быть осуществлено с использованием молекул МНС, презентующих эпитоп нужного антигена (т.е. антигена, экзогенно экспрессируемого антигенпрезентирующими клетками в стадии А). Молекулы МНС могут быть помечены, например, для облегчения процедур сортировки, таких как FACS или MACS. Низкая аффинность взаимодействия между TCR и соответствующими комплексами "пептид:МНС" может быть предотвращена путем сборки растворимых мультимеров молекул "пептид:МНС", как описано Wilde и др. (Dendritic cells pulsed with PHK encoding allogeneic MHC and antigen induce T cells with superior antitumor activity and higher TCR functional avidity, Blood, 114(10):2131-2139; 2009), таких как, но не ограничивающихся ими, димеры, тримеры, тетрамеры, пентамеры, гексамеры, гептамеры или октамеры. Кроме того, могут быть использованы так называемые стрептамеры "пептид:МНС", которые обратимо связываются с TCR, что позволяет выделять высокоаффинные TCR без риска индуцирования функциональных модификаций или клеточной гибели, индуцированной активацией (Knabel et al. (2002), Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer, Nature Medicine, 8(6), 631-7). Обратимые свойства взаимодействия T-клеток со стрептамером основаны на модифицированной форме стрептавидина (стрептактина), который действует как остов стрептамера.

Такой подход позволяет осуществлять направленное обогащение эпитоп-специфических TCR со специфической рестрикцией.

Выделение активированных и/или антигенспецифических T-лимфоцитов может быть осуществлено с помощью клеточного сортировки с активацией флуоресценции (FACS), а также клеточного сортировки с магнитной активацией (MACS). Для проведения FACS, связывающую молекулу, специфически связывающуюся с маркерным белком или с молекулой МНС, презентующей эпитоп нужного антигена, метят флуоресцентным красителем. FACS является особенно подходящим для выделения небольших количеств молекул с высокой степенью чистоты. Для MACS, связывающую молекулу, специфически связывающуюся с маркерным белком или с молекулой МНС, презентующей эпитоп нужного антигена, метят магнитной частицей, такой как магнитная сфера. MACS является особенно подходящим для быстрого сортировки всех культур.

Кроме того, в стадии (а) клетки могут быть подвергнуты дополнительному контактированию со связывающей молекулой, которая специфически связывается с CD4 для дальнейшего обогащения, и/или со связывающей молекулой, которая специфически связывается с CD8.

Другой вариант изобретения относится к способу по любому из предшествующих пунктов, где указанный способ также включает стадию

С2) идентификации антигенспецифических T-лимфоцитов, включающей следующие стадии:

а) инкубирования размноженных клеточных клонов клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические T-лимфоциты,

(i) с антигенпрезентирующими клетками, определенными в стадии А), и

(ii) с контрольными антигенпрезентирующими клетками;

б) сравнения профиля активации при инкубировании (i) и (ii) для каждого клеточного клона;

с) идентификации антигенспецифических клеточных клонов путем сравнения с б);

где активация в стадии (i), но не в стадии (ii), указывает на то, что клеточный клон является антигенспецифическим.

Стадия идентификации С2) антигенспецифических T-лимфоцитов может быть осуществлена после стадии обогащения С1) активированных T-лимфоцитов или, альтернативно, после стадии обработки В) клеточной популяции, содержащей T-лимфоциты, антигенпрезентирующими клетками без проведения стадии обогащения С1).

Другой вариант изобретения относится к способу по любому из предшествующих пунктов, где указанный способ также включает стадию

С2) идентификации антигенспецифических T-лимфоцитов, включающей следующие стадии:

а) инкубирования по меньшей мере одной фракции клеток клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические T-лимфоциты,

(i) с антигенпрезентирующими клетками, определенными в стадии А), и

(ii) с контрольными антигенпрезентирующими клетками или в отсутствии антигенпрезентирующих клеток;

б) сравнения профиля активации при инкубировании (i) и (ii) по меньшей мере для одной фракции клеток;

с) идентификации фракции клеток, которые являются антигенспецифическими, путем сравнения б); где активация в стадии (i), но не в стадии (ii), указывает на то, что фракция клеток является антигенспецифической.

Другой вариант изобретения относится к способу по любому из предшествующих пунктов, где указанный способ также включает стадию

С2) идентификации антигенспецифических Т-лимфоцитов, включающей следующие стадии:

- а) инкубирования размноженных Т-клеточных клонов клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты,
 - (i) с антигенпрезентирующими клетками, определенными в стадии А), и
 - (ii) с контрольными антигенпрезентирующими клетками или в отсутствии антигенпрезентирующих клеток;
 - б) сравнения профиля активации при инкубировании (i) и (ii) для каждого клеточного клона;
 - с) идентификации антигенспецифических клеточных клонов путем сравнения б);
- где активация в стадии (i), но не в стадии (ii), указывает на то, что клеточный клон является антигенспецифическим.

Профиль активации Т-лимфоцитов может быть определен, например, путем оценки высвобождения цитокинов, индуцированного активацией, или антиген-направленной способности к цитолизу.

Для оценки секреции цитокинов, индуцированной активацией, Т-клетки могут быть культивированы вместе с АПК, нагруженными антигеном. При этом могут быть использованы различные отношения эффекторных клеток к клеткам-мишеням (Е:Т). Т-клетки, инкубированные с контрольным антигенпрезентирующими, т.е. ложнотрансфицированными АПК, или в отсутствии стимулирующих клеток, могут быть использованы в качестве негативного контроля. Супернатанты культуры оценивают с помощью стандартного твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA). Примерами маркеров являются, но не ограничиваются ими, секреция гранулоцитарного-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), интерферона- γ (IFN- γ), IL-2 и TNF- α . Секреция IFN- γ , IL-2 и TNF- α после взаимодействия с антигеном коррелирует с улучшенной противоопухолевой функцией, а поэтому она является особенно подходящей для оценки индуцированной антигеном секреции цитокинов цитотоксическими CD8⁺-Т-клетками. Кроме того, IFN- γ и гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) являются хорошо охарактеризованными цитокинами для оценки антигенспецифических Т-клеточных клонов, поляризованных CD4⁺-Т-хелпером-1 (Th1).

Если для первичного индуцирования Т-клеток используется множество антигенов одновременно, то отдельные популяции АПК, экспрессирующие каждый стимулирующий антиген, могут быть смешаны в равных соотношениях и использованы в Т-клеточных со-культурах. Таким образом, первоначальные скрининг-анализы, проводимые для оценки специфичности, позволяют лишь предсказать общую антигенную реактивность по отношению ко всем представленным здесь антигенам-мишеням. Для оценки специфичности к одному антигену необходимо последующее совместное культивирование антиген-реактивных Т-клеток с АПК, трансфицированными *ivt*-РНК одного вида.

Кроме того, цитотоксическая активность отдельных Т-клонов может быть оценена, например, с помощью анализов на высвобождение хрома. В таких анализах клетки-мишени метят радиоактивным хромом и подвергают контактированию с Т-клетками. После цитолиза, радиоактивный хром высвобождается в супернатант и детектируется через 4 ч после начала совместного культивирования. Специфическое высвобождение хрома нормализуют на спонтанное высвобождение, оцениваемое путем инкубирования клеток-мишеней в отсутствие эффекторных клеток. В соответствии с этим высокое количество хрома в супернатанте коррелирует с превосходной цитолитической Т-клеточной активностью. Анализы на высвобождение хрома предпочтительно осуществляют для скрининга опухолевых антигенспецифических CD8⁺-Т-клеток.

Антигенпрезентирующими клетками, подходящими для их использования в целях идентификации антигенспецифических Т-лимфоцитов, могут быть, например, опухолевые клеточные линии, экспрессирующие нужный антиген и необходимые молекулы МНС; стабилизированные антигенпрезентирующие клеточные линии, экспрессирующие общие молекулы МНС; или антигенпрезентирующие клетки, взятые у того же донора, у которого была взята популяция, содержащая Т-лимфоциты.

Одним из примеров стабилизированной антигенпрезентирующей клеточной линией является человеческая лимфоидная клеточная линия Т2, экспрессирующая часто встречающийся аллель HLA-A*02:01 и обладающая дефектной природной презентацией эпитопа, и такая клеточная линия может быть внешне нагружена короткими пептидами, например синтетическими пептидами, т.е. эта клеточная линия может быть использована для скрининга HLA-A*02:01-рестриктированных CD8⁺-Т-лимфоцитов. Другим примером является человеческая клеточная линия K562, которая не экспрессирует HLA класса I и II и в которую может быть стабильно или временно введена любая представляющая интерес молекула HLA, а поэтому такая клеточная линия может служить для скрининга на CD8⁺-Т-лимфоциты и CD4⁺-Т-лимфоциты.

Происходящие от донора антигенпрезентирующие клетки могут представлять собой, например, выделенные моноциты, которые созревают с образованием дендритных клеток. Зрелые дендритные клетки обладают оптимальной способностью к активации.

Другим примером ценных АПК, происходящих от донора, являются В-лимфоциты, иммортализованные вирусом Эпштейна-Барра (EBV), т.е. так называемые лимфобластоидные клеточные линии (ЛКЛ). Поскольку ЛКЛ по своей природе происходят от В-клеток, то такие АПК обладают преимущест-

венной функцией, такой как процессинг и презентация антигена. Кроме того, ЛКЛ экспрессируют костимуляторные молекулы, такие как B7.1 (CD80) и B7.2 (CD86), а также соответствующие адгезивные молекулы, которые способствуют усилению стимулирующей активности. Мутантные штаммы EBV с сокращенным геномом (мини-EBV) могут быть использованы для продуцирования мини-EBV-трансформированных В-клеток (мЛКЛ), в которых отсутствует большинство генов литического цикла, что приводит к снижению EBV-зависимой активации Т-лимфоцитов (Kempkes, B. et al. (1995), *Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein Barr virus DNA*, *J. Virol*, 69(1):231-238, 1995; Moosmann et al. (2002), *B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells*, *Blood*, 100(5):1755-1764).

Донорные ЛКЛ/мЛКЛ могут быть использованы для оценки специфичности Т-клеток, в частности, в случае когда необходимо оценить большое количество выделенных Т-клеточных клонов. Антигенная нагрузка ЛКЛ/мЛКЛ может быть осуществлена, например, посредством *inv*-РНК-трансфекции путем ретровирусной трансдукции и доставки внешнего пептида или белка.

Выделение антигенспецифических Т-лимфоцитов основано на сравнении профиля активации Т-лимфоцитами, инкубированных (i) с антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими нужный антиген и (ii) с контрольными антигенпрезентирующими клетками или в отсутствии антигенпрезентирующих клеток.

Активация (i) антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими нужный антиген, но не (ii) контрольными антигенпрезентирующими клетками или в отсутствии антигенпрезентирующих клеток указывает на то, что Т-клеточный клон является антигенспецифическим. Термин "активированный" по сравнению с "неактивированным" означает уменьшение по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% от уровня секреции (т.е. секреции IFN- γ) Т-лимфоцитами, инкубированными с антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими нужный антиген.

Сигнальная последовательность транслокации в ЭР может происходить от белка, ассоциированного с эндосомами/лизосомами.

Сигнальная последовательность транслокации в ЭР, используемая в раскрываемом способе, может представлять собой последовательность, полученную путем сортировки из белка, локализованного в эндосомах/лизосомах. Используемые здесь белки, локализованные в эндосомах/лизосомах, представляют собой белки, которые локализуются в мембране или в просвете эндосом и/или лизосом клетки.

Примерами белков, локализованных в эндосомах или в лизосомах, являются гликозидазы, такие как альфа-галактозидаза A/GLA, эндо-бета-N-ацетилглюкозаминидаза H/Endo H, альфа-N-ацетилгалактозаминидаза/NAGA, галактозилцерамидаза/GALC, альфа-N-ацетилглюкозаминидаза/NAGLU, глюкозилцерамидаза/GBA, альфа-галактозидаза/a-Gal, гепараназа/HPSE, альфа-L-фукозидаза, гепариназа I, тканевая альфа-L-фукозидаза/FUCA1, гепариназа II, бета-галактозидаза-1/GLB1, гепариназа III, бета-глюкуронидаза/GUSB, гексозаминидаза A/HEXA, бета(1-3)-галактозидаза, гиалуронан-лиаза, бета(1-4)-галактозидаза, гиалуронидаза 1/HYAL1, белок 1, подобный хитиназе 3, гиалуронидаза 4/HYAL4, белок 2, подобный хитиназе 3, альфа-L-идуронидаза/IDUA, белок 3, подобный хитиназе 3/ECF-L, хитобиаза/CTBS, хитотриозидаза/CHIT1, лактазо-подобный белок/LCTL, хондроитин В-лиаза/хондроитиназа В, лизосомная альфа-глюкозидаза, хондроитиназа ABC, MBD4, хондроитиназа AC, NEU-1/сиалидаза-1, цитозольная бета-глюкозидаза/GBA3, O-GlcNAказа/OGA, эндо-бета-N-ацетилглюкозаминидаза F1/Endo F1, PNGase F, эндо-бета-N-ацетилглюкозаминидаза F3/Endo F3, SPAM1; лизосомные протеазы, такие как AMSH/STAMBP, катепсин H, катепсин 3, катепсин K, катепсин 6, катепсин L, катепсин 7/катепсин 1, катепсин O, катепсин A/лизосомная карбоксипептидаза A, катепсин S, катепсин B, катепсин V, катепсин C/DPPI, катепсин X/Z/P, катепсин D, галактозилцерамидаза/GALC, катепсин F, эгумаин/аспарагинил-эндопептидаза; сульфатазы, такие как арилсульфатаза A/ARSA, идуронат-2-сульфатаза/IDS, арилсульфатаза B/ARSB, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза/GALNSv, арилсульфатаза G/ARSG, сульфамидаза/SGSH, глюкозамин(N-ацетил)-6-сульфатаза/GNS, сульфатаза-2/SULF2; или другие лизосомальные белки, такие как BAD-LAMP/LAMPS; гиалуронидаза 1/HYAL1; CD63; LAMP1/CD107a; CD-M6PR; LAMP2/CD107b; тяжелая цепь клатрина 1/CHC17; Rab27a; тяжелая цепь клатрина 2/CHC22; UNC13D, CD68, CD1b или DC-LAMP.

Последовательность сигнала транслокации в ЭР происходит от белка, ассоциированного с эндосомами/лизосомами. Белком, ассоциированным с эндосомами/лизосомами, может быть LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68, CD1b, а предпочтительно LAMP1. Предпочтительной последовательностью сигнала транслокации в ЭР является человеческая последовательность. Последовательность сигнала транслокации в ЭР содержит по меньшей мере одну из последовательностей SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность сигнала транслокации в ЭР может состоять из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47. В конкретных вариантах осуществления изобретения, последовательность сигнала транслокации в ЭР содержит последовательность SEQ ID NO: 33 или ее фрагмент. В более конкретных вариантах осуществления изобретения, последовательность сигнала транслокации в ЭР состоит из нижеследующей последова-

тельности SEQ ID NO: 34.

Эндосомная/лизосомная нацеливающая последовательность может происходить от LAMP1 или DC-LAMP, а предпочтительно от DC-LAMP. Эндосомная/лизосомная нацеливающая последовательность обычно является частью трансмембранного и цитоплазматического домена. Таким образом, трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, может происходить от LAMP1 или DC-LAMP, а предпочтительно DC-LAMP. Предпочтительно трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, является человеческим доменом. Обычно эндосомная/лизосомная нацеливающая последовательность содержит мотив Y-XX, за которым следует гидрофобная аминокислота. Предпочтительно эндосомная/лизосомная нацеливающая сигнальная последовательность представляет собой YQRI. Трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, может включать последовательность SEQ ID NO: 54 или ее фрагмент. Так, например, трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, может включать последовательность SEQ ID NO: 35 или ее фрагмент.

Термин "гидрофобная аминокислота" хорошо известен специалистам в данной области. Примерами гидрофобных аминокислот являются Ala, Ile, Leu, Phe, Val, Pro, Gly, Met, Trp, Tyr, Pro, Cys.

Обычно антигенпрезентирующие клетки выбирают из дендритных клеток, активированных В-клеток, моноцитов, макрофагов, EBV-трансформированных лимфобластоидных клеточных линий, предпочтительно дендритных клеток, а более предпочтительно моноцитарных дендритных клеток.

Антигенпрезентирующие клетки могут содержать различные популяции антигенпрезентирующих клеток, где каждая популяция экспрессирует различные антигенные гибридные белки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенпрезентирующими клетками являются зрелые дендритные клетки, полученные способом, включающим следующие стадии:

- i) получения моноцитов;
- ii) инкубирования моноцитов стадии (i) с IL-4 и GM-CSF;
- iii) инкубирования моноцитов стадии (ii) с IL-4 и GM-CSF в комбинации с коктейлем для созревания.

Коктейль для созревания может содержать по меньшей мере один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из IL- β , TNF- α , IFN- γ , агониста TLR7/8, агониста PGE2 и TLR3 или их комбинации. Так, например, агонистом TLR7/8 может быть R848, и/или агонистом TLR3 может быть поли(I:C). Стадия инкубирования ii) может продолжаться по меньшей мере в течение 2 дней. Стадия инкубирования iii) может продолжаться по меньшей мере в течение 12 ч, а предпочтительно 24 ч.

Обычно клеточной популяцией, содержащей Т-лимфоциты, является популяция лимфоцитов периферической крови. Клеточная популяция, содержащая Т-лимфоциты, может представлять собой популяцию неразделенных лимфоцитов периферической крови. Клеточная популяция может быть обогащена Т-лимфоцитами, а предпочтительно CD8⁺- и/или CD4⁺-Т-лимфоцитами.

Другой аспект изобретения относится к экспрессионному вектору, включающему сигнальную последовательность транслокации в человеческий эндоплазматический ретикулум (ЭР) и человеческий трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность.

Вектор может содержать промотор для *in vitro* транскрипции мРНК. Последовательность сигнала транслокации в ЭР происходит от белка, ассоциированного с эндосомами/лизосомами, например от LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68, CD1b, а наиболее предпочтительно от LAMP1. Предпочтительно последовательностью сигнала транслокации в ЭР является человеческая последовательность. В конкретных вариантах осуществления изобретения последовательность сигнала транслокации в ЭР содержит последовательность SEQ ID NO: 33 или ее фрагмент. В более конкретных вариантах осуществления изобретения сигнал транслокации в ЭР состоит из нижеследующей последовательности SEQ ID NO: 34.

Эндосомная/лизосомная нацеливающая последовательность может происходить от LAMP1 или DC-LAMP, а предпочтительно от DC-LAMP. Эндосомная/лизосомная нацеливающая последовательность обычно является частью трансмембранного и цитоплазматического домена. Таким образом, трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, может происходить от LAMP1 или DC-LAMP, а предпочтительно DC-LAMP. Предпочтительно трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, является человеческим доменом. Обычно эндосомная/лизосомная нацеливающая последовательность содержит мотив Y-XX, за которым следует гидрофобная аминокислота (X означает любую природную аминокислоту). Предпочтительно эндосомный/лизосомный нацеливающий сигнал представляет собой YQRI. Трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, может включать последовательность SEQ ID NO: 54 или ее фрагмент. Так, например, трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, может включать последовательность SEQ ID NO: 35 или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессионный вектор также включает рестрикционные сайты, расположенные между последовательностью сигнала транслокации в ЭР и человеческим трансмембранным и цитоплазматическим доменом, содержащим эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность. В других вариантах осуществления изобретения вектор также включает по меньшей мере один антиген или его фрагмент, встроенные между последовательностью сигнала транслокации в человеческий эндоплазматический ретикулум (ЭР) и человеческим трансмембранным и цитоплазматическим доменом, содержащим эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность.

В конкретных вариантах осуществления изобретения вектор содержит последовательность, кодирующий по меньшей мере два антигена или их фрагмента. Вектор может содержать последовательность, кодирующую по меньшей мере три, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 антигенов или их фрагментов. Вектор может содержать последовательность, кодирующую менее 100, менее 50, менее 40, менее 30, менее 20, менее 10 антигенов или их фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полноразмерную аминокислотную последовательность антигена. Альтернативно вектор содержит фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность антигена. Как показано на фиг. 12, антигенпрезентирующие клетки, в которые был введен вектор, содержащий фрагменты двух различных антигенов, могут индуцировать активацию различных TCR, специфичных к этим двум антигенам.

Обычно антиген представляет собой опухолевый антиген или вирусный антиген. Опухолевый антиген может быть выбран из группы, состоящей из вирусного опухолевого антигена, опухолеспецифического антигена, антигена, ассоциированного с опухолью, и антигена, вызывающего специфические мутации у пациента и экспрессирующегося в опухолевых клетках пациента.

Вирусные опухолевые антигены, также называемые онкогенными вирусными антигенами, представляют собой антигены онкогенных вирусов, таких как онкогенные ДНК-вирусы, например вирусы гепатита В, герпесвирусы и папилломавирусы и онкогенные РНК-вирусы. Опухолеспецифические антигены вызывают опухолеассоциированные мутации, которые экспрессируются исключительно опухолевыми клетками. Группа опухолеассоциированных антигенов включает, например, тканеспецифические раковые антигены/антигены яичек или антигены дифференцировки тканей, такие как MART-1, тирозиназа или CD20. Предпочтительно опухолевым антигеном является опухолеассоциированный антиген, а более предпочтительно опухолеассоциированным антигеном является раковый антиген/антиген яичек (антиген С/Т). Антиген С/Т может быть выбран из группы, включающей члены семейства MAGE, например MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, включая, но не ограничиваясь ими, опухолевые антигены, содержащие одну точковую мутацию, NY-ESO1, опухолевый антиген/антиген яичек 1B, GAGE-1, SSX-4, XAGE-1, BAGE, GAGE, SCP-1, SSX-2, SSX-4, CTZ9, CT10, SAGE и CAGE. Предпочтительно антиген С/Т может быть выбран из группы, состоящей из GAGE-1, SSX-4 и XAGE-1. Предпочтительно антиген, вызывающий специфические мутации у пациента и экспрессирующийся в опухолевых клетках пациента, не экспрессируется в не-раковых клетках пациента.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к антигенпрезентирующей клетке, а в частности к дендритным клеткам, экспрессирующим по меньшей мере один гибридный белок, содержащий по меньшей мере один антиген или его фрагмент,

последовательность сигнала транслокации в эндоплазматический ретикулум (ЭР) перед N-концом антигена, и

трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность за C-концом антигена.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к применению описанного здесь экспрессионного вектора для *in vitro* продуцирования антигенспецифических Т-лимфоцитов.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к Т-лимфоцитам для их применения в способе профилактики или лечения рака, включающем введение млекопитающему Т-лимфоцитов, полученных описанными здесь способами.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу продуцирования антигенспецифических TCR, включающему стадии описанных выше способов, а также дополнительную стадию выделения TCR из активированных антигенспецифических лимфоцитов, полученных описанными здесь способами.

Выделение TCR и последующий анализ последовательности описаны, например, в публикации Steinle et al. (In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex. The Journal of Experimental Medicine, 181(2), 503-13; 1995). Анализ последовательностей может быть осуществлен, например, с помощью ПЦР или методами секвенирования нового поколения. Методы идентификации последовательности нуклеиновой кислоты хорошо известны специалистам в данной области.

TCR состоит из двух различных белковых цепей, а и b. Цепь TCR- α содержит переменные облас-

ти (V), области стыка (J) и константные области (C). Цепь TCR- α содержит переменные области (V), дивергентные области (D), области стыка (J) и константные области (C). Рearанжированные области V(D)J обеих цепей TCR- α и TCR- β содержат гиперпеременные области (CDR, комплементарные определяющие области), среди которых область CDR3 определяет специфическое распознавание эпитопов.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к TCR, специфичному к GAGE-1. В одном из вариантов осуществления изобретения TCR, специфичный к GAGE-1, специфически распознает по меньшей мере одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 49 или их фрагментов. Фрагмент может иметь длину по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15 или более аминокислот. TCR может специфически связываться по меньшей мере с одной из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 49 или их фрагментов.

TCR, специфичный к GAGE-1, может содержать цепь TCR- α , имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 7, и цепь TCR- β , имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 8.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к рецептору TCR, специфичному к GAGE-1 и включающему цепь TCR- α , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и цепь TCR- β , имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Кроме того, настоящее изобретение относится к рецептору TCR, специфичному к GAGE-1 и включающему цепь TCR- α и цепь TCR- β , где

цепь TCR- α содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 7, и CDR3, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3;

цепь TCR- β содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 8, и CDR3, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к рецептору TCR, специфичному к GAGE-1 и включающему цепь TCR- α и цепь TCR- β , где

цепь TCR- α содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 7, и CDR3, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3;

цепь TCR- β содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 8, и CDR3, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к рецептору TCR, специфичному к GAGE-1 и содержащему цепь TCR- α , кодируемую нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 5, и цепь TCR- β , кодируемую нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 6.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к рецептору TCR, специфичному к GAGE-1 и содержащему цепь TCR- α , кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5, и цепь TCR- β , кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 6.

Кроме того, настоящее изобретение относится к рецептору TCR, специфичному к GAGE-1 и включающему цепь TCR- α и цепь TCR- β , где

цепь TCR- α кодируется нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 5 и содержит область CDR3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1;

цепь TCR- β кодируется нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 80%

меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 29, и цепь TCR- β , кодируемую нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 30.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к рецептору TCR, специфичному к XAGE-1 и включающему цепь TCR- α , кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 29, и цепь TCR- β , кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 30.

Кроме того, настоящее изобретение относится к рецептору TCR, специфичному к XAGE-1 и включающему цепь TCR- α и цепь TCR- β , где

цепь TCR- α кодируется нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 29, и содержит область CDR3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25;

цепь TCR- β кодируется нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 30, и содержит область CDR3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к рецептору TCR, специфичному к XAGE-1 и включающему цепь TCR- α и цепь TCR- β , где

цепь TCR- α кодируется нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 29, и содержит область CDR3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25;

цепь TCR- β кодируется нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 30, и содержит область CDR3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим TCR, определенные выше.

В общую последовательность нуклеиновой кислоты могут быть внесены нужные изменения для оптимизации кодонов. Эти изменения могут приводить к консервативным заменам в экспрессированной аминокислотной последовательности. Такие изменения могут быть сделаны в гипервариабельных и негипервариабельных областях аминокислотной последовательности в цепи TCR, которые не влияют на его функцию. Обычно добавления и делеции не должны быть введены в область CDR3.

Термин "консервативные аминокислотные замены" известен специалистам в данной области и, предпочтительно, означает, что кодоны, кодирующие положительно заряженные остатки (H, K и R), заменены кодонами, кодирующими положительно заряженные остатки; кодоны, кодирующие отрицательно заряженные остатки (D и E) заменены кодонами, кодирующими отрицательно заряженные остатки; кодоны, кодирующие нейтральные полярные остатки (C, G, N, Q, S, T и Y), заменены кодонами, кодирующими нейтральные полярные остатки, и кодоны, кодирующие нейтральные неполярные остатки (A, F, I, L, M, P, V, и W), заменены кодонами, кодирующими нейтральные неполярные остатки. Эти замены могут происходить спонтанно, либо они могут быть введены посредством случайного мутагенеза или направленного мутагенеза. Эти замены могут быть сделаны без ухудшения основных характеристик этих полипептидов. Специалист в данной области может легко рутинным способом осуществлять скрининг вариантов аминокислот и/или нуклеиновых кислот, кодирующих эти варианты, для того чтобы с применением известных методов определить, могут ли эти замены значительно снижать или ухудшать лиганд-связывающую способность.

Эпитопные метки представляют собой короткие аминокислотные фрагменты, против которых может продуцироваться специфическое антитело, которое в некоторых вариантах осуществления изобретения позволяет специфически идентифицировать и выявить меченый белок, добавленный в живой организм или в культивируемые клетки. Детектирование меченой молекулы может быть осуществлено любыми различными методами. Примерами таких методов являются иммуногистохимический анализ, иммунопреципитация, проточная цитометрия, иммунофлюоресцентная микроскопия, ELISA, иммуноблоттинг ("вестерн-блоттинг") и аффинная хроматография. Эпитопную метку присоединяют к известному эпитопу (антигенсвязывающему сайту) на рассматриваемом белке для обеспечения связывания известного и часто высокоаффинного антитела и тем самым для специфической идентификации и выявления меченого белка, который был добавлен в живой организм или в культивируемые клетки.

В контексте настоящего изобретения, термин "функциональный" гибридный белок, содержащий цепь TCR- α и/или TCR- β , означает TCR или вариант TCR, например, модифицированный путем добав-

ления, делеции или замены аминокислот, которые сохраняют по меньшей мере основную биологическую активность. В случае α - и/или β -цепи TCR, этот термин означает, что обе цепи сохраняют свою способность образовывать Т-клеточный рецептор (либо с немодифицированной осью/или β -цепью, либо с другой α - и/или β -цепью гибридного белка согласно изобретению), который обладает биологической функцией, а в частности способностью связываться со специфическим комплексом "пептид-МНС" указанного TCR и/или передавать функциональный сигнал после специфического взаимодействия пептида с МНС.

В конкретных вариантах осуществления изобретения TCR может быть модифицирован так, чтобы он представлял собой гибридный белок α - и/или β -цепи функционального Т-клеточного рецептора (TCR), где указанная эпитопная метка имеет длину от 6 до 15 аминокислот, а предпочтительно от 9 до 11 аминокислот. В другом варианте осуществления изобретения TCR может быть модифицирован так, чтобы он представлял собой гибридный белок α - и/или β -цепи функционального Т-клеточного рецептора (TCR), где указанный гибридный белок α - и/или β -цепи функционального Т-клеточного рецептора (TCR) содержит две или более эпитопных метки, расположенные либо на расстоянии друг от друга, либо непосредственно в тандеме. Варианты гибридного белка могут содержать 2, 3, 4, 5 или даже более эпитопных меток, при условии что гибридный белок будет сохранять свою биологическую активность/функции ("функциональность").

Предпочтительным является гибридный белок α - и/или β -цепи функционального Т-клеточного рецептора (TCR) согласно изобретению, где указанная эпитопная метка выбрана из меток, которыми являются, но не ограничиваются ими, метки CD20 или HER2/neu или другие стандартные метки, такие как тус-метка, FLAG-метка, T7-метка, HA (гемагглютинин)-метка, His-метка, S- метка, GST-метка или GFP-метка. Метки тус, T7, GST, GFP представляют собой эпитопы, происходящие от существующих молекул. В противоположность этому FLAG представляет собой синтетическую эпитопную метку, сконструированную так, чтобы она обладала высокой антигенностью (см., например, патенты США № 4703004 и 4851341). тус-Метка может оказаться предпочтительной, поскольку для ее детектирования существуют высококачественные реагенты. Очевидно, что эпитопные метки могут обладать одной или более дополнительными функциями, помимо распознавания антителом. Последовательности этих меток описаны в литературе и хорошо известны специалистам в данной области.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится Т-клеткам, экспрессирующим TCR, определенный выше.

Кроме того, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих TCR, определенный выше. Предпочтительным вектором является плазида, челночный вектор, фагида, космида, экспрессионный вектор, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор или частица и/или вектор, используемые в генной терапии.

"Вектор" представляет собой любую молекулу или композицию, которая обладает способностью встраивать последовательность нуклеиновой кислоты в подходящую клетку-хозяина, где осуществляется синтез кодируемого полипептида. Обычно и предпочтительно вектор представляет собой нуклеиновую кислоту, которая была сконструирована методами рекомбинантных ДНК, известными специалистам в данной области, для включения нужной последовательности нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновой кислоты согласно изобретению). Вектор может содержать ДНК или РНК и/или липосомы. Вектор может представлять собой плазмиду, челночный вектор, фагмиду, космиду, экспрессионный вектор, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор или частицу и/или вектор, используемые в генной терапии. Вектор может включать последовательности нуклеиновой кислоты, позволяющие ему реплицироваться в клетке-хозяине, такие как ориджин репликации. Вектор может также включать один или более селективных маркерных генов и другие генетические элементы, известные специалистам. Вектор, предпочтительно, представляет собой экспрессионный вектор, который включает нуклеиновую кислоту согласно изобретению, функционально присоединенную к последовательностям, обеспечивающим экспрессию указанной нуклеиновой кислоты.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к клетке, в которую была введена вышеуказанная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TCR, как описано выше. В Т-клетку может быть введен вышеописанный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный выше TCR, или *in vitro* транскрибированную РНК, кодирующую указанный TCR. Клеткой может быть лимфоцит периферической крови, такой как Т-клетка. Метод клонирования и экзогенной экспрессии TCR описан, например, Engels и др. (Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity, Cancer Cell, 23(4), 516-26, 2013).

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к TCR или к клеткам, экспрессирующим TCR, определенный выше, для их применения в качестве лекарственного средства. Таким образом, в настоящей заявке также рассматривается фармацевтическая композиция, содержащая TCR или клетки, экспрессирующие TCR, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель. Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к TCR или к клеткам, экспрессирующим TCR, как определено выше, для их применения в лечении заболевания, вызываемого злокачественными клетками, экспрессирующими GAGE-1, SSX-4, XAGE-1 или их смесь. Таким образом, настоящее изобретение также отно-

сится к определенным выше TCR, применяемым для лечения рака. В соответствии с этим настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, нуждающегося в адоптивной клеточной терапии, где указанный способ включает введение указанному пациенту фармацевтической композиции, определенной в настоящей заявке. Пациент может страдать заболеваниями, вызываемыми злокачественными клетками, экспрессирующими GAGE-1, SSX-4, XAGE-1 или их смесь.

Эти активные компоненты согласно изобретению предпочтительно используются в такой фармацевтической композиции в дозах, смешанных с приемлемым носителем или материалом-носителем и приемлемых для лечения заболевания или по меньшей мере ослабления его симптомов. Такая композиция может включать (помимо активного компонента и носителя) наполнители, соли, буфер, стабилизаторы, солюбилизаторы и другие материалы, известные специалистам.

Термин "фармацевтически приемлемый" относится к нетоксичному материалу, который не оказывает негативного воздействия на эффективность биологической активности активного компонента. Выбор носителя зависит от целей его применения.

Фармацевтическая композиция может содержать дополнительные компоненты, которые усиливают действие активного компонента или усиливают эффект лечения. Такие дополнительные компоненты и/или факторы могут быть частью фармацевтической композиции и вводятся для достижения синергического эффекта или сведения к минимуму нежелательных или побочных эффектов.

Методы приготовления или получения и применения/введения активных компонентов лекарственного средства согласно изобретению опубликованы в руководстве "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, в последнем издании. Подходящим введением является парентеральное введение, например внутримышечные подкожные, интрамедулярные инъекции, а также интратекальные, прямые внутрижелудочковые, внутривенные, интранодальные, внутрибрюшинные или внутриопухолевые инъекции. Для лечения пациента предпочтительной является внутривенная инъекция.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения фармацевтическую композицию вводят путем вливания или инъекции.

Инъецируемая композиция представляет собой фармацевтически приемлемую жидкую композицию, содержащую по меньшей мере один активный ингредиент, например размноженную популяцию Т-клеток (например аутологичных или аллогенных для пациента, подвергаемого лечению), экспрессирующих TCR. Активный ингредиент обычно растворяют или суспендируют в физиологически приемлемом носителе, и композиция может дополнительно содержать небольшое количество одного или более нетоксичных вспомогательных веществ, таких как эмульгаторы, консерванты и рН-забуферивающие агенты и т.п. Такие композиции для инъекций, подходящие для их использования вместе с гибридными белками согласно изобретению, являются стандартными, и такие композиции хорошо известны специалистам в данной области.

Примеры

Подтверждение эффективной перекрестной презентации МНС класса II вектором CrossTAg.

Для перекрестной презентации МНС класса II и РНК-кодируемых белков выбранные последовательности антигенной ДНК подвергали взаимодействию с сигналом, нацеленным на МНС класса II (CrossTAg). Для этой цели сигнал транслокации в ЭР человеческого мембранного белка, ассоциированного с лизосомой 1 (LAMP-1), был присоединен у 5'-конца к трансмембранным и цитоплазматическим доменам человеческого DC-LAMP. Эти два сигнальных компонента были разделены уникальными рестрикционными сайтами, что позволяло осуществлять интеграцию выбранных антигенных последовательностей в одной рамке считывания с CrossTAg. Сигнальный пептид LAMP-1 использовали для облегчения ко-трансляционной транслокации только что синтезированных белков в ЭР. После транслокации цитоплазматический сигнал, нацеленный на DC-LAMP (мотив YXXΦ; X означает любую природную аминокислоту; Φ означает любую гидрофобную аминокислоту; SEQ ID NO: 38), должен сообщать эффективную челночную доставку белка в эндосомный/лизосомный компартмент.

Авторами изобретения была проведена интеграция неполной кодирующей последовательности ядерного антигена вируса Эпштейна-Барра (EBNA)-3C, кодирующей 1 т.п.н.-фрагмент, содержащий известный эпитоп для EBNA-3C-специфического CD4⁺-Т-клеточного клона 3H10 (описанного Xiaojun Yu, et al.: Antigen-armed antibodies targeting B lymphoma cells effectively activate antigen-specific CD4⁺ T-cells, Blood, 2015 Mar 5, 125(10):1601-10.; <http://www.iedb.org/assayId/2445148>), который является HLA-DRB1*11:01-рестриктированным. Дополнительные конструкции, содержащие только один сигнал или вообще не содержащие сигналов, использовали для подтверждения необходимости перекрестной презентации каждой последовательности нужного МНС класса II (фиг. 1a). Затем РНК транскрибировали *in vitro* из линейризованных плазмид и переносили в другие АПК, экспрессирующие нужный рестрикционный элемент HLA-DRB1*11:01. Определение уровня продуцирования IFN-γ после специфического распознавания антигена клоном 3H10 позволило эффективно детектировать перекрестную презентацию МНС класса II и эндогенно транслированного и процессированного белка в экспериментах по совместному культивированию с DC, а также с мини-EBV-трансформированными лимфобластоидными клеточными линиями (мЛКЛ), трансфицированными EBNA-3C-CrossTAg-РНК (фиг. 1b). Детектирование активации Т-клеток достигалось только с использованием *ivt*-РНК, содержащей сигнал транслокации в ЭР

LAMP-1. По сравнению с явно выраженной презентацией МНС класса II, достигаемой с использованием EBNA-3C-CrossTAg-РНК, сигнальный пептид LAMP-1, взятый отдельно, обладал незначительной перекрестной презентацией. Эти данные были подтверждены авторами с использованием одного дополнительного CD4⁺-Т-клеточного клона, специфичного к HLA-DRB1*15:01-рестриктированному эпитопу EBV-антигена BNRF1 (данные не приводятся).

Затем авторами были использованы Т-клетки 3Н10, для того чтобы подтвердить, может ли сигнал CrossTAg сообщать презентацию МНС класса II посредством 1) секреции и повторного поглощения белка или 2) путей презентации внутри клеток. Для этого авторами были трансфицированы HLA-DRB1*11:01-позитивные или HLA-DRB1*11:01-негативные DC конструкцией EBNA-3C-CrossTAg-РНК.

Трансфицированные и нетрансфицированные DC совместно инкубировали во всех возможных комбинациях (HLA-DRB1*11:01-позитивных/негативных), а затем культивировали вместе с клетками 3Н10. Распознавание АПК детектировалось только в том случае, когда HLA-DRB1*11:01-позитивные DC были трансфицированы антиген-CrossTAg-РНК. Распознавание нетрансфицированных HLA-DRB1*11:01-позитивных DC, которые могли поглощать и процессировать антиген, секретлируемый HLA-DRB1*11:01-негативными DC, не детектировалось (фиг. 8).

Экспрессия CD40L, индуцированная антигеном-CrossTAg.

Для разработки быстрого метода селективного обогащения антигенспецифических CD4⁺-Т-клеток авторами была оценена способность антиген-CrossTAg-РНК-трансфицированных DC индуцировать экспрессию CD40L в отвечающих CD4⁺-Т-клетках. Для этого Т-клетки 3Н10 окрашивали флуоресцентным детектирующим красителем и смешивали с аутологичными ЛПК до конечных концентраций 10, 5, 1 или 0,1% от всех клеток (фиг. 1с). Эти различные фракции культивировали вместе с EBNA-3C-CrossTAg-ivt-РНК-трансфицированными аутологичными DC и окрашивали на экспрессию CD40L. После 6-часового совместного культивирования авторами была детектирована явная экспрессия CD40L на EBNA-3C-специфических клетках 3Н10, но при этом наблюдалась лишь очень незначительная экспрессия CD40L на аутологичных ЛПК. Даже при наименьшей концентрации клеток 3Н10 (0,1%), последующий сортинг CD40L-позитивных CD4⁺-Т-клеток выявил популяцию 66% клеток 3Н10.

Альтернативные последовательности сигнала транслокации в ЭР.

Оценка уровня продуцирования IFN- γ после специфического распознавания антигена клоном 3Н10 позволяла эффективно детектировать перекрестную презентацию МНС класса II и эндогенно транслированного и процессированного белка в экспериментах по совместному культивированию с АПК, трансфицированными различными EBNA-3C, помеченными CrossTAg-РНК, и другими молекулами, служащими в качестве альтернативы CrossTAg-РНК (фиг. 11).

Эффективная презентация МНС класса II и МНС класса I.

Авторами было показано, что использование CrossTAg-сигнала облегчает не только презентацию МНС класса II, но также и презентацию МНС класса I (фиг. 12).

Эффективная презентация нескольких антигенов, кодируемых одной и той же молекулой ivt-мРНК.

Авторами был также разработан эффективный метод презентации нескольких эпитопов, происходящих от различных антигенов, одной и той же ivt-мРНК. Как показано на фиг. 12, антигенпрезентирующие клетки экспрессируют конструкцию, включающую два эпитопа, происходящих от различных антигенов, и эти клетки активируют клон 3Н10, специфичный к EBNA-3C, а также клон IVSB, специфичный к тирозиназе. Поэтому, ivt-конструкция, имеющая два различных эпитопа, облегчает презентацию обоих эпитопов.

Активация ЛПК клетками DC, подвергнутыми импульсной РНК-обработке.

В соответствии с крупномасштабным подходом, авторами была исследована возможность использования множества антигенов-кандидатов одновременно для примирования CD4⁺-Т-клеток. Таким образом, CD4⁺-Т-клетки, присутствующие в неразделенных ЛПК, активировали с использованием DC, трансфицированных молекулами ivt-РНК, кодирующими четыре различных антигена C/T (GAGE-1, MAGE-A4, SSX-4 и XAGE-1), которые были присоединены к CrossTAg-сигналу. DC трансфицировали каждой отдельно взятой конструкцией ivt-РНК путем электропорации как описано в литературе (Javovic, M. et al. (2008), Inhibitory effect of РНК pool complexity on stimulatory capacity of РНК-pulsed dendritic cells, *J. Immunother.*, 31(1):52-62). Авторами был оценен статус созревания трансфицированных DC по уровням экспрессии костимулирующих молекул с помощью проточной цитометрии. Авторами было обнаружено, что DC имеет зрелый фенотип с высоким уровнем экспрессии костимулирующих молекул (CD80, CD83, CD86) и HLA класса II (фиг. 9а).

Для оценки эффективности трансфекции, антигенную кДНК, происходящую от мРНК, экстрагированной из трансфицированных DC, анализировали с помощью количественной ОТ-ПЦР. Полученные данные указывали на увеличение уровня числа копий мРНК антигена C/T с $1,5 \times 10^5$ до 2×10^7 после электропорации (фиг. 9б). Кроме того, приблизительно 68% DC экспрессировали белок, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра (eGFP), на уровне, превышающем уровень, достигаемый с использованием ivt-РНК eGFP, как было определено с помощью проточной цитометрии через 12 ч после трансфекции (данные не приводятся).

После трансфекции антигеном-CrossTAg-РНК четыре отдельных популяции DC объединяли и использовали одновременно для примирования неразделенных аутологических ЛПК, взятых у здорового донора. Последующая процедура размножения включала два раунда стимуляции АПК. Замороженные аликвоты первичных популяций DC оттаивали и использовали для повторной стимуляции культур.

Выделение активированных CD4⁺-Т-клеток.

Через каждый 14-дневный интервал совместного культивирования DC, примированные аутологичные ЛПК обнаруживали общее 3-4-кратное увеличение числа клеток. Изменения отношений CD4:CD8 оценивали в различные периоды времени для определения степени размножения активированных CD4⁺-Т-клеток. Кроме того, образцы ЛПК инкубировали вместе с нагруженными антигеном DC в присутствии CD40-блокирующего антитела, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием mAb, специфичных к CD4, CD137 и CD40L (фиг. 2а). В течение всего периода мониторинга, отношение CD4:CD8 снижалось с 1,7 на день 0 до 0,7 на день 27, что указывало на повышение уровня пролиферации CD8⁺-Т-клеток (данные не приводятся). Однако в популяции CD4⁺-Т-клеток процент CD40L-позитивных Т-клеток увеличивался с 4,6% на день 13 до свыше 30% на день 27. В противоположность этому число предполагаемых регуляторных Т-клеток (Tregs), которые, как было описано, представляют собой CD4⁺-Т-клетки, позитивные по одному CD137 (Schoenbrunn et al., A converse 4-1BB and CD40 ligand expression pattern delineates activated regulatory T cells (Treg) and conventional T cells enabling direct isolation of alloantigen-reactive natural Foxp3⁺ Treg, *J. Immunol.*, 2012, 189(12):5985-94), снижалось приблизительно на 36%.

После третьего цикла стимуляции наблюдалось обогащение CD40L-позитивных CD4⁺-Т-клеток из культуры ЛПК, а затем эти клетки непосредственно клонировали в 96-луночных планшетах и анализировали с помощью FACS (фиг. 10). Клонированные CD4⁺-Т-клетки размножали. Избыток клеток после проведения процедуры клонирования был определен как избыток всех CD40L-позитивных (CD40Lpos) и CD40L-негативных (CD40Lneg) CD4⁺-Т-клеточных линий. Этот анализ указывал на успешное обогащение С/Т-антигенспецифичных CD4⁺-Т-лимфоцитов, поскольку CD4⁺-Т-клетки, отобранные как CD40Lpos, пролиферировали на уровне, который приблизительно в 4 раза превышал уровень CD40Lneg-Т-клеток в течение 14 дней после повторной стимуляции, специфичной к антигену С/Т, и высвобождали значительно большее количество IFN- γ после культивирования вместе с РНК-трансфицированными АПК (фиг. 2b, 2c).

Скрининг на CD4⁺-Т-клеточные клоны, реагирующие с антигеном С/Т.

Авторами были протестированы Т-клеточные клоны, размноженные в 96-луночных планшетах, на реактивность с антигеном в анализах на высвобождение IFN- γ через 12 дней после FACS-клонирования (фиг. 3а). Совместное культивирование, проводимое с использованием DC, нагруженных смесью всех четырех антигенов-CrossTAg-РНК, показало, что наряду с неактивными и неспецифическими Т-клеточными клонами, присутствуют также Т-клеточные клоны, реагирующие со множеством антигенов. Реагирующие с антигеном Т-клеточные клоны не обнаруживали за некоторым исключением фоновой активации при их совместном культивировании с ложнотрансфицированными DC.

Для подтверждения этих наблюдений авторами были повторно протестированы отдельные клоны через один день с использованием ivt-РНК-трансфицированных мЛКЛ, которые служили в качестве альтернативного источника АПК. Анализы на высвобождение IFN γ и GM-CSF подтвердили данные, полученные ранее для DC (фиг. 3b). Кроме того, отобранные Т-клеточные клоны окрашивали на экспрессию поверхностных маркеров CD4 и CD8, и было обнаружено, что все эти клоны экспрессировали рецептор CD4 (фиг. 3c).

Молекулярная и функциональная характеристика антигенспецифических CD4⁺-Т-клеточных клонов.

Для анализа специфичности к антигену отдельных реагирующих с антигеном CD4⁺-Т-клеточных клонов, авторами было проведено культивирование отдельных клонов вместе с отдельными популяциями АПК, трансфицированных отдельными конструкциями антиген-CrossTAg-РНК. Ответы оценивали по секреции IFN- γ с помощью стандартного ELISA (фиг. 4). Авторами были детектированы антигенспецифические CD4⁺-Т-клеточные клоны, распознающие каждый из четырех антигенов С/Т, используемых для примирования. Т-клеточные клоны не обнаруживали фоновой активации ложнотрансфицированными АПК и какой-либо детектируемой перекрестной реактивности с другими антигенами, с которыми они контактировали в процессе примирования.

С помощью анализа на репертуар TCR было идентифицировано 4 уникальных последовательности Т-клеточных рецепторов, происходящих от множества выделенных клонов. Анализы на МНС-рестрикцию показали, что различные Т-клетки распознавали эпитопы, презентированные различными аллотипами МНС класса II (данные не приводятся).

Авторами была продемонстрирована важная роль антигена, присоединенного к CrossTAg-сигналу, подтверждаемая тем фактом, что DC, снабженные ivt-РНК без этого сигнала, не могли индуцировать секрецию IFN- γ выделенными CD4⁺-Т-клеточными клонами (фиг. 5а). Индуцированная активацией секреция IFN- γ наблюдалась только в том случае, когда CD4⁺-Т-клеточные клоны были культивированы вместе с АПК, трансфицированными конструкцией антиген-CrossTAg-РНК. Исключение составлял тот

случай, когда Т-клеточный клон экспрессировал GAGE-1-TCR-2, который также распознавал АПК, трансфицированные РНК без соответствующих сигналов сортировки, хотя и на значительно меньших уровнях.

Для подтверждения специфичности выделенных CD4⁺-Т-клеточных клонов согласно изобретению к антигену авторами была проведена нагрузка АПК рекомбинантными белками. CD4⁺-Т-клеточные клоны обнаруживали позитивную секрецию IFN- γ нагруженными белком АПК, и такая секреция была сравнима с активацией, наблюдаемой при культивировании вместе с антиген-CrossTAg-РНК-трансфицированными АПК (фиг. 5b).

Прямая идентификация эпитопа МНС класса II.

Для этих 4 клонов был применен метод прямого картирования эпитопов МНС класса II (DEPI) (Milosevic, S. et al. (2006), Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-Barr virus) для определения эпитопов, которые распознавались в ассоциации с молекулами МНС класса II. Авторами было подтверждено распознавание выделенных антигенных фрагментов с короткими перекрывающимися конструкциями CrossTAg-РНК, и эти фрагменты были использованы для дополнительного подтверждения минимальных последовательностей эпитопа (фиг. 6a, 6b). В результате было обнаружено, что GAGE-1-TCR-1 распознает эпитоп GAGE-1₇₆₋₉₈, презентируемый HLA-DRB5*01:01. Интересно отметить, что два XAGE-1-специфичных CD4⁺-Т-клеточных клонов распознают один и тот же эпитоп XAGE-1₃₇₋₄₉, презентируемый двумя различными аллотипами МНС класса II (HLA-DRB1*13:02 и HLA-DRB5*01:01).

Трансгенная экспрессия С/Т-антигенспецифических ТCR.

После проведения анализа на репертуар ТCR авторами были повторно сконструированы выделенные последовательности ТCR с использованием экспрессионных векторов, содержащих ТCR. CD4⁺-Т-клетки клона 3Н10 (EBNA-3С-специфического и HLA-DRB1*11:01-рестриктированного) трансфицировали соответствующими ТCR- α и β -цепями CD4⁺-Т-клеточных клонов GAGE-1-TCR-2, XAGE-1-TCR-1 или ТCR-2. Клетки 3Н10, сконструированные на основе ТCR, культивировали вместе с АПК, нагруженными антигеном С/Т (фиг. 7). Измерение уровня секреции IFN- γ показало, что специфичность всех CD4⁺-Т-клеточных клонов была успешно сообщена клеткам 3Н10 без какого-либо негативного влияния на эндогенный EBV-специфический ТCR. Таким образом, после трансфекции ТCR, клетки 3Н10 распознавали EBNA-3С-CrossTAg-ivt-РНК-трансфицированные АПК, а также АПК, трансфицированные соответствующими конструкциями С/Т-антиген-CrossTAg-ivt-РНК.

Методы.

Генетические конструкции.

Вектор pGEM-eGFP-A120 был использован в качестве исходной конструкции для получения CrossTAg-вектора (S. Milosevic). Этот polyA120-вариант исходного вектора pGEM сообщает транскрибируемой РНК более высокую стабильность и повышает уровень экспрессии белка. Эта плаزمид также содержит уникальный AgeI-сайт у 5'-конца кДНК eGFP, а также уникальный EcoRI-сайт у 3'-конца. За poly-A-хвостом расположен SpeI-сайт, который обеспечивает линейаризацию плазмиды при продуцировании ivt-РНК.

Плазмиду pGEM-CrossTAg-A120 клонировали путем замены eGFP на кДНК, кодирующую сигнал, нацеленный на CrossTAg.

Последовательность CrossTAg состоит из сигнала транслокации в ЭР человеческого мембранного белка-1, ассоциированного с лизосомой (LAMP-1, регистрационный номер: NP_005552, а.к. 1-28) и присоединенного 5'-концом к трансмембранному и цитоплазматическому домену DC-LAMP (регистрационный номер: NP_055213, а.к. 376-416). Для инсерции антиген-кодирующей кДНК отдельные последовательности CrossTAg разделяли 18-п.о.-спейсером, содержащим рестрикционные сайты NheI, KpnI и PstI без нарушения открытой рамки считывания LAMP1 (OPC). Оптимизированную по кодомам последовательность CrossTAg конструировали фактически с использованием компьютерной программы для клонирования и синтезировали с помощью GeneArt (Regensburg). Затем полноразмерную последовательность CrossTAg вырезали из плазмидной ДНК с использованием рестрикционных сайтов AgeI (5'-конец) и EcoRI (3'-конец) и лигировали в MCS вектора pGEM-A120, гидролизованного обоими ферментами. Для клонирования различных конструкций антиген С/Т-CrossTAg (pGEM-GAGE-1-CrossTAg-A120, pGEM-MAGE-A4-CrossTAg-A120, pGEM-NY-ESO-1-CrossTAg-A120, pGEM-SSX-4-CrossTAg-A120, pGEM-XAGE-1-CrossTAg-A120), антигенную кДНК амплифицировали из плазмид с помощью ПЦР (регистрационные номера: GAGE-1, U19142; MAGE-A4, NM_001011550; NY-ESO1, AJ003149; SSX-4, U90841; XAGE-1, AF251237) с использованием прямых и обратных геноспецифических праймеров и лигировали посредством рестрикционных сайтов NheI и PstI/NotI. Праймеры, используемые для ПЦР-реакций, поставлялись по запросу. Все антигенные последовательности встраивали в расщепленный CrossTAg-сигнал pGEM-CrossTAg-A120 без нарушения исходной OPC. Для подтверждения CD4⁺-Т-клеточных эпитопов были синтезированы комплементарные олигонуклеотиды (Metabion), которые затем подвергали отжигу. Липкие концы, образовавшиеся после отжига, использовали для прямого лигирования этих коротких антигенных последовательностей в CrossTAg-вектор.

Продукция ивt-РНК.

После SpeI-линеаризации рGEM-плазмиды были использованы в качестве матриц для продуцирования отдельных молекул *in vitro* транскрибируемой (ивt)-РНК с использованием набора mMACHINE mMACHINE T7 (Ambion) в соответствии с инструкциями производителей. Для оценки контроля качества определяли длину продукта ивt-РНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Концентрацию и чистоту определяли на спектрофотометре Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Клеточная культура.

Монокитарные 3-дневные зрелые DC (mDC) получали и трансфицировали как описано Bürdek и др. (Journal of Translational Medicine, 2010, 8:90). РНК-трансфекция mDC и лимфобластоидных миниклеточных линий, трансформированных вирусом Эпштейна-Барра (EBV) (мЛКЛ), достигалась посредством электропорации, как описано Burdek и др. (Three-day dendritic cells for vaccine development: Antigen uptake, processing and presentation, Journal of Translational Medicine, 2010, 8:90).

мЛКЛ культивировали в виде суспензионных культур в среде для ЛКЛ, описанной в литературе (Milosevic, S. et al. (2006), Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-Barr virus).

Загрузка белка в мЛКЛ достигалась путем культивирования 2×10^6 клеток в 24-луночных планшетах в 2 мл среды для ЛКЛ в течение 16 ч в присутствии 25 мкг рекомбинантного человеческого белка GAGE-1, MAGE-A4, SSX-4 или XAGE-1 (обогащенного посредством бх-сHis-метки после экспрессии в клетках HEK-293T). По окончании инкубирования клетки два раза промывали средой RPMI 1640 и культивировали вместе со специфическими CD4⁺-Т-клеточными клонами.

Количественная ОТ-ПЦР.

Клеточную РНК трансфицированных и нетрансфицированных DC выделяли и синтезировали соответствующую кДНК с использованием олиго-dT-праймеров с помощью набора для синтеза первой цепи кДНК для ОТ-ПЦР (AMV) (Roche). Различия в количествах антигенных матриц определяли с помощью количественной ОТ-ПЦР (кол.ОТ-ПЦР) с использованием набора LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) в соответствии с инструкциями производителей. Все геноспецифические праймеры (α -энолаза, GAGE-1, MAGE-A4, SSX-4 и XAGE-1), используемые для ОТ-ПЦР, поставлялись по запросу. Результаты измерений нормализовали по данным для α -энолазы, кодируемой геном "домашнего хозяйства", и анализировали $\Delta\Delta C_T$ -методом.

Фенотипирование поверхности Т-клеток и DC.

Поверхностные маркеры, экспрессируемые Т-клетками и DC, детектировали с использованием следующих антител: ФЭ-конъюгированного CCR7-специфического антитела (3D12) (eBioscience), Hz450-конъюгированного CD4-специфического антитела (RPA-T4), Hz500-конъюгированного CD8-специфического антитела (RPA-T8), ФИТЦ-конъюгированного CD14-специфического антитела (M5E2), ФЭ-конъюгированного CD40-специфического антитела (5C3), ФЭ-конъюгированного CD40L-специфического антитела (TRAP1), ФЭ-конъюгированного CD80-специфического антитела (L307.4), ФИТЦ-конъюгированного CD83-специфического антитела (HB15e), ФИТЦ-конъюгированного CD86-специфического антитела (2331), АПК-конъюгированного CD137-специфического антитела (4B4-1), ФИТЦ-конъюгированного DC-SIGN-специфического антитела (DCN46), ФЭ-конъюгированного HLA-DR-специфического антитела (G46-6) (все от BD Biosciences). После промывки клетки окрашивали в течение 30 мин при 4°C и добавляли иодид пропидия (2 мкг/мл) для удаления погибших клеток. Экспрессию всех поверхностных маркеров анализировали с помощью проточной цитометрии (LSRII, BD). Анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы FlowJo 8 (TreeStar). Анализ на экспрессию CD40L на поверхности Т-клеток осуществляли, как описано в литературе (Frentsch, M. et al. (2005), Direct access to CD4⁺ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression, Nat. Med., 11(10):1118-1124) с использованием 2 мкг/мл анти-CD40 антитела (клон G28.5, предоставленный М. Frentsch, Берлинским-Бранденбургским Центром восстановительной терапии) и результаты оценивали через 6 ч после начала совместного культивирования Т-клеток:АПК. De novo приращивание ЛПК РНК-трансфицированными DC 3-дневные mDC здорового донора трансфицировали в отдельных популяциях 2 отдельными молекулами CrossTAg-РНК, кодирующими антигены С/Т GAGE-1, MAGE-A4, SSX-4 и XAGE-1. После электропорации трансфицированные mDC собирали и смешивали. mDC этой смеси культивировали в отношении 1:2 с лимфоцитами периферической крови (ЛПК), которые не прилипали во время культивирования МКПК на пластиковом планшете в процессе получения mDC. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере повышенной влажности. Интерлейкин-2 (IL-2, 20 ед./мл; Chiron Behring) и 5 нг IL-7/мл (Promokine) добавляли через 1 день, а затем через 2 дня. Смешанные mDC, которые не были использованы для совместного культивирования с ЛПК, подвергали криоконсервации и оттаивали для повторной стимуляции de novo индуцированной культуры ЛПК.

Выделение и размножение антигенспецифических CD4⁺-Т-клеток.

Примированные ЛПК совместно культивировали с CrossTAg-РНК-трансфицированными mDC (смесью из 4 антигенов) в отношении 2:1 в течение 6 ч в присутствии анти-CD40 антитела, как описано в литературе (Frentsch, M. (2005), Direct access to CD4⁺-T cells specific for defined antigens according to

CD154 expression, *Nat. Med.*, 11(10):1118-1124). После стимуляции клетки окрашивали анти-CD4- и анти-CD40L-специфическими антителами (SK3 и TRAP1; BD Biosciences). DAPI добавляли для удаления погибших клеток. С использованием FACS Aria III (BD Biosciences) живые CD40L-позитивные CD4⁺-Т-клетки распределяли в виде отдельных клеток по лункам круглодонных 96-луночных планшетов. CD4⁺-Т-клеточные клоны в 96-луночных планшетах размножали с использованием антиген-CrossTAg-ivt-РНК-трансфицированных мЛКЛ, фидерных клеток и IL-2.

Анализ на высвобождение цитокинов.

Для определения секреции цитокинов, индуцированной активацией, 5×10^4 Т-клеток культивировали вместе с 1×10^5 ivt-РНК-нагруженными АПК (DC/мЛКЛ) в 200 мкл среды для культивирования Т-клеток в круглодонных 96-луночных планшетах при 37°C в атмосфере повышенной влажности. Т-клетки с ложнотрансфицированными АПК или без клеток-стимуляторов использовали в качестве негативного контроля. После 16-часового совместного культивирования супернатанты собирали и оценивали с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) с использованием набора человеческих IFN- γ или GM-CSF OptEIA (оба от BD Biosciences).

Перенос генов TCR на основе Ivt-РНК.

Рearанжировки и последовательности TCR- α - и TCR- β -цепей определяли с помощью ПЦР с использованием панели TCR-V α - и TCR-V β -специфических праймеров как описано в литературе (Steinle, A. et al. (1995), *In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex*, *J. Exp. Med.*, 181(2):503-513). После замены константных областей обеих TCR-цепей их мышинными аналогами, оптимизированные по кодонам последовательности TCR- α - и TCR- β -цепей синтезировали и клонировали в экспрессионный вектор для продуцирования РНК. Для подтверждения специфичности этих последовательностей TCR, клетки Т-клеточного клона 3H10 (HLA-DRB1*11:01-рестриктированного, специфического к EBNA-3C EBV) ко-трансфицировали TCR- α - и TCR- β -ivt-РНК и использовали в анализах на секрецию цитокинов.

Настоящее изобретение также включает следующие варианты его осуществления.

Вариант 1.

Способ продуцирования человеческих антигенспецифических Т-лимфоцитов, включающий следующие стадии:

А) экспрессии по меньшей мере одного гибридного белка, содержащего по меньшей мере один антиген или его фрагмент, последовательность сигнала транслокации в эндоплазматический ретикулум (ЭР) перед N-концом антигена, и трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность за С-концом антигена, в антигенпрезентирующих клетках; и

В) обработки клеточной популяции, содержащей Т-лимфоциты, антигенпрезентирующими клетками стадии (А) *in vitro* для активации антигенспецифических Т-лимфоцитов, специфичных к антигену, экспрессируемому антигенпрезентирующей клеткой.

Вариант 2.

Способ в соответствии с вариантом 1, где обработкой в стадии (В) является культивирование антигенпрезентирующих клеток вместе с клеточной популяцией, содержащей Т-лимфоциты.

Вариант 3.

Способ в соответствии с вариантом 1 или 2, где экспрессией в стадии (А) является временная экспрессия или стабильная экспрессия, а предпочтительно временная экспрессия.

Вариант 4.

Способ в соответствии с вариантом 3, где временную экспрессию осуществляют путем введения ivt-РНК, кодирующей по меньшей мере один гибридный белок.

Вариант 5.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где указанный способ также включает стадию

С1) обогащения активированных и/или антигенспецифических Т-лимфоцитов.

Вариант 6.

Способ в соответствии с вариантом 5, где обогащение активированных Т-лимфоцитов включает следующие стадии:

(а) контактирования клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты, по меньшей мере с одной связывающей молекулой, которая специфически связывается с маркерным белком, специфически экспрессируемым активированными Т-лимфоцитами, или по меньшей мере с одной молекулой МНС, презентующей эпитоп нужного антигена;

(б) выделения Т-лимфоцитов, с которыми связана по меньшей мере одна связывающая молекула или по меньшей мере одна молекула МНС, презентующая эпитоп нужного антигена.

Вариант 7.

Способ в соответствии с вариантом 6, где связывающей молекулой, которая специфически связывается с маркерным белком, является антитело, производное антитела, фрагмент антитела или конъюгат вышеупомянутых антител с другой молекулой.

Вариант 8.

Способ в соответствии с вариантом 6 или 7, где по меньшей мере один маркерный белок, специфически экспрессируемый активированными Т-лимфоцитами, выбран из группы, включающей: Oх40, CD137, CD40L, PD-1, рецептор IL-2, интерферон γ , IL-2, GM-CSF и TNF α .

Вариант 9.

Способ в соответствии с вариантом 8, где в стадии (а) клетки также подвергаются контактированию со связывающей молекулой, которая специфически связывается с CD4.

Вариант 10.

Способ в соответствии с вариантом 8 или 9, где в стадии (а) клетки также подвергаются контактированию со связывающей молекулой, которая специфически связывается с CD8.

Вариант 11.

Способ в соответствии с вариантом 6, где отбор активированных CD4-Т-клеток включает следующие стадии:

(a1) контактирования клеточной популяции стадии (B) с антителом против CD4 0 для блокирования взаимодействия между CD40-CD40L антигенпрезентирующих клеток и антигенспецифических Т-лимфоцитов и для аккумуляции CD40L на поверхности Т-лимфоцитов;

(a2) контактирования клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты, с анти-CD40L антителом;

(b) выделения Т-лимфоцитов, меченных анти-CD40L антителом и анти-CD4 антителом.

Вариант 12.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где указанный способ также включает стадию:

C2) идентификации антигенспецифических Т-лимфоцитов, включающей следующие стадии:

а) инкубирования размноженных клеточных клонов клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты,

(i) с антигенпрезентирующими клетками, определенными в стадии (A), и

(ii) с контрольными антигенпрезентирующими клетками или в отсутствие антигенпрезентирующих клеток;

б) сравнения профиля активации при инкубировании (i) и (ii) для каждого клеточного клона;

с) идентификации антигенспецифических клеточных клонов путем сравнения (b);

где активация в стадии (i), но не в стадии (ii), указывает на то, что клеточный клон является антигенспецифическим.

Вариант 13.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где в стадии (B), антигенпрезентирующие клетки добавляют к клеточной популяции, содержащей Т-лимфоциты, по меньшей мере один раз, необязательно по меньшей мере два раза, необязательно по меньшей мере три раза и необязательно три раза.

Вариант 14.

Способ в соответствии с вариантом 12, где временной интервал между повторными добавлениями антигенпрезентирующих клеток составляет 7-21 день, предпочтительно 12-16 дней, более предпочтительно 13-15 дней, а еще более предпочтительно 14 дней.

Вариант 15.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где последовательность сигнала транслокации в ЭР происходит от белка, ассоциированного с эндосомами/лизосомами.

Вариант 16.

Способ в соответствии с вариантом 15, где белок, ассоциированный с эндосомой/лизосомой, выбран из группы, включающей LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68 и CD1b, а предпочтительно LAMP1.

Вариант 17.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где эндосомная/лизосомная нацеливающая последовательность происходит от LAMP1 или DC-LAMP, а предпочтительно от DC-LAMP.

Вариант 18.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, происходит от LAMP1 или DC-LAMP, а предпочтительно от DC-LAMP.

Вариант 19.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где последовательность сигнала транслокации в ЭР является человеческой последовательностью.

Вариант 20.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, происходит от LAMP1 или DC-LAMP, а предпочтительно от DC-LAMP.

матический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, представляет собой человеческий домен.

Вариант 21.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где сигнал транслокации в ЭР содержит последовательность SEQ ID NO: 33 или ее фрагмент.

Вариант 22.

Способ в соответствии с вариантом 20, где последовательность сигнала транслокации в ЭР состоит из последовательности SEQ ID NO: 34.

Вариант 23.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где антигенпрезентирующие клетки выбраны из дендритных клеток, активированных В-клеток, моноцитов, макрофагов, EBV-трансформированных лимфобластоидных клеточных линий, предпочтительно от дендритных клеток, а более предпочтительно от дендритных клеток, происходящих от моноцитов.

Вариант 24.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где антигенпрезентирующие клетки включают различные популяции антигенпрезентирующих клеток, где каждая популяция экспрессирует различные антигенные гибридные белки.

Вариант 25.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где антигенпрезентирующими клетками являются зрелые дендритные клетки, полученные способом, включающим следующие стадии:

i) получения моноцитов;

ii) инкубирования моноцитов стадии (i) с IL-4 и GM-CSF;

iii) инкубирования моноцитов стадии (ii) с IL-4 и GM-CSF в комбинации с коктейлем для созревания.

Вариант 26.

Способ в соответствии с вариантом 25, где коктейль для созревания включает комбинацию IL- β , TNF α , IFN γ , агониста TLR7/8, агониста PGE2 и TLR3.

Вариант 27.

Способ в соответствии с вариантом 25 или 26, где стадия инкубирования (ii) продолжается по меньшей мере 2 дня.

Вариант 28.

Способ в соответствии с вариантами 25-27, где стадия инкубирования (iii) продолжается по меньшей мере 12 ч, а предпочтительно 24 ч.

Вариант 29.

Способ в соответствии с вариантом 28, где агонистом TLR7/8 является R848 и где агонистом TLR3 является поли(I:C).

Вариант 30.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где клеточной популяцией, содержащей Т-лимфоциты, является популяция лимфоцитов периферической крови.

Вариант 31.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где клеточной популяцией, содержащей Т-лимфоциты, является популяция неразделенных лимфоцитов периферической крови.

Вариант 32.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где клеточная популяция обогащена Т-лимфоцитами, а предпочтительно CD8⁺- и/или CD4⁺-Т-лимфоцитами.

Вариант 33.

Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов, где гибридный белок содержит по меньшей мере два антигена или их фрагмента.

Вариант 34.

Т-лимфоцит, получаемый способом в соответствии с вариантами 1-33.

Вариант 35.

Экспрессионный вектор, включающий сигнальную последовательность транслокации в человеческий эндоплазматический ретикулум (ЭР), и человеческий трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность.

Вариант 36.

Экспрессионный вектор в соответствии с вариантом 1, где вектор содержит промотор для *in vitro* транскрипции мРНК.

Вариант 37.

Экспрессионный вектор в соответствии с вариантом 35 или 36, где последовательность сигнала транслокации в ЭР происходит от белка, ассоциированного с эндосомами/лизосомами.

Вариант 38.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-37, где белок, ассоциированный с эндосомами/лизосомами, выбран из группы, включающей LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68, CD1b.

Вариант 39.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-38, где эндосомная/лизосомная нацеливающая последовательность происходит от LAMP1 или DC-LAMP, а предпочтительно от DC-LAMP.

Вариант 40.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-39, где трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, происходит от LAMP1 или DC-LAMP, а предпочтительно от DC-LAMP.

Вариант 41.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-40, где последовательность сигнала транслокации в ЭР является человеческой последовательностью.

Вариант 42.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-41, где трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, представляет собой человеческий домен.

Вариант 43.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-42, где последовательность сигнала транслокации в ЭР содержит последовательность SEQ ID NO: 33 или ее фрагмент.

Вариант 44.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-43, где сигнал транслокации в ЭР состоит из последовательности SEQ ID NO: 34.

Вариант 45.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-44, где эндосомная/лизосомная нацеливающая последовательность содержит мотив SEQ ID NO: 38.

Вариант 46.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-45, где эндосомная/лизосомная нацеливающая последовательность представляет собой последовательность SEQ ID NO: 39.

Вариант 47.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-46, где трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, включает последовательность SEQ ID NO: 54 или ее фрагмент, такую как SEQ ID NO: 35 или ее фрагмент.

Вариант 48.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-47, также содержащий рестрикционный сайт, расположенный между последовательностью сигнала транслокации в ЭР и человеческим трансмембранным и цитоплазматическим доменом, содержащим эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность.

Вариант 49.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-48, где вектор также включает по меньшей мере один антиген или его фрагмент, которые встроены между человеческой последовательностью сигнала транслокации в эндоплазматический ретикулум (ЭР) и человеческим трансмембранным и цитоплазматическим доменом, содержащим эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность.

Вариант 50.

Экспрессионный вектор в соответствии с вариантом 49, где вектор включает по меньшей мере два антигена или их фрагмента, которые встроены между человеческой последовательностью сигнала транслокации в эндоплазматический ретикулум (ЭР) и человеческим трансмембранным и цитоплазматическим доменом, содержащим эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность.

Вариант 51.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-50, где вектор включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полноразмерную аминокислотную последовательность антигена.

Вариант 52.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-51, где вектор включает фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность антигена.

Вариант 53.

Экспрессионный вектор в соответствии с вариантом 52, где антигеном является опухолевый антиген или вирусный антиген.

Вариант 54.

Экспрессионный вектор в соответствии с вариантом 53, где опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из вирусного опухолевого антигена, опухолеспецифического антигена, антигена, ассоциированного с опухолью, и антигена, вызывающего специфические мутации у пациента и экспрессирующегося в опухолевых клетках пациента.

Вариант 55.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-54, где опухолевым антигеном является антиген, ассоциированный с опухолью.

Вариант 56.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-55, где антигеном, ассоциированным с опухолью, является раковый антиген/антиген яичек (антиген C/T).

Вариант 57.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-56, где антиген C/T выбран из группы, включающей MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, NY-ESO1, опухолевый антиген/антиген яичек IB, GAGE-1, SSX-4, XAGE-1, BAGE, GAGE, SCP-1, SSX-2, SSX-4, CTZ9, CT10, SAGE и CAGE.

Вариант 58.

Экспрессионный вектор в соответствии с любым из вариантов 35-57, где антиген C/T выбран из группы, состоящей из GAGE-1, SSX-4 и XAGE-1.

Вариант 59.

Применение экспрессионного вектора в соответствии с любым из вариантов 35-58 для *in vitro* продуцирования антигенспецифических Т-лимфоцитов.

Вариант 60.

Т-лимфоциты для использования в способе профилактики или лечения рака, включающем введение млекопитающему Т-лимфоцитов в соответствии с вариантом 34.

Вариант 61.

Способ продуцирования антигенспецифического TCR, включающий стадии способа в соответствии с любым из вариантов 1-33, а также стадию выделения TCR из активированных антигенспецифических лимфоцитов.

Вариант 62.

TCR, выделенный из лимфоцита в соответствии с вариантом 34.

Вариант 63.

TCR, специфичный к GAGE-1 и содержащий

α -цепь TCR, включающую область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5,

β -цепь TCR, включающую область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 6.

Вариант 64.

TCR, специфичный к GAGE-1, в соответствии с вариантом 63 и содержащий

α -цепь TCR, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 5, и которая содержит область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1,

β -цепь TCR, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 6, и которая содержит область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2.

Вариант 65.

TCR, специфичный к SSX-4 и содержащий

α -цепь TCR, включающую область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 13,

β -цепь TCR, включающую область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 14.

Вариант 66.

TCR, специфичный к SSX-4 в соответствии с вариантом 65 и содержащий

α -цепь TCR, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 13, и которая содержит область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9,

β -цепь TCR, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 14, и которая содержит область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 10.

Вариант 67.

TCR, специфичный к XAGE-1 и содержащий

α -цепь TCR, включающую область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 21,

β-цепь TCR, включающую область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 22.

Вариант 68.

TCR, специфичный к XAGE-1 в соответствии с вариантом 66 и содержащий

α-цепь TCR, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 21, и которая содержит область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 17,

β-цепь TCR, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 22, и которая содержит область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 18.

Вариант 69.

TCR, специфичный к XAGE-1 и содержащий

α-цепь TCR, включающую область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 29,

β-цепь TCR, включающую область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 30.

Вариант 70.

TCR, специфичный к XAGE-1 в соответствии с вариантом 68 и содержащий

α-цепь TCR, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 29, и которая содержит область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 25,

β-цепь TCR, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной SEQ ID NO: 30, и которая содержит область CDR 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26.

Вариант 71.

TCR в соответствии с любым из вариантов 62-70 для его применения в способе профилактики или лечения рака.

Вариант 72.

Способ профилактики или лечения рака, включающий стадию введения млекопитающему TCR в соответствии с любым из вариантов 62-70.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ продуцирования человеческих антигенспецифических Т-лимфоцитов, включающий следующие стадии:

А) экспрессии по меньшей мере одного гибридного белка, содержащего по меньшей мере два антигена или их фрагмента, последовательность сигнала транслокации в эндоплазматический ретикулум (ЭР) перед N-концом N-концевого антигена из указанных по меньшей мере двух антигенов, и трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность за C-концом C-концевого антигена из указанных по меньшей мере двух антигенов, в антигенпрезентирующих клетках; и

В) обработки клеточной популяции, содержащей Т-лимфоциты, антигенпрезентирующими клетками стадии (А) *in vitro* для активации антигенспецифических Т-лимфоцитов, специфичных к антигену, экспрессируемому антигенпрезентирующей клеткой.

2. Способ по п.1, где указанный способ дополнительно включает стадию

С1) обогащения активированных и/или антигенспецифических Т-лимфоцитов, включающего следующие стадии:

(а) контактирования клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты, со связывающей молекулой, которая специфически связывается с маркерным белком, специфически экспрессируемым активированными Т-лимфоцитами, или с молекулами МНС, презентующими эпитоп нужного антигена;

(б) выделения Т-лимфоцитов, с которыми связана связывающая молекула или молекула МНС, презентующая эпитоп нужного антигена.

3. Способ по п.2, где маркерный белок, специфически экспрессируемый активированными Т-лимфоцитами, выбран из группы, состоящей из Oх40, CD137, CD40L, PD-1, рецептора IL-2, интерферона γ, IL-2, GM-CSF и TNF-α.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный способ дополнительно включает стадию

С2) идентификации антигенспецифических Т-лимфоцитов, включающей следующие стадии:

а) инкубирования размноженных клеточных клонов клеточной популяции, содержащей активированные антигенспецифические Т-лимфоциты,

(i) с антигенпрезентирующими клетками, определенными в стадии (A), и
 (ii) с контрольными антигенпрезентирующими клетками или в отсутствии антигенпрезентирующих клеток;

b) сравнения профиля активации при инкубировании (i) и (ii) для каждого клеточного клона;

c) идентификации антигенспецифических клеточных клонов путем сравнения (b);

где активация в стадии (i), но не в стадии (ii), указывает на то, что клеточный клон является антигенспецифическим.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность сигнала транслокации в ЭР происходит от белка, ассоциированного с эндосомами/лизосомами, и где белок, ассоциированный с эндосомой/лизосомой, выбран из группы, включающей LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68 и CD1b, а предпочтительно LAMP1.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, происходит от LAMP1 или DC-LAMP, а предпочтительно от DC-LAMP.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность сигнала транслокации в ЭР является человеческой последовательностью и где трансмембранный и цитоплазматический домен, содержащий эндосомную/лизосомную нацеливающую последовательность, представляет собой человеческий домен.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где антигенпрезентирующие клетки включают различные популяции антигенпрезентирующих клеток, где каждая популяция экспрессирует различные антигенные гибридные белки.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, где антигенпрезентирующими клетками являются зрелые дендритные клетки, полученные способом, включающим следующие стадии:

i) получения моноцитов;

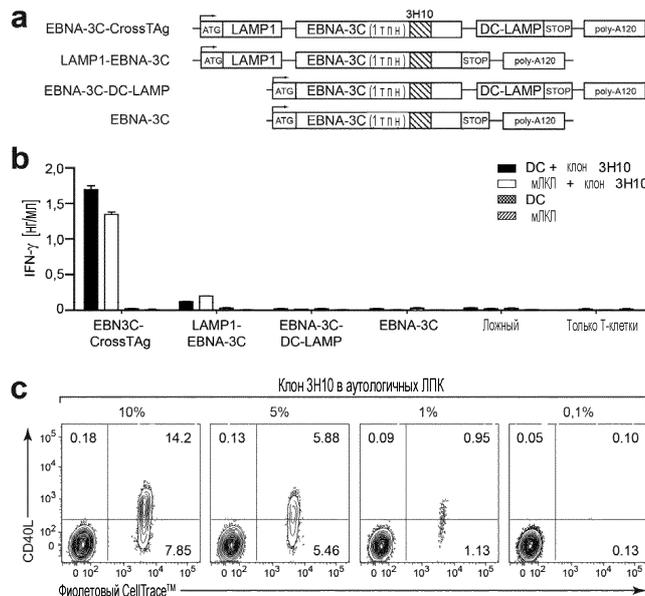
ii) инкубирования моноцитов стадии (i) с IL-4 и GM-CSF;

iii) инкубирования моноцитов стадии (ii) с IL-4 и GM-CSF в комбинации с коктейлем для созревания, где коктейль для созревания включает, но необязательно, комбинацию IL- β , TNF α , IFN γ , агониста TLR7/8, агониста PGE2 и TLR3.

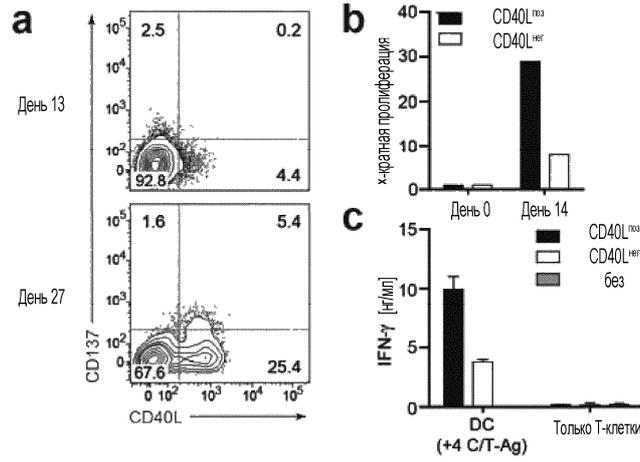
10. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клеточной популяцией, содержащей Т-лимфоциты, является популяция неразделенных лимфоцитов периферической крови.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клеточная популяция, содержащая Т-лимфоциты, обогащена Т-лимфоцитами, а предпочтительно CD8⁺- и/или CD4⁺-Т-лимфоцитами.

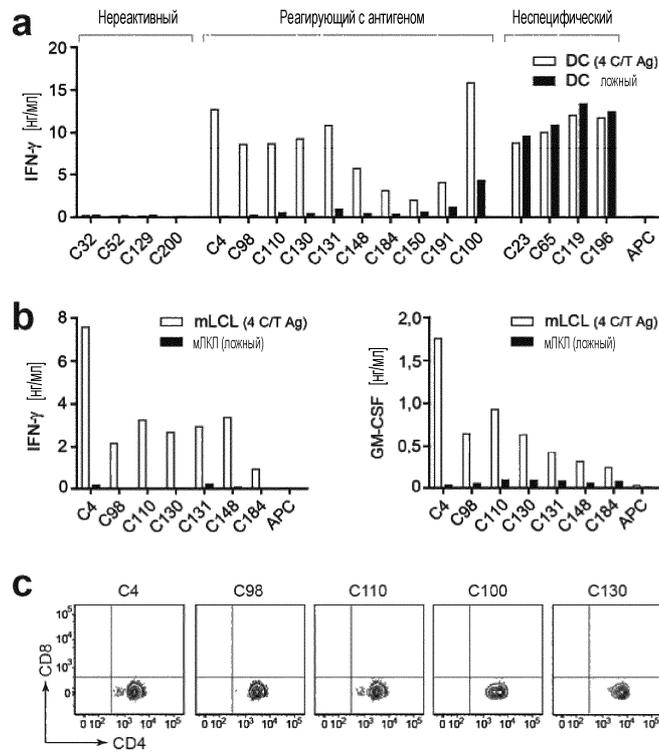
12. Способ продуцирования антигенспецифического TCR, включающий стадии способа по любому из пп.1-11 и дополнительно включающий стадию выделения TCR из активированных антигенспецифических лимфоцитов.



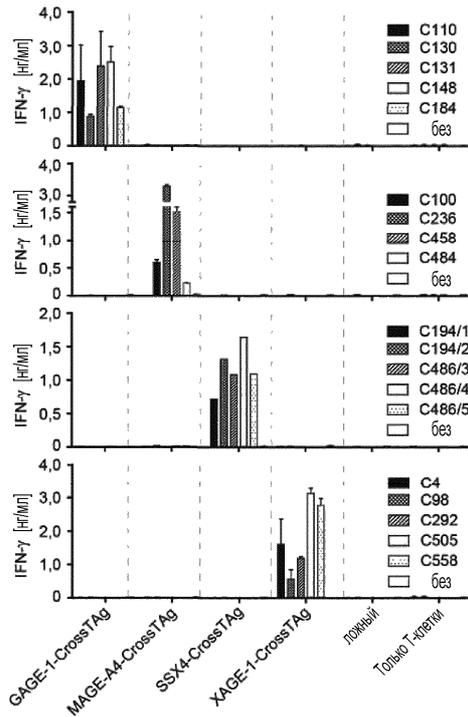
Фиг. 1



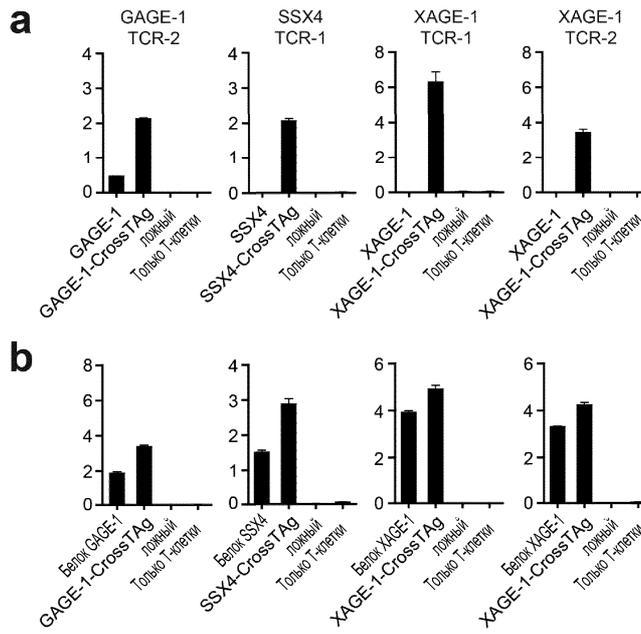
Фиг. 2



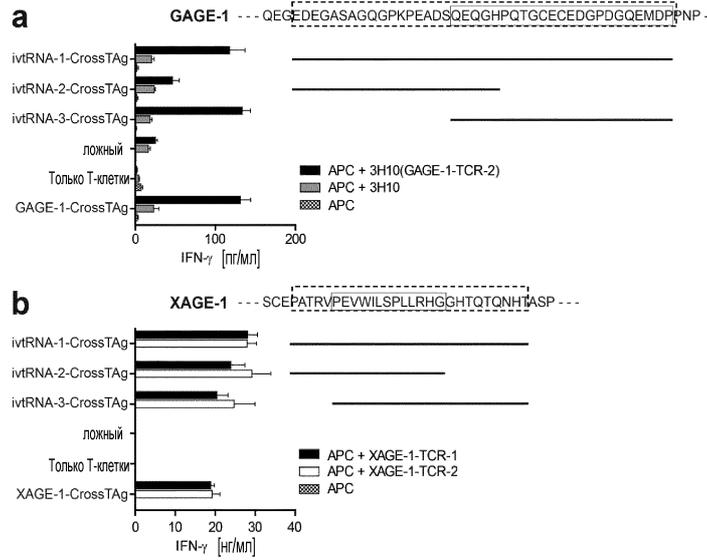
Фиг. 3



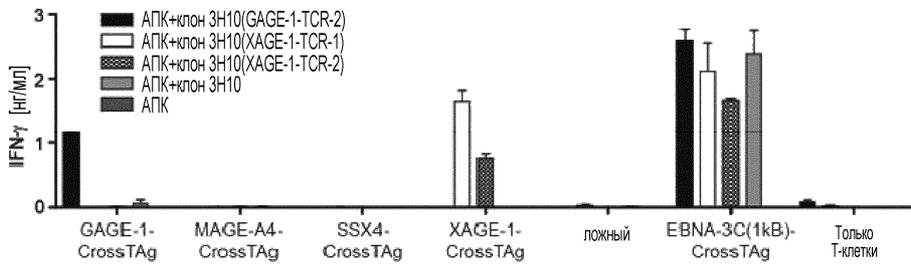
Фиг. 4



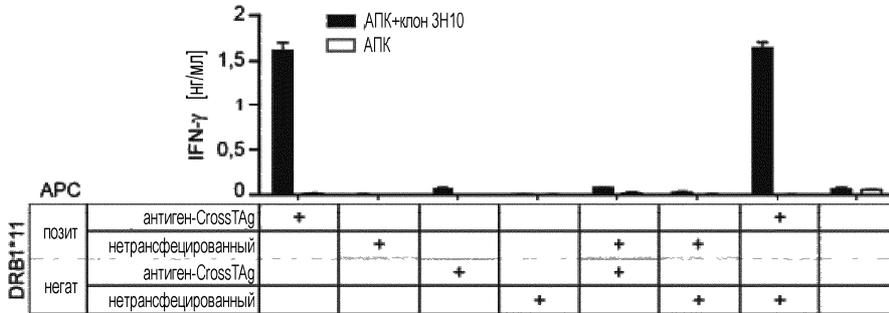
Фиг. 5



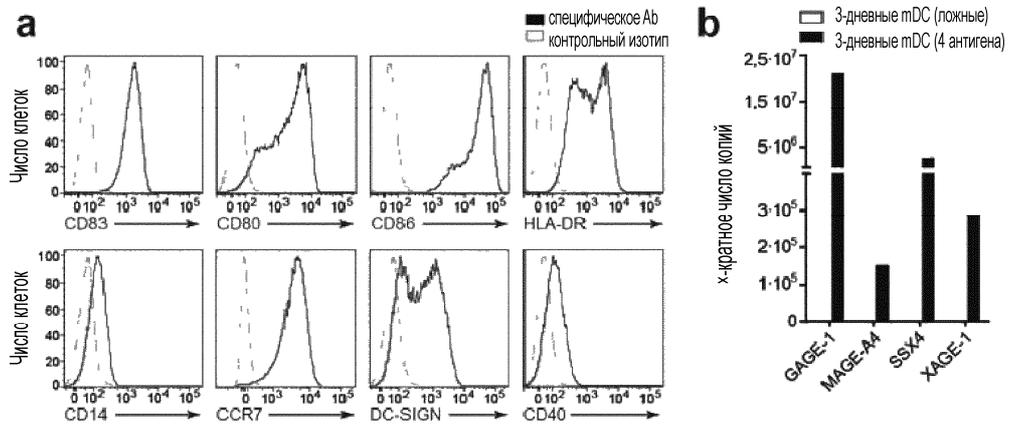
Фиг. 6



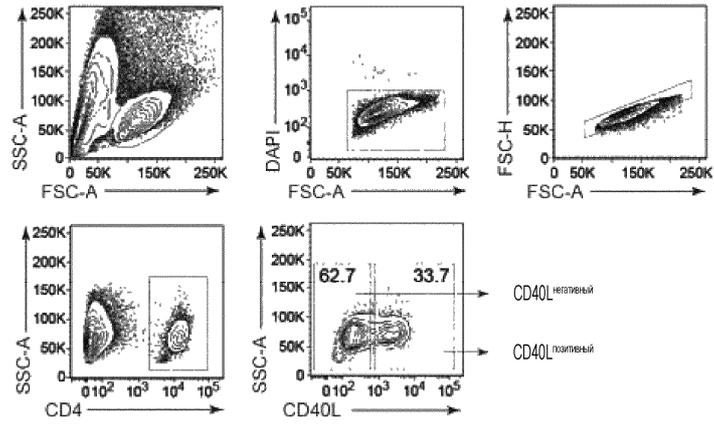
Фиг. 7



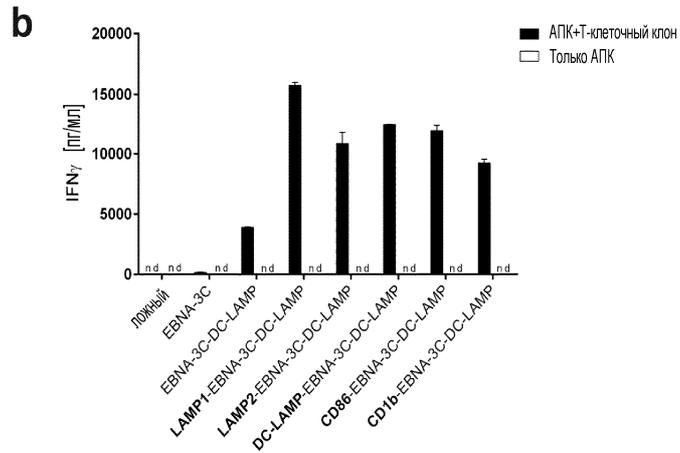
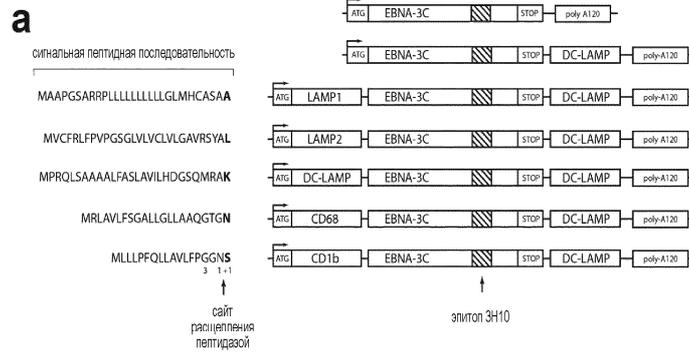
Фиг. 8



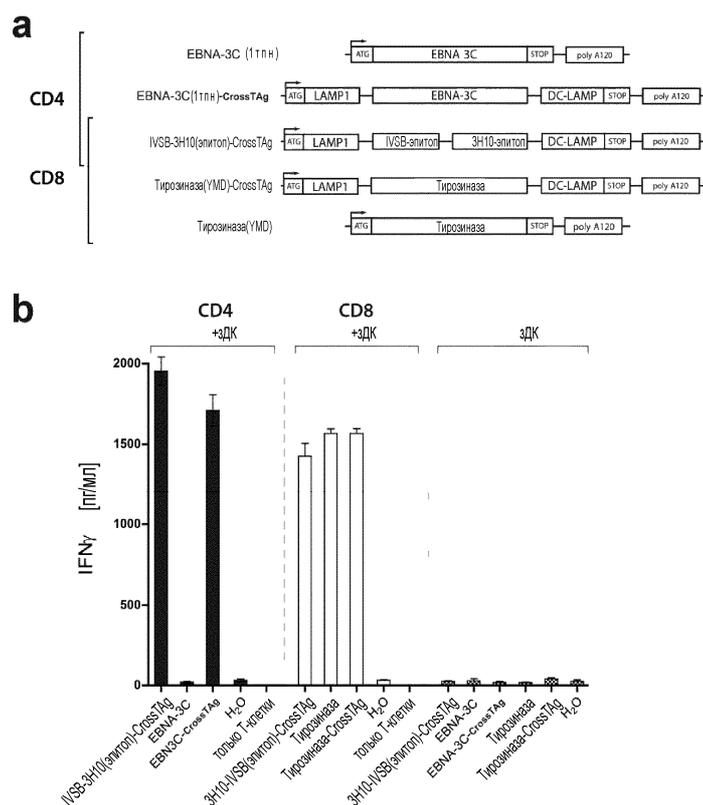
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12