

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192726** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.26

(22) Дата подачи заявки
2020.04.01

(51) Int. Cl. *C07K 14/725* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 16/30 (2006.01)

**(54) MAGEA1-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ИХ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**

(31) **19167440.7**

(32) **2019.04.04**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2020/059193**

(87) **WO 2020/201318 2020.10.08**

(71) Заявитель:

**МЕДИДЖИН ИММЬЮНОТЕРАПИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Венер Карина, Вайс Манон,
Раффегерст Зилке, Меш Аня (DE)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к выделенному Т-клеточному рецептору (TCR), специфическому к MAGEA1-производному пептиду, и к полипептиду, содержащему функциональную часть TCR. Также рассматривается поливалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, клетка, экспрессирующая TCR, и фармацевтическая композиция, содержащая TCR. Изобретение также относится к TCR для использования в качестве лекарственного средства, в частности к TCR для использования при лечении рака.

202192726

A1

A1

202192726

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-570246EA/042

MAGEA1-специфические Т-клеточные рецепторы и их использование

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к выделенному Т-клеточному рецептору (TCR), специфическому для MAGEA1-производного пептида, и к полипептиду, содержащему функциональную часть TCR. Далее рассматривается поливалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, клетка, экспрессирующая TCR, и фармацевтическая композиция, содержащая TCR. Изобретение также относится к TCR для использования в качестве лекарственного средства, в частности, к TCR для использования при лечении рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

MAGEA1, также называемый Меланома-ассоциированный антиген 1 является членом семейства генов MAGEA, кодирующим ряд белков, имеющих высокую гомологию друг с другом. Антигены MAGEA принадлежат к семейству раково-тестикулярных антигенов (СТА) и являются первыми опухолеассоциированными антигенами человека, идентифицированными на молекулярном уровне (Science 1991. 254: 1643–1647/ republished in J. Immunol. 2007; 178:2617-2621). Семейство генов MAGEA включает 12 высокоомологичных генов, расположенных на хромосоме Xq28. Их экспрессия постоянно обнаруживается в раках различного гистологического происхождения, таких как немелкоклеточный рак легких, рак мочевого пузыря, пищевода, рак головы и шеи и саркома, а также миелома, некоторые типы рака молочной железы, а также в зародышевых клетках (Front Med (Lausanne). 2017; 4: 18.). MAGEA1 представляет собой цитозольный/цитоплазматический белок, и пептиды, полученные из белка MAGEA1, представлены на фоне МНС-класса I, т.е. на молекулах HLA. Более конкретно, MAGEA1-производные эпитопы представлены на молекулах HLA-A2, что указывает на иммуногенность антигенов и, следовательно, на их пригодность в качестве мишени для иммунотерапии рака. Уже проведено множество клинических испытаний в области иммунотерапии, направленных на белки MAGEA (clinicaltrials.gov). Экспрессия MAGEA1 в широком диапазоне опухолевых образований, таких как меланома и рак легких (Lancet Oncol 2003; 4: 104-09) с большим количеством пациентов в сочетании с описанной иммуногенностью антигена, квалифицирует MAGEA1 как многообещающую мишень для опосредованной Т клетками иммунотерапии. Принцип иммунотерапии рака с использованием адаптивного переноса клеток (ACT) позволяет высокоспецифическое к опухоли лечение рака с использованием собственной иммунной системы пациента. ACT использует ex vivo размноженные аутологичные (полученные от пациента) Т-клетки, генетически сконструированные для экспрессии Т-клеточных рецепторов (TCR) со специфичностью в отношении определенного эпитопа, полученного из внутриклеточного белка, такого как MAGEA1. Таким образом, все еще существует потребность в высокоэффективных TCR, которые направлены только на

опухолеспецифический/ограниченный антиген MAGEA1 и, следовательно, обладают исключительным потенциалом для иммунотерапии рака. Таким образом, существует потребность в таких специфических TCR, направленных на MAGEA1.

ЦЕЛИ И СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Одной из целей настоящего изобретения является презентация T-клеточного рецептора (TCR), специфического для MAGEA1.

В конкретном варианте осуществления, выделенный TCR содержит TCR α цепь, содержащую CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3 и CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, TCR β цепь, содержащую CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6 и CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7.

TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или ее фрагмент.

В конкретных вариантах осуществления, TCR специфически распознает связанную с HLA-A2 и/или HLA-A26 форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, предпочтительно, связанную с HLA-A2 форму. Более конкретно, TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая представлена молекулой, кодируемой геном, выбранным из группы, состоящей из HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:04, HLA-A*02:16, HLA-A*02:17 и HLA-A*26:01, более предпочтительно, TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая представлена молекулой, кодируемой геном, выбранным из группы, состоящей из HLA-A*02:01, HLA-A*02:04, HLA-A*02:16 и HLA-A*02:17, даже более предпочтительно, TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая представлена молекулой, кодируемой HLA-A*02:01.

TCR по изобретению особенно полезен, поскольку он демонстрирует высокую способность распознавания опухолевых клеток, высокую способность уничтожать опухолевые клетки и высокую функциональную avidность. Более того, TCR не показывает значительной секреции Th2 цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13, что является преимуществом для эффективной регрессии опухоли.

Предпочтительно TCR не обладает перекрестной реактивностью с другими членами семейства MAGEA.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление T-клеток, экспрессирующих функциональный TCR, специфичный в отношении MAGEA1.

TCR по изобретению выделен и/или очищен и может быть растворимым или мембраносвязанным.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотная последовательность TCR может содержать одну или несколько фенотипически молчащих замен. Кроме того, TCR по настоящему изобретению может быть меченым. Полезные метки известны в данной

области техники и могут быть связаны с TCR или вариантом TCR с использованием обычных способов, необязательно через линкеры различной длины. Термин «метка» или «метящая группа» относится к любой обнаруживаемой метке. Дополнительно или альтернативно, аминокислотная последовательность может быть модифицирована для включения терапевтического агента или модифицирующей фармакокинетику группы. Терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из иммунной эффекторной молекулы, цитотоксического агента и радионуклида. Иммунной эффекторной молекулой может быть, например, цитокин. Модифицирующей фармакокинетику группой может быть, по меньшей мере, одна повторяющаяся единица полиэтиленгликоля, по меньшей мере, одну гликолевая группа, по меньшей мере, одна сиалильная группа или их комбинация.

TCR, в частности, растворимая форма TCR, по изобретению может быть модифицирован путем присоединения дополнительных функциональных групп, например, для снижения иммуногенности, увеличения гидродинамического размера (размера в растворе), растворимости и/или стабильности (например, через усиление защиты от протеолитической деградации) и/или продления периода полужизни в сыворотке. Другие полезные функциональные группы и модификации включают «суицидные» или «переключатели безопасности», которые можно использовать для выключения или включения эффекторных клеток-хозяев, несущих TCR по изобретению в организме пациента, или для выключения или включения самого трансгенного TCR. В настоящем документе также предусмотрены TCR с измененным профилем гликозилирования.

Также возможно добавление лекарственного средства или терапевтического вещества, такого как низкомолекулярное соединение, к TCR, в частности, к растворимой форме TCR по изобретению.

TCR, в частности растворимая форма TCR по изобретению, можно дополнительно модифицировать для введения дополнительных доменов, которые помогают в идентификации, отслеживании, очистке и/или выделении соответствующей молекулы (меток).

В некоторых вариантах осуществления TCR относится к одноцепочечному типу, где TCR α цепь и TCR β цепь связаны линкерной последовательностью.

Другой аспект изобретения относится к полипептиду, содержащему функциональную часть TCR, как описано в настоящем документе, где функциональная часть содержит одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:4 и 7, предпочтительно, где функциональная часть содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2, 3, 4 и 5, 6, 7.

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

Конкретные варианты осуществления относятся к поливалентному комплексу TCR, содержащему, по меньшей мере, два TCR, как описано в настоящем документе. В

более конкретном варианте осуществления, по меньшей мере, один из указанных TCR ассоциирован с терапевтическим агентом.

Некоторые варианты осуществления относятся к TCR по изобретению, экспрессируемому на эффекторной клетке, особенно на иммунной эффекторной клетке, в виде функционального полипептида или функционального поливалентного полипептида, где секреция IFN- γ индуцируется в вышеупомянутой эффекторной клетке, экспрессирующей TCR, при связывании с HLA-A2, связанной формой аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2.

Другой аспект изобретения относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей TCR, как описано в настоящем документе, или кодирующей полипептид, как описано выше.

Дополнительный аспект изобретения относится к плазмиде или вектору, содержащему нуклеиновую кислоту по настоящей заявке, как описано выше. Предпочтительно, вектором является вектор экспрессии или вектор, подходящий для трансдукции или трансфекции клеток, особенно эукариотических клеток. Вектор может быть, например, ретровирусным вектором, например гамма-ретровирусным или лентивирусным вектором.

Другой аспект изобретения относится к клетке, экспрессирующей TCR, как описано в настоящем документе. Клетка может быть выделенной первичной клеткой или не встречающейся в природе.

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

а) вектор экспрессии, который содержит, по меньшей мере, одну нуклеиновую кислоту, как описано выше, или

б) первый вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа цепь TCR, как описано в настоящем документе, и второй вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую бета цепь TCR, как описано в настоящем документе.

Клеткой может быть лимфоцит периферической крови (PBL) или моноклеарная клетка периферической крови (PBMC). Обычно, клеткой является иммунная эффекторная клетка, особенно Т-клетка. Другие подходящие типы клеток включают гамма-дельта Т-клетки и НК-подобные Т-клетки и НК-клетки, модифицированные или не модифицированные.

Другой аспект относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающемуся с частью TCR, как описано в настоящем документе, которая опосредует специфичность к MAGEA1. В конкретном варианте осуществления, часть TCR, которая опосредует специфичность к MAGEA1, содержит CDR3 альфа цепи SEQ ID NO:4 и/или CDR3 бета цепи SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах осуществления, часть TCR, которая опосредует специфичность MAGEA1, содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2, 3, 4 и 5, 6, 7.

Другой аспект изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей TCR, как описано в настоящем документе, полипептид, как описано в настоящем документе, мультивалентный комплекс TCR, как описано в настоящем документе, нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе, вектор, как описано в настоящем документе, клетку, как описано в настоящем документе, или антитело, как описано в настоящем документе.

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

Другой аспект изобретения относится к TCR, как описано в настоящем документе, полипептиду, как описано в настоящем документе, поливалентному комплексу TCR, как описано в настоящем документе, нуклеиновой кислоте, как описано в настоящем документе, вектору, как описано в настоящем документе, клетке, как описано в настоящем документе, или антителу, как описано в настоящем документе, для использования в качестве лекарственного средства, в частности, для использования при лечении рака. Рак может быть гематологическим раком или солидной опухолью. Рак может быть выбран из группы, состоящей из рака простаты, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичек, рака почек, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, гепатоцеллюлярного рака, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, аденокарциномы желудка, холангиокарциномы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, миелоидного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза, саркомы или остеосаркомы.

НАДПИСИ К ЧЕРТЕЖАМ

На **фигуре 1** показано специфическое распознавание T2 клеток, нагруженных пептидом MAGEA1_{KVL} (SEQ ID NO. 1) (KVL), эффекторами, экспрессирующими TCR T15.8-4.3-83, полученными от различных доноров (донор А или В; столбики серого цвета или черного). TCR-опосредованное распознавание мишени, измеренное по секреции IFN- γ для версии TCR с С-областью только мыши (murC), показано на левом графике с минимально-мураинизированной С-областью человека (mmC) на среднем графике. Распознавание, опосредованное эталонным контролем MAGEA1-TCR-трансдуцированных эффекторов, показано справа. В качестве контроля, клетки T2, нагруженные нерелевантным пептидом ASTN-1 (SEQ ID NO. 28), инкубируют с Т-клетками, экспрессирующими TCR по изобретению или контрольный TCR (Ctrl. MAGEA1-TCR).

На **фигуре 2** показана секреция IFN- γ при специфическом распознавании нагруженных KVL-пептидом лимфобластоидных клеточных линий (LCL) TCR T15.8-4.3-83, экспрессированным в трех различных препаратах эффекторных клеток (заштрихованные белые, светло-серые и темно-серые столбики). Распознавание не наблюдается, когда не нагруженные LCL совместно культивируют с соответствующими

эффекторными клетками (сплошные белые, светло-серые, темно-серые столбики). В рамках указаны аллели HLA, ответственные за презентирование и распознавание. В случае гетерозиготных по HLA-A LCL (как указано звездочкой) распознавание пептида на другом HLA-A может быть исключено (данные не показаны).

На **фигуре 3** показано распознавание различных линий опухолевых клеток разного происхождения, опосредованное эффекторами, экспрессирующими TCR T15.8-4.3-83 (верхний график) или контрольными Ctrl. MAGEA1-TCR (нижний график). Эффекторные клетки получают от трех разных доноров (донор А, В или С; столбики белого, светло-серого или темно-серого цвета). Распознавание мишени эффекторными клетками, экспрессирующими MAGEA1-TCR (сплошные столбики) или не трансдуцированными контрольными клетками (заштрихованные столбики), определяют через измерение секреции IFN- γ . Клетки T2, нагруженные пептидом KVL или нагруженные нерелевантным пептидом ASTN1, служат в качестве контроля мишени и показаны с правой стороны каждого графика (T2+KVL, T2+ASTN1).

На **фигуре 4 А-Д** показан TCR-опосредованный лизис линий опухолевых клеток UACC-62 (А), NCI-H1703 (В), Saos-2 (С) и 647-V (D). Лизис клеток измеряют по исчезновению флуоресцентно меченных клеток-мишеней. Опухолевые клетки тестируют либо немодифицированным (черный), либо нагруженным KVL пептидом (серый) в качестве положительного контроля. Мишени совместно культивируют до 144 часов с эффекторными клетками, полученными от трех разных доноров (доноры А, В или С, закрашенные кружки), экспрессирующих TCR T15.8-4.3-83 (верхние графики), контроль Ctrl. MAGEA1-TCR (средний график) или не трансдуцированный (нижний график). Клетки-мишени, культивированные отдельно, показаны на каждом графике в качестве эталона (пустые кружки). Изображения получают и анализируют каждые 2 ч с помощью IncuCyte™ Zoom System, изображено количество клеток-мишеней на лунку за 144 часа.

На **фигуре 5** показано распознавание клеток T2, нагруженных пептидами для сканирования с треониновой заменой, после совместного культивирования с контрольным ctrl. MAGEA1-TCR-трансдуцированными (сплошные столбики) или не трансдуцированными (заштрихованные столбики) эффекторами от трех разных доноров (донор А, В или С; столбики белого, светло-серого или темно-серого цвета). Распознавание исходного MAGEA1-производного эпитопа KVL TCR показано слева. Последовательность эпитопа, показанная на оси x, указывает положение замены исходной АК на треонин. Удаленное распознавание заменой исходной АК выделено черными рамками. Распознавание мишени определяют через измерение секреции IFN- γ , опосредованной Т-клетками.

На **Фигуре 6** показано распознавание клеток T2, нагруженных пептидами для сканирования с треониновой заменой, после совместного культивирования с эффекторами, трансдуцированными TCR T15.8-4.3-83 (сплошные столбики) или не трансдуцированными (заштрихованные столбики) от трех разных доноров (донор А, В или С; столбики белого, светло-серого или темно-серого цвета). Распознавание исходного

MAGEA1-производного эпитопа KVL TCR показано слева. Последовательность эпитопа, показанная на оси x, указывает положение замены исходной АК на треонин. Удаленное распознавание заменой исходной АК выделено черными рамками. Распознавание мишени определяют через измерение секреции IFN- γ , опосредованной Т-клетками.

На **Фигуре 7** показано опосредованное TCR T15.8-4.3-83 распознавание клеток НЕК 293Т (А), клеток К562 (В) и клеток LCL (С). Распознавание клеток-мишеней определяют через измерение секреции IFN- γ , опосредованной Т-клетками. Клеточные линии и клетки Т2 либо нагружают MAGEA1-производным пептидом KVL (+ KVL), либо ASTN1-производным пептидом KLY (+ ASTN1) в качестве контролей, либо трансфицируют *in vitro* РНК, кодирующей MAGEA1, ASTN1 или 13 членов семейства MAGE, как указано по осям x. Мишени совместно культивируют либо с TCR-трансдуцированными (сплошные столбики), либо не трансдуцированными (заштрихованные столбики) эффекторными клетками, полученными от двух доноров (светло-серые или темно-серые). Фон, опосредованный только клетками-мишенями, культивируемыми отдельно (только мишени), указан в белых столбиках. Пунктирные линии указывают независимую от мишени фоновую секрецию IFN- γ .

На **фигуре 8** показано опосредованное TCR T15.8-4.3-83 распознавание не модифицированных (не нагруженных) или нагруженных KVL клеток-мишеней, полученных из здоровых тканей или из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS), представляющих здоровые ткани человека. Распознавание клеток-мишеней определяют через измерение секреции IFN- γ Т-клетками, полученными от трех разных доноров, трансдуцированными TCR T15.8-4.3-83 (донор А, В или С; столбики белого, светло-серого или темно-серого цвета). Фоновая секреция IFN- γ только мишенями (только мишени) показана для каждого типа клеток в качестве контроля, распознавание клеток Т2, нагруженных эпитопом KVL (Т2+KVL), распознаваемых TCR, и фон для только эффекторов (только эффекторы) показаны в правой части графика.

На **фигуре 9** показаны типовые изображения, полученные с помощью фазово-контрастного микроскопа, совместных культур нормальных клеток с эффекторными клетками. Хотя существует явный TCR-опосредованный лизис всех нагруженных KVL клеток-мишеней (полное разрушение клеточного слоя), эффекторные клетки, экспрессирующие TCR, не лизируют не модифицированные нормальные клетки.

На **фигуре 10** показана способность популяций TCR-трансгенных эффекторных Т-клеток продуцировать IFN- γ в ответ на двойные положительные линии опухолевых клеток MAGEA1 и HLA-A*02:01. FH1, FH2 FH3 и FH4 относятся к TCR, описанным в WO 2018/170338 FH1: V α =SEQ ID NO.:7 из WO'338 V β =SEQ ID NO:5 из WO'338; FH2: V α =SEQ ID NO.: 11 V β =SEQ ID NO.: 9 из WO'338, FH3: V α =SEQ ID NO.: 15 из WO'338 V β =SEQ ID NO:13 из WO'338; FH1: V α =SEQ ID NO.:19 из WO'338 V β =SEQ ID NO:17 из WO'338; R37P1C9 относится к MAGA1-TCR, описанному в WO2018/104438.

На **Фигуре 11** показана способность популяций TCR-трансгенных эффекторных Т-клеток лизировать линии двойных положительных опухолевых клеток MAGEA1 и HLA-

A*02:01. FH1, FH2 FH3 и FH4 относятся к TCR, описанным в WO 2018/170338 (см. Фиг. 10). R37P1C9 относится к MAGA1-TCR, описанному в WO2018/104438. UTD: не трансдуцированные.

На **Фигуре 12** показана функциональная avidность различных TCR, специфических к пептиду KVL. Функциональная avidность относится к накопленной силе *множественных* аффинностей отдельных взаимодействий нековалентного связывания между трансгенным TCR и комплексом pMHC. FH1, FH2 FH3 и FH4 относятся к TCR, описанным в WO 2018/170338 (см. Фиг. 10). R37P1C9 относится к MAGA1-TCR, описанному в WO2018/104438.

На **фигуре 13** сериновые остатки используют для систематической замены отдельных аминокислот в пептиде MAGEA1_{KVL} (Serine Scan) с целью определения критических аминокислот в последовательности эпитопа.

На **фигуре 14** показан профиль секреции TH2-специфических цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13 T-клетками, трансдуцированными различными TCR. UT: нетрансфицированный. T1367 обозначает TCR, описанный в WO2014/118236. Только мишени: опухолевые клетки культивируют без TCR.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Прежде чем изобретение будет подробно описано в отношении некоторых из его предпочтительных вариантов осуществления, даны следующие общие определения.

Настоящее изобретение, как иллюстративно описано ниже, может быть подходящим образом реализовано на практике при отсутствии какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не описанных в настоящем документе.

Настоящее изобретение будет описано в отношении конкретных вариантов осуществления и со ссылкой на определенные чертежи, но изобретение не ограничивается ими, а только формулой изобретения.

Если термин «содержащий» используется в настоящем описании и формуле изобретения, он не исключает других элементов. Для целей настоящего изобретения, термин «состоящий из» считается предпочтительным вариантом осуществления термина «содержащий». Если в дальнейшем определено, что группа содержит, по меньшей мере, определенное количество вариантов осуществления, это также следует понимать как описание группы, которая предпочтительно состоит только из этих вариантов осуществления.

Для целей настоящего изобретения термин «полученный» считается предпочтительным вариантом осуществления термина «получаемый». Если в дальнейшем, например, определено, что антитело может быть получено из определенного источника, это также следует понимать как описание антитела, которое получают из этого источника.

Если неопределенный или определенный артикль используется при обращении к существительному в единственном числе, например, «a», «an» или «the», он включает

множественное число этого существительного, если иное не оговорено особо. Термины «примерно» или «приблизительно» в контексте настоящего изобретения обозначают интервал точности, который специалист в данной области техники поймет, чтобы по-прежнему гарантировать технический эффект рассматриваемого признака. Термин обычно указывает отклонение от указанного числового значения $\pm 10\%$, и предпочтительно, $\pm 5\%$.

Технические термины используются в их общепринятом смысле или значении для специалиста в данной области техники. Если определенным терминам передается конкретное значение, ниже будут даны определения терминов, в контексте которых эти термины используются.

Фон TCR

TCR состоит из двух различных и отдельных белковых цепей, а именно альфа (α) и бета (β) цепи TCR. Цепь α TCR содержит переменную (V), соединительную (J) и константную (C) области. Цепь TCR β содержит переменную (V), дополнительную (D), соединительную (J) и константную (C) области. Перестроенные V(D)J области и TCR α , и TCR β цепи содержат гиперпеременные области (CDR, определяющие комплементарность области), среди которых область CDR3 определяет специфическое распознавание эпитопа. В C-концевой области и α цепь TCR, и β цепь TCR содержат гидрофобный трансмембранный домен и заканчиваются коротким цитоплазматическим хвостом.

Обычно TCR является гетеродимером одной α цепи и одной β цепи. Этот гетеродимер может связываться с молекулами МНС, презентующими пептид.

Термин «*переменная α область TCR*» или «*переменная α цепь TCR*» или «*переменный домен*» в контексте изобретения относится к переменной области α цепи TCR. Термин «*переменная β область TCR*» или «*переменная β цепь TCR*» в контексте изобретения относится к переменной области TCR β цепи.

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

Мишень

Мишенью для описанного в настоящем документе TCR является MAGEA1 (эталонная последовательность NCBI: NM_004988.4)-производный пептид KVL (SEQ ID NO:1).

TCR специфическая последовательность

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

- α цепь TCR содержит определяющую комплементарность область 3 (CDR3), имеющую последовательность SEQ ID NO:4,

- β цепь TCR содержит CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7.

Конкретные варианты осуществления относятся к выделенному TCR, содержащему:

- α цепь TCR, содержащую CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, CDR 2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3, и CDR 3, имеющую последовательность SEQ ID NO:4.

- β цепь TCR, содержащая CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, CDR 2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, и CDR 3, имеющую последовательность SEQ ID NO:7.

В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит вариабельную α область TCR с аминокислотной последовательностью, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% идентична SEQ ID NO:8, и вариабельную TCR β область с аминокислотной последовательностью, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO:9.

Предпочтительный вариант осуществления относится к TCR, содержащему вариабельную α область TCR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8, и вариабельную β область TCR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9.

TCR, происходящий из клона Т-клеток T15.8-4.3-83, который в его трансгенной форме используют в примерах, содержит TCR α цепь, содержащую определяющую комплементарность область 3 (CDR3), имеющую последовательность SEQ ID NO:4, и TCR β цепь, содержащую CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7. В частности, TCR по изобретению содержит вариабельную TCR α область с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8, и вариабельную TCR β область с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9.

Как видно из примеров, TCR по изобретению являются специфичными в отношении MAGEA1 и демонстрируют только очень низкую перекрестную реактивность по отношению к другим эпитопам или антигенам.

Другие варианты осуществления относятся к выделенному TCR, содержащему TCR α цепь с аминокислотной последовательностью, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, на 98%, по меньшей мере, на 99% идентична SEQ ID NO:10, и TCR β цепь с аминокислотной последовательностью, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO:11.

Конкретные варианты осуществления относятся к TCR, содержащему TCR α цепь с

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:10, и TCR β цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11. Таким образом, описанный в настоящем документе TCR, специфичный в отношении комплексу HLA-A*02:01 с пептидом MAGEA1, имеющим SEQ ID NO:1, содержит V α цепь, кодированную TRAV19*01 геном, и V β ген, кодированный TRAV30*01 геном.

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

- варибельная TCR α область имеет аминокислотную последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO:8, и содержит CDR3 область, указанную в SEQ ID NO:3;

- варибельная TCR β область имеет аминокислотную последовательность, которая на, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO:9, и содержит CDR3 область, указанную в SEQ ID NO:7.

Определение доли идентичности между множественными последовательностями предпочтительно проводят с использованием приложения AlignX программы Vector NTI Advance™ 10 (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, USA). Эта программа использует модифицированный алгоритм Clustal W (Thompson et al., 1994. Nucl Acids Res. 22: pp. 4673-4680; Invitrogen Corporation; Vector NTI Advance™ 10 DNA and protein sequence analysis software. User's Manual, 2004, pp.389-662). Определение доли идентичности выполняют со стандартными параметрами приложения AlignX.

TCR по изобретению выделяют или очищают. «Выделенный» в контексте изобретения означает, что TCR не присутствует в контексте, в котором он первоначально существует в природе. «Очищенный» в контексте изобретения означает, например, что TCR не содержит по существу не содержит другие белки и не белковые части клетки, из которой он происходит.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотная последовательность TCR может содержать одну или несколько фенотипически молчащих замен.

«Фенотипически молчащие замены» также называются «консервативными аминокислотными заменами». Концепция «консервативных аминокислотных замен» понятна специалисту в данной области техники и предпочтительно означает, что кодоны, кодирующие положительно заряженные остатки (H, K и R), заменены кодонами, кодирующими положительно заряженные остатки, кодонами, кодирующими отрицательно заряженные остатки (D и E), заменены кодонами, кодирующими отрицательно заряженные остатки, кодонами, кодирующими нейтральные полярные остатки (C, G, N, Q, S, T и Y) заменены кодонами, кодирующими нейтральные полярные остатки, а кодонами, кодирующими нейтральные не полярные остатки (A, F, I, L, M, P, V и W), заменены

кодонами, кодирующими нейтральные не полярные остатки. Эти варианты могут возникать спонтанно, могут быть введены случайным мутагенезом или могут быть введены направленным мутагенезом. Эти изменения могут быть выполнены без нарушения основных характеристик этих полипептидов. Специалист в данной области техники может легко и обычно провести скрининг вариантов аминокислот и/или кодирующих их нуклеиновых кислот, чтобы определить, могут ли эти варианты по существу снижать или разрушать способность связывания лиганда, способами, известными в данной области техники.

Специалист в данной области техники поймет, что также может быть модифицирована нуклеиновая кислота, кодирующая TCR. Полезные модификации общей последовательности нуклеиновой кислоты включают оптимизацию кодона последовательности. Могут быть внесены изменения, которые приводят к консервативным заменам в экспрессированной аминокислотной последовательности. Эти изменения могут быть сделаны в определяющих комплементарность и не определяющих комплементарность областях аминокислотной последовательности цепи TCR, которые не влияют на функцию. Обычно добавления и делеции не должны выполняться в CDR3 области.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения аминокислотная последовательность TCR модифицирована, чтобы включать определяемую метку, терапевтический агент или модифицирующую фармакокинетику группу.

Неограничивающими примерами определяемых меток являются радиоактивные метки, флуоресцентные метки, зонды на основе нуклеиновых кислот, ферменты и контрастные реагенты. Терапевтические агенты, которые могут быть ассоциированы с TCR, включают радиоактивные соединения, иммуномодуляторы, ферменты или химиотерапевтические агенты. Терапевтические агенты могут быть заключены в липосомы, связанные с TCR, так что соединение может медленно высвободиться в сайте-мишени. Это позволит избежать повреждения во время транспортировки в организме и гарантирует, что терапевтический агент, например токсин, будет иметь максимальный эффект после связывания TCR с соответствующими антигенпрезентирующими клетками. Другими примерами терапевтических агентов являются:

пептидные цитотоксины, т.е. белки или пептиды, способные убивать клетки млекопитающих, такие как рицин, дифтерийный токсин, псевдомонадный бактериальный экзотоксин А, ДНКаза и РНКаза. Низкомолекулярные цитотоксические агенты, т.е. соединения со способностью убивать клетки млекопитающих, имеющие молекулярную массу менее 700 Дальтон. Такие соединения могут содержать токсичные металлы, способные оказывать цитотоксическое действие. Кроме того, следует понимать, что эти низкомолекулярные цитотоксические агенты также включают пролекарства, т.е. соединения, которые распадаются или превращаются в физиологических условиях с высвобождением цитотоксических агентов. Такие агенты могут, например, включать

доцетаксел, гемцитабин, цисплатин, производные майтанзина, рахелмицин, калихеамицин, этопозид, ифосфамид, иринотекан, порфимер натрия, фотофрин II, темозоломид, топотекан, триметрексат, глюкуронат, митоксантрон, ауристатин E, винкристин и доксорубицин; радионуклиды, такие как йод 131, рений 186, индий 111, иттрий 90, висмут 210 и 213, актиний 225 и астатин 213. Ассоциация радионуклидов с TCR или их производными может, например, осуществляться с помощью хелатирующих агентов; иммуностимуляторов, также известные как иммуностимуляторы, т.е. иммунных эффекторных молекул, которые стимулируют иммунный ответ. Типовыми иммуностимуляторами являются цитокины, такие как IL-2 и IFN- γ , антитела или их фрагменты, включая детерминантные антитела против T-клеток или NK-клеток (например, анти-CD3, анти-CD28 или анти-CD16); альтернативные белковые каркасы с антителоподобными характеристиками связывания; суперантигены, т.е. антигены, которые вызывают неспецифическую активацию T-клеток, приводящую к активации поликлональных T-клеток и массивному высвобождению цитокинов, и их мутанты; хемокины, такие как IL-8, фактор тромбоцитов 4, белок, стимулирующий рост меланомы, и т.д., активаторы комплемента; ксеногенные белковые домены, аллогенные белковые домены, вирусные/бактериальные белковые домены, вирусные/бактериальные пептиды.

Молекулы антигенного рецептора (молекулы T-клеточного рецептора) на T-лимфоцитах человека нековалентно связаны с молекулярным комплексом CD3 (T3) на поверхности клетки. Нарушение этого комплекса анти-CD3 моноклональными антителами вызывает активацию T-клеток. Таким образом, некоторые варианты осуществления относятся к описанному в настоящем документе TCR, связанному (обычно путем слияния с N- или C-концом альфа- или бета цепи) с анти-CD3 антителом или функциональным фрагментом или вариантом указанного анти-CD3 антитела. Фрагменты и варианты/аналоги антител, которые подходят для использования в композициях и способах, описанных в настоящем документе, включают минитела, Fab фрагменты, F(ab')₂ фрагменты, dsFv и scFv фрагменты, Nanobodies™ (Ablynx (Belgium), молекулы, содержащие синтетический одиночный иммуноглобулиновый домен переменной тяжелой цепи, полученный из антитела верблюжьих (например, верблюда или ламы)) и Domain Antibodies (включающих одиночный иммуноглобулиновый домен переменной тяжелой цепи с созревшей аффинностью или иммуноглобулиновый домен переменной легкой цепи (Domantis (Belgium)) или альтернативные белковые каркасы, которые проявляют антителоподобные характеристики связывания, такие как Affibodies (содержащие сконструированный каркас белка A Affibody (Швеция)) или Anticalins (включая сконструированные антикалины Pieris (German)).

Терапевтический агент предпочтительно может быть выбран из группы, состоящей из иммунной эффекторной молекулы, цитотоксического агента и радионуклида. Предпочтительно, иммунной эффекторной молекулой является цитокин.

Группой, модифицирующей фармакокинетику, является, например, по меньшей мере, одна повторяющаяся единица полиэтиленгликоля, по меньшей мере, одна

гликолевая группа, по меньшей мере, одна сиалильная группа или их комбинация. Объединение по меньшей мере, одной повторяющейся единицы полиэтиленгликоля, по меньшей мере, одной гликолевой группы, по меньшей мере, одной сиалильной группы может быть проведено рядом способов, известных специалистам в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления, единицы ковалентно связаны с TCR. TCR по изобретению могут быть модифицированы одним или несколькими группами, модифицирующими фармакокинетику. В частности, растворимая форма TCR модифицирована одним или несколькими группами, модифицирующими фармакокинетику. Группа, модифицирующая фармакокинетику, может вызвать полезные изменения фармакокинетического профиля терапевтического агента, например улучшить период полужизни в плазме, снижать или повышать иммуногенность и улучшать растворимость.

TCR по изобретению может быть растворимым или мембраносвязанным. Термин «растворимый» относится к TCR, находящемуся в растворимой форме (т.е. не имеющему трансмембранных или цитоплазматических доменов), например, для использования в качестве таргетного агента для доставки терапевтических агентов к антигенпрезентирующей клетке. Для стабильности растворимые $\alpha\beta$ гетеродимерные TCR предпочтительно имеют введенную дисульфидную связь между остатками соответствующих константных доменов, как описано, например, в WO 03/020763. Один или оба константных домена, присутствующих в $\alpha\beta$ гетеродимере по настоящему изобретению, могут быть усечены на C-конце или C-концах, например, до 15, или до 10, или до 8, или меньше аминокислот. Для использования в адоптивной терапии, $\alpha\beta$ гетеродимерный TCR может быть, например, трансфицирован в виде полноразмерных цепей, имеющих как цитоплазматические, так и трансмембранные домены. TCR могут содержать дисульфидную связь, соответствующую той, которая встречается в природе, между соответствующими альфа и бета константными доменами, дополнительно или альтернативно может присутствовать не нативная дисульфидная связь.

Таким образом, TCR, в частности растворимая форма TCR по настоящему изобретению, может быть модифицирован присоединением дополнительных функциональных групп, например, для снижения иммуногенности, увеличения гидродинамического размера (размера в растворе), растворимости и/или стабильности (например, усиления защиты от протеолитического разложения) и/или продления периода полужизни в сыворотке.

Другие полезные функциональные группы и модификации включают «суицидные» или «переключатели безопасности», которые можно использовать для выключения эффекторных клеток-хозяев, несущих TCR по изобретению в организме пациента. Примером является индуцируемый каспазой 9 (iCasp9) «переключатель безопасности», описанный Gargett and Brown *Front Pharmacol.* 2014; 5: 235. Коротко, эффекторные клетки-хозяева модифицированы хорошо известными способами для экспрессии домена каспазы 9, димеризация которого зависит от низкомолекулярного димеризатора, такого как

AP1903/CIP, и приводит к быстрой индукции апоптоза в модифицированных эффекторных клетках. Система описана, например, в EP2173869 (A2). Примеры других «суицидных» «переключателей безопасности» известны в данной области техники, например, тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV-TK), экспрессия CD20 и последующее истощение с использованием анти-CD20 антитела или метки myc (Kieback et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jan 15;105(2):623-8).

В настоящем документе также предусмотрены TCR с измененным профилем гликозилирования. Как известно в данной области техники, профили гликозилирования могут зависеть от аминокислотной последовательности (например, присутствия или отсутствия определенных аминокислотных остатков гликозилирования, обсуждаемых ниже) и/или клетки-хозяина или организма, в котором продуцируется белок. Гликозилирование полипептидов обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанный относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи остатка аспарагина. Добавление N-связанных сайтов гликозилирования к связывающей молекуле обычно осуществляют изменением аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько трипептидных последовательностей, выбранных из аспарагин-X-серина и аспарагин-X-треонина (где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина). O-связанные сайты гликозилирования могут быть введены добавлением или заменой одного или нескольких остатков серина или треонина в исходной последовательности.

Другим способом гликозилирования TCR является химическое или ферментативное связывание гликозидов с белком. В зависимости от используемого способа связывания сахар может быть присоединен к (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (в) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (г) свободным гидроксильным группам, таким как остатки серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Точно так же дегликозилирование (т.е. удаление углеводных групп, присутствующих в связывающей молекуле) может осуществляться химически, например, подвергая TCR воздействию трифторметансульфоновой кислоты, или ферментативно, используя эндо- и экзогликозидазы.

Также возможно добавление лекарственного средства, такого как низкомолекулярное соединение, к TCR, в частности, к растворимой форме TCR по изобретению. Связывание может быть проведено через ковалентные связи или не ковалентные взаимодействия, такие как электростатические силы. Для образования конъюгатов лекарственных средств могут применяться различные линкеры, известные в данной области техники.

TCR, в частности растворимая форма TCR по изобретению, может быть дополнительно модифицирован для введения дополнительных доменов, которые помогают в идентификации, отслеживании, очистке и/или выделении соответствующей

молекулы (меток). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, TCR α цепь или TCR β цепь может быть модифицирована для включения эпитопной метки.

Эпитопные метки являются полезными примерами меток, которые могут быть включены в TCR по настоящему изобретению. Эпитопными метками являются короткие отрезки аминокислот, которые позволяют связываться с конкретным антителом и, следовательно, позволяют идентифицировать и отслеживать связывание и перемещение растворимых TCR или клеток-хозяев в организме пациента или культивируемых клетках (хозяевах). Определение эпитопной метки и, следовательно, меченого TCR может быть достигнуто с использованием ряда различных методов.

Метки могут быть дополнительно использованы для стимуляции и размножения клеток-хозяев, несущих TCR по изобретению, путем культивирования клеток в присутствии связывающих молекул (антител), специфических для указанной метки.

В общем, в некоторых случаях TCR может быть модифицирован с помощью различных мутаций, которые модифицируют аффинность и скорость диссоциации TCR с антигеном-мишенью. В частности, мутации могут увеличивать аффинность и/или снижать скорость диссоциации. Таким образом, TCR может быть мутирован по меньшей мере, в одном CDR и его каркасной области варибельного домена.

Однако в предпочтительном варианте осуществления, CDR области TCR не модифицированы или не являются аффинно зрелыми *in vitro*, как, например, для рецепторов TCR в примерах. Это означает, что CDR области имеют природные последовательности. Это может быть выгодно, поскольку созревание аффинности *in vitro* может привести к иммуногенности молекулы TCR. Это может привести к продуцированию антител к лекарственным средствам, уменьшающих или инактивирующих терапевтический эффект и лечение, и/или вызывающих побочные эффекты.

Мутацией может быть одна или несколько замен, делеций или вставок. Эти мутации могут быть введены любым подходящим способом, известным в данной области техники, таким как полимеразная цепная реакция, клонирование на основе рестрикционных ферментов, процедуры клонирования, не зависящие от лигирования, которые описаны, например, в Sambrook, *Molecular Cloning - 4th Edition* (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Теоретически, непредсказуемая специфичность TCR с риском перекрестной реактивности может возникать из-за ошибочного спаривания между эндогенными и экзогенными цепями TCR. Чтобы избежать ошибочного спаривания последовательностей TCR, рекомбинантная последовательность TCR может быть модифицирована, чтобы содержать минимальные мураинизированные C α и C β области, технология, которая, как было показано, эффективно улучшает правильное спаривание нескольких различных трансдуцированных цепей TCR. Мураинизация TCR (т.е. замена константных областей человека в альфа и бета цепи их аналогами от мышей) является методикой, которая обычно применяется для улучшения экспрессии TCR на клеточной поверхности в

клетках-хозяевах. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, считается, что муринизированные TCR более эффективно связываются с CD3 корцепторами; и/или предпочтительно спариваются друг с другом и менее склонны к образованию смешанных TCR на T-клетках человека, генетически модифицированных *ex vivo* для экспрессии TCR с желаемой антигенной специфичностью, но все же сохраняющих и экспрессирующих свои «исходные» TCR.

Было идентифицировано девять аминокислот, ответственных за улучшенную экспрессию муринизированных TCR (Sommermeier and Uckert, *J Immunol.* 2010 Jun 1; 184(11):6223-31), и предполагается заменить один или все аминокислотные остатки в константной области альфа и/или бета цепи TCR на соответствующие остатки мыши. Этот метод также называется «минимальной муринизацией» и предлагает преимущество повышения экспрессии на клеточной поверхности при одновременном снижении количества «чужеродных» аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности и, следовательно, риска иммуногенности.

Некоторые варианты осуществления относятся к выделенному TCR, как описано в настоящем документе, где TCR относится к одноцепочечному типу, где TCR α цепь и TCR β цепь связаны линкерной последовательностью.

Подходящая одноцепочечная форма TCR содержит первый сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей вариабельной TCR α области, второй сегмент, образованный аминокислотной последовательностью, соответствующей вариабельной TCR β области, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области TCR β цепи, и линкерной последовательности, связывающей C-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента. Альтернативно, первый сегмент может состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей вариабельной области TCR β цепи, второй сегмент может состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей последовательности вариабельной области TCR α цепи, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области TCR α цепи. Вышеупомянутые одноцепочечные TCR могут дополнительно содержать дисульфидную связь между первой и второй цепями, и при этом длина линкерной последовательности и положение дисульфидной связи таковы, что последовательности вариабельных доменов первого и второго сегментов по существу взаимно ориентированы, как в природных рецепторах T-клеток. Более конкретно, первый сегмент может состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей последовательности вариабельной области TCR α цепи, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области TCR α цепи, второй сегмент может состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей вариабельной области TCR β цепи, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области TCR β цепи, и между первой и

второй цепями может быть предусмотрена дисульфидная связь. Линкерная последовательность может быть любой последовательностью, которая не нарушает функции TCR.

В контексте настоящего изобретения «функциональный» белок слияния TCR α и/или β цепи должен означать TCR или вариант TCR, например, модифицированный добавлением, делецией или заменой аминокислот, который сохраняет, по меньшей мере, существенную биологическую активность. В случае TCR α и/или β цепи это должно означать, что обе цепи сохраняют способность образовывать T-клеточный рецептор (либо с не модифицированной α и/или β цепью, либо с α и/или β цепью другого слитого белка по изобретению), который выполняет свою биологическую функцию, в частности связывание со специфическим комплексом пептид-MHC указанного TCR, и/или функциональную трансдукцию сигнала при взаимодействии специфический пептид:MHC.

В конкретных вариантах осуществления, TCR может быть модифицирован так, чтобы стать функциональным белком слияния α и/или β цепи функционального T-клеточного рецептора (TCR), где указанный эпитоп-метка имеет длину от 6 до 15 аминокислот, предпочтительно от 9 до 11 аминокислот. В другом варианте осуществления, TCR может быть модифицирован так, чтобы стать функциональным белком слияния α и/или β цепи функционального T-клеточного рецептора (TCR), где указанный слитый белок α и/или β цепи T-клеточного рецептора (TCR) содержит две или несколько эпитопных меток, расположенных на расстоянии друг от друга или непосредственно в тандеме. Варианты осуществления слитого белка могут содержать 2, 3, 4, 5 или даже больше эпитопных меток, пока слитый белок сохраняет свою биологическую активность/активности («функциональные»).

Предпочтительным является функциональный белок слияния α и/или β цепи функционального T-клеточного рецептора (TCR) в соответствии с настоящим изобретением, где указанная эпитопная метка выбрана, но не ограничивается ими, из меток CD20 или Her2/neu или других обычных меток, таких как мус-метка, FLAG-метка, T7-метка, HA (гемагглютининовая)-метка, His-метка, S-метка, GST-метка или GFP-метка. Метки мус, T7, GST, GFP являются эпитопами, полученными из существующих молекул. Напротив, FLAG является синтетической эпитопной меткой, сконструированной для обеспечения высокой антигенности (см., например, патенты США №№ 4,703,004 и 4,851,341). Метка мус предпочтительно может быть использована, так как для ее определения доступны высококачественные реагенты. Эпитопные метки, конечно, могут иметь одну или несколько дополнительных функций, не распознаваемых антителом. Последовательности этих меток описаны в литературе и хорошо известны специалистам в данной области техники.

Варианты TCR

Другой аспект изобретения относится к полипептиду, содержащему функциональную часть TCR, как описано в настоящем документе, где функциональная часть содержит, по меньшей мере, одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID

NO:4 и 7.

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

В одном варианте осуществления, функциональная часть содержит переменную цепь TCR α и/или переменную цепь TCR β , как описано в настоящем документе.

Вариант молекулы TCR может обладать связывающими свойствами рецептора TCR, но может быть объединен с сигнальными доменами эффекторных клеток (кроме Т-клеток), в частности с сигнальными доменами NK клеток. Следовательно, некоторые варианты осуществления относятся к белку, содержащему функциональную часть TCR, как описано в настоящем документе, в комбинации с сигнальными доменами эффекторной клетки, такой как NK клетка.

Другой аспект изобретения относится к поливалентному комплексу TCR, содержащему, по меньшей мере, два TCR, как описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления этого аспекта, по меньшей мере, две молекулы TCR связаны через линкерные группы с образованием поливалентных комплексов. Предпочтительно, комплексы являются водорастворимыми, поэтому линкерную группу следует выбирать соответственно. Предпочтительно, чтобы линкерная группа была способна присоединяться к определенным положениям на молекулах TCR, так что структурное разнообразие образующихся комплексов сводится к минимуму. Один вариант осуществления настоящего аспекта обеспечивается комплексом TCR по изобретению, в котором последовательность полимерной цепи или пептидного линкера находится между аминокислотными остатками каждого TCR, которые не расположены в последовательности переменной области TCR. Поскольку комплексы по изобретению могут использоваться в медицине, линкерные группы следует выбирать с учетом их фармацевтической пригодности, например их иммуногенности. Примеры линкерных групп, которые удовлетворяют указанным выше желаемым критериям, известны в данной области техники, например в области связывания фрагментов антител.

Примерами линкеров являются гидрофильные полимеры и пептидные линкеры. Примерами гидрофильных полимеров являются полиалкиленгликоли. Чаще всего используемые представители этого класса основаны на полиэтиленгликоле или ПЭГ. Однако, другие основаны на других подходящих, необязательно замещенных полиалкиленгликолях, которые включают полипропиленгликоль и сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля. Пептидные линкеры состоят из цепочек аминокислот, и их функцией является продуцирование простых линкеров или доменов мультимеризации, к которым могут быть прикреплены молекулы TCR.

Один вариант осуществления относится к поливалентному комплексу TCR, где, по меньшей мере, один из указанных TCR связан с терапевтическим агентом.

Высвобождение цитокинов и хемокинов

Некоторые варианты осуществления относятся к выделенному TCR, как описано в настоящем документе, полипептиду, как описано в настоящем документе,

поливалентному комплексу TCR, как описано в настоящем документе, где секреция IFN- γ индуцируется связыванием TCR по изобретению, экспрессированным на эффекторной клетке, со связанной формой HLA-A*02 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1.

Секреция IFN- γ , индуцированная связыванием TCR по изобретению, экспрессированного на эффекторной клетке, со связанной формой HLA-A*02 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, может составлять более 500 пг/мл, например, более 1000 пг/мл, более 2000 пг/мл, более предпочтительно, более 4000 пг/мл, наиболее предпочтительно, даже более 6000 пг/мл. Секреция IFN- γ может быть, по меньшей мере, в 5 раз выше при связывании со связанной формой HLA-A*02 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 по сравнению со связыванием со связанной формой HLA-A*02 нерелевантного пептида (например, SEQ ID №: 28).

«Эффекторной клеткой» может быть лимфоцит периферической крови (PBL) или мононуклеарная клетка периферической крови (PBMC). Обычно, эффекторной клеткой является иммунная эффекторная клетка, особенно Т-клетка. Другие подходящие типы клеток включают гамма-дельта Т-клетки и NK-подобные Т-клетки.

Изобретение также относится к способам идентификации TCR или его фрагмента, который связывается с целевой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1 или HLA-A*02, предпочтительно, или его связанной формой HLA-A*02:01, где способ включает контакт кандидатного TCR или его фрагмента с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:1 или HLA-A*02, предпочтительно, или его связанной формой HLA-A*02:01, и определение того, связывается ли кандидатный TCR или его фрагмент с мишенью и/или опосредует иммунный ответ.

Опосредует ли кандидатный TCR или его фрагмент иммунный ответ, можно определить, например, через измерение секреции цитокинов, такой как секреция IFN- γ . Как описано выше, секреция цитокина может быть измерена с помощью анализа *in vitro*, в котором клетки K562 (или другие APC), трансфицированные *in vitro* ПНК, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, инкубируют с обогащенными CD8+ PBMC, экспрессирующими TCR, или молекулой, содержащей фрагмент TCR, подлежащий исследованию.

В конкретном варианте осуществления, TCR по изобретению не показывает значительной секреции цитокинов Th2 IL-4, IL-5 и IL-13. Это может быть выгодно, поскольку ответ цитокинов Th2 может увеличивать прогрессирование опухоли (Jager MJ, Desjardins L, Kivelä T, Damato BE (eds): *Current Concepts in Uveal Melanoma*. Dev Ophthalmol. Basel, Karger, 2012, vol 49, pp 137-149, J Immunother. 2018 Oct;41(8):369-378).

Нуклеиновые кислоты, векторы

Другой аспект изобретения относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей TCR, как описано в настоящем документе, или кодирующей полинуклеотид, кодирующий TCR, как описано в настоящем документе.

Пептидная последовательность SEQ ID NO	Нуклеотидная последовательность SEQ ID NO	Описание
2	14	CDR1 TCR α цепи
3	15	CDR2 TCR α цепи
4	16	CDR3 TCR α цепи
5	17	CDR1 TCR β цепи
6	18	CDR2 TCR β цепи
7	19	CDR3 TCR β цепи
8	20	Вариабельная область TCR α цепи
9	21	Вариабельная область TCR β цепи
10	22	Полная TCR α цепь (минимально муринализованная константная область)
11	23	Полная TCR β цепь (минимально муринализованная константная область)
12	24	Полная TCR α цепь (константная область мыши)
13	25	Полная TCR β цепь (константная область мыши)

«Молекула нуклеиновой кислоты» обычно означает полимер ДНК или РНК, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным, синтезированным или полученным (например, выделенным и/или очищенным) из природных источников, которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды, и которые могут содержать природную, неприродную или измененную межнуклеотидную связь, такую как фосфоамидатная связь или фосфоротиоатная связь, вместо фосфодизфира, найденного между нуклеотидами не модифицированного олигонуклеотида. Предпочтительно, описанные в настоящем документе нуклеиновые кислоты являются рекомбинантными. Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантная» относится к (i) молекулам, которые сконструированы вне живых клеток путем присоединения сегментов природных или синтетических нуклеиновых кислот к молекулам нуклеиновых кислот, которые могут реплицироваться в живой клетке, или (ii) молекулам, которые являются результатом репликации из тех, что описаны в пункте (i) выше. Для целей настоящего описания, репликацией может быть репликация *in vitro* или репликация *in vivo*. Нуклеиновые кислоты могут быть сконструированы на основе химического синтеза и/или реакций ферментативного лигирования с использованием процедур, известных в данной области техники, или коммерчески доступных (например, от Genscript, Thermo Fisher и подобных компаний). См., например,

Sambrook et al. например, нуклеиновая кислота может быть химически синтезирована с использованием встречающихся в природе нуклеотидов или различным образом модифицированных нуклеотидов, сконструированных для увеличения биологической стабильности молекул или для увеличения физической стабильности дуплекса, образующегося при гибридизации (например, производных фосфоротиоата и нуклеотидов, замещенных акридином). Нуклеиновая кислота может содержать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует любой из рекомбинантных TCR, полипептидов или белков, или их функциональные части или функциональные варианты.

В настоящем описании также представлены варианты выделенных или очищенных нуклеиновых кислот, где варианты нуклеиновых кислот содержат нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с нуклеотидной последовательностью, кодирующей описанный в настоящем документе TCR. Такая вариантная нуклеотидная последовательность кодирует функциональный TCR, который специфически распознает MAGEA1.

Описание также представляет выделенную или очищенную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности любой из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, или нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе.

Нуклеотидная последовательность, которая гибридизуется в жестких условиях, предпочтительно гибридизуется в условиях высокой жесткости. Под «условиями высокой жесткости» подразумевается, что нуклеотидная последовательность специфически гибридизуется с последовательностью-мишенью (нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе) в количестве, которое определяемо сильнее, чем неспецифическая гибридизация. Условия высокой жесткости включают условия, которые позволяют отличить полинуклеотид с точной комплементарной последовательностью, или таковой, содержащий только несколько разбросанных ошибочных спариваний из случайной последовательности, которая, как оказалось, имеет несколько небольших областей (например, 3-10 оснований), которые соответствуют нуклеотидной последовательности. Такие небольшие области комплементарности легче расплавляются, чем полноразмерный комплемент из 14-17 или более оснований, и гибридизация с высокой жесткостью делает их легко различимыми. Условия относительно высокой жесткости будут включать, например, условия с низким содержанием соли и/или высокой температурой, такие, которые обеспечиваются примерно 0,02-0,1 М NaCl или эквивалентом, при температурах примерно 50-70°C. Такие условия высокой жесткости допускают мало, если вообще допускают, ошибок спаривания между нуклеотидной последовательностью и матрицей или цепью-мишенью, и они особенно подходят для определения экспрессии любого из TCR, описанных в настоящем

документе. Обычно считается, что условия можно сделать более жесткими путем добавления возрастающих количеств формамида.

Как уже описано в другом месте в настоящем документе, нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, может быть модифицирована. Полезные модификации общей последовательности нуклеиновой кислоты могут включать оптимизацию кодона. Могут быть сделаны изменения, которые приводят к консервативным заменам в экспрессированной аминокислотной последовательности. Эти изменения могут быть сделаны в определяющих комплементарность и не определяющих комплементарность областях аминокислотной последовательности цепи TCR, которые не влияют на функцию. Обычно добавления и делеции не должны проводиться в области CDR3.

Другой вариант осуществления относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, как описано в настоящем документе.

Вектором предпочтительно является плазида, челночный вектор, фагмид, космиду, вектор экспрессии, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор или частицу и/или вектор для использования в генной терапии.

«Вектором» является любая молекула или композиция, которая обладает способностью переносить последовательность нуклеиновой кислоты в подходящую клетку-хозяин, где может происходить синтез кодированного полипептида. Обычно и предпочтительно, вектором является нуклеиновая кислота, которая сконструирована с использованием методов рекомбинантной ДНК, которые известны в данной области техники, для включения желаемой последовательности нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновой кислоты по изобретению). Вектор может содержать ДНК или РНК и/или липосомы. Вектор может быть плазмидой, челночным вектором, фагмидом, космидой, вектором экспрессии, ретровирусным вектором, лентивирусным вектором, аденовирусным вектором или частицей и/или вектором для использования в генной терапии. Вектор может включать последовательности нуклеиновых кислот, которые позволяют ему реплицироваться в клетке-хозяине, такие как точка начала репликации. Вектор также может включать один или несколько селективных маркерных генов и других генетических элементов, известных специалистам в данной области техники. Вектором предпочтительно является вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, функционально связанную с последовательностями, обеспечивающими экспрессию указанной нуклеиновой кислоты.

Предпочтительно, вектором является вектор экспрессии. Более предпочтительно, вектором является ретровирусный вектор, более конкретно, гамма-ретровирусный или лентивирусный вектор.

Клетки, клеточные линии

Другой аспект изобретения относится к клетке, экспрессирующей TCR, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, клетка является выделенной или не встречающейся в природе.

В конкретных вариантах осуществления, клетка может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, как описано в настоящем документе, или вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту.

В клетку может быть введен описанный выше вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный выше TCR, или может быть введена *in vitro* РНК, кодирующая указанный TCR. Клетка может быть лимфоцитом периферической крови, например Т-клеткой. Способ клонирования и экзогенной экспрессии TCR описан, например, в Engels et al. (Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity. *Cancer Cell*, 23(4), 516-26. 2013). Трансдукция первичных Т-клеток человека лентивирусным вектором описана, например, в Cribbs “simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells” *BMC Biotechnol.* 2013; 13: 98.

Термины «трансфекция» и «трансдукция» взаимозаменяемы и относятся к процессу, посредством которого последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты вводят в клетку-хозяин, например, в эукариотическую клетку-хозяин. Следует отметить, что введение или перенос последовательностей нуклеиновых кислот не ограничиваются указанными способами, но может быть проведен с помощью любого количества средств, включая электропорацию, микроинъекцию, доставку геной пушкой, липофекцию, суперфекцию и упомянутую инфекцию ретровирусами или другими подходящими вирусами для трансдукции или трансфекции.

Некоторые варианты осуществления относятся к клетке, содержащей:

- a) вектор экспрессии, который содержит, по меньшей мере, одну нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе, или
- b) первый вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа цепь TCR, как описано в настоящем документе, и второй вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую бета цепь TCR, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, клеткой является лимфоцит периферической крови (PBL) или моноклеарная клетка периферической крови (PBMC). Клетка может быть естественной клеткой-киллером или Т-клеткой. Предпочтительно, клеткой является Т-клетка. Т-клетка может быть CD4+ или CD8+ Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления, клеткой является Т-клетка памяти, подобная стволовой клетке.

Т-клетки памяти, подобные стволовой клетке (TSCM), являются менее дифференцированной субпопуляцией CD8+ или CD4+ Т-клеток, которые характеризуются способностью к самообновлению и сохранению в течение длительного времени. Как только эти клетки сталкиваются со своим антигеном *in vivo*, они дифференцируются дальше в центральные Т-клетки памяти (TCM), эффекторные Т-клетки памяти (TEM) и терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти (TEMRA), при этом некоторое количество TSCM остается в состоянии покоя (Flynn et al., *Clinical & Translational Immunology* (2014). Эти оставшиеся клетки TSCM демонстрируют

способность создавать прочную иммунологическую память *in vivo* и поэтому считаются важной субпопуляцией Т-клеток для адоптивной Т-клеточной терапии (Lugli et al., Nature Protocols 8, 33-42 (2013) Gattinoni et al., Nat. Med. 2011 Oct; 17(10): 1290-1297). Иммуномагнитная селекция может применяться для ограничения пула Т-клеток только подтипом стволовых клеток Т-клеток памяти (см. Riddell et al. 2014, Cancer Journal 20(2): 141-44)

Антитела, таргетирующие TCR

Другой аспект изобретения относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающемуся с частью TCR, как описано в настоящем документе, которая опосредует специфичность к MAGEA1. В одном варианте осуществления, часть TCR, которая опосредует специфичность MAGEA1, содержит CDR3 альфа цепи SEQ ID NO:4 и/или CDR3 бета цепи SEQ ID NO:7.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут модулировать активность TCR. Оно может блокировать или не блокировать связывание TCR с MAGEA1. Его можно использовать для регулирования терапевтической активности TCR или в диагностических целях.

Фармацевтические композиции, терапевтическое лечение и наборы

Другой аспект изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей TCR, как описано в настоящем документе, полипептид, содержащий функциональную часть указанного TCR, поливалентный комплекс TCR, как описано в настоящем документе, нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, клетку содержащий указанный TCR, или антитело, специфически связывающееся с частью TCR, как описано в настоящем документе.

Эти активные компоненты настоящего изобретения предпочтительно используют в такой фармацевтической композиции в дозах, смешанных с приемлемым носителем или материалом носителя, чтобы заболевание можно было лечить или, по меньшей мере, облегчить. Такая композиция может (в дополнение к активному компоненту и носителю) включать наполнитель, соли, буфер, стабилизаторы, солюбилизаторы и другие материалы, которые являются известным уровнем техники.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает нетоксичный материал, который не влияет на эффективность биологической активности активного компонента. Выбор носителя зависит от применения.

Фармацевтическая композиция может содержать дополнительные компоненты, которые усиливают активность активного компонента или дополняют лечение. Такие дополнительные компоненты и/или факторы могут быть частью фармацевтической композиции для достижения синергетических эффектов или для минимизации неблагоприятных или нежелательных эффектов.

Методики составления или приготовления и применения/лечения активными компонентами настоящего изобретения опубликованы в "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition. Подходящим применением является парентеральное введение, например внутримышечные, подкожные,

интрамедулярные инъекции, а также интратекальные, прямые внутрижелудочковые, внутривенные, интранодальные, внутрибрюшинные или внутриопухолевые инъекции. Внутривенная инъекция является предпочтительным лечением пациента.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, фармацевтическая композиция является инфузией или инъекцией.

Композиция для инъекций представляет собой фармацевтически приемлемую жидкую композицию, содержащую, по меньшей мере, один активный ингредиент, например, размноженную популяцию Т-клеток (например, аутологичных или аллогенных для пациента, подлежащего лечению), экспрессирующих ТCR. Активный ингредиент обычно растворяют или суспендируют в физиологически приемлемом носителе, и композиция может дополнительно содержать незначительные количества одного или нескольких нетоксичных вспомогательных веществ, таких как эмульгирующие агенты, консерванты, буферные агенты pH и подобные. Такие композиции для инъекций, которые можно использовать со слитыми белками по настоящему описанию, являются общепринятыми; соответствующие составы хорошо известны специалистам в данной области техники.

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

Соответственно, другой аспект изобретения относится к ТCR, как описано в настоящем документе, полипептиду, содержащему функциональную часть указанного ТCR, поливалентному комплексу ТCR, как описано в настоящем документе, нуклеиновой кислоте, кодирующей указанный ТCR, вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту, клетке, содержащей указанный ТCR, или антителу, специфически связывающемуся с частью ТCR, как описано в настоящем документе, для использования в качестве лекарственного средства.

Некоторые варианты осуществления относятся к ТCR, как описано в настоящем документе, полипептиду, содержащему функциональную часть указанного ТCR, поливалентному комплексу ТCR в соответствии с описанием в настоящем документе, нуклеиновой кислоте, кодирующей указанный ТCR, вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту, клетке, содержащей указанный ТCR, для использования при лечении рака.

В одном из вариантов осуществления, раком является гематологический рак или солидная опухоль.

Гематологические раки также называют раками крови, которые не образуют солидных опухолей и поэтому рассредоточены по телу. Примерами гематологического рака являются лейкоз, лимфома или множественная миелома. Есть два основных типа солидных опухолей, саркомы и карциномы. Саркомами являются, например, опухоли кровеносных сосудов, костей, жировой ткани, связок, лимфатических сосудов, мышц или сухожилий.

В одном варианте осуществления, рак выбран из группы, состоящей из рака

простаты, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичек, рака почек, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака, карциномы, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, аденокарциномы желудка, холангиокарциномы, рака груди, рака мочевого пузыря, миелолейкоза и острого лимфолейкоза, саркомы или остеосаркомы.

В настоящем документе также рассматриваются фармацевтические композиции и наборы, содержащие один или несколько из (i) выделенного TCR, как описано в настоящем документе; (ii) вирусных частиц, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный TCR; (iii) иммунных клеток, таких как Т-клетки или НК-клетки, модифицированные для экспрессии рекомбинантного TCR, как описано в настоящем документе; (iv) нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный TCR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлены композиции, содержащие лентивирусные векторные частицы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный TCR, описанный в настоящем документе (или Т-клетки, которые были модифицированы с использованием векторных частиц, описанных в настоящем документе, для экспрессии рекомбинантного TCR). Такие композиции можно вводить субъектам способами по настоящему описанию, как описано далее в настоящем документе.

Композиции, содержащие модифицированные Т-клетки, как описано в настоящем документе, могут быть использованы в способах и композициях адоптивной иммунотерапии в соответствии с известными методиками или их вариациями, которые будут очевидны специалистам в данной области техники на основании настоящего описания.

В некоторых вариантах осуществления, клетки готовят, сначала собирая их из культуральной среды, а затем промывая и концентрируя клетки в среде и системе контейнеров, подходящих для введения («фармацевтически приемлемом» носителе), в эффективном для лечения количестве. Подходящей инфузионной средой может быть любой состав изотонической среды, обычно нормальный солевой раствор, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), но также можно использовать 5% декстрозу в воде или лактат Рингера. Инфузионная среда может быть дополнена человеческим сывороточным альбумином.

Количество клеток для эффективного лечения в композиции обычно превышает 10 клеток, и вплоть до 10^6 , вплоть до и включая 10^8 или 10^9 клеток, и может составлять более 10^{10} клеток. Количество клеток будет зависеть от конечного применения, для которого предназначена композиция, а также от типа содержащихся в ней клеток. Для представленных в настоящем документе применений, клетки обычно содержатся в объеме литр или меньше, могут составлять 500 мл или меньше, даже 250 мл или 100 мл или меньше. Следовательно, плотность желаемых клеток обычно больше 10^6 клеток/мл и

обычно больше 10^7 клеток/мл, обычно 10^8 клеток/мл или больше. Клинически значимое количество иммунных клеток может быть разделено на несколько инфузий, которые в совокупности равны или превышают 10^9 , 10^{10} или 10^{11} клеток. Представленные в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть в различных формах, например, в твердой, жидкой, порошковой, водной или лиофилизированной форме. Примеры подходящих фармацевтических носителей известны в данной области техники. Такие носители и/или добавки могут быть составлены обычными способами и могут вводиться субъекту в подходящей дозе. Стабилизирующие агенты, такие как липиды, ингибиторы нуклеаз, полимеры и хелатирующие агенты, могут сохранять композиции от разложения в организме. В композицию, предназначенную для введения инъекцией, может быть включен один или несколько из поверхностно-активного вещества, консерванта, смачивающего агента, диспергирующего агента, суспендирующего агента, буфера, стабилизатора и изотонического агента.

Рекомбинантные TCR, описанные в настоящем документе, или частицы вирусного вектора, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный TCR, представленные в настоящем документе, могут быть упакованы в виде наборов. Наборы могут необязательно включать один или несколько компонентов, таких как инструкции по применению, устройства и дополнительные реагенты, а также компоненты, такие как пробирки, контейнеры и шприцы для практического применения способов. Типовые наборы могут включать нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантные TCR, рекомбинантные полипептиды TCR или вирусы, представленные в настоящем документе, и могут необязательно включать инструкции по применению, устройство для определения вируса у субъекта и устройство для введения композиций субъекту.

В настоящем документе также рассматриваются наборы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие ген, представляющий интерес (например, рекомбинантный TCR). В настоящем документе также рассматриваются наборы, содержащие вирусный вектор, кодирующий последовательность, представляющую интерес (например, рекомбинантный TCR) и, необязательно, полинуклеотидную последовательность, кодирующую ингибитор иммунных контрольных точек.

Рассматриваемые в настоящем документе наборы также включают наборы для проведения способов определения присутствия полинуклеотидов, кодирующих любой один или несколько TCR, описанных в настоящем документе. В частности, такие диагностические наборы могут включать наборы подходящих праймеров для амплификации и определения и другие связанные реагенты для выполнения глубокого секвенирования для определения полинуклеотидов, кодирующих TCR, описанных в настоящем документе. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, наборы могут содержать реагенты для определения описанных в настоящем документе TCR, таких как антитела или другие связывающие молекулы. Диагностические наборы могут также содержать инструкции для определения присутствия полинуклеотидов, кодирующих описанные в настоящем документе TCR, или для

определения присутствия описанных в настоящем документе TCR. В набор также могут входить инструкции. Инструкции обычно включают осязаемое выражение, описывающее компоненты, включенные в набор, и способы введения, включая способы определения надлежащего состояния субъекта, правильного количества дозировки и правильного способа введения. Инструкции могут также включать руководство по наблюдению за субъектом в течение всего времени лечения.

Предлагаемые в настоящем документе наборы также могут включать устройство для введения субъекту композиции, описанной в настоящем документе. Любое из множества устройств, известных в данной области техники для введения лекарственных средств или вакцин, может быть включено в наборы, представленные в настоящем документе. Примеры устройств включают, но не ограничиваются ими, иглу для подкожных инъекций, иглу для внутривенного введения, катетер, безыгольное инъекционное устройство, ингалятор и дозатор жидкости, такой как пипетка. Обычно устройство для введения вируса из набора является совместимым с вирусом из набора; например, безыгольное инъекционное устройство, такое как инъекционное устройство под высоким давлением, может быть включено в наборы с вирусами, не повреждаемыми инъекцией под высоким давлением, но обычно не входит в наборы с вирусами, повреждаемыми инъекцией под высоким давлением.

Предлагаемые в настоящем документе наборы также могут включать устройство для введения соединения, такого как активатор или стимулятор Т-клеток, или агониста TLR, такого как агонист TLR4, субъекту. Любое из множества устройств, известных в данной области техники для введения лекарственных средств субъекту, может быть включено в наборы, представленные в настоящем документе. Примеры устройств включают иглу для подкожных инъекций, иглу для внутривенного введения, катетер, безыгольную инъекцию, но не ограничиваются ими, иглу для подкожных инъекций, иглу для внутривенного введения, катетер, устройство для безыгольной инъекции, ингалятор и дозатор для жидкости, например пипетку. Обычно устройство для введения соединения из набора является совместимым с желаемым способом введения соединения.

Эксперименты

1. Эксперимент: выделение MAGEA1-специфических TCR

Для выделения Т-клеток со специфичностью к MAGEA1-производному эпитопу, и ограничением для любой MHC молекулы, представляющей интерес, используют подход примирования *in vitro*. Система примирования использует зрелые дендритные клетки (mDC) отрицательного донора HLA-A*02:01 в качестве антигенпрезентирующих клеток для инициирования антигенспецифического Т-клеточного ответа и размножения аутологичных CD8⁺ Т-клеток. *In vitro* транскрибируемая РНК (*ivt*РНК), кодирующая миниген (SEQ ID NO:27) и транслируемая в аминокислотную последовательность, содержащую MAGEA1-производный пептид KVLEYVIKV (как указано в SEQ ID NO:1), служит источником специфического антигена. Одновременно, *ivt*РНК человека, кодирующую HLA-A*02:01, используют в качестве источника рестрикционного элемента,

трансфицированного в mDC, для создания аллогенного примирования с точки зрения этого специализированного HLA аллеля (как описано в WO2007/017201). После электропорации в mDC, кодирующую миниген ivtPHK транслируют в белок, который впоследствии обрабатывается и презентуется в виде пептидов трансгенными молекулами HLA-A*02:01, которые экспрессируются котрансфицированными mDC. Совместное *in vitro* культивирование Т-клеток с ivtPHK-трансфицированными mDC от одного и того же донора приводит к *de novo* индукции антигенспецифических Т-клеток, которые служат источником соответствующих TCR. После размножения антигенспецифические Т-клетки могут быть обогащены и одноклеточно клонированы путем ограничивающего разведения или сортировки отдельных клеток на основе FACS.

1.1 План эксперимента

Примирование Т-клеток дендритными клетками для выделения и идентификации высокоаффинных TCR проводят с использованием презентации пептида аллогенными молекулами HLA-A*02:01 в соответствии со следующим протоколом:

Зрелые дендритные клетки создают в течение 8 дней с использованием подходящих коктейлей созревания для DC согласно Jonuleit et al. (Jonuleit et al. 1997, Eur. J. Immunol. 1997, 27:3135-3142). Антигенпрезентирующие клетки (8-дневные mDC) получают от здорового донора, и клетки трансфицируют электропорацией 20 мкг ivtPHK, кодирующей MG_X1, и 20 мкг ivtPHK, кодирующей аллогенную молекулу HLA (HLA-A*02:01). Приготовленные mDC затем совместно культивируют с аутологичными, обогащенными CD8⁺ PBMC здорового донора в соотношении 1:20 в течение ~14 дней в подходящей клеточной среде, дополненной IL-7 (5 нг/мл в день 0) и IL-2 (50 Ед/мл каждые два-три дня) при 37°C (6% CO₂). Затем MAGEA1₂₇₈₋₂₈₆ специфические клетки идентифицируют с использованием HLA-A*02:01 MAGEA1₂₇₈₋₂₈₆ мультимера (ProImmune) и затем разделяют сортировкой отдельных клеток с использованием технологии FACS.

1.2 Результаты

Описанный подход *in vitro* примирования дает идентификацию клонов Т-клеток, экспрессирующих кандидатный TCR T15.8-4.3-83. Последовательности TCR идентифицируют с использованием анализа NGS, реконструируют и трансгенно экспрессируют в подходящих эффекторных Т-клетках для полной характеристики TCR с точки зрения функциональности и безопасности.

2. Эксперимент: специфичность эпитопа

Для обеспечения функциональности трансгенно экспрессированных рекомбинантных TCR, TCR-трансдуцированные эффекторные Т-клетки культивируют совместно с нагруженными пептидом Т2-клетками (клетками-мишенями). TCR-опосредованное распознавание специфического комплекса пептид:МНС приводит к активации TCR-экспрессирующих Т-клеток и секреции определенных цитокинов, например IFN- γ . Для анализа секретированного IFN- γ в супернатантах совместной культуры проводят ELISA.

2.2 План эксперимента

Клетки T2, экспрессирующие HLA-A*02, нагружают насыщающими количествами пептидов (10^{-5} М). Клетки T2, нагруженные пептидом KVL, полученным из MAGEA1 (**SEQ ID NO:1**), служат положительной мишенью, клетки T2, нагруженные нерелевантным пептидом ASTN1 (**SEQ ID NO:28**), служат отрицательной мишенью. В качестве эффекторных клеток трансдуцируют обогащенные CD8 популяции T-клеток от двух разных доноров для стабильной экспрессии рекомбинантного TCR T15.8-4.3-83. Готовят эффекторы для экспрессии двух различных версий TCR T15.8-4.3-83, одна версия с С-областью мыши (murC) и одна версия с минимально муринизированной С-областью человека (mmC). Контрольный MAGEA1-TCR (эталонный TCR) также экспрессируют в T-клетках от двух разных доноров и анализируют.

Эффекторные клетки и клетки-мишени совместно культивируют при E:T 2,5:1 в 96-луночных круглодонных планшетах. Через ~20 часов совместного культивирования супернатанты собирают и анализируют с помощью ELISA (стандартный сэндвич ELISA, набор BD human IFN- γ ELISA).

2.3 Результаты

Эффекторные клетки, экспрессирующие TCR, секретируют IFN- γ только при культивировании с нагруженными KVL-пептидом T2-клетками, что указывает на специфическое распознавание представленного комплекса пептид:МНС, опосредованное трансгенным TCR T15.8-4.3-83, и доказывает его функциональность. Отрицательная мишень, клетки T2, нагруженные нерелевантным пептидом ASTN1 (**SEQ ID NO 28**, KLYGLDWAEEL), не распознаются (фигура 1). Трансгенный TCR опосредует специфическое распознавание мишени и секрецию IFN- γ независимо от С-области TCR.

3. Эксперимент: анализ ограничений

Поскольку TCR распознают свои специфические эпитопы только в сочетании с определенной молекулой МНС, не только уровень экспрессии антигена, но также HLA-тип клетки-мишени (*in vitro* и *in vivo*) определяет мишень как положительную или отрицательную мишень. Другими словами, в зависимости от HLA-типа, пациент может или не может быть включен в схему лечения АКТ на основе TCR.

Чтобы оценить, какие молекулы HLA, помимо HLA-A*02:01, могут быть загружены MAGEA1-производным пептидом KVL и могут распознаваться T-клетками, экспрессирующими TCR T15.8-4.3-83, проводят детальный анализ ограничений. Таким образом, 53 клеточные линии LCL (EBV трансформированные В-клетки), охватывающие наиболее часто встречающиеся HLA-аллотипы у жителей Европы и Северной Америки, используют в качестве APC (антигенпрезентирующих клеток) и совместно культивируют с эффекторами, экспрессирующими TCR (фигура 2), либо разгруженными, либо нагруженными KVL пептидом.

3.1 План эксперимента:

53 клеточные линии LCL нагружают насыщающими количествами MAGEA1-производного KVL пептида (10^{-5} М; **SEQ ID NO 1**) в течение ~1,5 часов, промывают и

затем совместно культивируют с TCR T15.8-4.3-83, экспрессирующим эффекторы, полученные из различных эффекторных препаратов. Незагруженные LCL использовали в качестве контроля. Совместное культивирование проводят с Е:Т 1:1 в 96-луночных круглодонных планшетах, супернатанты собирают через ~20 часов и уровни IFN- γ анализируют с помощью ELISA (стандартный сэндвич ELISA, набор BD human IFN- γ ELISA).

3.2 Результаты

Рестрикционный анализ для TCR T15.8-4.3-83 указывает на способность TCR распознавать его MAGEA1-производный эпитоп, не только презентированный на HLA-A*02:01, но, в различной степени, также на HLA-A*02:04, HLA-A*02:16 и HLA-A*02:17. На фигуре 2 показаны данные только для тех LCL (из 53 протестированных), которые привели к пептид-специфическому распознаванию выше фонового уровня, обнаруженного для не нагруженного LCL.

4. Эксперимент: распознавание опухолевых клеток

Чтобы проанализировать эффективность, специфичность и пригодность Т-клеточного рецептора для клинического применения, ряд линий опухолевых клеток тестируют на TCR-опосредованное распознавание путем измерения секреции IFN- γ при совместном культивировании с эффекторными клетками, трансдуцированными TCR.

4.1 План эксперимента (фигура 3):

Эффекторные клетки, полученные от 3 разных доноров, трансдуцируют с помощью TCR T15.8-4.3-83 и контрольного Ctrl. MAGEA1-TCR. Эффекторы, трансдуцированные или не трансдуцированные TCR, культивируют совместно с различными линиями опухолевых клеток. Клеточные линии U266, NCI-H1703, UACC-62, Saos-2 и Mel624.38 (HLA-A2+/MAGEA1+) и HLA-A2-трансфицированные клеточные линии KYO-1 and OPM-2 (HLA-A2+/MAGEA1+) служат в качестве положительных мишеней. Клеточные линии NCI-H1755, 647-V и CMK (HLA-A2+/MAGEA1-), немодифицированные OPM-2 и KYO-1 (HLA-A2-/MAGEA1+) служат в качестве отрицательных мишеней. Экспрессию HLA-A2 клеточных линий анализируют с помощью FACS (данные не показаны), данные экспрессии MAGEA1 получают с использованием qPCR или извлекают из общедоступных баз данных, известных специалисту в данной области техники. В качестве контроля, все эффекторы также совместно культивируют с клетками T2, нагруженными насыщающими концентрациями (10^{-5} M) MAGEA1-производного KVL пептида (**SEQ ID NO 1**) или нерелевантного пептида ASTN1 (**SEQ ID NO 28**). Для совместного культивирования эффекторы и мишени высевают в 96-луночные круглодонные планшеты при Е:Т 2,5:1, супернатанты собирают через ~20 часов совместного культивирования и уровни IFN- γ анализируют с помощью ELISA.

4.2 Результаты (фигура 3):

Способность TCR эффективно распознавать опухолевые клетки оценивают путем совместного культивирования T15.8-4.3-83-трансдуцированных эффекторов с рядом различных линий опухолевых клеток. Как показано на фигуре 3, и T15.8-4.3-83, и Ctrl

MAGEA1-TCR опосредуют специфическое распознавание HLA-A2-положительных и MAGEA1-положительных линий опухолевых клеток U266, NCI-H1703, UACC-62, Saos-2 и Mel624.38. Клетки KYO-1 и OPM-2 распознаются только после трансфекции с *ivt*РНК, кодирующей HLA-A2.

Нетрансфицированные KYO-1 и OPM-2 (HLA-A2-/MAGEA1-положительные), а также NCI-H1755, 647-V и CMK (HLA-A2+/MAGEA1-) служат отрицательными контролями. Когда антиген MAGEA1 не экспрессировался или необходимый элемент ограничения отсутствовал, ни один из отрицательных контролей не распознавался. Это эффективное распознавание только MAGEA1-положительных и HLA-A2-положительных клеточных линий указывает на высокоэффективное и специфическое распознавание опухолевых клеток TCR.

4.3 План эксперимента (фигура 10)

20000 TCR-трансгенных эффекторных Т-клеток культивируют совместно с 20000 опухолевых клеток в 96-луночном круглодонном планшете. Стандартный ИФН- γ ELISA проводят через 20 часов совместного культивирования с линией клеток меланомы UACC-257, линией клеток меланомы UACC-62 или линией клеток остеосаркомы SAOS-2. Значения выше 4000 пг экстраполируют с использованием многочлена третьей степени.

4.5 Результаты (фигура 10):

Оценивают способность популяций TCR-трансгенных эффекторных Т-клеток продуцировать ИФН- γ в ответ на MAGEA1 и HLA-A*02:01 линии двойных положительных опухолевых клеток. T15.8-4.3-83 демонстрирует повышенную способность распознавания опухолевых клеток для всех трех клеточных линий UACC-257, UACC-62 или SAOS-2 по сравнению с TCR FH1, FH2, FH3 и FH4, описанными в WO2018/170338, и R37P1C9, описанными в WO2018/104438. UACC-62 распознается только T15.8-4.3-83.

5. Эксперимент: уничтожение опухолевых клеток

Способность TCR не только распознавать, но и эффективно лизировать и тем самым убивать опухолевые клетки имеет первостепенное значение и клиническую значимость. Чтобы проанализировать убивающую способность TCR T15.8-4.3-83, используют устройство IncuCyte™ Zoom для проведения долгосрочного анализа уничтожения в течение 6 дней. Устройство IncuCyte™ представляет собой систему на основе микроскопа, которая позволяет получать изображения клеток в реальном времени. Набор линий опухолевых клеток высевает в лунки 96-луночного планшета с плоским дном и культивируют совместно с TCR-экспрессирующими эффекторами, полученными от 3 разных доноров. Линии опухолевых клеток стабильно экспрессируют красный флуоресцентный белок с ядерной ограниченностью mKate2, позволяя системе IncuCyte™ Zoom определять точное количество красных флуоресцентных клеток в каждой лунке. Увеличенное количество клеток на лунку с течением времени будет означать рост опухолевых клеток, в то время как уменьшение количества клеток на лунку будет указывать на опосредованное TCR уничтожение.

5.1 План эксперимента (фигуры 4A-4D)

Линии опухолевых клеток 647-V (уротелиальная карцинома мочевого пузыря), UACC-62 (меланома), Saos-2 (костная остеосаркома) и NCI-H1703 (аденокарцинома легкого) стабильно трансдуцируют красным флуоресцентным белком с ядерной ограниченностью mKate2 с использованием IncuCyte™ NucLight™ Red Lentivirus Reagent в соответствии с инструкциями производителя. Опухолевые клетки высевают в 96-луночные планшеты с плоским дном, чтобы позволить прикрепиться к пластику в течение ночи. В качестве положительного контроля, опухолевые клетки нагружают насыщающими концентрациями MAGEA1-производного KVL пептида (10^{-5} М) в течение ~1,5 часов, промывают и затем используют для совместного культивирования. Нагруженные KVL или не модифицированные опухолевые клетки культивируют либо отдельно, либо совместно с эффекторами, трансдуцированными TCR T15.8-4.3-83, полученными от 3 разных доноров. Совместное культивирование с не трансдуцированными эффекторами служит отрицательным контролем. Снимки делают с помощью системы масштабирования IncuCyte™ каждые 2 часа и анализируют с помощью программного обеспечения IncuCyte™ Zoom (версия 2016B).

5.2 Результаты (фигуры 4A-4D)

На фигурах 4A - 4D показан TCR-опосредованный антиген-специфический лизис красных флуоресцентных клеточных линий-мишеней 647-V (HLA-A2+/MAGEA1-), UACC-62 (HLA-A2+/MAGEA1+), Saos-2 (HLA-A2+/MAGEA1+) и NCI-H1703 (HLA-A2+/MAGEA1+), соответственно. Хотя не трансдуцированные эффекторные клетки не влияют на рост каких-либо опухолевых клеток (увеличивая количество клеток с течением времени), эффекторные клетки, трансдуцированные TCR T15.8-4.3-83, эффективно убивают опухолевые клетки NCI-H1703, UACC- 62 и Saos-2, которые экспрессируют антиген MAGEA1, а также HLA-A2 (уменьшая количество клеток с течением времени). MAGEA1-отрицательные 647-V клетки не погибают. Все опухолевые клетки погибают при искусственной загрузке KVL пептида в качестве контроля. Опухолевые клетки, культивированные отдельно, не нагруженные или нагруженные KVL пептидом, также анализируют, и рост показывают на каждом графике в качестве эталона.

5.3 План эксперимента (фигура 11)

20000 TCR-трансгенных эффекторных Т-клеток совместно культивируют с 7500 клетками SAOS-2, трансдуцированными лентивирусом IncuCyte® NucLight Red. Опухолевые клетки высевают за день до начала совместного культивирования. После добавления эффекторных клеток, культуральные планшеты переносят в устройство IncuCyte ZOOM® и размножение красных флуоресцентных клеток наблюдают в течение 72 часов при температуре 37°C и 6% CO₂, делая снимки каждые 4 часа. Количество клеток ($1/\text{мм}^2$) красных флуоресцентных опухолевых клеток на лунку в каждой точке измерения рассчитывают с использованием программного обеспечения IncuCyte ZOOM®. Каждая точка измерения представляет собой среднее значение трех технических повторов.

5.4 Результаты (фигура 11)

Клетки SAOS-2, культивированные в присутствии не трансдуцированных Т-клеток,

демонстрируют сильную пролиферацию. Совместное культивирование различных TCR-трансгенных Т-клеток вызывает уменьшение количества клеток SAOS-2. Интересно, что скорость и степень уничтожения варьирует между различными TCR-трансгенными эффекторными клетками. TCR T15.8-4.3-83 демонстрирует наивысшую способность лизировать линию двойных положительных опухолевых клеток MAGEA1 и HLA-A*02:01 по сравнению с TCR FN1, FN2, FN3 и FN4, описанными в WO2018/170338, и R37P1C9, описанными в WO2018/104438.

6. Эксперимент: мотив распознавания эпитопа TCR

Для подробного анализа специфического к TCR мотива распознавания эпитопа проводят сканирование с заменой треонина и/или серинового сканирование. Путем замены исходных аминокислот эпитопа треонином (или серином, соответственно) можно идентифицировать положения внутри эпитопа, которые необходимы для опосредованного TCR распознавания. Это распознавание зависит от правильного связывания пептида с молекулой HLA и от взаимодействия комплекса пептид:МНС с самим TCR, на которые может повлиять замена одной единственной аминокислоты.

6.1 План эксперимента (фигуры 5 и 6)

Для специфического определения мотива распознавания эпитопа TCR T15.8-4.3-83 готовят эффекторы, происходящие от 3 разных доноров, экспрессирующие TCR T15.8-4.3-83, а также эффекторы, экспрессирующие контрольный MAGEA1-TCR. Т-клетки совместно культивируют с клетками Т2, нагруженными специфическим к TCR KVL эпитопом (**SEQ ID NO 1**), или нагруженными пептидами, каждый отдельный аминокислотный остаток которых последовательно заменен треонином (сканирование с заменой треонина). Клетки Т2 отдельно загружают насыщенными концентрациями (10^{-5} М) пептидов, промывают и совместно культивируют с эффекторами при Е:Т 1:1. Супернатанты собирают через ~20 часов совместного культивирования, и секретированный IFN- γ анализируют с помощью ELISA.

6.2 Результаты (фигуры 5 и 6)

Результаты сканирования с заменой треонина для эффекторов, трансдуцированных с TCR T15.8-4.3-83 (как показано на фигуре 6) или трансдуцированных с контрольным Ctrl. MAGEA1-TCR (как показано на фигуре 5) демонстрирует особую специфичность отдельных TCR в отношении их эпитопа и производных эпитопа. Для справки, распознавание MAGEA1-производного KVL эпитопа показано на каждом графике слева. Контрольный Ctrl. MAGE A1-TCR не распознает пептиды с заменой треонина в положениях 4 и 7 (E и I, фигура 5).

Напротив, TCR T15.8-4.3-83, по-видимому, очень чувствителен к аминокислотным заменам в положениях 1, 3 и 5 (K, L и Y), на что указывает отсутствие распознавания пептида (фигура 6).

Обмен отдельных аминокислот внутри эпитопа заметно мешает распознаванию, опосредованному обоими TCR, что доказывает их высокоселективные модели распознавания, и позиции, которые кажутся критическими для распознавания, заметно

различаются для двух проанализированных TCR.

6.3. План эксперимента (фигура 13)

20000 TCR-трансгенные Т-клетки совместно культивируют с 20000 10^{-5} М нагруженных пептидом Т2-клеток. Стандартный IFN- γ ELISA проводят через 20 часов совместного культивирования (значения выше 4000 пг экстраполируют с использованием многочлена третьей степени). Вместо остатков треонина, как описано выше, остатки серина используют для систематической замены отдельных аминокислот в MAGEA1_{KVL} пептиде (сериновое сканирование).

6.4 Результаты (фигура 13)

Т-клетки, трансдуцированные TCR T15.8-4.3-83, демонстрируют другой мотив распознавания (согласно сериновому сканированию) с фиксированными положениями, отличными от Т-клеток, трансдуцированных TCR FH1 или R37P1C9.

Комбинация треонинового и серинового сканирования указывает на то, что первое положение в эпитопе (лизин) и 5 положение (тирозин) в эпитопе, по-видимому, особенно критично для TCR T15.8-4.3-83.

7. Эксперимент: члены семейства MAGE

Поскольку 13 членов семейства MAGE содержат пептидные последовательности, очень похожие (только 2-4 несовпадающие аминокислоты) с MAGEA1-производным KVL пептидом, проводят углубленный анализ для дальнейшего изучения потенциала опосредованного TCR T15.8-4.3-83 перекрестного распознавания. Экспрессия членов семейства MAGE описана не только при раке и в яичках, но и в жизненно важных органах, что позволяет квалифицировать потенциальное перекрестное распознавание пептидов, полученных из белков, как критерий исключения для TCR для клинической разработки.

Чтобы исследовать распознавание эндогенно процессированных и презентируемых пептидов, происходящих от других членов семейства MAGE, все 13 членов семейства MAGE, содержащих пептидные последовательности, подобные MAGEA1-эпитопу KVLEYVIKV рекомбинантно экспрессируют в 3 клеточных линиях различного происхождения. Путем совместного культивирования клеточных линий, экспрессирующих рекомбинантные члены семейства MAGE, с эффекторами, экспрессирующими TCR T15.8-4.3-83, анализируют возможное перекрестное распознавание MAGE-пептидов, полученных из белков.

7.1 План эксперимента

Продуцируют *ivt*PHK, кодирующую члены семейства MAGE MAGEA8 (эталонная последовательность NCBI (доступ): NM_001166400.1), MAGEA9 (NM_005365.4), MAGEA11 (NM_005366.4), MAGEB1 (NM_002363.4), MAGEB2 (NM_002363.4), MAGEB3 (NM_002365.4), MAGEB5 (NM_001271752.1), MAGEB16 (NM_001099921.1), MAGEB17 (NM_001277307.1), MAGEB18 (NM_173699.3), MAGEC2 (NM_016249.3), MAGED2 (NM_014599.5) и MAGEE2 (NM_138703.4). *Ivt*PHK, кодирующую MAGEA1 (NM_004988.4) и пептид KLY ASTN1, продуцируют в качестве PHK положительного и

отрицательного контроля. Линии опухолевых клеток НЕК 293Т (HLA-A2+/MAGE-), LCL (HLA-A2+/MAGE-) и HLA-A2-трансдуцированных К562 (MAGE-) отдельно трансфицируют 20 мкг *in vitro* РНК, кодирующей любой из 13 членов семейства MAGE, MAGEA1 или ASTN1 пептид KLY. Трансгенную экспрессию членов семейства MAGE анализируют с помощью FACS (данные не показаны). В качестве контроля, клетки T2, а также 3 клеточные линии дополнительно нагружают либо MAGEA1-производным пептидом KVL (10^{-5} М), либо ASTN1-производным пептидом KLY (10^{-5} М). Нагруженные пептидом контрольные клетки и трансфицированные клеточные линии высевают через 3 часа после трансфекции в 96-луночные круглодонные планшеты и совместно культивируют с не трансдуцированными или трансдуцированными TCR T15.8-4.3-83 эффекторами, полученными от 2 доноров в соотношении E:T 1:1. Супернатанты собирают через ~20 часов совместного культивирования, и секретированный IFN- γ анализируют с помощью ELISA.

7.2 Результаты

На фигуре 7 показано опосредованное TCR T15.8-4.3-83 распознавание рекомбинантных членов семейства MAGE, экспрессированных в клетках НЕК 293Т (А), клетках К562 (В) и клетках LCL (С). Распознавание клеток T2, а также клеток НЕК 293Т, К562 или LCL, нагруженных *in vitro* пептидом KVL или пептидом ASTN1, служит контролем. В то время как не трансдуцированные эффекторы не проявляют какое-либо специфическое распознавание, трансдуцированные TCR T15.8-4.3-83 эффекторы, полученные от 2 доноров, специфически распознают все 3 клеточные линии, трансфицированные полноразмерной *in vitro* РНК, кодирующей MAGEA1. Это указывает на эффективную трансляцию РНК, кодирующую MAGEA1, в белок MAGEA1 и протеосомный процессинг полученного из белка пептида KVL с последующей нагрузкой и презентированием эпитопа молекулами HLA-A2 на поверхности клетки. Не было распознавания какой-либо из клеточных линий, трансфицированных пептидом ASTN1, а также не было распознавания каких-либо рекомбинантно экспрессируемых членов семейства MAGE выше фоновых уровней. Пептиды, производные от членов семейства MAGE, которые можно распознать при искусственной загрузке клеток-мишеней (как описано ранее), либо не процессируются из эндогенно экспрессируемых белков MAGE, не загружаются в молекулы МНС, либо не представлены на поверхности клетки. Следовательно, эти пептиды не квалифицируются как иммуногенные Т-клеточные эпитопы и не считаются клинически значимыми мишенями для перекрестного распознавания, опосредованного TCR T15.8-4.3-83.

8. Эксперимент: анализ нормальных клеток

Чтобы исследовать профиль безопасности TCR, необходимо исследовать и исключить опосредованное TCR распознавание клеток, происходящих из здоровых тканей различного происхождения. Таким образом, эффекторы, экспрессирующие TCR, культивируют совместно с нормальными клетками, полученными из почек (эпителиальные клетки почечной коры, полученные от PromoCell), легких (фибробласты

легких, полученные от Lonza) и гепатоцитами, кардиомиоцитами и эндотелиальными клетками, полученными из iPS (полученные от Cellular Dynamics). Исследуемые клетки являются эндогенно отрицательными по антигену MAGEA1 и, следовательно, позволяют идентифицировать потенциальную не относящуюся к MAGEA1 нецелевую токсичность.

8.1 План эксперимента

Нормальные клетки размораживают и культивируют в течение одной недели перед совместным культивированием, как указано поставщиками. Клетки высевают в 96-луночные планшеты с плоским дном и совместно культивируют с трансдуцированными или не трансдуцированными TCR T15.8-4.3-83 эффекторами (данные не показаны), полученными от 3 разных доноров. HLA-A2-экспрессию клеток-мишеней подтверждают окрашиванием антителом и FACS (данные не показаны), и клетки-мишени либо тестируют не модифицированными, либо нагружают превышающими количествами (10^{-5} M) MAGEA1-производным KVL пептидом (**SEQ ID NO 1**) в качестве контроля. В качестве контролей засевают отдельно эффекторные клетки и клетки-мишени, и T2 клетки нагружают TCR эпитопом KVL (10^{-5} M; **SEQ ID NO 1**). Через ~20 часов совместного культивирования супернатанты собирают и анализируют с помощью ELISA. Через ~48 часов совместного культивирования, с помощью устройства IncuCyte™ Zoom (Essen BioScience Inc.) получают фазово-контрастные изображения для визуализации потенциальных токсических эффектов с точки зрения лизиса и отделения прилипших клеток-мишеней.

8.2 Результаты

Как показано на фигуре 8, совместное культивирование TCR T15.8-4.3-83-трансдуцированных эффекторов, полученных от 3 доноров, привело к распознаванию только искусственно нагруженных KVL пептидом клеток, что говорит о потенциально правильном презентировании TCR эпитопа клетками-мишенями на их клеточной поверхности в контексте молекул МНС. Не модифицированные нормальные клетки не распознаются эффекторами, экспрессирующими трансгенный TCR T15.8-4.3-83, что указывает на благоприятный профиль безопасности исследуемого рецептора.

Для визуализации потенциальных токсических эффектов, опосредованных TCR-трансдуцированными эффекторами, на клетки-мишени получают фазово-контрастные изображения различных клеток-мишеней, культивируемых отдельно, совместно с эффекторами, трансдуцированными TCR T15.8-4.3-83, или KVL. нагруженные пептидом клетки-мишени, совместно культивируемые с эффекторами, экспрессирующими TCR. На фигуре 9 показаны типовые изображения совместных культур с эффекторными клетками от одного из трех доноров. Хотя существует явный TCR-опосредованный лизис всех нагруженных KVL клеток-мишеней (полное разрушение клеточного слоя), эффекторные клетки, экспрессирующие TCR, не лизируют не модифицированные нормальные клетки.

9. Эксперимент: функциональная avidность

Для измерения функциональной avidности различных TCR, специфических к KVL пептиду, определяют полумаксимальное относительное высвобождение IFN- γ (значение

EC50) в совместной культуре с T2 клетками, нагруженными градуированными количествами KVL пептида.

Функциональная avidность относится к накопленной силе *множественных* аффинностей отдельных взаимодействий нековалентного связывания между трансгенным TCR и комплексом pMHC.

9.1 План эксперимента (фигура 12)

Функциональную avidность популяций TCR-трансгенных Т-клеток определяют как полумаксимальное относительное высвобождение IFN- γ (значения EC50) при совместном культивировании с T2 клетками, нагруженными градуированными количествами KVL пептида (от 10^{-4} М до 10^{-12} М). Стандартный IFN- γ ELISA проводят через 20 часов совместного культивирования (значения выше 4000 пг экстраполируют с использованием многочлена третьей степени).

9.2 Результаты (фигура 12)

Различные KVL-специфические TCR отличаются своими функциональными avidностями T2 клеток, нагруженных KVL пептидом. TCR T15.8-4.3-83 показывает низкое значение EC50, т.е. высокую функциональную avidность к 2 клеткам, нагруженным KVL пептидом, по сравнению с TCR FH1, FH2, FH3 и FH4, описанными в WO2018/170338, и R37P1C9, описанным в WO2018/104438.

10. Эксперимент: секреция цитокинов.

Сравнивают профиль секреции TCR для TH2 специфических цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13 Т-клеток, трансдуцированных разными TCR. Воспаление Th2-типа предложено для облегчения роста опухоли (Jager MJ, Desjardins L, Kivelä T, Damato BE (eds): Current Concepts in Uveal Melanoma. Dev Ophthalmol. Basel, Karger, 2012, vol 49, pp 137-149, J Immunother. 2018 Oct;41(8):369-378). Следовательно, низкие или не определяемые уровни секреции Th2 могут быть благоприятными для регрессии опухоли.

10.1 План эксперимента (фигура 14)

20000 TCR-трансгенных эффекторных Т-клеток культивируют совместно с 20000 опухолевых клеток в 96-луночном планшете с круглым дном. Бесклеточный супернатант анализируют в отношении секретируемых цитокинов с использованием набора MILLIPLEX® MAP Kit в соответствии с протоколом в системе MAGPIX®.

10.2 Результаты (фигура 14)

Т-клетки, трансдуцированные T1367 TCR, секретируют несколько TH2 цитокинов, особенно IL-4, IL-5 и IL-13. Т-клетки, трансдуцированные TCR 15,8-4,3-83, не показывают эквивалентной секреции TH2 цитокинов, тогда как T1367, описанный в WO2014/118236, показывает значительную секрецию этих цитокинов.

Заявка также содержит следующие варианты осуществления:

Вариант осуществления 1: Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), специфичный в отношении MAGEA1.

Вариант осуществления 2: Выделенный TCR варианта осуществления 1, где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или ее

фрагмент.

Вариант осуществления 3: Выделенный TCR по вариантам осуществления 1 и 2, где TCR специфически распознает связанную с HLA-A2 и/или HLA-A26 форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, предпочтительно связанную с HLA-A2 форму.

Вариант осуществления 4: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая представлена молекулой, кодированной геном, выбранным из группы, состоящей из HLA-A*02:01, HLA-HLA-A*02:04, HLA-A*02:16 и HLA-A*02:17.

Вариант осуществления 5: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая представлена молекулой, кодированной геном, выбранным из группы, состоящей из HLA-A*02:01, HLA-A*02:04, HLA-A*02:16 и HLA-A*02:17.

Вариант осуществления 6: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая представлена молекулой, кодированной HLA-A*02: 01.

Вариант осуществления 7: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где TCR содержит

- TCR α цепь, содержащую CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3, и CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4,

- TCR β цепь, содержащую CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, и CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7.

Вариант осуществления 8: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где TCR содержит

вариабельную TCR α область с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере, на 80% идентична SEQ ID NO:8, и вариабельную TCR β область с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере, на 80% идентична SEQ ID NO:9.

Вариант осуществления 9: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где TCR содержит

вариабельную TCR α область с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8, и вариабельную TCR β область с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9.

Вариант осуществления 10: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где TCR содержит

TCR α цепь с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере, на 80% идентична SEQ ID NO:10, и TCR β цепь с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере, на 80% идентична SEQ ID NO:11.

Вариант осуществления 11: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где TCR содержит

TCR α цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:12, и TCR β цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:13.

Вариант осуществления 12: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где TCR содержит TCR α цепь и TCR β цепь, где

- переменная TCR α область имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% идентична SEQ ID NO:8 и содержит CDR3 с аминокислотной последовательностью, указанную в SEQ ID NO:4,

- переменная TCR β область имеет аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% идентична SEQ ID NO:9 и содержит CDR3 с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:7.

Вариант осуществления 13: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где TCR очищен.

Вариант осуществления 14: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где его аминокислотная последовательность содержит одну или несколько фенотипически молчащих замен.

Вариант осуществления 15: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где его аминокислотная последовательность модифицирована, чтобы содержать определяемую метку, терапевтический агент или модифицирующую фармакокинетику группу.

Вариант осуществления 16: Выделенный TCR варианта осуществления 15, где терапевтический агент выбран из группы, состоящей из иммунной эффекторной молекулы, цитотоксического агента и радионуклида.

Вариант осуществления 17: Выделенный TCR варианта осуществления 16, где иммунной эффекторной молекулой является цитокин.

Вариант осуществления 18: Выделенный TCR любого из предыдущих вариантов осуществления, где TCR растворим или связан с мембраной.

Вариант осуществления 19: Выделенный TCR варианта осуществления 15, где модифицирующим фармакокинетику фрагментом является, по меньшей мере, одна повторяющаяся единица полиэтиленгликоля, по меньшей мере, одна гликолевая группа, по меньшей мере, одна сиалильная группа или их комбинация.

Вариант осуществления 20: Выделенный TCR по любому из предыдущих вариантов осуществления, где TCR относится к одноцепочечному типу, где TCR α цепь и TCR β цепь связаны линкерной последовательностью.

Вариант осуществления 21: Выделенный TCR по вариантам осуществления 1-20, где TCR α цепь или TCR β цепь модифицирована для включения эпитопной метки.

Вариант осуществления 22: Выделенный полипептид, содержащий функциональную часть TCR по любому из вариантов осуществления изобретения 1-21,

где функциональная часть содержит, по меньшей мере, одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:4 и 7.

Вариант осуществления 23: Выделенный полипептид, содержащий функциональную часть TCR по любому из вариантов осуществления изобретения 1-21, где функциональная часть содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6 и 7.

Вариант осуществления 24: Выделенный полипептид варианта осуществления 21, где функциональная часть содержит TCR α переменную цепь и/или TCR β переменную цепь.

Вариант осуществления 25: Поливалентный комплекс TCR, содержащий TCR по любому из вариантов осуществления 1-21.

Вариант осуществления 26: Выделенный TCR по вариантам осуществления 1-21, полипептид по вариантам осуществления 22-24, мультивалентный комплекс TCR варианта осуществления 25, где секреция IFN- γ индуцируется связыванием с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, которая представлена молекулой, кодированной HLA-A*02:01.

Вариант осуществления 27: Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR по любому из вариантов осуществления 1-21 или кодирующая полипептид по вариантам осуществления 22-24.

Вариант осуществления 28: Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту варианта осуществления 27.

Вариант осуществления 29: Вектор варианта осуществления 28, где вектором является вектор экспрессии.

Вариант осуществления 30: Вектор варианта осуществления 28 или 29, где вектором является ретровирусный вектор.

Вариант осуществления 31: Вектор варианта осуществления 28 или 29, где вектором является лентивирусный вектор.

Вариант осуществления 32: Клетка, экспрессирующая TCR, по вариантам осуществления 1-21.

Вариант осуществления 33: Клетка варианта осуществления 32, где клетка является выделенной или не встречающейся в природе.

Вариант осуществления 34: Клетка по вариантам осуществления 32 и 33, где клетка содержит нуклеиновую кислоту варианта осуществления 27 или вектор по вариантам осуществления 28-31.

Вариант осуществления 35: Клетка по вариантам осуществления 32-34, где клетка содержит:

а) вектор экспрессии, который содержит, по меньшей мере, одну нуклеиновую кислоту, варианта осуществления 27, или

б) первый вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа цепь TCR, по любому из вариантов осуществления 1-21, и второй

вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую бета цепь TCR, по любому из вариантов осуществления 1-21.

Вариант осуществления 36: Клетка по любому из вариантов осуществления 32-35, где клеткой является лимфоцит периферической крови (PBL) или моноклеарная клетка периферической крови (PBMC).

Вариант осуществления 37: Клетка по любому из вариантов осуществления 32-36, где клеткой является Т-клетка.

Вариант осуществления 38: Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с частью TCR по вариантам осуществления 1-21, который опосредует специфичность к MAGEA1.

Вариант осуществления 39: Антитело варианта осуществления 38, где часть TCR, которая опосредует специфичность MAGEA1, содержит, по меньшей мере, одну из CDR, указанных в SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6 и 7, предпочтительно CDR3 альфа цепи SEQ ID NO:4 и/или CDR3 бета цепи SEQ ID NO:7, более предпочтительно, CDR альфа цепи, представленной в SEQ ID NO:2, 3 и 4, и CDR цепи бета цепи SEQ ID 5, 6 и 7.

Вариант осуществления 40: Фармацевтическая композиция, содержащая TCR по вариантам осуществления 1-21, полипептид по вариантам осуществления 22-24, поливалентный комплекс TCR варианта осуществления 25, нуклеиновую кислоту варианта осуществления 27, вектор по вариантам осуществления 28-31, клетку по любому из вариантов осуществления 32-37 или антитело по вариантам осуществления 38-39.

Вариант осуществления 41: Фармацевтическая композиция варианта осуществления 40, где фармацевтическая композиция содержит, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 42: TCR по вариантам осуществления 1-21, полипептид по вариантам осуществления 22-24, поливалентный комплекс TCR варианта осуществления 25, нуклеиновая кислота варианта осуществления 27, вектор по вариантам осуществления 28-31, клетка по любому из вариантов осуществления 32-37, или антитело по вариантам осуществления 38-39 для использования в качестве лекарственного средства.

Вариант осуществления 43: TCR по вариантам осуществления 1-21, полипептид по вариантам осуществления 22-24, поливалентный комплекс TCR варианта осуществления 25, нуклеиновая кислота варианта осуществления 27, вектор по пунктам 28-31 или клетка по любому из вариантов осуществления 32-37 для использования при лечении рака.

Вариант осуществления 44: TCR, полипептид, поливалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота, вектор или клетка варианта осуществления 43, где раком является гематологический рак или солидная опухоль.

Вариант осуществления 45: TCR, полипептид, поливалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота, вектор или клетка по вариантам осуществления 43 и 44, где рак выбран из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичек, рака почек, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, немелкоклеточного рака легких, аденокарциномы легких,

плоскоклеточного рака, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, аденокарциномы желудка, холангиокарциномы, рака груди, рака мочевого пузыря, миелоидного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза, саркомы или остеосаркомы.

Вариант осуществления 46: TCR, полипептид, поливалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота, вектор или клетка по вариантам осуществления 43 и 44, где рак предпочтительно выбран из группы, состоящей из саркомы или остеосаркомы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), специфичный в отношении MAGEA1.
2. Выделенный TCR по п. 1, где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или ее фрагмент.
3. Выделенный TCR по пп. 1 и 2, где TCR специфически распознает HLA-A2 связанную форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1.
4. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая представлена молекулой, кодированной геном, выбранным из группы, состоящей из HLA-A*02:01, HLA-A*02:04, HLA-A*02:16 и HLA-A*02:17, предпочтительно, где TCR специфически распознает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, которая представлена молекулой, кодированной HLA-A*02:01.
5. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR содержит
 - α цепь TCR, содержащую CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3 и CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4,
 - β цепь TCR, содержащую CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, и CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7.
6. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, где TCR содержит переменную α область TCR с аминокислотной последовательностью, которая, по меньшей мере, на 80% идентична SEQ ID NO:8, и переменную β область TCR с аминокислотной последовательностью, которая, по меньшей мере, на 80% идентична SEQ ID NO:9.
7. Выделенный полипептид, содержащий функциональную часть TCR по любому из пп. 1-6, где функциональная часть содержит, по меньшей мере, одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:4 и 7, предпочтительно, где функциональная часть содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6 и 7.
8. Поливалентный комплекс TCR, содержащий, по меньшей мере, два TCR по любому из пп. 1-6.
9. Выделенный TCR по пп.1-6, полипептид по п.7, мультивалентный TCR комплекс по п.8, где секреция IFN- γ индуцируется связыванием с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, которая представлена молекулой, кодированной HLA-A*02:01.
10. Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR по любому из пп.1-6 или кодирующая выделенный полипептид по п.7.
11. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 10, где вектором предпочтительно является вектор экспрессии, более предпочтительно, ретровирусный

вектор или лентивирусный вектор.

12. Клетка, экспрессирующая TCR, по пп.1-6.

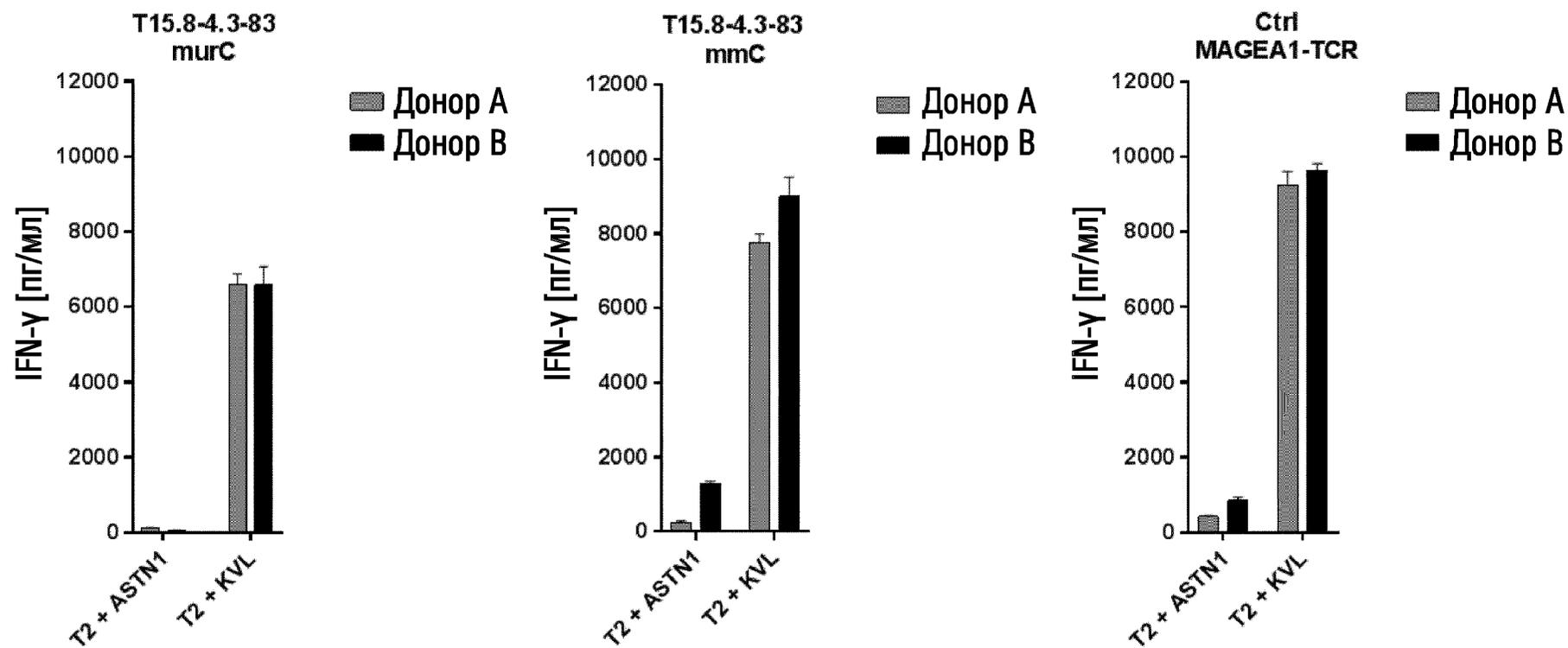
13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с частью TCR по пп.1-6, которая опосредует специфичность к MAGEA1, предпочтительно, отличающееся тем, что часть TCR, которая опосредует специфичность MAGEA1, содержит CDR3 альфа цепи SEQ ID NO:4 и/или CDR3 бета цепи SEQ ID NO:7.

14. TCR по пп.1-6, полипептид по п.7, поливалентный комплекс TCR по п.8, нуклеиновая кислота по п.10, вектор по п.11, клетка по п.12 или антитело по п.13 для применения в качестве лекарственного средства.

15. TCR по пп.1-6, полипептид по п.7, поливалентный комплекс TCR по п.8, нуклеиновая кислота по п.10, вектор по п.11, клетка по п.12 или антитело по п. 13 для применения в лечении злокачественной опухоли, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака простаты, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичек, рака почек, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, немелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, гепатоцеллюлярного рака, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, рака шейки матки, рака толстой кишки, аденокарциномы желудка, холангиокарциномы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, миелоидного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза, саркомы или остеосаркомы.

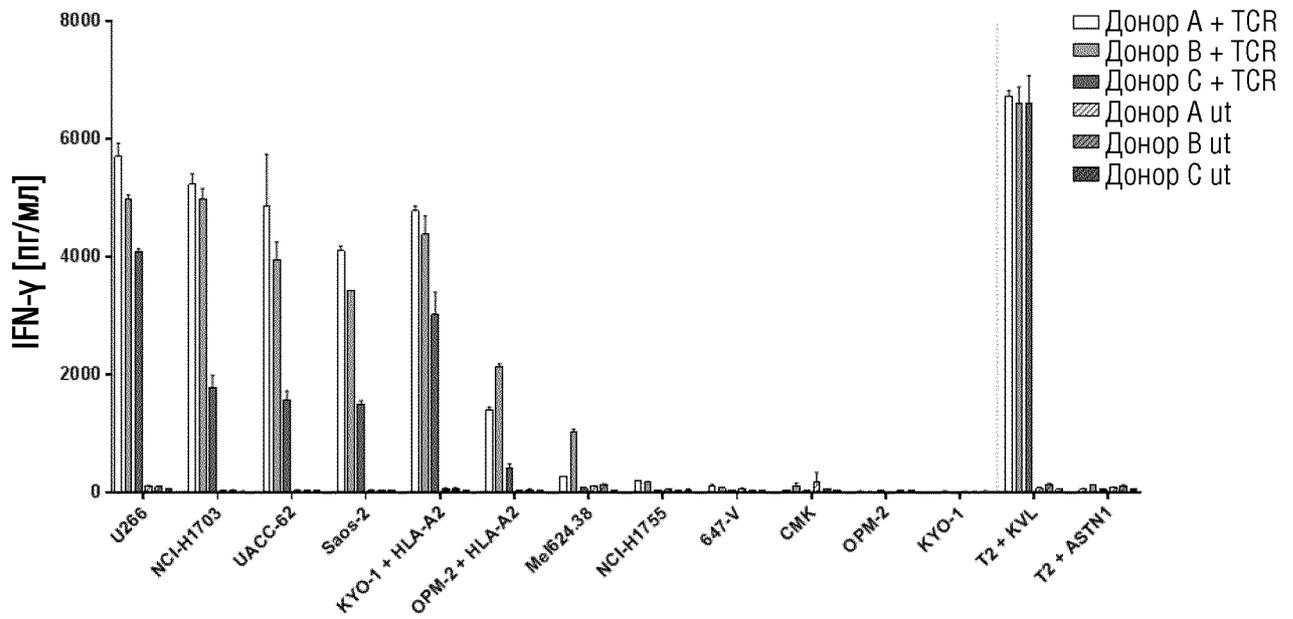
По доверенности

ФИГ.1

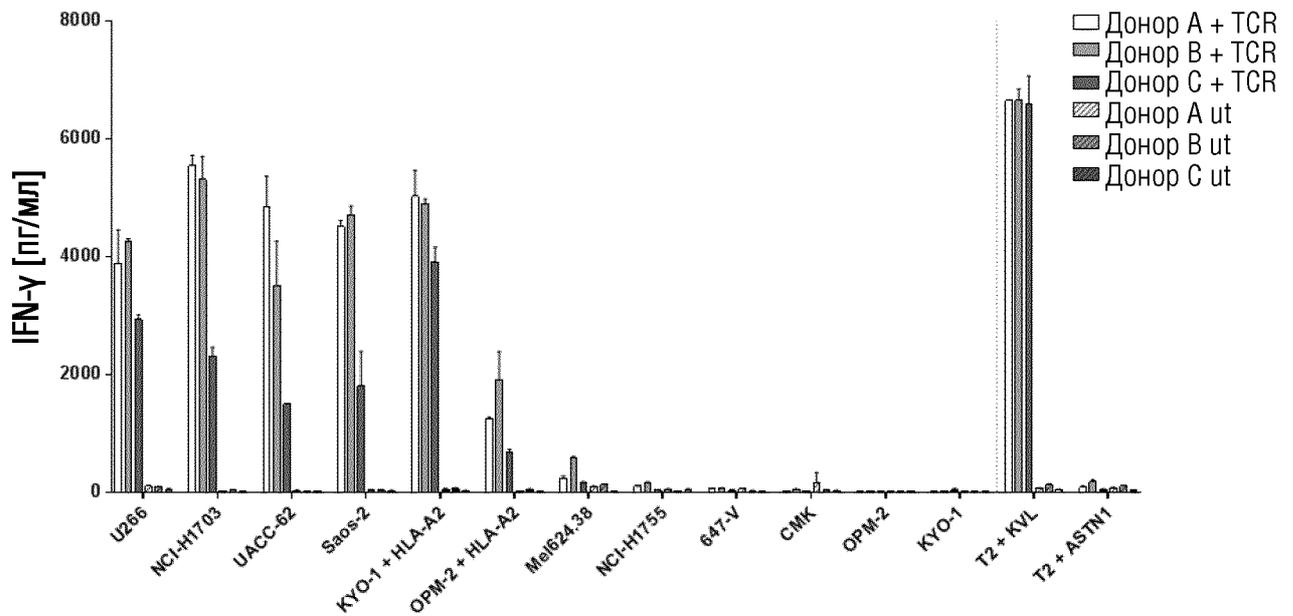


ФИГ.3

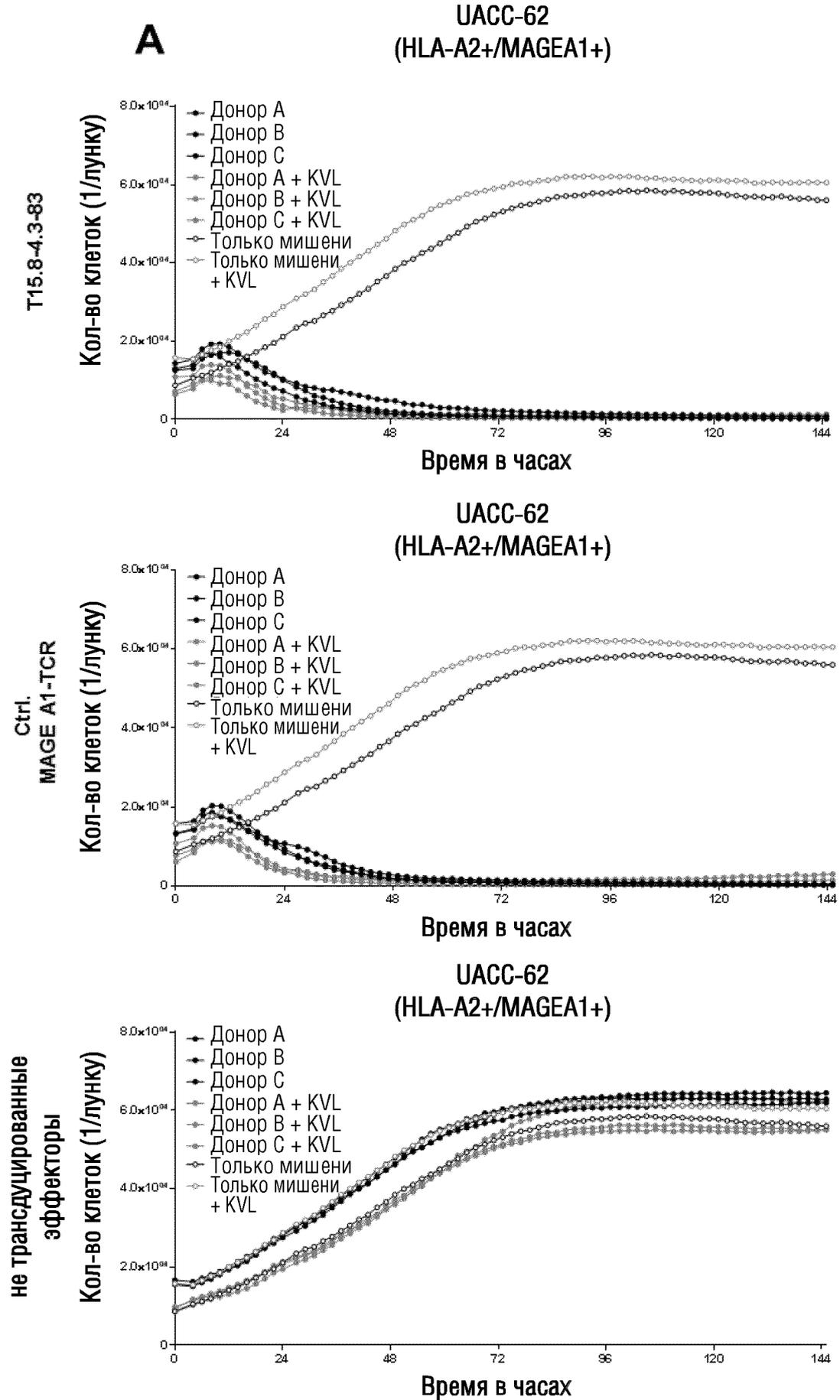
T15.8-4.3-83



Ctrl MAGEA1-TCR

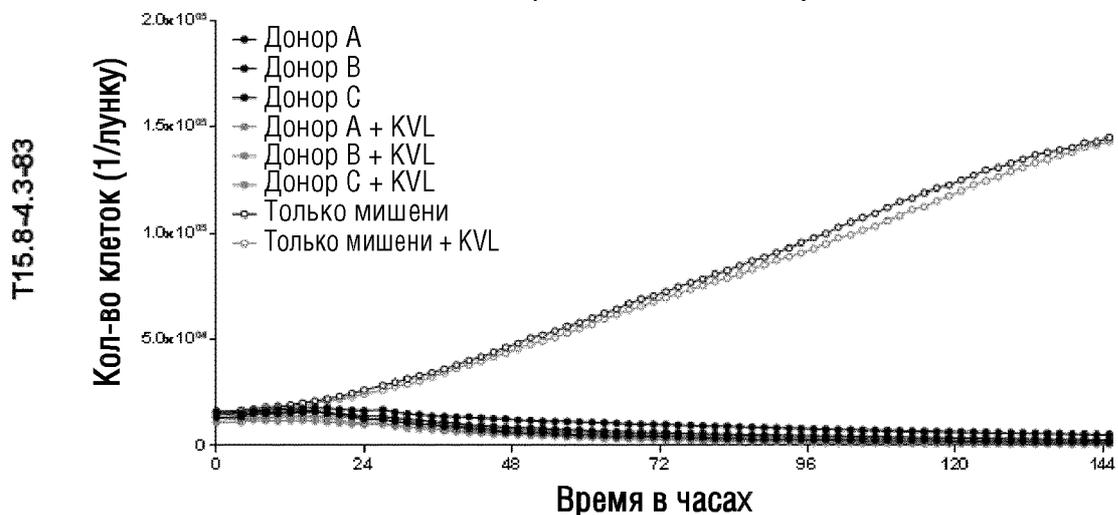


ФИГ.4А

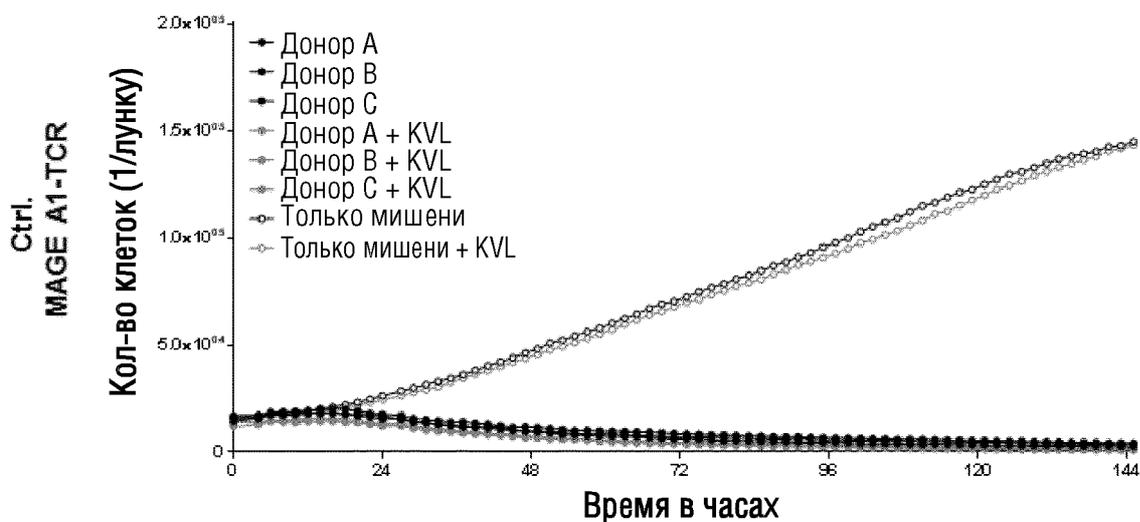


В

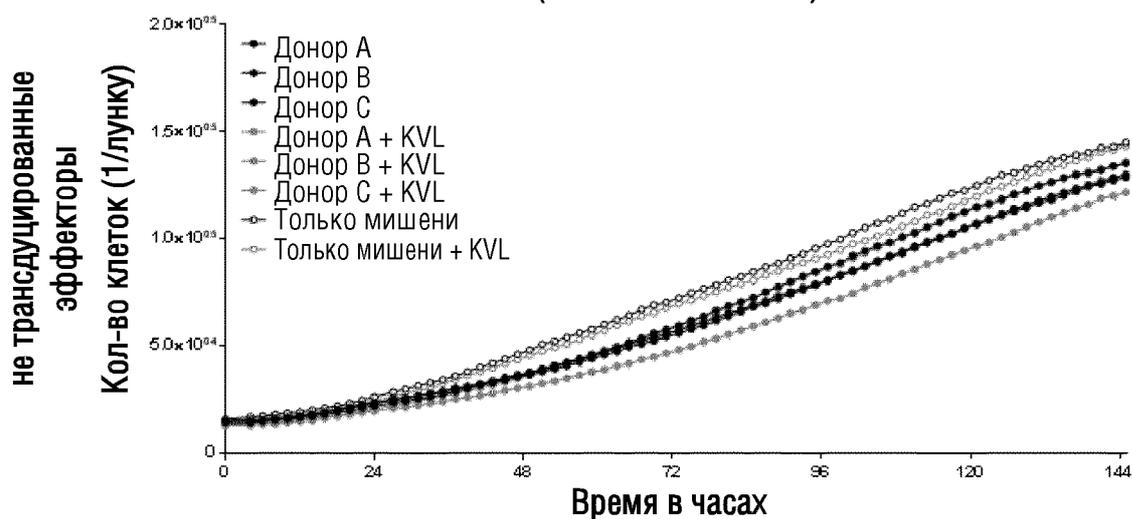
NCI-H1703
(HLA-A2+/MAGEA1+)



NCI-H1703
(HLA-A2+/MAGEA1+)

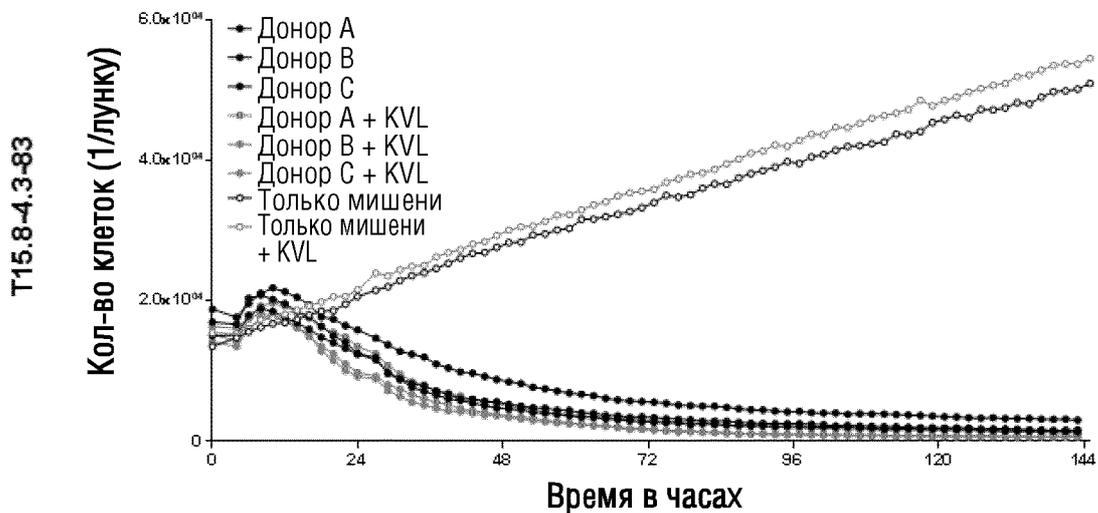
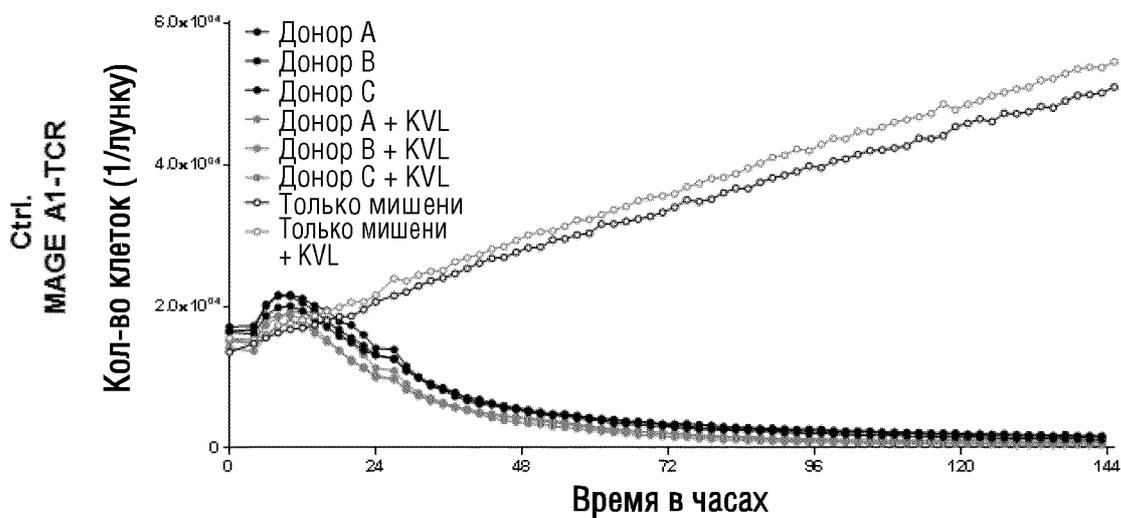
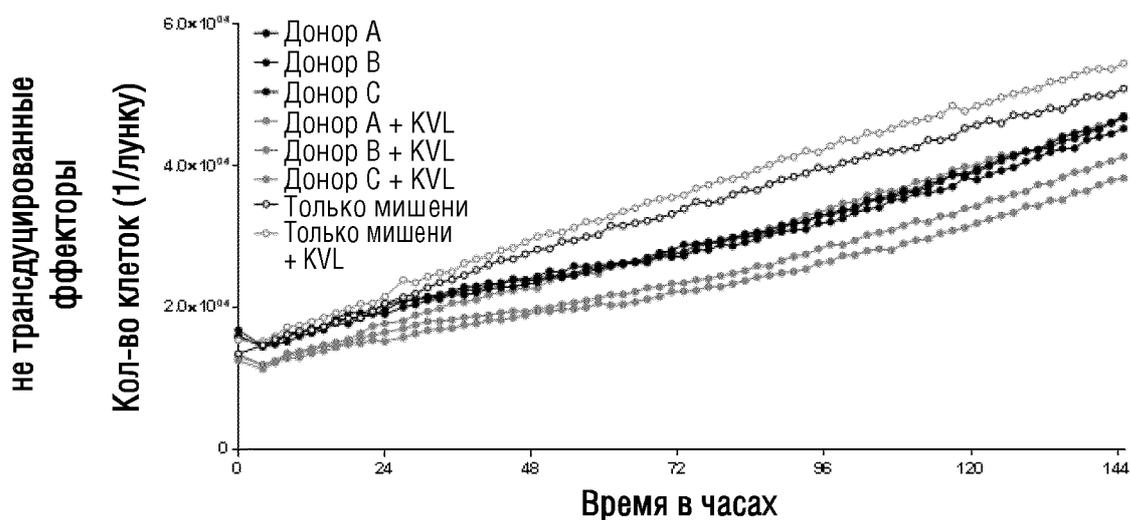


NCI-H1703
(HLA-A2+/MAGEA1+)

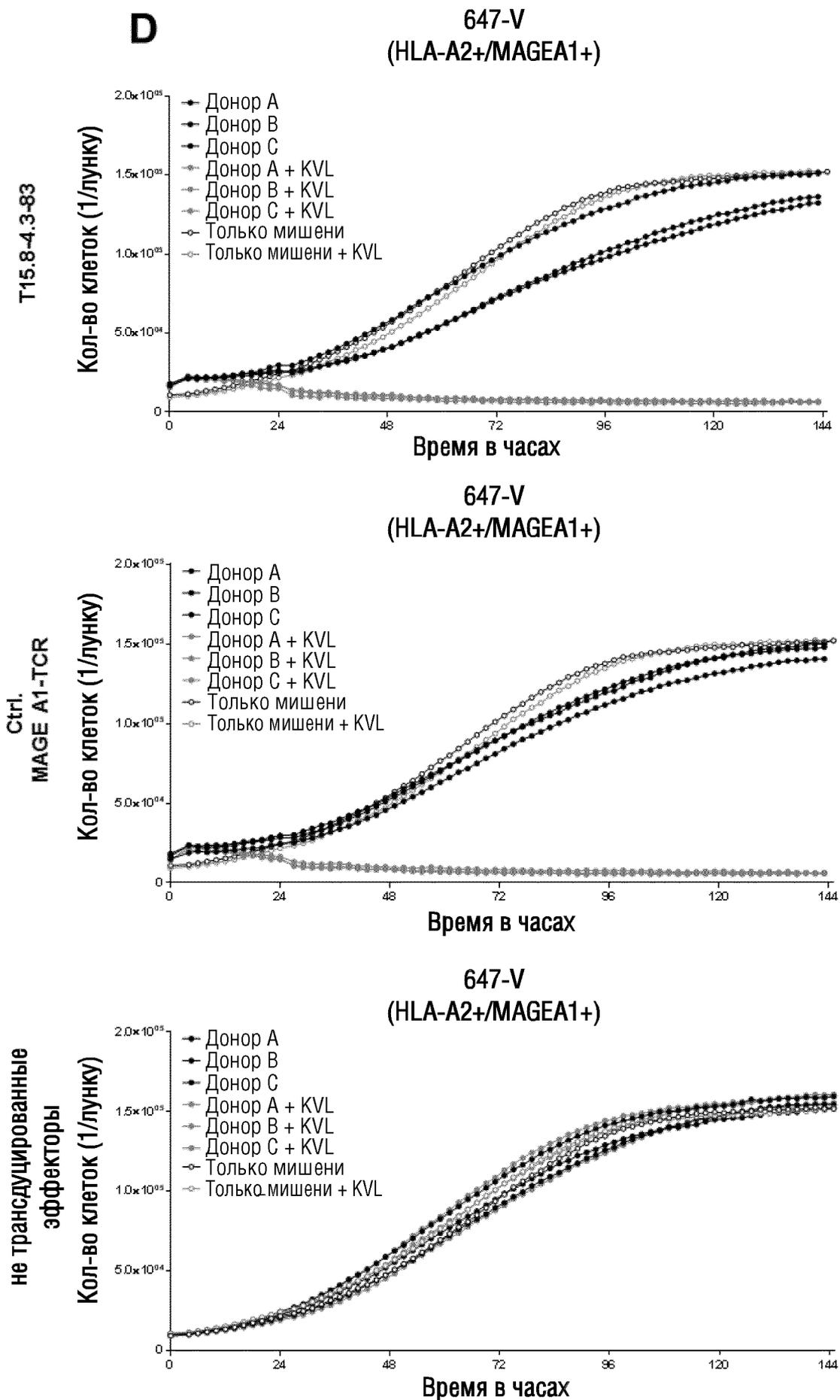


ФИГ.4С

С

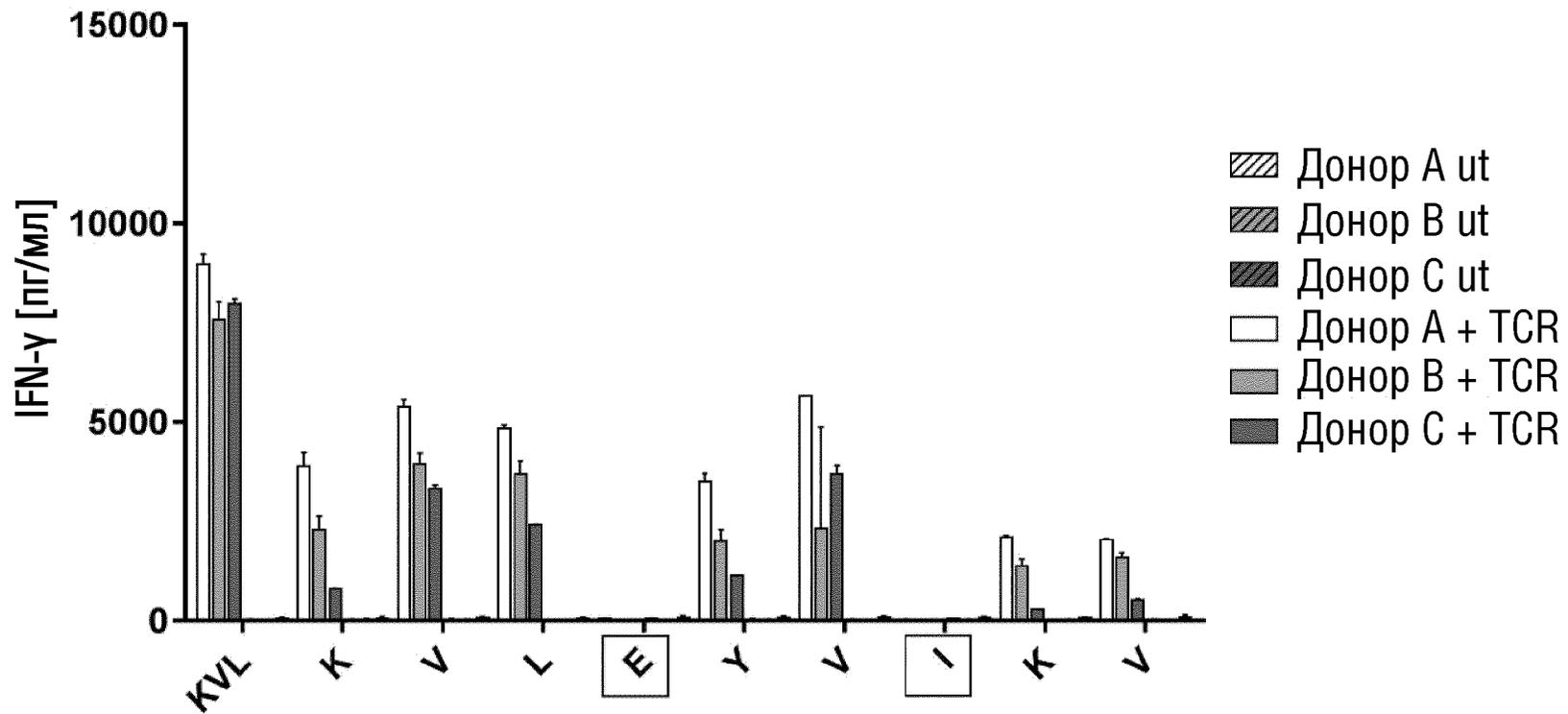
Saos-2
(HLA-A2+/MAGEA1+)Saos-2
(HLA-A2+/MAGEA1+)Saos-2
(HLA-A2+/MAGEA1+)

ФИГ.4D



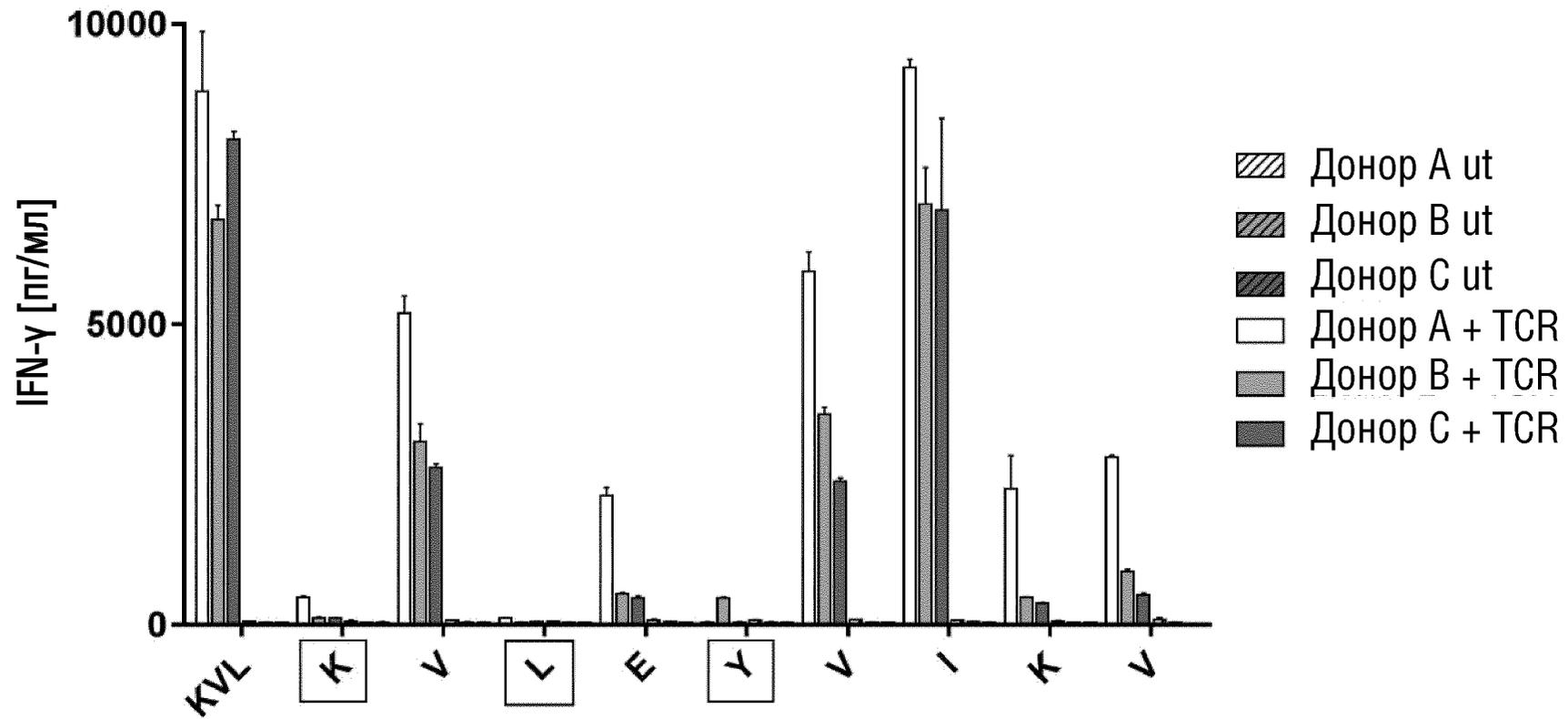
ФИГ.5

Сканирование с треониновым замещением
Ctrl. MAGEA1-TCR

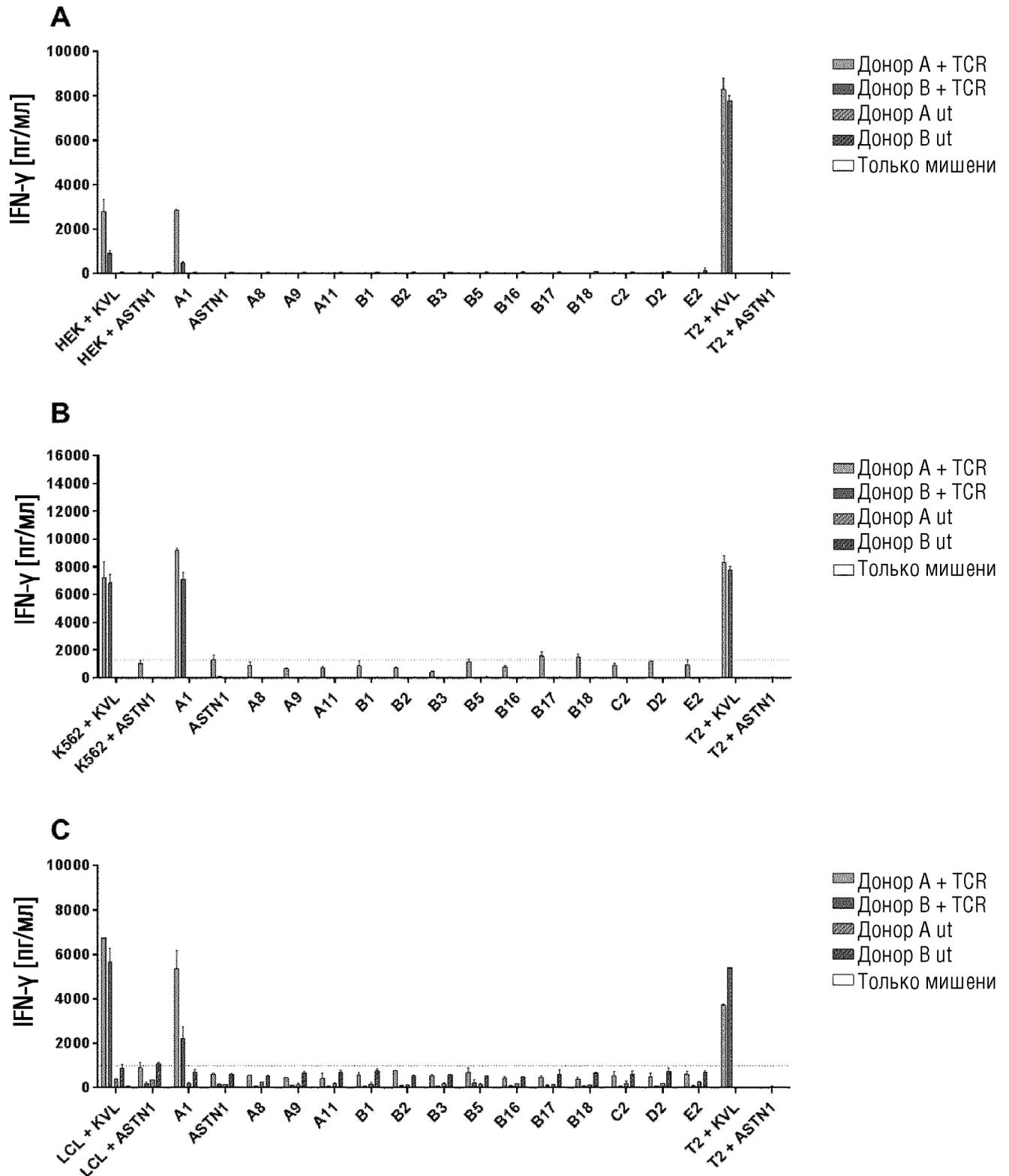


ФИГ.6

Сканирование с треониновым замещением
T15.8-4.3-83

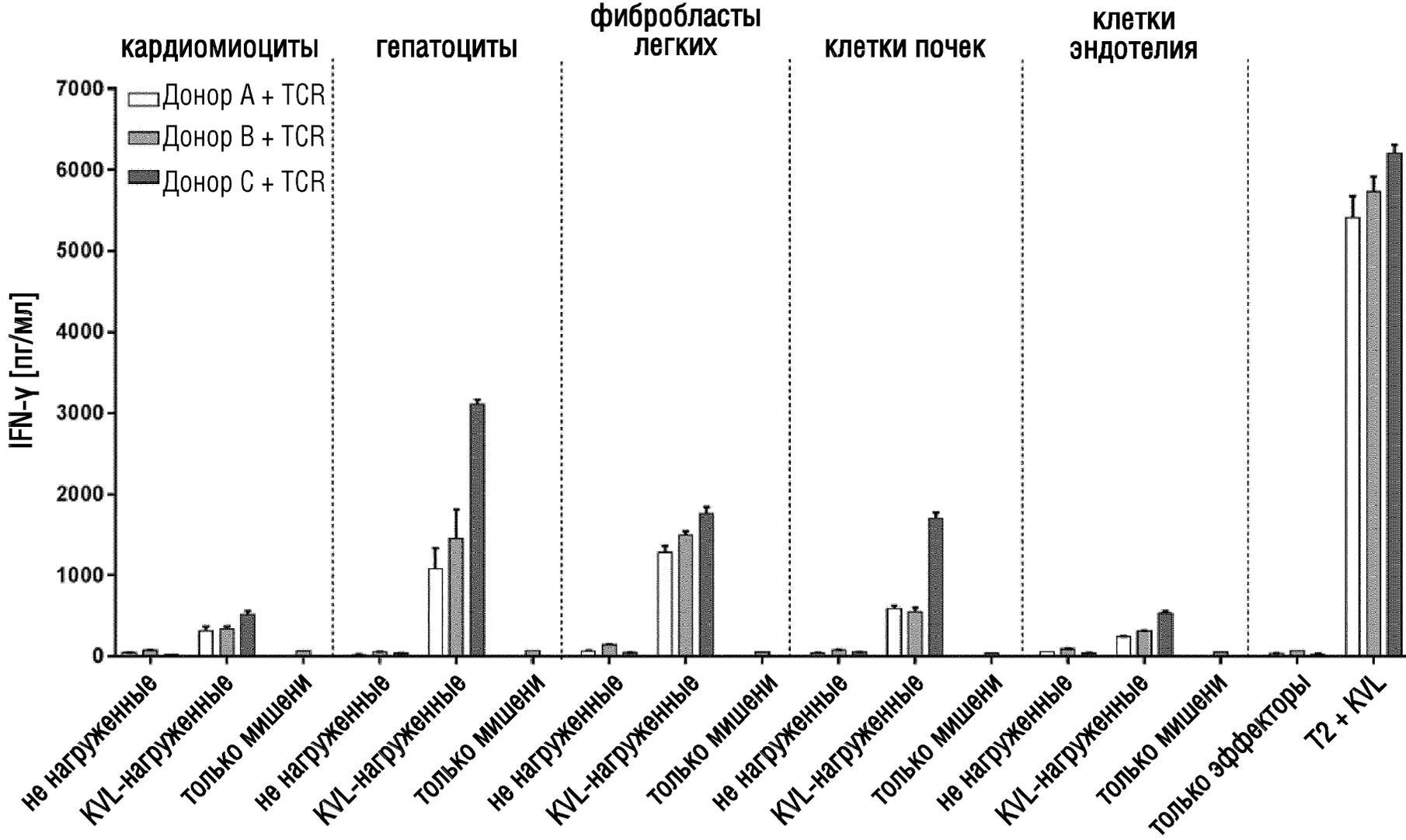


ФИГ.7

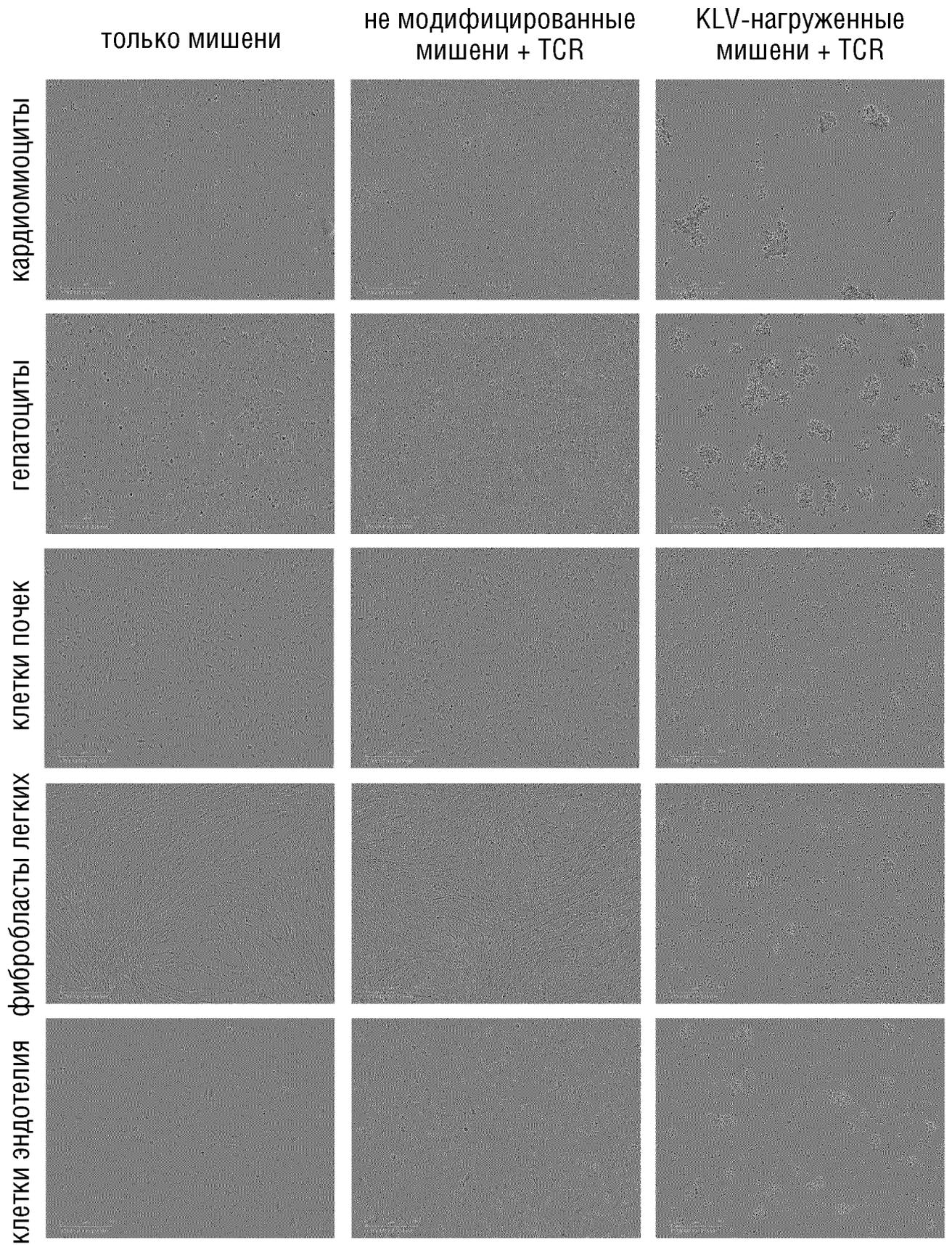


ФИГ.8

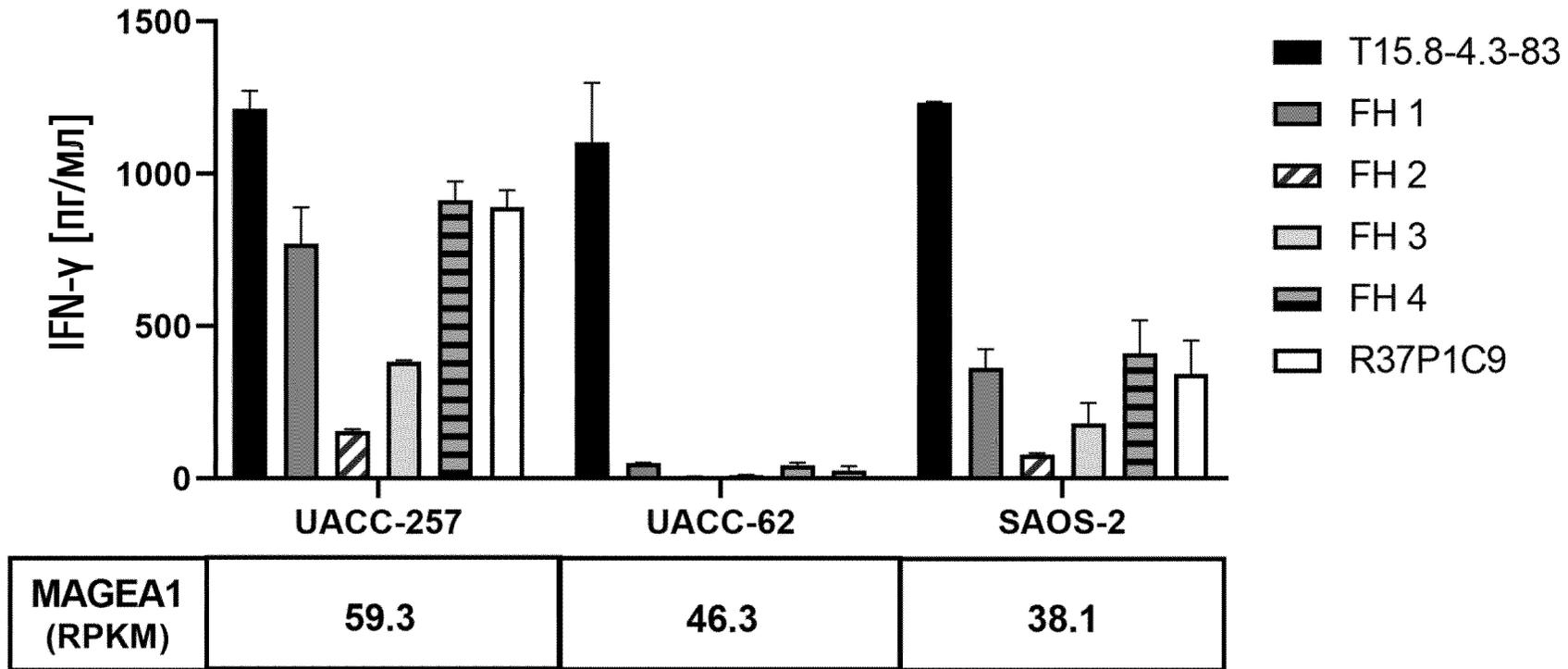
T15.8-4.3-83



ФИГ.9

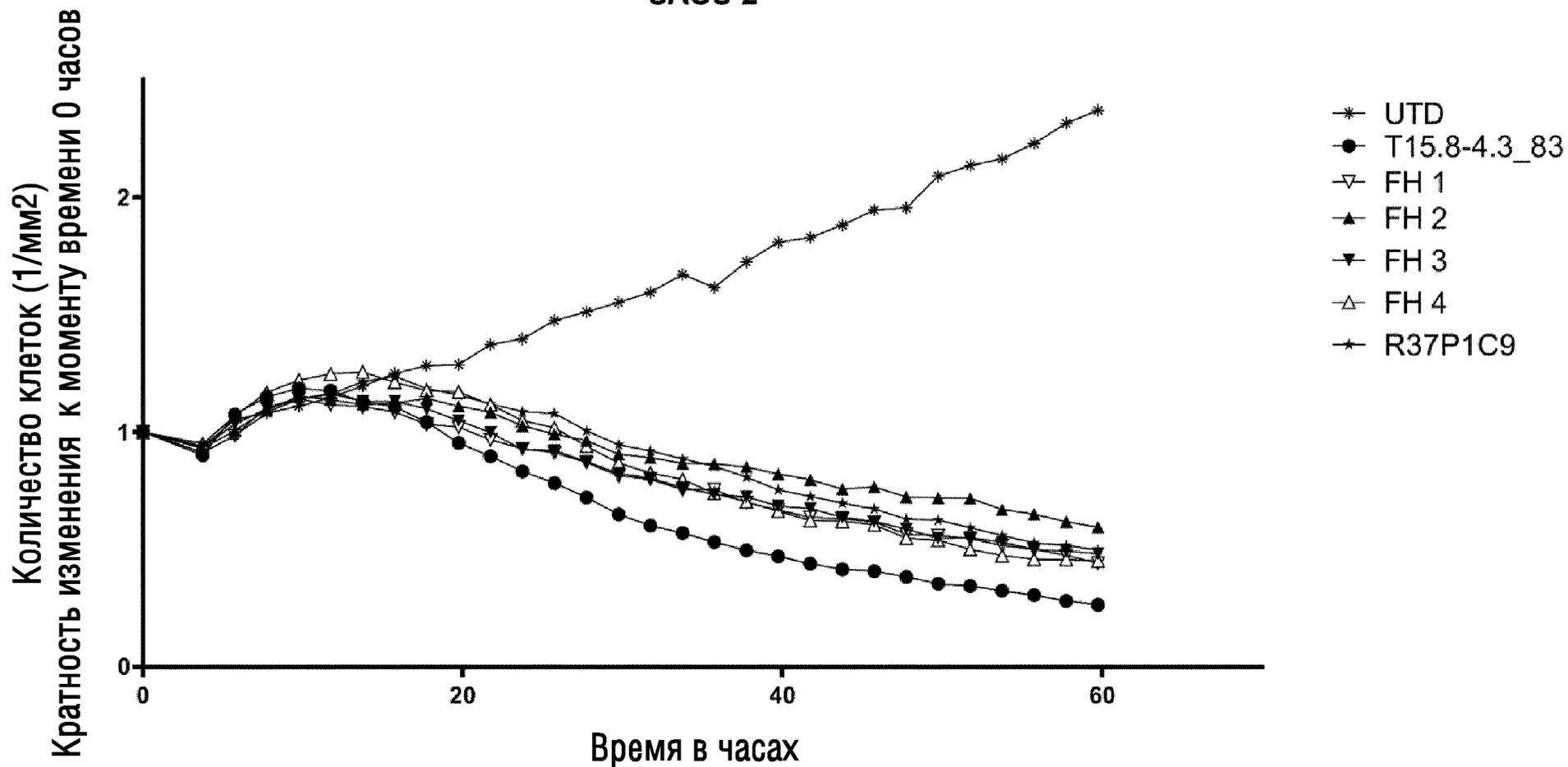


ФИГ.10

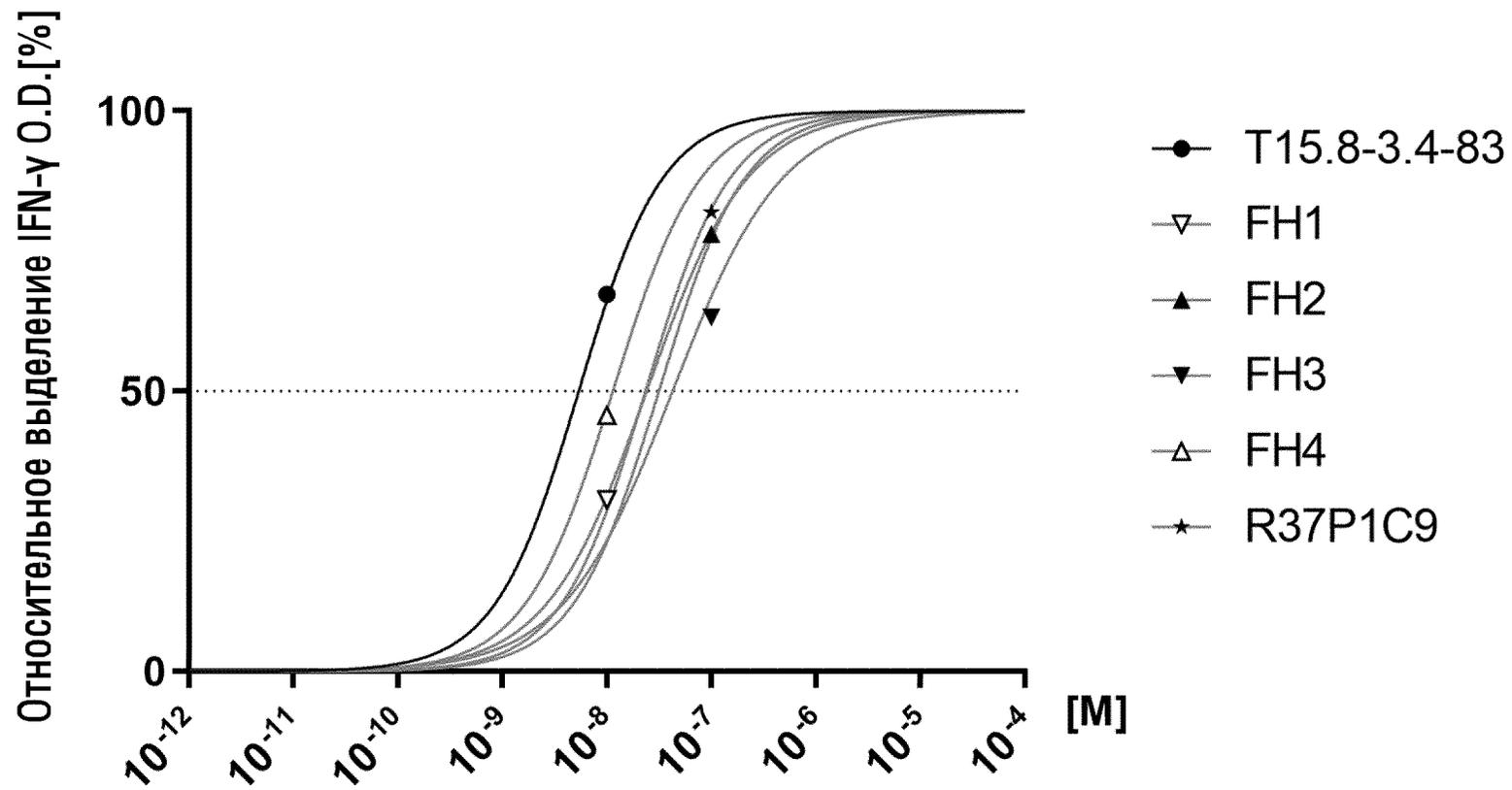


ФИГ.11

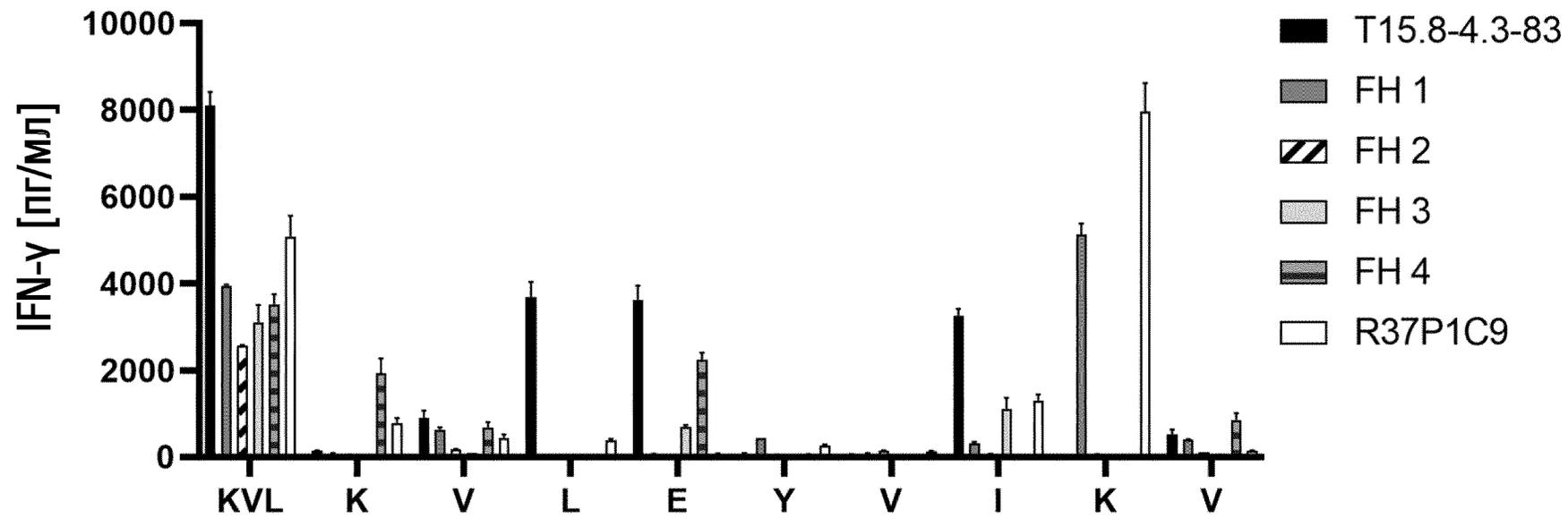
SAOS-2



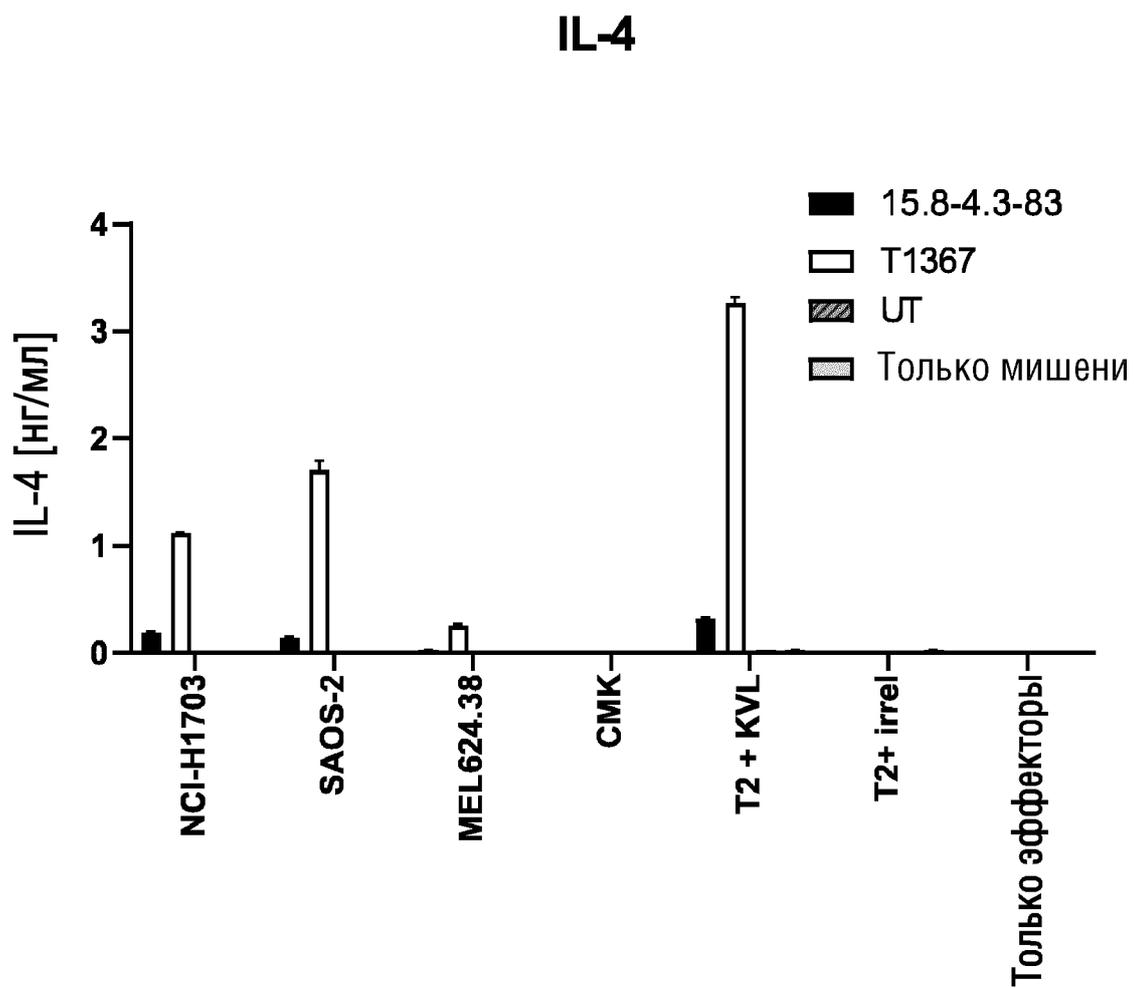
ФИГ.12



ФИГ.13

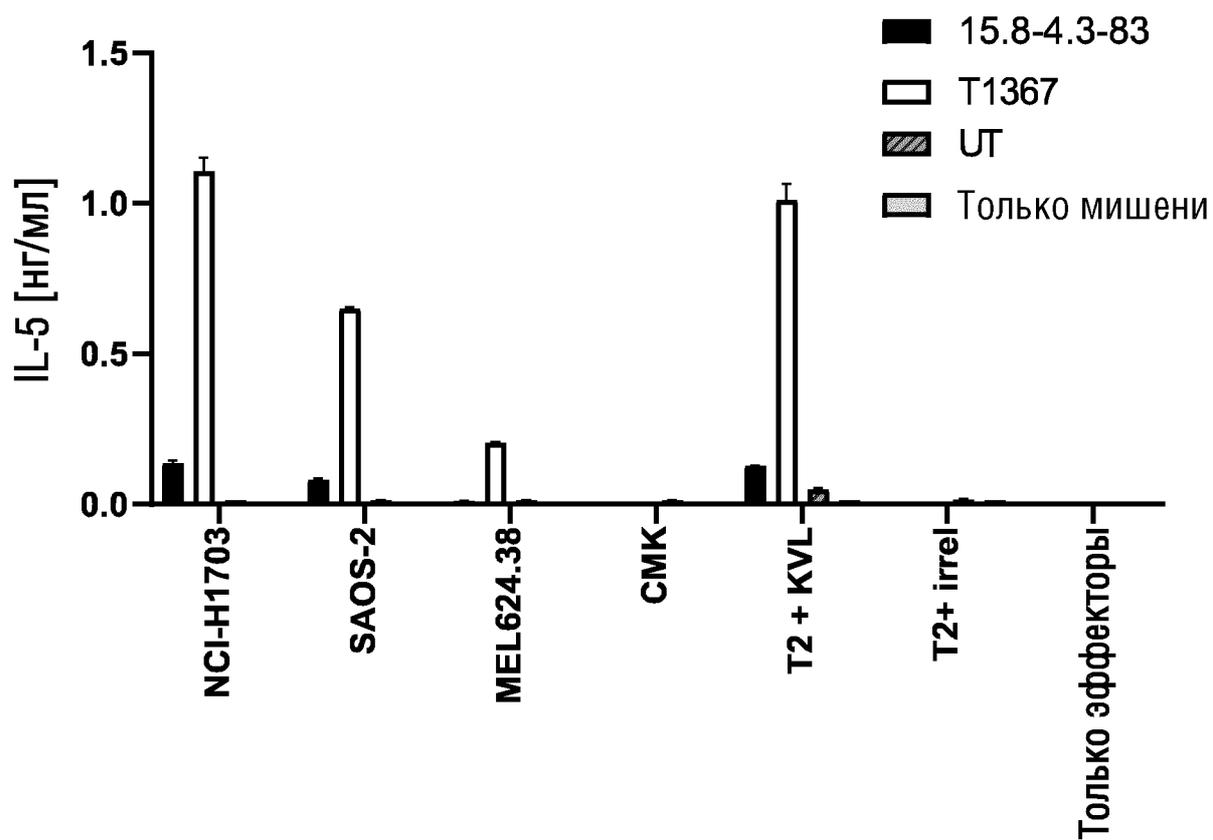


ФИГ.14А



ФИГ.14В

IL-5



ФИГ.14С

IL-13

