(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202290212 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.26

(22) Дата подачи заявки
2020.07.02

(51) Int. Cl. ***A61K 38/00*** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ПРОТИВ НЬЮ-ЙОРКСКОЙ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ПИЩЕВОДА 1 (NY-ESO-1) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

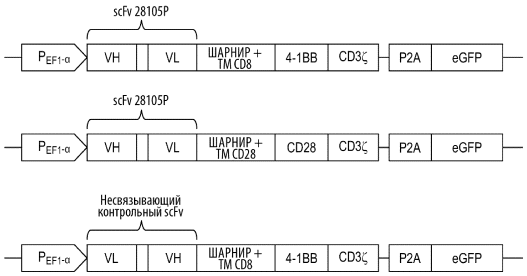
(31) **62/870,232; 63/020,177; 63/021,826**
(32) **2019.07.03; 2020.05.05; 2020.05.08**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/040642**
(87) **WO 2021/003357 2021.01.07**

(71) Заявитель:
РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Брэй Кевин Э., Дельфино Фрэнк, Дайлилло Дэвид, Франклин Мэттью К., Киршнер Джессика, Макдоналд Дуглас (US)

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

(57) В данном изобретении предложены антигенсвязывающие белки, которые специфически связываются с пептидом нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (NY-ESO-1), отображаемым с помощью HLA, терапевтические и диагностические способы применения указанных связывающих белков. Антигенсвязывающие белки по данному изобретению связываются с высокой специфичностью с NY-ESO-1, отображаемым с помощью HLA, и не связываются с пептидами, отображаемыми с помощью HLA, которые отличаются на 2, 3, 4, 5 или более аминокислот.



202290212 A1

202290212 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572575EA/019

АНТИГЕН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ПРОТИВ НЬЮ-ЙОРКСКОЙ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ПИЩЕВОДА 1 (NY-ESO-1) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] В данной заявке заявляется приоритет по предварительной патентной заявке США № 62/870232, поданной 3 июля 2019 г., предварительной патентной заявке США № 63/020177, поданной 5 мая 2020 г., и предварительной патентной заявке США № 63/021826, поданной 8 мая 2020 г. Полное содержание каждой из вышеуказанных заявок включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка содержит Перечень последовательностей, который подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Копия указанного файла ASCII, созданная 2 июля 2020 г., называется 118003_10520_SL.txt и имеет размер 245227 байта.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Данное изобретение относится к антиген-связывающим белкам, которые специфически связываются с пептидом нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (NY-ESO-1), отображаемым с помощью HLA, и терапевтическим и диагностическим способам применения указанных связывающих белков.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Нью-йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1 (NY-ESO-1) представляет собой раково-тестикулярный антиген (CTA), также именуемый как CTAG1B. Экспрессия NY-ESO-1, кодируемого геном CTAG1B, ограничена зародышевыми клетками. Однако NY-ESO-1 часто ошибочно реэкспрессируется в опухолях различных типов. Основной белковый продукт гена CTAG1B представляет собой белок длиной 180 аминокислот массой 18 кДа с N-концевой областью, богатой глицином, и чрезвычайно гидрофобной С-концевой областью. Однако функция NY-ESO-1 остается неясной.

[0005] Были обнаружены и проанализированы самопроизвольные ответы $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клеток на NY-ESO-1 у пациентов с раком (Jager, E. et al. (1998) J Exp Med 187:265-270; Jager, E. et al. (2000) J Exp Med 191:628-630). В частности, было обнаружено, что пептиды NY-ESO-1 157-165, 157-167 и 155-163 ограничены HLA-A2 в опухолереактивных $CD8^+$ Т-клеточных линиях, а пептид 56-62 распознается HLA-A31 $CD8^+$ Т-клетками (Jager et al. (1998) J. Exp Med 187:265-270; Wang, R.F. et al. (1998) J. Immunol 161:3598-3606). Было продемонстрировано несколько эпитопов, ограниченных HLA-DR4, в ответах CD4 Т-клеток, а ответы на пептид 157-170 были ограничены HLA-DP4, аллелью, найденной у большинства представителей европеоидной расы (Jager et al. (2000) J Exp Med 191:625-630; Zang et al. (2001) Proc Natl Acd Sci USA 98:3964-3969).

[0006] Способность NY-ESO-1 вызывать спонтанные гуморальные и клеточные иммунные ответы вместе с его ограниченным профилем экспрессии представляет его в качестве подходящего кандидата для противораковой терапии. Хотя антиген NY-ESO-1 оценивали как потенциальную противораковую вакцину, было получено мало полных гуморальных и клеточных иммунных ответов. В самом деле, применение NY-ESO-1 в качестве терапевтической мишени является трудным вследствие сложности разработки антиген-связывающих белков, которые нацелены на антигены, презентируемые HLA, и необходимости избегать нецелевого связывания, так чтобы предупреждать неспецифическое связывание, которое может приводить к снижению терапевтической эффективности и усилению побочных эффектов (например, неспецифическая цитотоксичность, которая снижает активность уничтожения опухолевых клеток и/или вызывает побочные эффекты у субъектов).

[0007] Следовательно, существует неудовлетворенная потребность в данной области техники относительно новых терапевтических стратегий для нацеливания на NY-ESO-1 с высокой специфичностью и для лечения раковых заболеваний, связанных с NY-ESO-1.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] В данном изобретении предложены антиген-связывающие белки, которые специфически связываются с конформационным эпитопом пептида нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (NY-ESO-1), отображаемым с помощью HLA. Антиген-связывающие белки по данному изобретению связываются с высокой степенью специфичности с отображаемым с помощью HLA NY-ESO-1 и не связываются с отображаемыми с помощью HLA пептидами, которые отличаются на 2, 3, 4, 5 или более аминокислот. Антиген-связывающие белки по данному изобретению делают возможным специфическое нацеливание на клетки, презентирующие пептид NY-ESO-1 (т.е. клетки, презентирующие на своей поверхности пептид NY-ESO-1, связанный с молекулой MHC, например HLA-A2), такие как раковые клетки, экспрессирующие NY-ESO-1, а в некоторых вариантах осуществления изобретения стимуляцию активации Т-клеток, например, для стимуляции опосредованного Т-клетками уничтожения таких клеток. Кроме того, при связывании с обнаружимым фрагментом антиген-связывающие белки по данному изобретению делают возможным диагностику и прогноз NY-ESO-1-положительных заболеваний или расстройств с высокой чувствительностью к изменениям в количестве и распределении клеток, презентирующих пептид NY-ESO-1, что является более уместным показателем прогрессирования заболевания, чем уровни NY-ESO-1 в кровотоке.

[0009] Антиген-связывающие белки по изобретению могут представлять собой антитела, такие как антитела полной длины (например, антитело IgG1 или IgG4), или могут содержать только антиген-связывающую часть антитела (например, фрагмент Fab, $F(ab')_2$ или scFv) и могут быть модифицированными для изменения функциональных свойств, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000,

J. Immunol. 164:1925-1933). В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки по изобретению могут представлять собой антитела или их антиген-связывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки могут быть биспецифическими.

[0010] В первом аспекте в данном изобретении предложены рекомбинантные антиген-связывающие белки, которые специфически связываются с конформационным эпитопом отображаемого с помощью HLA пептида нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (NY-ESO-1), такого как отображаемый с помощью HLA пептид, содержащий аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки представляют собой антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела являются полностью человеческими.

[0011] Иллюстративные антитела к HLA-A2: белки, связывающие антиген NY-ESO-1, по данному изобретению перечислены в Таблицах 1 и 2 в данном документе. В Таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR), вариабельных областей легкой цепи (LCVR), гипервариабельных областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и гипервариабельных областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к HLA-A2:NY-ESO-1. В Таблице 2 представлены идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к HLA-A2:NY-ESO-1.

[0012] В данном изобретении предложены антиген-связывающие белки, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1, или по существу подобную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,9% или 100% идентична указанной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок, характеризующийся идентичностью последовательности менее 100%, содержит последовательности CDR из HCVR Таблицы 1. Например, такой антиген-связывающий белок может содержать такие последовательности CDR, но отличаться в каркасной области по сравнению с HCVR из Таблицы 1.

[0013] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1, или

по существу подобную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,9% или 100% идентична указанной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок, характеризующийся идентичностью последовательности менее 100%, содержит последовательности CDR из LCVR Таблицы 1. Например, такой антиген-связывающий белок может содержать такие последовательности CDR, но отличаться в каркасной области по сравнению с LCVR из Таблицы 1.

[0014] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR , перечисленных в Таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в данном изобретении предложены антиген-связывающие белки, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая содержится в любом из иллюстративных антиген-связывающих белков к HLA-A2:NY-ESO-1, перечисленных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID №: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/203, 211/219 и 230/238. В некоторых вариантах осуществления изобретения пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из одной из SEQ ID №: 2/10 (например, mAb24955N), 22/30 (например, mAb24956N), 42/50 (например, mAb24958N) и 62/70 (например, mAb24959N).

[0015] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность, перечисленную в Таблице 1, содержащую не более чем пять аминокислотных замен, а указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность, перечисленную в Таблице 1, содержащую не более пяти аминокислотных замен. Например, в данном изобретении предложены антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID №: 2, содержащую не более пяти аминокислотных замен, а указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID №: 10, содержащую не более пяти аминокислотных замен. В другом иллюстративном варианте осуществления в данном изобретении предложены антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, содержащие

HCVR и LCVR, при этом указанная HCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID №: 2, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену, а указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID №: 10, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену.

[0016] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в Таблице 1, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0017] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в Таблице 1, или по существу подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0018] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в Таблице 1, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0019] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей

LCDR1, перечисленных в Таблице 1, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0020] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в Таблице 1, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0021] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в Таблице 1, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0022] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в Таблице 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в Таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в данном изобретении предложены антиген-связывающие белки, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, которая содержится в любом из иллюстративных антиген-связывающих белков к HLA-A2:NY-ESO-1, перечисленных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы,

состоящей из SEQ ID №: 8/16 (например, mAb24955N), 28/36 (например, mAb24956N), 48/56 (например, mAb25958N) и 68/76 (например, mAb24959N).

[0023] В данном изобретении также представлены антиген-связывающие белки, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная HCVR содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в Таблице 1, на 1 аминокислоту, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в Таблице 1, на 1 аминокислоту, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в Таблице 1, на 1 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении представлены антиген-связывающие белки, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная LCVR содержит LCVR1, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в Таблице 1, на 1 аминокислоту, LCVR2, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в Таблице 1, на 1 аминокислоту, и LCVR3, содержащую аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности, перечисленной в Таблице 1, на 1 аминокислоту. Например, в данном изобретении предложены антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная HCVR содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №: 4 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID №: 4 на 1 аминокислоту; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №: 6 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID №: 6 на 1 аминокислоту; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №: 8 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID №: 8 на 1 аминокислоту. В другом иллюстративном варианте осуществления в данном изобретении предложены антиген-связывающие белки, содержащие HCVR и LCVR, при этом указанная LCVR содержит LCVR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №: 12 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID №: 12 на 1 аминокислоту; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №: 14 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID №: 14 на 1 аминокислоту; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №: 16 или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID №: 16 на 1 аминокислоту.

[0024] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из иллюстративных антиген-связывающих белков, перечисленных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы,

состоящей из SEQ ID №: 4-6-8-12-14-16 (например, mAb24955N), 24-26-28-32-34-36 (например, mAb24956N), 44-46-48-52-54-56 (например, mAb24958N) и 64-66-68-72-74-76 (например, mAb24959N).

[0025] В связанном варианте осуществления в данном изобретении предложены антиген-связывающие белки, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено в любом из иллюстративных антиген-связывающих белков, перечисленных в Таблице 1. Например, данное изобретение включает антиген-связывающие белки, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №: 2/10 (например, mAb24955N), 22/30 (например, mAb24956N), 42/50 (например, mAb24958N) и 62/70 (например, mAb24959N).

[0026] Способы и приемы идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут быть использованы для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в данном документе. Иллюстративные допущения, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение по AbM. В общих словах определение по Kabat основано на вариабельности последовательности, определение по Chothia основано на положении областей структурной петли, а определение по AbM представляет собой среднее между подходами по Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Также для идентификации последовательностей CDR в антиген-связывающем белке доступны общие базы данных.

[0027] Данное описание включает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, содержащие модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть полезной модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, или антитело без фрагмента фукозы, имеющегося на олигосахаридной цепи, например, для повышения функции клеточной токсичности, зависимой от антитела (ADCC), (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях модификацию галактозилирования можно осуществить, чтобы модифицировать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC).

[0028] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки по данному изобретению представляют собой моноклональные антитела, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR ,

перечисленных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения моноклональные антитела содержат домен изотипа, выбранного из группы, состоящей из IgA, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM и их вариантов.

[0029] В данном изобретении предложены антиген-связывающие белки или их антиген-связывающие фрагменты, содержащие тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в Таблице 3, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок, характеризующийся идентичностью последовательности менее 100%, содержит последовательности CDR из HC Таблицы 3. Например, такой антиген-связывающий белок может содержать такие последовательности CDR, но отличаться в каркасной области по сравнению с HC из Таблицы 3.

[0030] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки или их антиген-связывающие фрагменты, содержащие легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в Таблице 3, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок, характеризующийся идентичностью последовательности менее 100%, содержит последовательности CDR из LC Таблицы 3. Например, такой антиген-связывающий белок может содержать такие последовательности CDR, но отличаться в каркасной области по сравнению с LC из Таблицы 3.

[0031] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки или их антиген-связывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HC и LC (HC/LC), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в Таблице 3, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в Таблице 3. В соответствии с

некоторыми вариантами осуществления в данном изобретении предложены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HC/LC, которая содержится в любом из иллюстративных антител к NY-ESO-1, перечисленных в Таблице 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения пара аминокислотных последовательностей HC/LC выбрана из группы, состоящей из SEQ ID №: 18/20, 38/40, 58/60 и 78/80. В некоторых вариантах осуществления изобретения пара аминокислотных последовательностей HC/LC выбрана из группы, состоящей из SEQ ID №: 18/20, 38/40, 58/60 и 78/80.

[0032] В одном аспекте в данном изобретении предложены антиген-связывающие белки или их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с HLA-пептидным комплексом, при этом антиген-связывающий белок или его антиген-связывающий фрагмент контактирует с по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% аминокислотных остатков пептида, который входит в состав HLA-пептидного комплекса. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок или его антиген-связывающий фрагмент «охватывает» или контактирует со всеми аминокислотными остатками пептида, входящего в состав HLA-пептидного комплекса. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок или его антиген-связывающий фрагмент связывается с HLA-пептидным комплексом с высокой аффинностью и специфичностью, при этом антиген-связывающий белок или его антиген-связывающий фрагмент контактирует по всей длине отображаемого пептида. «Контактирует», при использовании в данном документе, включает прямые или опосредованные водой водородные связи, взаимодействия заряд-заряд или гидрофобные/ван-дер-ваальсовы взаимодействия. В одном варианте осуществления изобретения антиген-связывающий белок или его антиген-связывающий фрагмент связывается комплексом HLA-A2-пептид-NY-ESO-1 157-165, при этом антиген-связывающий белок связывается с по меньшей мере 3 из 9 аминокислотных остатков пептида 157-165 (SEQ ID №: 269) и с HLA-A2, так что антиген-связывающий белок приблизительно центрирован на пептиде в пептид-связывающей полости HLA-A2, таким образом «покрывая» (физически блокируя) комплекс HLA-A2-пептид. В другом варианте осуществления изобретения антиген-связывающий белок или его антиген-связывающий фрагмент связывается с комплексом HLA-A2-пептид-NY-ESO-1 157-165, при этом антиген-связывающий белок связывается с по меньшей мере 3 из 9 аминокислотных остатков пептида 157-165 (SEQ ID №: 270 или 291) и с HLA-A2, так что антиген-связывающий белок приблизительно центрирован на пептиде в пептид-связывающей полости HLA-A2, таким образом «покрывая» (физически блокируя) комплекс HLA-A2-пептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок или его антиген-связывающий фрагмент содержит CDR HCVR и CDR LCVR, при этом каждая HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в Таблице 1. В одном варианте осуществления изобретения антиген-связывающий белок является полностью

человеческим. В некоторых вариантах осуществления изобретения полностью человеческие антиген-связывающие белки не являются полученными с использованием способов и приемов фагового отображения. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки содержат вариабельную область легкой цепи подтипа IGKV1-39. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки содержат вариабельную область легкой цепи подтипа IGKJ1.

[0033] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены антиген-связывающие белки или их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с пептидным комплексом HLA-A2:NY-ESO-1 157-165, при этом антиген-связывающий белок связывается с одной или более аминокислотами из SEQ ID №: 269. В одном варианте осуществления изобретения антиген-связывающий белок связывается с по меньшей мере 3 аминокислотами из SEQ ID №: 269.

[0034] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены антиген-связывающие белки или их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с пептидным комплексом HLA-A2:NY-ESO-1 157-165, при этом антиген-связывающий белок связывается с одной или более аминокислотами из SEQ ID №: 270 или 291. В одном варианте осуществления изобретения антиген-связывающий белок связывается с по меньшей мере 3 аминокислотами из SEQ ID №: 270 или 291. В одном варианте осуществления изобретения антиген-связывающий белок связывается с одной или более аминокислотами, выбранными из группы, состоящей из M160, W161 и Q164 из SEQ ID №: 270.

[0035] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен антиген-связывающий белок, который специфически связывается с конформационным эпитопом отображаемого с помощью HLA пептида нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (NY-ESO-1), при этом конформационный эпитоп содержит одну или более аминокислот SEQ ID №: 269.

[0036] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен антиген-связывающий белок, который специфически связывается с конформационным эпитопом отображаемого с помощью HLA пептида нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (NY-ESO-1), при этом конформационный эпитоп содержит одну или более аминокислот SEQ ID №: 270 или 291. В некоторых вариантах осуществления изобретения конформационный эпитоп содержит одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из M160, W161 и Q164 из SEQ ID №: 270 или 291.

[0037] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, которые конкурируют за специфическое связывание с HLA-A2:NY-ESO-1 с антиген-связывающим белком, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, при этом каждая HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в Таблице 1.

[0038] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, которые перекрестно конкурируют за связывание с HLA-A2:NY-ESO-1 с эталонным

антиген-связывающим белком, содержащим CDR HCVR и CDR LCVR, при этом каждая HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в Таблице 1.

[0039] В данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонный антиген-связывающий белок, содержащий CDR HCVR и CDR LCVR, при этом каждая HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, перечисленных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении также предложены антиген-связывающие белки, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонный антиген-связывающий белок, содержащий CDR HCVR и CDR LCVR, при этом HCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID №: 2, 22, 42 и 62, и LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID №: 10, 30, 50 и 70.

[0040] В одном варианте осуществления в изобретении предложен рекомбинантный антиген-связывающий белок, который специфически связывается с конформационным эпитопом презентируемого с помощью HLA-A2 пептида нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (NY-ESO-1), при этом антиген-связывающий белок обладает свойством, выбранным из группы, состоящей из: (a) связывается с мономерным пептидным комплексом HLA-A2:NY-ESO-1 157-165 (C165 или V165) с равновесной константой связывания-диссоциации (K_D) менее чем около 1 нМ, как измерено с помощью анализа с использованием поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (b) связывается с клетками, экспрессирующими пептидный комплекс HLA-A2:NY-ESO-1 157-165, с EC_{50} менее чем около 10 нМ и не связывается с клетками, экспрессирующими предсказанные нецелевые пептиды, как определено с помощью проточного цитометрического анализа; и (c) эпитоп содержит одну или более аминокислот из SEQ ID №: 269, 270 или 291. Как раскрыто в любом месте в данном документе, «нецелевой пептид» относится к пептиду, который отличается на 2, 3, 4, 5 или более аминокислот от целевого пептида (например, пептида NY-ESO-1 157-165 (SEQ ID №: 269 и/или SEQ ID №: 270 или 291)).

[0041] Во втором аспекте в данном изобретении предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1. Например, в данном изобретении предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в Таблице 2, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей

мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0042] В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в Таблице 2, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0043] В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в Таблице 2, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0044] В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, перечисленных в Таблице 2, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на

97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0045] В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в Таблице 2, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0046] В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в Таблице 2, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0047] В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в Таблице 2, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на

97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0048] В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в Таблице 1; в некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в Таблице 2, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности.

[0049] В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, при этом HCVR содержит набор трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 определен любым из иллюстративных антиген-связывающих белков к HLA-A2:NY-ESO-1, перечисленных в Таблице 1.

[0050] В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, при этом LCVR содержит набор трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 определен любым из иллюстративных антиген-связывающих белков к HLA-A2:NY-ESO-1, перечисленных в Таблице 1.

[0051] В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, при этом HCVR содержит любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1, а LCVR содержит любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в Таблице 2, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности, и

полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в Таблице 2, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с этим аспектом изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, при этом обе HCVR и LCVR получены из одного и того же антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1, указанного в Таблице 1.

[0052] В данном изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, перечисленных в Таблице 3. В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей легкой цепи, перечисленных в Таблице 3.

[0053] В данном изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как тяжелую цепь (HC), так и легкую цепь (LC), при этом HC содержит любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в Таблице 3, а LC содержит любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в Таблице 3.

[0054] В связанном аспекте в данном изобретении предложены рекомбинантные экспрессионные вектора, способные экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой и/или легкой цепи антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1. Например, данное изобретение включает рекомбинантные экспрессионные вектора, содержащие любую из молекул нуклеиновых кислот, упомянутых выше, т.е. молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как представлено в Таблице 1. В данном изобретении также предложены рекомбинантные экспрессионные вектора, способные экспрессировать полипептид, содержащий тяжелую и/или легкую цепь антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1. Например, данное изобретение включает рекомбинантные экспрессионные вектора, содержащие любую из молекул нуклеиновых кислот, упомянутых выше, т.е. молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей тяжелой цепи или легкой цепи, как представлено в Таблице 2. Также в объем данного изобретения включены клетки-хозяева, в которые такие вектора были введены, а также способы получения антиген-связывающих белков путем культивирования клеток-хозяев в

условиях, позволяющих получение антиген-связывающих белков и выделение таким образом полученных антиген-связывающих белков.

[0055] В третьем аспекте в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество рекомбинантного антиген-связывающего белка, который специфически связывается с конформационным эпитопом пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2 (например, пептида, содержащего аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1), и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте в изобретении описана композиция, которая представляет собой комбинацию антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления изобретения второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который полезно объединить с антиген-связывающим белком к HLA-A2:NY-ESO-1. Иллюстративные агенты, которые можно с пользой объединить с антиген-связывающим белком к HLA-A2:NY-ESO-1 включают, без ограничения, другие агенты, которые модулируют активацию иммунной клетки. Дополнительные терапии, которые можно применять в комбинации с антиген-связывающими белками к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению, описаны везде в данном документе.

[0056] В четвертом аспекте в данном изобретении предложены способы лечения субъекта, имеющего заболевание или расстройство, связанное с NY-ESO-1, такое как NY-ESO-1-положительный рак. Способы включают введение терапевтически эффективного количества антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. Расстройство, которое лечат, представляет собой любое заболевание или патологическое состояние, которое улучшают, ослабляют, ингибируют или предотвращают с помощью антиген-связывающих белков и композиций, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок (или фармацевтическую композицию) по изобретению вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом субъекту, нуждающемуся в этом. Второй терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из антитела к Т-клеточному коингибитору, антитела к антигену опухолевой клетки, антитела к Т-клеточному рецептору, цитотоксического агента, противоракового лекарственного средства, противовоспалительного лекарственного средства (например, кортикостероиды), химиотерапевтического агента, хирургического вмешательства, лучевой терапии, иммунодепрессанта и любого другого лекарственного средства или терапии, известной в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй терапевтический агент может представлять собой агент, который помогает противодействовать или снижать любые возможные побочные эффекты (эффект), связанные с антиген-связывающим белком по изобретению, если такие побочные эффекты (эффект) будут возникать.

[0057] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы подавления роста рака, связанного с NY-ESO-1. Например, в данном изобретении предложены способы подавления роста опухоли, например первичной опухоли или метастатической опухоли, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы повышения выживаемости (например, выживаемости без прогрессирования или общей выживаемости) субъекта с раком, связанным с NY-ESO-1. Примеры рака включают, но не ограничиваясь ими, липосаркому, нейробластому, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, печеночно-клеточный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарную опухоль, мультиформную глиобластому, анапластическую астроцитому, опухоль мозга, рак фаллопиевых труб, эпителиальный рак яичника, первичный рак полости брюшины, солидные опухоли в прогрессирующей стадии, саркому мягких тканей, меланому, саркому, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, болезнь Ходжкина, множественную миелому, синовиальную саркому, метастатические солидные опухоли, рак пищевода, рабдомиосаркому, миксоидную опухоль в прогрессирующей стадии, круглоклеточную липосаркому, метастатическую меланому или рецидивирующий немелкоклеточный рак легкого.

[0058] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы ингибирования или подавления роста развившихся опухолей. Способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей терапевтический эффективное количество антиген-связывающего белка по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

[0059] Антиген-связывающий белок, например антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, можно вводить подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутрибрюшинно, перорально, внутримышечно или интракраниально. Антиген-связывающий белок, например антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, можно вводить в дозе от около 0,1 мг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела субъекта.

[0060] В пятом аспекте в данном изобретении предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), или клетка, экспрессирующая такой CAR (например, клетка, экспрессирующая CAR на своей поверхности). CAR может содержать внеклеточный связывающий домен, который специфически связывается с конформационным эпитопом пептида нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (NY-ESO-1), отображаемого с помощью HLA , например аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В одном варианте осуществления изобретения внеклеточный связывающий домен представляет собой антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1 или его антиген-связывающий фрагмент. Иллюстративные антиген-

связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению представляют собой любые из антиген-связывающих белков, описанных в данном документе.

[0061] Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок, пригодный для применения в CAR по изобретению, содержит три гипервариабельные области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), перечисленных в Таблице 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельной области легкой цепи (LCVR), перечисленных в Таблице 1.

[0062] В других вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок, пригодный для применения в CAR по изобретению, содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; и/или LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

[0063] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок, пригодный для применения в CAR по изобретению, содержит (a) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; и (b) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

[0064] В одном варианте осуществления изобретения антиген-связывающий белок, пригодный для применения в CAR по изобретению, содержит (a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 4, 24, 44, 64, 84, 104, 124, 144, 164, 213 и 232; (b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 6, 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 182, 199, 215 и 234; (c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168, 184, 201, 217 и 236; (d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 12, 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 188, 221 и 240; (e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 14, 34, 54, 74, 94, 114, 134, 154, 174 и 242; и (f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 16, 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 190, 205, 224 и 244.

[0065] В дополнительном варианте осуществления изобретения антиген-связывающий белок, пригодный для применения в CAR по изобретению, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/203, 211/219 и 230/238.

[0066] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок для применения в CAR по данному изобретению представляет собой scFv.

[0067] В других аспектах в данном изобретении предложены векторы, содержащие выделенные молекулы нуклеиновой кислоты CAR; и иммунные эффекторные клетки, содержащие такие вектора.

[0068] В других аспектах данного изобретения предложены способы лечения субъекта, имеющего заболевание или расстройство, связанное с NY-ESO-1, такое как NY-ESO-1-положительный рак, например, липосаркома, нейробластома, миелома, метастатическая меланома, синовиальная саркома, рак мочевого пузыря, рак пищевода, печеночно-клеточный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарная опухоль, мультиформная глиобластома, анапластическая астроцитома, опухоль мозга, рак фаллопиевых труб, эпителиальный рак яичника, первичный рак полости брюшины, солидные опухоли в прогрессирующей стадии, саркома мягких тканей, меланома, саркома, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, болезнь Ходжкина, множественная миелома, синовиальная саркома, метастатические солидные опухоли, рак пищевода, рабдомиосаркома, миксоидная опухоль в прогрессирующей стадии, круглоклеточная липосаркома, метастатическая меланома или рецидивирующий немелкоклеточный рак легкого. Способ включает введение субъекту популяции иммунных эффекторных клеток, содержащих CAR по изобретению.

[0069] В некоторых аспектах в данном изобретении предложены способы детектирования NY-ESO-1-положительных клеток, например, у субъекта или в образце, полученном от субъекта. Способы включают приведение в контакт клетки, такой как образец клетки, полученный от субъекта, или введение субъекту антиген-связывающего белка по изобретению, содержащего детектируемый фрагмент, и детектирование наличия детектируемого фрагмента.

[0070] Другие варианты осуществления изобретения будут очевидны из обзора последующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0071] Фиг. 1A изображает схемы трех различных конструкций CAR, в том числе промоторы и векторные элементы.

[0072] Фиг. 1B иллюстрирует объемы опухолей у мышей, на которых воздействовали Т-клетками, которые экспрессируют или несвязывающий контроль BB/z CAR (контрольные CAR T), CAR к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z или CAR к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR в течение дней 0-21. Левая часть: средний объем опухолей; правая часть: объемы опухолей отдельных мышей.

[0073] Фиг. 1C иллюстрирует объемы опухолей у мышей, на которых воздействовали Т-клетками, которые экспрессируют или несвязывающий контроль BB/z CAR (контрольные CAR T), CAR к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z или CAR к HLA-A2/NY-

ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR в течение дней 0-38. Левая часть: средний объем опухолей; правая часть: объемы опухолей отдельных мышей.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0074] До того, как способы данного изобретения будут описаны, необходимо понимать, что это изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, в силу этого способы и условия могут изменяться. Также необходимо понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена для описания только конкретных вариантов осуществления изобретения и не предполагается ограничивающей, поскольку объем данного изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0075] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой это изобретение относится. В данном документе описаны предпочтительные способы и материалы, хотя для практического осуществления или апробации данного изобретения можно использовать любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

[0076] Термины «NY-ESO-1», «NY-ESO-1», «нью-йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1» и «CTAG1B» относятся к хорошо известному раково-тестикулярному антигену (CTA), который реэспрессируется при раковых заболеваниях различных типов и кодируется геном CTAG1B.

[0077] Аминокислотная последовательность NY-ESO-1 полной длины представлена в GenBank под номером доступа NP_001318.1 (SEQ ID №: 271). Термин «NY-ESO-1» включает рекомбинантный NY-ESO-1 или его фрагмент. Термин также охватывает NY-ESO-1 или его фрагмент, присоединенный к, например, гистидиновому тегу, Fc мыши и человека или сигнальной последовательности, такой как ROR1. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин включает NY-ESO-1 или его фрагмент в контексте HLA-A2, связанный с HLA-A2 или отображаемый с помощью HLA-A2.

[0078] В некоторых вариантах осуществления изобретения пептид NY-ESO-1 включает аминокислоты 157-165 с SEQ ID №: 271 (SLLMWITQC (SEQ ID №: 269)) и называется в данном документе как «пептид NY-ESO-1_157-165C» или «пептид NY-ESO-1 (157-165)» (за исключением когда для «пептида NY-ESO-1 (157-165)» дополнительно уточняют, что он содержит C или V в положении 165). В других вариантах осуществления изобретения пептид NY-ESO-1 включает аминокислоты 157-165 с SEQ ID №: 271, в которой цистеин в положении 165 был заменен на валин (SLMMWITQV (SEQ ID №: 270)), и называется в данном документе «пептид NY-ESO-1_157-165V» или «NY-ESO-1 (пептид 157-165V)», или в ином случае обозначается «C165V» или «V165». Для простоты понятно, что, если иное не указано, термины «пептид NY-ESO-1_157-165», «NY-ESO-1

(157-165)» и «пептид, содержащий аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1» охватывают, как пептид NY-ESO-1_157-165C, так и пептид NY-ESO-1_157-165V.

[0079] Термин «HLA» относится к системе или комплексу лейкоцитарного антигена человека (HLA), который представляет собой генный комплекс, кодирующий белки главного комплекса гистосовместимости (MHC) у людей. Эти белки клеточной поверхности ответственны за регуляцию иммунной системы у людей. HLA, соответствующие MHC класса I (A, B и C), представляет пептиды изнутри клетки.

[0080] Термин «HLA-A» относится к группе лейкоцитарных антигенов человека (HLA), которые кодируются локусом HLA-A. HLA-A представляет собой один из трех основных типов рецепторов клеточной поверхности MHC человека I класса. Рецептор представляет собой гетеродимер и состоит из тяжелой цепи α и более легкой цепи β. Цепь α кодируется вариантом гена HLA-A, а цепь β (β2-микроглобулин) представляет собой инвариантную молекулу микроглобулина β2.

[0081] Термин «HLA-A2» представляет собой одну конкретную аллельную группу основного комплекса гистосовместимости (MHC) I класса в локусе HLA-A; цепь α кодируется геном HLA-A*02, а цепь β кодируется β2-микроглобулином или локусом B2M.

[0082] Термин «антиген-связывающий белок», «связывающий белок» или «связывающая молекула», при использовании в данном документе, включает молекулы, которые содержат по меньшей мере один антиген-связывающий сайт, который специфически связывается с молекулой, представляющей интерес, такие как конформационный эпитоп пептида нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (пептид NY-ESO-1), презентируемого с помощью HLA-A2, например отображаемый с помощью HLA-A2 пептид, содержащий аминокислотные остатки 157-165. Связывающий белок может представлять собой антитело, такое как антитело полной длины или антиген-связывающий фрагмент антитела, или химерный антигенный рецептор (CAR), или любой другой полипептид, например белок рецептор-антитело (Rab).

[0083] Термин «антиген-связывающий белок HLA-A2:NY-ESO-1» или «антиген-связывающий белок HLA-A2:NY-ESO-1» или тому подобное относится к такому антиген-связывающему белку, как антитело или его антиген-связывающий участок, который специфически связывается с конформационным эпитопом путем презентирования пептидного фрагмента NY-ESO-1, например аминокислотных остатков 157-165, с помощью HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления изобретения конформационный эпитоп создан на поверхности клетки с помощью пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2. При использовании в данном документе, термин «пептидный комплекс HLA-A2:NY-ESO-1 157-165» или тому подобное относится к комплексу между HLA-A2 и полипептидом NY-ESO-1, при этом HLA-A2 презентирует аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1. В этом контексте NY-ESO-1 может представлять собой полипептид NY-ESO-1 полной длины или усеченную версию при условии, что аминокислоты 157-165 (со ссылкой на SEQ ID №: 271) представлены на

полипептиде NY-ESO-1 и презентированы с помощью HLA-A2. Для устранения сомнений термин «пептид NY-ESO-1 157-165» охватывает пептиды длиной 157-165 NY-ESO-1 (со ссылкой на SEQ ID №: 271) или более, вплоть до и включая белок NY-ESO-1 полной длины (например, последовательности SEQ ID №: 271).

[0084] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в вариабельной области антиген-связывающего белка, известной как паратоп. Один антиген может обладать более чем одним эпитопом. Таким образом, различные антиген-связывающие белки могут связываться с различными областями на антигене и могут обладать различным биологическим действием. Термин «эпитоп» также относится к сайту на антигене, на который отвечают B- и/или T-клетки. Он также относится к области антигена, которая связывается с антиген-связывающим белком. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, представляют собой подгруппу структурных эпитопов и содержат те остатки, которые непосредственно дают вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы могут быть «конформационными», т.е. состоять из нелинейных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитопы могут содержать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в некоторых вариантах осуществления изобретения могут обладать специфическими трехмерными структурными характеристиками и/или специфическими характеристиками заряда. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок по данному изобретению взаимодействует с конформационным эпитопом пептидного комплекса HLA-A2:NY-ESO-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот конформационный эпитоп содержит одну или более аминокислот (например, одну, две или три аминокислоты), соответствующие M160, W161 и Q164 SEQ ID №: 271. Для определения аминокислот, которые соответствуют одной или более M160, W161 или Q164, выравнивание последовательности можно выполнять, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок по данному изобретению специфически связывается с пептидным комплексом HLA-A2:NY-ESO-1, содержащим аминокислоты, соответствующие аминокислотам 157-165 SEQ ID №: 271, что определено с помощью рентгеновской кристаллографии при разрешении 4,0 Å или выше. Для устранения сомнений разрешение 4,0 Å или выше охватывает разрешение 3,9 Å или выше, 3,8 Å или выше, 3,7 Å или выше, 3,6 Å или выше, 3,5 Å или выше, 3,4 Å или выше, 3,3 Å или выше, 3,2 Å или выше, 3,1 Å или выше, 3,0 Å или выше, 2,9 Å или выше, 2,8 Å или выше, 2,7 Å или выше, 2,6 Å или выше, 2,5 Å или выше, 2,4 Å или выше, 2,3 Å или выше, 2,2 Å или выше, 2,1 Å или выше, 2,0 Å или выше, 1,9 Å или выше, 1,8 Å или выше, 1,7 Å или выше, 1,6 Å или выше, 1,5 Å или выше, 1,4 Å или выше, 1,3 Å или выше, 1,2 Å или выше, 1,1 Å или выше, 1,0 Å или выше, 0,9 Å или выше, 0,8 Å или выше, 0,7 Å или выше, 0,6 Å или выше или 0,5 Å или выше.

[0085] В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий белок представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, такое как антитело полной длины или его антиген-связывающий фрагмент.

[0086] Термин «антитело», при использовании в данном документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, взаимосвязанных дисульфидными связями (т.е., «молекулы антител полной длины»), а также их мультимеров (например, IgM) или их антиген-связывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоит из доменов C_H1, C_H2 и C_H3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи («LCVR» или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно разделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность, (CDR), вперемежку с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления изобретения FR антитела (или его антиген-связывающего фрагмента) может быть идентичным последовательностям зародышевой линии человека или может быть природным образом или искусственно модифицирован. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании параллельного анализа двух или более CDR.

[0087] Также возможны замена одного или более остатков CDR или пропуск одной или более CDR. В научной литературе были описаны антиген-связывающие белки, такие как антитела, в которых для связывания были устранены одна или две CDR. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировал контактные области между антителами и их антигенами на основании опубликованных кристаллических структур и пришел к выводу, что только от около одной пятой до одной третьей всех остатков CDR действительно контактирует с антигеном. Padlan также установил много антител, в которых одна или две CDR не имеют аминокислот в контакте с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

[0088] Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не являются необходимыми) из областей CDR по Kabat, лежащих вне CDR по Chothia путем молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или ее остаток (остатки) пропущены, их обычно замещают аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности антитела человека или консенсусе таких последовательностей. Положения для замещения в CDR и аминокислоты для замещения также можно выбрать эмпирически. Эмпирические замены могут представлять собой консервативные или неконсервативные замены.

[0089] Антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, например моноклональные антитела кHLA-A2:NY-ESO-1 человека полной длины, или их антиген-связывающие фрагменты, или CAR, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной и/или CDR областях вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевых линий. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными из, например, открытых баз данных последовательностей антител. Данное изобретение включает антиген-связывающие белки, например антитела, или их антиген-связывающие фрагменты, или CAR, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, причем одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях или областях CDR заменены на соответствующие остатки (остаток) последовательности зародышевой линии, из которой был получен антиген-связывающий белок, или соответствующие остатки (остаток) другой последовательности зародышевой линии человека, или путем консервативной аминокислотной замены на соответствующие остатки (остаток) последовательности зародышевой линии (такие изменения последовательности обобщенно называют в данном документе «мутациями последовательности зародышевой линии»). Специалист в данной области техники может легко получить различные антиген-связывающие белки, например антитела, или их антиген-связывающие фрагменты, или CAR, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинацию, исходя из последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения все из остатков каркасной области и/или CDR в доменах V_H и/или V_L заменены обратно на остатки, обнаруживаемые в исходной последовательности зародышевой линии, из которой антиген-связывающий белок, например антитело, был изначально получен. В других вариантах осуществления изобретения только некоторые остатки заменены обратно на остатки исходной последовательности зародышевой линии, например только измененные остатки среди первых 8 аминокислот FR1 или среди последних 8 аминокислот FR4, или только измененные остатки среди CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления изобретения один или более остатков в каркасной области и/или CDR заменены на соответствующие остатки (остаток) различных последовательностей зародышевой линии (т.е. последовательность зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой исходно было получено антитело). Кроме того, антиген-связывающие белки, например антитела, или их антиген-связывающие фрагменты, или CAR по данному изобретению, могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных областях и/или областях CDR, например когда определенные отдельные остатки заменены на соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как

некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или заменены на соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антиген-связывающие белки, например антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать относительно одного или более желаемых свойств, таких как повышенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, повышенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в случае, если могут быть), сниженная иммуногенность и т.д. Антиген-связывающие белки, например антитела, или их антиген-связывающие фрагменты, или CAR, полученные таким общим способом, охвачены данным изобретением.

[0090] Данное изобретение также включает антиген-связывающие белки, например полностью человеческие моноклональные антитела к HLA-A2:NY-ESO-1, или их антиген-связывающие фрагменты, или CAR, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, содержащих одну или более консервативных замен. Например, данное изобретение включает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, содержащие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, с, например, 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе.

[0091] Термин «человеческое антитело», при использовании в данном документе, предназначен для включения антител, имеющих вариабельную и константную области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека зародышевой линии. Моноклональные антитела человека (mAb) по изобретению могут включать аминокислотные остатки, некодируемые последовательностями иммуноглобулинов человека зародышевой линии (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфичным мутагенезом in vitro или с помощью соматической мутации in vivo), например в CDR и особенно в CDR3. Однако термин «антитело человека», при использовании в данном документе, не предназначен для включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), привиты на последовательности FR человека. Термин включает антитела, рекомбинантно полученные у млекопитающего, отличного от человека, или в клетках млекопитающего, отличного от человека. Термин не предназначен для включения антител, выделенных или полученных от субъекта-человека.

[0092] Термин «рекомбинантный», при использовании в данном документе, относится к антиген-связывающим белкам, таким как антитела или их антиген-связывающие фрагменты, по изобретению, созданным, экспрессированным, выделенным или полученным с помощью технологий или методик, известных в данной области техник, таких как технология рекомбинантной ДНК, которая включает, например,

сплайсинг ДНК или трансгенную экспрессию. Этот термин относится к антиген-связывающим белкам, например антителам, экспрессируемым у млекопитающего, отличного от человека (в том числе у трансгенных млекопитающих, отличных от человека, например трансгенных мышей), или в клетке (например, клетки CHO), или в экспрессионной системе, или выделенным из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека.

[0093] При использовании в данном документе, термины «химерный антигенный рецептор» или «CAR», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к рекомбинантному слитому белку, содержащему внеклеточный домен, способный связывать антиген (например, конформационный эпитоп пептида NY-ESO-1, отображаемого с помощью HLA-A2, например пептида, содержащего аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1), трансмембранный домен и по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен.

[0094] «Иммунная эффекторная клетка», при использовании в данном документе, относится к любой клетке иммунной системы, которая обладает одной или более эффекторными функциями (например, цитотоксическая активность уничтожения клеток, секреция цитокинов, индукция ADCC и/или CDC). В одном варианте осуществления изобретения иммунные эффекторные клетки, используемые с CAR, как описано в данном документе, представляют собой Т-лимфоциты, в частности цитотоксические Т-клетки (CTL; CD8+ Т-клетки) и хелперные Т-клетки (HTL; CD4+ Т-клетки). Другие популяции Т-клеток также пригодны для данного изобретения, например интактные Т-клетки и Т-клетки памяти. Как понятно специалисту в данной области техники, другие клетки также можно применять в качестве иммунных эффекторных клеток с CAR, описанными в данном документе. В частности, иммунные эффекторные клетки также включают NK-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы и макрофаги. Иммунные эффекторные клетки также включают предшественников эффекторных клеток, при этом такие клетки-предшественники могут быть индуцированы для дифференцировки в иммунные эффекторные клетки in vivo или in vitro. Таким образом, в этом отношении иммунные эффекторные клетки включают предшественников иммунных эффекторных клеток, таких как гематопоэтические стволовые клетки (HSC), содержащиеся в CD34+ популяции клеток, полученных из спинного мозга, костного мозга или мобилизованной периферической крови, которые при введении субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки или которые могут быть индуцированы in vitro для дифференцировки в зрелые иммунные эффекторные клетки.

[0095] Как раскрыто в данном документе, термин «нецелевой пептид» относится к пептиду, который отличается на 2, 3, 4, 5 или более аминокислот от целевого пептида (например, пептида NY-ESO-1_157-165). В некоторых вариантах осуществления изобретения термин включает пептид, который отличается на 3 или менее аминокислот от целевого пептида. Например, для пептида, состоящего из 9 аминокислот, если 2, 3 или 4 аминокислоты не являются идентичными целевому пептиду, его считают «нецелевым»

пептидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотную идентичность выражают в терминах «степени подобия» (DoS). Если 6 аминокислот в пептиде, состоящем из 9 аминокислот, являются идентичными, DoS представляет собой 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептид с DoS $\leq$ 6 считают «нецелевым» пептидом. Термин «нецелевой» пептид также относится к пептиду, который подобен целевому пептиду на основании гомологии последовательности, как предсказано, связывается с HLA-A2 и входит в состав белка, который экспрессируется в ключевых здоровых тканях.

[0096] Термин «специфически связывается с» или «связывается специфически с» или подобный означает, что антиген-связывающий белок, например антитело или его антиген-связывающий фрагмент или CAR, образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации по меньшей мере около 1×10^{-8} M или менее (например, меньшее значение K_D обозначает более сильное связывание). Способы определения, связываются ли специфически две молекулы, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс. Как описано в данном документе, антиген-связывающие белки, например антитела, идентифицируют с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™, который специфически связывается с конформационным эпитопом пептида нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (NY-ESO-1), презентируемого с помощью HLA-A2 , например пептида, содержащего аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1.

[0097] Термин антиген-связывающий белок, например антитело, с «высокой аффинностью» относится к тем антиген-связывающим белкам, например mAb, которые обладают аффинностью связывания с конформационным эпитопом пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2, например пептида, содержащего аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1, выраженной в виде K_D, составляющей по меньшей мере 10^{-8} M; предпочтительно 10^{-9} M; более предпочтительно 10^{-10} M, еще более предпочтительно 10^{-11} M, еще более предпочтительно 10^{-12} M, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™, или определения аффинности в растворе методом ELISA.

[0098] Под термином «скорость замедления», «Koff» или «kd» понимают антиген-связывающий белок, который диссоциирует из HLA-A2:NY-ESO-1 с константой скорости 1×10^{-3} c^{-1} или менее, предпочтительно 1×10^{-4} c^{-1} или менее, что определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™.

[0099] Термины «антиген-связывающий участок» антиген-связывающего белка (например, антитела), «антиген-связывающий фрагмент» антиген-связывающего белка (например, антитела) и тому подобное, при использовании в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически

связывается с антигеном с образованием комплекса. Термины «антиген-связывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», при использовании в данном документе, относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с конформационным эпитопом пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2, например пептида, содержащего аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1, связанные с HLA-A2.

[00100] В конкретных вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки, например антитело или фрагменты антитела или CAR, по изобретению могут быть конъюгированы с таким фрагментом, как лиганд, детектируемый фрагмент или терапевтический фрагмент («иммуноконъюгат»), такой как цитотоксин, второй антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1, антитело к опухолеспецифическому антигену, противораковое лекарственное средство или любой другой терапевтический фрагмент, используемый для лечения заболевания или патологического состояния, в том числе заболевания или расстройства, связанного с NY-ESO-1, такого как NY-ESO-1-положительный рак.

[00101] «Выделенный антиген-связывающий белок», например выделенное антитело, при использовании в данном документе, предназначен для обозначения антиген-связывающего белка, например антитела, который практически не содержит других антиген-связывающих белков, например антител (Ab), обладающих различными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с HLA-A2:NY-ESO-1 или его фрагментом, практически не содержит антиген-связывающих белков, например антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от конформационного эпитопа пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2 .

[00102] Термин «поверхностный плазмонный резонанс», при использовании в данном документе, относится к оптическому явлению, которое позволяет осуществлять анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени путем детектирования изменений в концентрациях белка в матрице биосенсора, например с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция и Пискатауэй, Нью-Джерси).

[00103] Термин «K_D», при использовании в данном документе, предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антиген-связывающий белок-антиген.

[00104] Термин «перекрестно конкурирует», при использовании в данном документе, означает антиген-связывающей белок, например антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который связывается с антигеном и ингибирует или блокирует связывание другого антиген-связывающего белка, например антитела или его антиген-связывающего фрагмента. Термин также включает конкурирование между двумя антиген-связывающими белками, например антителами, в обоих направлениях, т.е. первым антиген-связывающим белком, например антителом, который связывается с и блокирует

связывание второго антиген-связывающего белка, например антитела, и наоборот. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый антиген-связывающий белок, например антитело, и второй антиген-связывающий белок, например антитело, могут связываться с одним и тем же эпитопом. Альтернативно, первый и второй антиген-связывающие белки, например антитела, могут связываться с различными, но перекрывающимися эпитопами, так что связывание одного ингибирует или блокирует связывание второго, например, за счет стерического затруднения. Перекрестное конкурирование между антиген-связывающими белками, например антителами, можно измерить с помощью способов, известных в данной области техники, например, с помощью биослойного интерферометрического анализа без меток в режиме реального времени. Перекрестное конкурирование между двумя антиген-связывающими белками, например антителами, можно выразить как связывание второго антиген-связывающего белка, например антитела, которое меньше чем фоновый сигнал вследствие самосвязывания (при этом первый и второй антиген-связывающие белки, например антитела, представляют собой тот же антиген-связывающий белок, например антитело). Перекрестное конкурирование между 2 антиген-связывающими белками, например антителами, можно выразить как, например, % связывания второго антиген-связывающего белка, например антитела, которое меньше чем исходное фоновое самосвязывание (при этом первый и второй антиген-связывающие белки, например антитела, представляют собой тот же антиген-связывающий белок, например антитело).

[00105] Термин «идентичность по существу» или «по существу идентичный», когда относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает, что при оптимальном выравнивании с подходящими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью), существует идентичная нуклеотидная последовательность на по меньшей мере около 90% и более предпочтительно на по меньшей мере около 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, что измерено с помощью любого хорошо известного алгоритма установления идентичности, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность по отношению к эталонной молекуле нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу такую же аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

[00106] Идентичность последовательности можно рассчитать с использованием алгоритма, например алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) для глобального выравнивания и алгоритма Смита-Ватермана (Smith and Waterman 1981, J. Mol. Biol. 147: 195-197) для локального выравнивания. Другой предпочтительный алгоритм описан в Dufresne et al в Nature Biotechnology в 2002 (т. 20, стр. 1269-71) и используется в программном обеспечении GenePAST (GQ Life Sciences, Inc. Бостон, Массачусетс).

[00107] В применении к полипептидам, термин «существенная идентичность» или «по существу идентичный» означает, что две пептидные последовательности, когда выравнены оптимальным образом, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием весов гэпа по умолчанию, идентичны по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная замена аминокислоты» представляет собой ту, в которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком с боковой цепью (группа R) с подобными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). В целом, консервативная замена аминокислоты не будет в значительной степени изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень подобия можно повышать, чтобы исправить неконсервативную природу замены. Способы осуществления такого повышения хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331, который включен в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи с гидроксильными группами: серин и треонин; 3) амид-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и 7) сера-содержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативная замена представляет собой любую замену, имеющую положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия, описанной в Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443 45, который включен в данный документ посредством ссылки. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любую замену, имеющую неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[00108] Подобие последовательностей для полипептидов, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков обнаруживает совпадения подобных последовательностей с использованием измерений подобия, приписываемых различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между близкородственными полипептидами, такими как гомологические полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого

типа и его мутантной формой. См., например, GCG версии 6.1. Последовательности полипептидов также можно сравнивать с помощью FASTA, используя параметры по умолчанию или рекомендуемые, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) дает выравнивание и процент идентичности последовательности областей с наилучшим перекрыванием между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson (2000), там же). Последовательности также можно сравнивать используя алгоритм поиска гомологии Смита-Ватермана с использованием поиска гэпа аффинности со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продление гэпа 2, матрицей BLOSUM 62. Другой предпочтительный алгоритм при сравнении последовательности по данному изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, представляет собой компьютерную программу BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

[00109] Под фразой «терапевтически эффективное количество» подразумевают количество, которое продуцирует желаемый эффект, для которого он был введен. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет очевидно специалисту в данной области техники с использованием известных методик (см., например, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

[00110] При использовании в данном документе, термин «субъект» относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в ослаблении, профилактике и/или лечении заболевания или расстройства, такого как заболевание или расстройство, связанное с NY-ESO-1, такое как рак, связанный с NY-ESO-1 (например, NY-ESO-1-положительный рак). Термин включает субъектов-людей, которые страдают от или имеют риск возникновения заболевания или расстройства, связанного с NY-ESO-1, такого как рак, связанный с NY-ESO-1, или метастатический рак, связанный с NY-ESO-1.

[00111] При использовании в данном документе, «противораковое лекарственное средство» означает любой агент, пригодный для лечения, или ослабления, или ингибирования рака, включая, но не ограничиваясь этим, цитотоксины и агенты, такие как антиметаболиты, алкилирующие агенты, антрациклины, антибиотики, антимитотические агенты, прокарбазин, гидроксимочевину, аспарагиназу, кортикостероиды, циклофосфамид, митотан (O, P′-(DDD)), биологические агенты (например, антитела и интерфероны) и радиоактивные агенты. При использовании в данном документе, «цитотоксин или цитотоксический агент» также относится к химиотерапевтическому агенту и означает любой агент, который причиняет вред клеткам. Примеры включают Taxol® (паклитаксел), темозоламид, цитохалазин B, грамицидин D, этидиния бромид, эметин, цисплатин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин,

актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи.

[00112] При использовании в данном документе, термин «противовирусное лекарственное средство» относится к любому лекарственному средству или терапии, используемым для лечения, профилактики или ослабления вирусной инфекции у субъекта-хозяина. Термин «противовирусное лекарственное средство» включает, но не ограничиваясь этим, зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренз, кобицистат, тенофовир, рилпивирин, анальгетические агенты и кортикостероиды.

[00113] Иммуноген, включающий любое из следующих, можно применять для получения антиген-связывающих белков, например антител, к конформационному эпитопу пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2, например пептида, содержащего аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1, связанного с HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки, например антитела, по изобретению можно получить от мышей, иммунизированных интактным белком NY-ESO-1 полной длины (см., № доступа GenBank NP_001318.1) (SEQ ID №: 271) или рекомбинантным пептидом NY-ESO-1 (например, пептид, содержащий аминокислотные остатки 157-165 (SLLMWITQC; SEQ ID №: 269), № доступа GenBank NP_001318.1 (SEQ ID №: 271) или последовательность с заменой C165V (SLMMWITQV; SEQ ID №: 270) с доступом GenBank, связанная с белком HLA, таким как HLA-A2).

[00114] Альтернативно, NY-ESO-1 или его фрагмент можно получать с использованием стандартных биохимических методик и модифицировать в контексте HLA-A2 и применять в качестве иммуногена.

[00115] В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноген может представлять собой рекомбинантный пептид NY-ESO-1 (который может представлять собой рекомбинантный пептид NY-ESO-1, презентируемый с помощью HLA), экспрессируемый в E. coli или в любых других клетках эукариот или млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

[00116] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки, которые связываются специфически с конформационным эпитопом пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2, могут быть получены с использованием полипептидов, описанных выше, или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептид NY-ESO-1, презентируемый с помощью HLA-A2, можно удлинить вне обозначенных областей на от около 5 до около 20 аминокислотных остатков с любого или обоих N или C концов областей, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения можно использовать любую комбинацию вышеуказанных областей или их фрагментов для получения антиген-связывающих белков, специфичных к HLA-A2:NY-ESO-1, например антител.

[00117] Пептиды можно модифицировать, чтобы включать вставки или замены в некоторых остатках для мечения или для целей конъюгации с молекулами носителей, такими как KLH. Например, цистеин можно добавлять или на N-конце, или на C-конце

пептида, или линкерную последовательность можно добавлять для получения пептида для конъюгации, например, KLH для иммунизации.

[00118] Неограничивающие иллюстративные in vitro анализы для измерения активности связывания проиллюстрированы в Примерах в данном документе. В примере 3 аффинности связывания и кинетические константы антиген-связывающих белков, специфичных к HLA-A2:NY-ESO-1, например антител, определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса и измерения проводили на устройстве Biacore 4000 или T200. Пример 4 описывает связывание антител с клетками, сверхэкспрессирующими фрагменты NY-ESO-1.

[00119] Антиген-связывающие белки, например антитела, специфичные к HLA-A2:NY-ESO-1, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания расположение метки (если есть) позволяет определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрывают авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован так, что C-концевая часть пептида будет отдалена от поверхности. В одном варианте осуществления изобретения метка может представлять собой радионуклид, флуоресцентный краситель или метку, детектируемую с помощью МРТ. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие меченые антиген-связывающие белки можно использовать в диагностических анализах, в том числе анализах визуализации.

Антиген-связывающие белки

[00120] В данном изобретении предложены антиген-связывающие белки, которые содержат антитела или их антиген-связывающие фрагменты и CAR (например, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие CAR по изобретению) (описано ниже). Если иное конкретно не указано, термин «антитело», при использовании в данном документе, необходимо понимать как охватывающий молекулы антител, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина (т.е. «полные молекулы антител») , а также их антиген-связывающие фрагменты. Термины «антиген-связывающий участок» антитела, «антиген-связывающий фрагмент» антитела и тому подобное, при использовании в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Термины «антиген-связывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела», при использовании в данном документе, относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с конформационным эпитопом пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2. Антиген-связывающий белок, такой как фрагмент антитела, может включать фрагмент Fab, фрагмент $F(ab')_2$, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. Антиген-связывающие белки, такие как антиген-связывающие

фрагменты антитела, могут быть получены, например, из целых молекул антитела, используя любые стандартные методики, такие как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, в том числе воздействие на и экспрессия ДНК, кодирующей вариабельный и (необязательно) константный домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, библиотек фагов-антител) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и подвергать химическому воздействию или с помощью методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или более вариабельных и/или константных доменов в пригодную конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

[00121] Неограничивающие примеры антиген-связывающих фрагментов антитела включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')2; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие компоненты, состоящие из аминокислотных остатков, которые напоминают гипервариабельную область антитела (например, выделенную гипервариабельную область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие искусственно созданные молекулы, такие как домен-специфичные антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела, прикрепленные к CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, одновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также охвачены выражением «антиген-связывающий фрагмент», при использовании в данном документе.

[00122] Антиген-связывающий фрагмент антиген-связывающего белка (например, антитела) будет, как правило, содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и будет в общем содержать по меньшей мере одну CDR, которая является смежной с или находится в рамке с одной или более каркасными последовательностями. В антиген-связывающих белках, содержащих домен V_H, связанный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут быть расположены друг относительного друга любым пригодным образом. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H, V_H - V_L или V_L - V_L. Альтернативно, антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

[00123] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые можно обнаружить в антиген-связывающем фрагменте антиген-связывающего белка по данному изобретению, включают: (i) V_H -C_H1; (ii) V_H -C_H2; (iii) V_H

-C_H3; (iv) V_H -C_H1-C_H2; (v) V_H -C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H -C_H2-C_H3; (vii) V_H -C_L; (viii) V_L -C_H1; (ix) V_L -C_H2; (x) V_L -C_H3; (xi) V_L -C_H1-C_H2; (xii) V_L -C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L -C_H2-C_H3; и (xiv) V_L -C_L. В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любые иллюстративные конфигурации, перечисленные выше, вариабельный и константный домены могут быть или непосредственно связаны друг с другом или могут быть связаны с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к гибкому или полугибкому соединению между соседними вариабельными и/или константными доменами в единой молекуле полипептида. Кроме того, антиген-связывающий фрагмент антитела по данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельного и константного домена, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной связи(-ей)).

[00124] Как и в случае полных молекул антител антиген-связывающие белки, например антиген-связывающие фрагменты антитела, могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичный антиген-связывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере два различных вариабельных домена, при этом каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или отличным эпитопом того же антигена. Любой мультиспецифичный формат антитела, включая иллюстративные биспецифичные форматы антител, раскрытые в данном документе, могут быть адаптированы для применения в контексте антиген-связывающего фрагмента антитела по данному изобретению с использованием традиционных методик, доступных в данной области техники.

Получение антиген-связывающих белков

[00125] В данной области техники известны способы получения антиген-связывающих белков, таких как антитела человека, у трансгенных мышей. Любой такой известный способ можно применять в контексте данного изобретения для получения антител человека, которые специфически связываются с конформационным эпитопом пептида нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (пептида NY-ESO-1), презентируемого с помощью HLA-A2.

[00126] С использованием технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа для получения антиген-связывающих белков, например моноклональных антител, антиген-связывающие белки с высокой аффинностью, например химерные антитела, к конформационному эпитопу пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2, исходно выделяют с вариабельной областью человека и константной областью мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий вариабельные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально

связанные с локусами эндогенной константной области мыши так, что указанная мышь продуцирует антиген-связывающий белок, например антитело, содержащий вариабельную область человека и константную область мыши в ответ на антигенный стимул. ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально присоединяют к ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепи человека. ДНК затем экспрессируется в клетке, способной экспрессировать антитело человека полной длины.

[00127] В общем, мышь VELOCIMMUNE® иммунизируют антигеном, представляющим интерес, и от этих мышей получают клетки лимфатической системы (такие как В-клетки), которые экспрессируют антиген-связывающие белки, например антитела. Клетки лимфатической системы можно сливать с клеточной линией миеломы для получения бессмертных гибридомных клеточных линий, и такие гибридомные клеточные линии подвергают скринингу и отбору для идентификации гибридомных клеточных линий, которые продуцируют антитела, специфичные к антигену, представляющему интерес. ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделить и связать с желаемыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такие антиген-связывающие белки можно получать в клетке, такой как клетка CHO. Альтернативно, ДНК, кодирующую антиген-связывающие белки, например химерные антитела, или вариабельные домены легкой и тяжелой цепей, можно выделить непосредственно из антиген-специфичных лимфоцитов.

[00128] Исходно, антиген-связывающие белки с высокой аффинность, например химерные антитела, выделяют с вариабельной областью человека и константной областью мыши. Как представлено в экспериментальном разделе ниже, антиген-связывающие белки характеризуют и отбирают на основании желаемых характеристик, в том числе аффинности, селективности, эпитопа и т.д. Константные области мыши заменяют на желаемую константную область человека для получения антиген-связывающих белков, например антител человека полной длины, по изобретению, например дикого типа или модифицированных IgG1 или IgG4. Хотя выбранная константная область может изменяться в зависимости от конкретного применения, связывание с антигеном с высокой аффинностью и характеристики специфичности к мишени свойственны вариабельной области.

Биоэквиваленты

[00129] Антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению охватывают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые могут отличаться от описанных антиген-связывающих белков, например антител, но которые сохраняют способность связываться с конформационным эпиопом пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2. Такие варианты антиген-связывающих белков содержат одну или более вставок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но демонстрируют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных антиген-связывающих белков. Подобно,

последовательности ДНК, кодирующие антиген-связывающий белок, по данному изобретению охватывают последовательности, которые содержат одну или более вставок, делеций или замен нуклеотидов при сравнении с раскрытыми последовательностями, но которые кодируют антиген-связывающий белок, который практически биоэквивалентен описанному антиген-связывающему белку по изобретению.

[00130] Два антиген-связывающих белка или антитела считают биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтически эквивалентными или фармацевтически альтернативными, скорость и длительность абсорбции которых не демонстрирует значительного различия при введении в той же молярной дозе в одинаковых экспериментальных условиях, как в виде однократной дозы, так и в виде нескольких доз. Некоторые антиген-связывающие белки или антитела будут считаться эквивалентными или фармацевтически альтернативными, если они являются эквивалентными по длительности их абсорбции, но не по скорости абсорбции, и все еще могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются намеренными и отражены на этикетке, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме при, например, хроническом применении, и считаются незначительными с медицинской точки зрения для конкретного изучаемого лекарственного продукта.

[00131] В одном варианте осуществления изобретения два антиген-связывающих белка (или антитела) являются биоэквивалентыми, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте или активности.

[00132] В одном варианте осуществления изобретения два антиген-связывающих белка (или антитела) являются биоэквивалентными, если пациенту можно поменять один или более раз эталонный продукт и биологический продукт без ожидаемого повышения риска побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности, по сравнению с продолжением терапии без такой замены.

[00133] В одном варианте осуществления изобретения два антиген-связывающих белка (или антитела) являются биоэквивалентными, если они оба действуют по одинаковому механизму или механизмам действия для условия или условий применения, в той степени, в которой такой механизм известен.

[00134] Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью in vivo и/или in vitro методов. Измерение биоэквивалентности включает, например, (a) тест in vivo у людей и других млекопитающих, у которых концентрацию антиген-связывающего белка или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке и других биологических жидкостях как функцию от времени; (b) тест in vitro, который коррелирует с и приемлемо предсказывает данные о биодоступности in vivo у человека; (c) тест in vivo у людей и других млекопитающих, у которых подходящий острый фармакологический эффект антиген-связывающего белка (или его мишени) измерен как функция от времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом испытании, в котором устанавливают

безопасность, эффективность, или биодоступность, или биоэквивалентность антиген-связывающего белка.

[00135] Биоэквивалентные варианты антиген-связывающих белков (или антител) по изобретению можно сконструировать, например, осуществляя различные замены остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не нужны для биологической активности. Например, остатки цистеина, которые являются несущественными для биологической активности, можно удалять или заменять другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах, биоэквивалентные антиген-связывающие белки могут включать варианты антиген-связывающего белка, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования антиген-связывающих белков, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, содержащие варианты Fc

[00136] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в данном изобретении представлены антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, например антитела, содержащие домен Fc, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или ослабляют связывание антиген-связывающего белка с рецептором FcRn, например при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, данное изобретение включает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 домена Fc, при этом мутация(-ии) увеличивает аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH изменяется от около 5,5 до около 6,0). Такие мутации могут приводить к возрастанию времени полувыведения антиген-связывающего белка из сыворотки при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F), и 434. В одном варианте осуществления изобретения модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В другом варианте осуществления изобретения модификация включает модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

[00137] Например, данное изобретение включает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, содержащие домен Fc, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L);

252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). В одном варианте осуществления данное изобретение включает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, содержащие домен Fc, содержащий мутацию S108P в шарнирной области IgG4 для стимуляции стабилизации димера. В рамках данного изобретения подразумеваются все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций домена Fc и другие мутации в вариабельных доменах антиген-связывающего белка, описанных в данном документе.

[00138] Данное изобретение также включает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C_H), при этом химерная область C_H содержит сегменты, полученные из областей C_H иммуноглобулина более чем одного изотипа. Например, антиген-связывающие белки по изобретению могут содержать химерную область C_H, содержащую часть или весь домен C_H2, полученный из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, объединенный с частью или всем доменом C_H3, полученным из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения антиген-связывающие белки по изобретению содержат химерную область C_H, содержащую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать аминокислотную последовательность «верхнего шарнира» (аминокислотные остатки из положений 216-227 в соответствии с нумерацией EU), полученную из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, объединенную с последовательностью «нижнего шарнира» (аминокислотные остатки из положений 228-236 в соответствии с нумерацией EU), полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхней шарнирной области IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, полученные из нижней шарнирной области IgG2 человека. Антиген-связывающий белок, содержащий химерную область C_H, как описано в данном документе, может, в некоторых вариантах осуществления изобретения, демонстрировать модифицированные эффекторные функции Fc без неблагоприятного влияния на терапевтические или фармакокинетические свойства антиген-связывающего белка. (См., например, патентную публикацию США № 20140243504, описание которой включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

Биологические характеристики антиген-связывающих белков

[00139] В общем, антиген-связывающие белки по данному изобретению функционируют путем связывания с конформационным эпитопом пептида нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (NY-ESO-1), презентируемого с помощью HLA.

[00140] Данное изобретение включает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, которые связываются с пептидом NY-ESO-1 в присутствии HLA-A2 с высокой

специфичностью. Антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1 не связываются с пептидом NY-ESO-1 в отсутствие HLA-A2. Дополнительно, антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1 не связываются с нецелевым пептидом в присутствии HLA-A2.

[00141] Данное изобретение включает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, которые связываются с мономерным пептидом HLA-A2:NY-ESO-1 (157-165) (при этом пептид NY-ESO-1 157-165 может содержать или C165, или V165; т.е. антиген-связывающие белки по данному изобретению могут быть специфичными к любой форме или неспецифичными по отношению к какой-то форме) с высокой аффинностью. Например, данное изобретение включает антиген-связывающие белки, которые связывают мономерный пептид HLA-A2:157-165 (необязательно с заменой C165V) (например, при 25°C или при 37°C) с K_D менее чем около 1 нМ, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 3 в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки связываются с мономерным пептидом HLA-A2:NY-ESO-1_157-165 с K_D менее чем около 1нМ, менее чем около 0,5 нМ, менее чем около 0,1 нМ, менее чем около 0,05 нМ или менее чем около 0,04 нМ, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в Примере 3 в данном документе, или по существу подобного анализа.

[00142] Данное изобретение также включает антиген-связывающие белки, которые связываются с клеткой, экспрессирующей пептидный комплекс HLA-A2:NY-ESO-1:157-165 (при этом пептид NY-ESO-1 157-165 может содержать или C165, или V165; т.е. антиген-связывающие белки по данному изобретению могут быть специфичными к любой форме или неспецифичными по отношению к какой-то форме) с EC_{50} менее чем около 10 нМ и не связываются с клетками, экспрессирующими предсказанные нецелевые пептиды, как определено с помощью проточного цитометрического анализа, как описано в Примерах 4 и 5 в данном документе, или с помощью по существу подобного анализа. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки связываются с клеткой, экспрессирующей пептид HLA-A2:NY-ESO-1_157-165 с EC_{50} менее чем около 10 нМ, менее чем около 5 нМ, менее чем около 2 нМ, менее чем около 1 нМ или менее чем около 0,5 нМ, и не связывается с клетками, экспрессирующими предсказанные нецелевые пептиды, что определено с помощью проточного цитометрического анализа, как описано в Примерах 4 и 5 в данном документе, или с помощью по существу подобного анализа, например, с использованием формата анализа в Примерах 4 и 5 в данном документе или по существу подобного анализа.

[00143] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки по данному изобретению пригодны при ингибировании роста опухоли или отсрочке прогрессирования рака при введении профилактически субъекту, нуждающемуся в этом, и могут увеличивать выживаемость субъекта. Например, введение антиген-связывающего белка по данному изобретению может приводить к уменьшению первичной опухоли и может предотвращать метастазирование или развитие вторичных опухолей. В некоторых

вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки по данному изобретению пригодны при ингибировании роста опухоли при введении терапевтически субъекту, нуждающемуся в этом, и могут увеличивать выживаемость субъекта. Например, введение терапевтически эффективного количества антиген-связывающего белка по изобретению субъекту может приводить к уменьшению и исчезновению развившейся опухоли у субъекта.

[00144] В одном варианте осуществления в изобретении предложен выделенный рекомбинантный антиген-связывающий белок, который связывается с конформационным эпитопом пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2, при этом антиген-связывающий белок демонстрирует одну или более из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 2, 22, 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 180, 196, 211 и 230, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности; (ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 186, 203, 219 и 238, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168, 184, 201, 217 и 236, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 16, 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 190, 205, 224 и 244, или по существу ей подобную

последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 4, 24, 44, 64, 84, 104, 124, 144, 164, 213 и 232, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 6, 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 215 и 234, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 12, 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 188, 221 и 240, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 14, 34, 54, 74, 94, 114, 134, 154, 174 и 242, или по существу ей подобную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по

меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности; (v) связывается с мономерным пептидным комплексом HLA-A2:NY-ESO-1 157-165 (C165 или V165) с равновесной константой связывания-диссоциации (KD) менее чем около 1 нМ, что измерено с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (vi) связывается с мономерным пептидным комплексом HLA-A2:NY-ESO-1 157-165 (C165 или V165) с равновесной константой диссоциации-связывания (KD) менее чем около 1 нМ, что измерено с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (vii) связывается с клетками, экспрессирующими пептидный комплекс HLA-A2:NY-ESO-1 157-165 (C165 или V165), с EC_{50} менее чем около 10 нМ; и (viii) не связывается с нецелевым пептидом, отображаемым с помощью HLA-A2, при этом пептид отличается на 2, 3, 4, 5 или более аминокислот от SEQ ID №: 271.

[00145] Антиген-связывающие белки по данному изобретению могут обладать одной или более вышеупомянутыми биологическими характеристиками или любой их комбинацией. Другие биологические характеристики антиген-связывающих белков по данному изобретению будут очевидны специалисту в данной области техники из рассмотрения данного изобретения, включая рабочие Примеры в данном документе.

Картирование эпитопа и родственные технологии

[00146] Данное изобретение включает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, которые находятся в одном или более доменах пептида NY-ESO-1, отображаемого с помощью HLA-A2. Эпитоп может состоять из множества не непрерывных аминокислот (или аминокислотных последовательностей), расположенных в любом или обоих вышеупомянутых доменах молекулы NY-ESO-1 (например, конформационный эпитоп).

[00147] Для определения того, взаимодействует ли антиген-связывающий белок «с одной или более аминокислотами» в полипептиде или белке, можно использовать различные методики, известные специалистам в данной области техники. Иллюстративные способы включают, например, традиционный перекрестный конкурентный анализ, такой как описанный в Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк). Другие способы включают мутационный анализ путем сканирования аланином, пептидный блот-анализ (Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248: 443-63), анализ расщепления пептида, кристаллографические исследования и ЯМР-анализ. Кроме того, можно применять такие методы, как вырезание эпитопа, выделение эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) Prot. Sci. 9: 487-496). Другой метод, который можно применять для идентификации аминокислот в полипептиде, с которыми взаимодействует антиген-связывающий белок, представляет собой замену водород/дейтерий, детектируемую с помощью масс-спектрометрии. В общем, метод замены водород/дейтерий включает мечение дейтерием белка, представляющего интерес, а затем связывание антиген-связывающего белка с белком,

меченым дейтерием. Затем комплекс белок/антиген-связывающий белок переносят в воду, и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом с антиген-связывающим белком, подвергаются обратному обмену дейтерия на водород с более низкой скоростью по сравнению со способными к обмену протонами в аминокислотах, которые не являются частью контактной поверхности. В результате аминокислоты, которые образуют часть контактной поверхности белок/антиген-связывающий белок могут удерживать дейтерий и поэтому демонстрировать относительно большую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в контактную поверхность. После диссоциации антиген-связывающего белка целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, таким образом высвобождая меченые дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антиген-связывающий белок. См., например, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267: 252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A.

[00148] Термин «эпитоп» относится к сайту на антигене, на который отвечают В- и/или Т-клетки. Эпитопы В-клеток могут быть образованы как непрерывными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, которые расположены рядом в третичной структуре белка. Эпитопы, которые образованы непрерывными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, которые образованы при третичном свертывании, как правило не сохраняются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 3, а обычно по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в индивидуальной пространственной конформации.

[00149] Характеризация с использованием модифицирования (MAP), также известная как характеризация антител на основе структуры антигена (ASAP), представляет собой способ, который классифицирует большие количества моноклональных антиген-связывающих белков, например антител (mAb), направленных против одного и того же антигена в соответствии с подобиями профиля связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными поверхностями антигенов (см. US 2004/0101920, который конкретно включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Каждая категория может отражать индивидуальный эпитоп или несомненно отличный от, или частично перекрывающийся с эпитопом, представленным другой категорией. Эта технология позволяет быстро отсеивать генетически идентичные антиген-связывающие белки, так что характеризацию можно сфокусировать на генетически различных антиген-связывающих белках. При применении к скринингу гибридом, MAP может облегчать идентификацию редких гибридомных клонов, которые продуцируют антиген-связывающие белки с желаемыми характеристиками. MAP можно применять для сортировки антиген-связывающих белков по изобретению по группам антиген-связывающих белков, которые связывают различные эпитопы.

[00150] Данное изобретение включает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любой из специфичных иллюстративных антиген-связывающих белков, описанных в данном документе в Таблице 1, или антиген-связывающий белок, имеющий последовательности CDR любого из иллюстративных антиген-связывающих белков, описанных в Таблице 1. Аналогично, данное изобретение также включает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, которые конкурирует за связывание с HLA-A2:NY-ESO-1 или его фрагментом с любыми специфичными иллюстративными антиген-связывающими белками, описанными в данном документе в Таблице 1, или антиген-связывающим белком, имеющим последовательности CDR любого из иллюстративных антиген-связывающих белков, описанных в Таблице 1.

[00151] Каждый может легко определить, связывается ли антиген-связывающий белок с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с эталонным антиген-связывающим белком к HLA-A2:NY-ESO-1 путем использования традиционных способов, известных в данной области техники. Например, чтобы определить связывается ли исследуемый антиген-связывающий белок с тем же эпитопом, что и эталонный антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению, эталонному антиген-связывающему белку позволяют связываться с белком или пептидом HLA-A2:NY-ESO-1 в условиях насыщения. Затем, оценивают способность исследуемого антиген-связывающего белка связываться с молекулой HLA-A2:NY-ESO-1. Если исследуемый антиген-связывающий белок способен связываться с HLA-A2:NY-ESO-1 после связывания насыщения с эталонным антиген-связывающим белком к HLA-A2:NY-ESO-1, можно сделать вывод, что исследуемый антиген-связывающий белок связывается с другим эпитопом, чем эталонный антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1. С другой стороны, если исследуемый антиген-связывающий белок не способен связываться с белком HLA-A2:NY-ESO-1 после насыщения связывания с эталонным антиген-связывающим белком к HLA-A2:NY-ESO-1, то исследуемый антиген-связывающий белок может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный с эталонным антиген-связывающим белком к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению.

[00152] Для определения конкурирует ли антиген-связывающий белок за связывание с эталонным антиген-связывающим белком к HLA-A2:NY-ESO-1, вышеуказанную методологию определения связывания осуществляют в двух направлениях. В первом направлении эталонному антиген-связывающему белку дают связываться с белком HLA-A2:NY-ESO-1 в условиях насыщения после оценки связывания исследуемого антиген-связывающего белка с молекулой HLA-A2:NY-ESO-1 . Во втором направлении исследуемому антиген-связывающему белку дают связываться с молекулой HLA-A2:NY-ESO-1 в условиях насыщения после оценки связывания эталонного антиген-связывающего белка с молекулой HLA-A2:NY-ESO-1 . Если, в обоих направлениях, только первый (насыщающий) антиген-связывающий белок способен к связыванию с молекулой HLA-A2:NY-ESO-1, то можно сделать вывод, что исследуемый антиген-

связывающий белок и эталонный антиген-связывающий белок конкурируют за связывание с HLA-A2:NY-ESO-1. Как будет понятно специалисту в данной области техники, антиген-связывающий белок, который конкурирует за связывание с эталонным антиген-связывающим белком, не обязательно должен связывать тот же эпитоп, что и эталонный антиген-связывающий белок, но может стерически блокировать связывание эталонного антиген-связывающего белка за счет связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

[00153] Два антиген-связывающих белка связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждый конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. Следовательно, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антиген-связывающего белка ингибирует связывание другого на по меньшей мере 50%, но предпочтительно 75%, 90% или даже 99%, что измерено в анализе конкурирующего связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Альтернативно, два антиген-связывающих белка имеют тот же эпитоп, если практически все мутации аминокислот в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антиген-связывающего белка, снижают или устраняют связывание другого. Два антиген-связывающих белка имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые мутации аминокислот в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антиген-связывающего белка, снижают или устраняют связывание другого.

[00154] Затем можно провести дополнительный обычный эксперимент (например, анализы мутации пептидов или связывания), чтобы подтвердить, что наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антиген-связывающего белка происходит действительно из-за связывания с тем же эпитопом, что и в случае эталонного антиген-связывающего белка, или за отсутствие наблюдаемого связывания отвечает стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого типа можно выполнять с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого качественного или количественного анализа связывания антиген-связывающего белка, известного в данной области техники.

Иммуноконъюгаты

[00155] Изобретение охватывает антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, конъюгированные с терапевтическим фрагментом («иммуноконъюгат»), таким как цитотоксин или химиотерапевтический агент, для лечения рака. При использовании в данном документе, термин «иммуноконъюгат» относится к антиген-связывающему белку, который химически или биологически связан с цитотоксином, радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, таким как обнаружимый фрагмент, фермент, токсин, пептид или белок или терапевтический агент. Антиген-связывающий белок может быть связан с цитотоксином, радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, целевым или репортерным фрагментом, ферментом, токсином, пептидом или терапевтическим агентом в любом положении молекулы при условии, что антиген-связывающий белок способен связывать свою мишень. Примеры

иммуноконъюгатов включают конъюгаты антиген-связывающий белок-лекарственное средство и слитые белки антиген-связывающий белок-токсин. В одном варианте осуществления изобретения агент может представлять собой второе отличное антитело к NY-ESO-1 или HLA-A2:NY-ESO-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок может быть конъюгирован с агентом, специфичным к опухолевой клетке. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антиген-связывающим белком к HLA-A2:NY-ESO-1 , будет зависеть от патологического состояния, подлежащего лечению и желаемого терапевтического эффекта, который необходимо достичь. Примеры пригодных агентов для получения иммуноконъюгатов известны в данной области техники; см., например, публикацию PCT № WO 05/103081.

Химерные антигенные рецепторы (CAR)

[00156] Химерные антигенные рецепторы (CAR) перенаправляют специфичность Т-клеток по отношению к распознаваемым антителами антигенам, экспрессируемым на поверхности раковых клеток, тогда как Т-клеточные рецепторы (TCR) расширяют диапазон мишеней для включения внутриклеточных опухолевых антигенов. Перенаправленные с помощью CAR Т-клетки, специфичные к антигену CD19 В-клеточной дифференцировки, демонстрируют исключительную эффективность в лечении В-клеточных злокачественных новообразований, тогда как TCR-перенаправленные Т-клетки демонстрируют пользу у пациентов, страдающих от солидного рака. Stauss et al. описывает стратегии для модификации терапевтических CAR и TCR для применения в лечении рака, например, для усиления антиген-специфической эффекторной функции и ограничения токсичности искусственно созданных Т-клеток (Current Opinion in Pharmacology 2015, 24:113-118).

[00157] Один аспект изобретения включает химерный антигенный рецептор (CAR), который является специфичным к пептиду NY-ESO-1, отображаемому на поверхности опухолевых клеток с помощью HLA-A2, такому как пептид, содержащий аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1. В одном варианте осуществления данного изобретения CAR, как описано в данном документе, содержит внеклеточный мишень-специфичный связывающий домен, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен (такой как сигнальный домен, полученный из CD3-зета или FcR-гамма), и/или один или более костимулирующих сигнальных доменов, полученных из костимулирующей молекулы, такой как, но не ограничиваясь ими, CD28, CD137, CD134 или CD278. В одном варианте осуществления изобретения CAR включает шарнирную или спейсерную область между внеклеточным связывающим доменом и трансмембранным доменом, такую как шарнир CD8-альфа или шарнир CD28. В другом варианте осуществления данного изобретения CAR, как описано в данном документе, содержит внешнеклеточный мишень-специфичный связывающий домен и константный домен Т-клеточного рецептора («конструкция Т-тела»). В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный/трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID №: 296. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирная область

содержит последовательность CD28 SEQ ID №: 305. В некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен содержит последовательность CD28 SEQ ID №: 304. В некоторых вариантах осуществления изобретения костимулирующий домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID №: 297. В некоторых вариантах осуществления изобретения костимулирующий домен CD28 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID №: 299. В некоторых вариантах осуществления изобретения сигнальный домен CD3-зета содержит аминокислотную последовательность SEQ ID №: 298.

[00158] Необходимо понимать, что для применения любого из CAR, описанных в данном документе, внеклеточный специфичный к мишени связывающий домен может содержать Fab, Fab', (Fab')2, Fv или одноцепочечный Fv (scFv) антиген-связывающего белка по изобретению.

[00159] При использовании в данном документе связывающий домен или внеклеточный домен CAR обеспечивает CAR со способностью связываться с целевым антигеном, представляющим интерес. Связывающий домен может представлять собой любой белок, полипептид, олигопептид или пептид, который обладает способностью специфически распознавать и связывать биологическую молекулу (например, рецептор клеточной поверхности или опухолевый белок или их компонент). Связывающий домен включает любого встречающегося в природе, синтетического, полусинтетического или полученного рекомбинантно партнера по связыванию для биологической модели, представляющей интерес. Например и как дополнительно описано в данном документе, связывающий домен может представлять собой вариабельные области легкой и тяжелой цепи антитела, или вариабельные области легкой и тяжелой цепи могут быть объединены вместе в единую цепь и в любой ориентации (например, VL-VH или VH-VL). Для идентификации связывающих доменов по данному изобретению, которые специфически связываются с конкретной мишенью, известен и описан в данном документе ряд анализов, в том числе вестерн-блоттинг, ELISA, проточная цитометрия или анализ с использованием поверхностного плазмонного резонанса (например, с использованием анализа BIACORE). Мишень может представлять собой любой антиген, представляющий клинический интерес, против которого было бы желательно запустить эффекторный иммунный ответ, который приводит к уничтожению опухоли. В одном варианте осуществления изобретения целевой антиген связывающего домена химерного антигенного рецептора представляет собой конформационный эпитоп пептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2, на поверхности опухолевых клеток, такого как пептид, содержащий аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1.

[00160] Иллюстративные связывающие домены включают антиген-связывающие белки, такие как антиген-связывающие фрагменты антитела, такие как scFv, scTCR, внеклеточные домены рецепторов, лиганды к молекулам/рецепторам клеточной поверхности или их рецептор-связывающие домены и опухолевые связывающие белки. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие домены,

включенные в CAR по изобретению, могут представлять собой вариабельную область (Fv), CDR, Fab, scFv, VH, VL, вариант доменного антитела (dAb), верблюжье антитело (VHH), вариант домена с фибронектином 3, вариант с повтором анкирина и другой антиген-специфический связывающий домен, полученный из других каркасов белков.

[00161] В одном варианте осуществления изобретения связывающий домен CAR представляет собой одноцепочечное антитело к HLA-A2:NY-ESO-1 (scFv) и может представлять собой мышиный, человеческий или гуманизированный scFv. Одноцепочечные антитела можно клонировать из генов области V гибридомы, специфичной к желаемой мишени. Методика, которую можно применять для клонирования вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), была описана, например, в Orlandi et al., PNAS, 1989; 86: 3833-3837. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен содержит полученный из антитела связывающий домен, но может представлять собой связывающий домен, полученный не из антитела. Связывающий домен, полученный из антитела, может представлять собой фрагмент антитела или продукт генной инженерии из одного или более фрагментов антитела, при этом фрагмент вовлечен в связывание с антигеном.

[00162] В некоторых вариантах осуществления изобретения CAR по данному изобретению могут содержать линкер между различными доменами, добавленный для получения подходящего пространственного размещения и конформации молекулы. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения может быть линкер между областями связывающих доменов VH и VL, который может быть в длину 1-10 аминокислот. В других вариантах осуществления изобретения линкер между любыми из доменов химерного антигенного рецептора может составлять 1-20 или 20 аминокислот в длину. В этом отношении линкер может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот в длину. В дополнительном варианте осуществления изобретения линкер может составлять 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот в длину. Диапазоны, включающие количества, описанные в данном документе, также включены в данный документ, например, линкер длиной 10-30 аминокислот в длину.

[00163] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкеры, пригодные для применения в CAR, описанном в данной документе, представляют собой гибкие линкеры. Пригодные линкеры можно легко выбрать, и они могут быть любой пригодной из различных длин, такой как от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, в том числе от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот, и могут составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот.

[00164] Иллюстративные гибкие линкеры включают полимеры глицина (G)n, полимеры глицина-серина (G)nS, где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере один (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более), полимеры глицина-

аланина, полимеры аланина-серина и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Дополнительно, линкеры могут содержать несколько единиц вышеупомянутых последовательностей, например ((G)nS)m), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере единицу (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более), а m представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере единицу (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более). В некоторых вариантах осуществления изобретения n равен 4, и линкер содержит последовательность GGGGS (SEQ ID №: 295). В некоторых вариантах осуществления изобретения n равен 4 и m равен 3, а линкер содержит последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID №: 303). Полимеры глицина и глицина-серина являются относительно неструктурированными, а поэтому могут служить в качестве нейтрального соединения между доменами слитых белков, таких как CAR, описанные в данном документе. Глицин занимает значительно больше фи-пси-пространства, чем даже аланин и значительно меньше ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Специалист в данном области техники поймет, что конструкция CAR может содержать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что указанный линкер может включать гибкий линкер, а также один или более участков, которые придают менее гибкую структуру, чтобы обеспечить необходимую структуру CAR.

[00165] За связывающим доменом CAR может следовать «спейсерная» или «шарнирная» область, которая относится к области, которая удаляет антиген-связывающий домен от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт клетка/клетка, связывание антигена и активацию (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). Шарнирная область в CAR обычно находится между трансмембранным (TM) и связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирная область представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и может представлять собой шарнирную область иммуноглобулина дикого типа или измененную шарнирную область иммуноглобулина дикого типа. Другие иллюстративные шарнирные области, используемые в CAR, описанных в данном документе, включают шарнирную область, полученную из внеклеточных областей мембранных белков 1 типа, таких как CD8-альфа, CD4, CD28 и CD7, которая может представлять собой шарнирные области дикого типа от этих молекул или могут быть изменены. В одном варианте осуществления изобретения шарнирная область содержит шарнирную область CD8-альфа.

[00166] «Трансмембранная» область или домен представляет собой участок CAR, который связывает внеклеточную связывающую часть с клеточной мембранной иммунной эффекторной клетки и облегчает связывание связывающего домена с целевым антигеном. Трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CD3-зета, однако другие трансмембранные домены, которые можно использовать, включают те, которые получены из CD8-альфа, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154. В одном варианте осуществления изобретения трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD137. В

некоторых вариантах осуществления изобретения трансмембранный домен является синтетическим, и в этом случае он будет содержать в основном гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

[00167] «Внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка химерного антигенного рецептора, которая принимает участие в передаче информации об эффективном связывании CAR с целевым антигеном во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки, чтобы получить функцию эффекторных клеток, например активацию, продуцирование цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов в связанную с CAR клетку-мишень, или другие клеточные ответы, получаемые при связывании антигена с внеклеточным доменом CAR. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или помощь или активность, включающую секрецию цитокина. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной функции и который направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя обычно можно использовать целый внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать целый домен. В той степени, в которой используют усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, такую усеченную часть можно использовать вместо целого домена до тех пор, пока она передает сигнал эффекторной функции. Подразумевается, что термин «внутриклеточный сигнальный домен» включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для трансдуцирования сигнала эффекторной функции. Внутриклеточный сигнальный домен также известен как «домен сигнальной трансдукции» и, как правило, получен из частей цепей CD3 или FcRy.

[00168] Известно, что сигналы, полученные посредством только Т-клеточного рецептора, не являются достаточными для полной активации Т-клетки и что также необходим вторичный костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредована двумя различными классами последовательностей передачи цитоплазматического сигнала: те, которые инициируют зависимую от антигена первичную активацию посредством Т-клеточного рецептора (последовательности передачи первичного цитоплазматического сигнала), и те, которые действуют независимым от антигена образом, чтобы обеспечить вторичный или костимулирующий сигнал (последовательности передачи вторичного цитоплазматического сигнала). Последовательности передачи первичного цитоплазматического сигнала регулируют первичную активацию комплекса рецептора Т-клеток или ингибирующим образом, или ингибирующим образом. Последовательности передачи первичного цитоплазматического сигнала, которые действуют костимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как мотив активации иммунорецептора на основе тирозина или ITAM.

[00169] Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые в частности используются в данном изобретении, включают те, которые получены из TCR-зета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения внутриклеточный сигнальный домен CAR к HLA-A2:NY-ESO-1, описанных в данном документе, получены от CD3-зета или FcR-гамма.

[00170] При использовании в данном документе, термин «костимулирующий сигнальный домен» или «костимулирующий домен» относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или рецепторов Fc, которые обеспечивают второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функционирования Т-лимфоцитов при связывании с антигеном. Примеры таких костимулирующих молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, B7-H2 и лиганд, который специфически связывается с CD83. Следовательно, хотя в данном изобретении предложены иллюстративные костимулирующие домены, полученные из CD3-зета, CD28 и 4-1BB, для использования с CAR, описанным в данном документе, также подразумеваются другие костимулирующие домены. Включение одного или более костимулирующих сигнальных доменов может усиливать эффективность и распространимость Т-клеток, экспрессирующих рецепторы CAR. Внутриклеточные сигнальные домены и костимулирующие сигнальные домены могут быть связаны в любом порядке в тандем с карбоксильным концом трансмембранного домена.

[00171] Хотя было показано, что CAR на основе scFv, сконструированные так, что содержат сигнальный домен из CD3 или FcR-гамма, доставляют сильный сигнал для Т-клеточной активации и эффекторной функции, они не являются достаточными, чтобы вызвать сигналы, которые стимулируют выживаемость и распространимость Т-клеток в отсутствие сопутствующего костимулирующего сигнала. Другие CAR, содержащие связывающий домен, шарнирную область, трансмембранный и сигнальный домен, полученные от CD3-зета или FcR-гамма, вместе с одним или более костимулирующими сигнальными доменами (например, внутриклеточные костимулирующие домены, полученные из CD28, CD137, CD134 и CD278), могут более эффективно нацеливать противоопухолевую эффективность, а также усиливать секрецию цитокина, литическую активность, выживаемость и пролиферацию в Т-клетках, экспрессирующих CAR in vitro, и в животных моделях и у пациентов с раком (Milone et al., Molecular Therapy, 2009; 17: 1453-1464; Zhong et al., Molecular Therapy, 2010; 18: 413-420; Carpenito et al., PNAS, 2009; 106:3360-3365).

[00172] В одном варианте осуществления изобретения CAR к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению содержит (a) scFv к HLA-A2:NY-ESO-1 в качестве связывающего домена (например, scFv, содержащий связывающие области (например, CDR или вариабельные домены) от любого одного или более антител к HLA-A2:NY-ESO-1, описанных в Таблице

1) (b) шарнирную область, полученную от CD8альфа человека, (c) трансмембранный домен CD8-альфа человека, и (d) внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3-зета (CD3) Т-клеточного рецептора человека, и необязательно один или более костимулирующих сигнальных доменов, полученных из CD28, CD137, CD134 и CD278. В одном варианте осуществления изобретения различные домены белка расположены от амино- к карбоксильному концу в следующем порядке: связывающий домен, шарнирная область и трансмембранный домен. Внутриклеточный сигнальный домен и необязательные костимулирующие сигнальные домены связаны с трансмембранным карбокси-концом в любом порядке в тандем с образованием одноцепочечного химерного полипептида. В одном варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR HLA-A2:NY-ESO-1, представляет собой молекулу химерной нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (5’ к 3’) кодирующие последовательности scFv к HLA-A2:NY-ESO-1, шарнирную область CD8-альфа человека, трансмембранный домен CD8-альфа человека, костимулирующий домен CD137 и внутриклеточный сигнальный домен CD3-зета. В другом варианте осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR HLA-A2:NY-ESO-1, представляет собой молекулу химерной нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (5’ к 3’) кодирующие последовательности scFv к HLA-A2:NY-ESO-1, шарнирную область CD8-альфа человека, трансмембранный домен CD8-альфа человека, костимулирующий домен CD137 и костимулирующий домен CD3-зета. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR HLA-A2:NY-ESO-1, представляет собой молекулу химерной нуклеиновой кислоты, содержащую различные кодирующие последовательности, например (5’ к 3’) кодирующие последовательности scFv к HLA-A2:NY-ESO-1, шарнирную область CD8-альфа человека, трансмембранный домен CD8-альфа человека, костимулирующий домен CD137 и костимулирующий домен CD3-зета, при этом scFv к HLA-A2:NY-ESO-1 содержит V_H, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 2, 22, 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 180, 196, 211, 230 и 250, или scFv к HLA-A2:NY-ESO-1 содержит V_L, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 186, 203, 219, 238 и 258, или scFv к HLA-A2:NY-ESO-1 содержит пару V_H/V_L, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/203, 211/219, 230/238 и 250/258. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует CAR HLA-A2:NY-ESO-1, выбранный из группы, состоящей из последовательностей Таблицы 2.

[00173] В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, кодирующий CAR, описанный в данном документе, вставлен в вектор. Термин «вектор», при использовании в данном документе, относится к носителю, в который может быть ковалентно вставлен полинуклеотид, кодирующий белок, так, чтобы осуществить экспрессию этого белка и/или клонировать полинуклеотид. Такие вектора также могут

называться «экспрессионными векторами». Выделенный полинуклеотид может быть вставлен в вектор с использованием любого пригодного способа, известного в данной области техники, например, без ограничения, вектор можно обработать с использованием подходящей эндонуклеазы рестрикции, а затем можно лигировать с помощью выделенного полинуклеотида, обладающего совпадающими концами рестрикции. Экспрессионные вектора обладают способностью включать и экспрессировать гетерологичные или модифицированные последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие по меньшей мере часть генного продукта, способного транскрибироваться в клетке. В большинстве случаев молекулы РНК затем транслируются в белок. Экспрессионные вектора могут содержать различные контрольные последовательности, которые относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, необходимым для транскрипции и возможно трансляции функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. В дополнении к контрольным последовательностям, которые управляют транскрипцией и трансляцией, вектора и экспрессионные вектора могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые служат также для других функций, и они обсуждаются ниже. Экспрессионный вектор может содержать дополнительные элементы, например, экспрессионный вектор может иметь две системы репликации, таким образом позволяя ему содержаться в двух организмах, например, в клетках человека для экспрессии и в прокариотическом хозяине для клонирования и амплифицирования.

[00174] Экспрессионный вектор может содержать необходимые 5’ восходящие и 3’ нисходящие регуляторные элементы, такие как промоторные последовательности, такие как промоторы CMV, PGK и EF1-альфа, распознавание рибосомы, и TATA-связывающий белок, и последовательность остановки транскрипции 3'-НТО AAUAAA для эффективной транскрипции и трансляции гена в соответствующей клетке-хозяине. Другие пригодные промоторы включают конститутивный промотор раннего промотора вируса обезьяны 40 (SV40), промотор вируса рака молочных желез мышей (MMTV), промотор HIV LTR, промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно-ранний промотор EBV и промотор вируса саркомы Рауса. Также можно использовать промоторы гена человека, в том числе, но не ограничиваясь ими, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор киназы креатина. В некоторых вариантах осуществления изобретения также подразумевается индуцируемый промотор как часть векторов, экспрессирующих химерный антигенный рецептор. Это обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию представляющей интерес полинуклеотидной последовательности или выключать экспрессию. Примеры индуцируемых промоторов включают, но не ограничиваются ими, металлотиониновый промотор, глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор или тетрациклиновый промотор.

[00175] Экспрессионный вектор может содержать дополнительную последовательность, такую как тэг, состоящий из 6 гистидинов (SEQ ID №: 292), тэги с-

Myc и FLAG, которые встроены в экспрессируемые CAR. Таким образом, экспрессионный вектор может быть сконструирован так, что содержит 5'- и 3'-нетранслируемые регулирующие последовательности, которые иногда могут функционировать как энхансерные последовательности, области промоторов и/или терминирующие последовательности, которые могут облегчать или усиливать эффективную транскрипцию представляющей интерес нуклеиновой кислоты (кислот), переносимой экспрессионным вектором. Экспрессионный вектор также может быть сконструирован для репликации и/или экспрессии функционального свойства (например транскрипции и трансляции) в клетках конкретного типа, расположении клеток или ткани определенного типа. Экспрессионные вектора могут содержать селектируемый маркер для поддержания вектора в клетке-хозяине или клетке-реципиенте.

[00176] Примеры векторов представляют собой плазмиды, автономно воспроизводимые последовательности и перемещающиеся элементы. Дополнительные иллюстративные вектора включают, без ограничения, плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как искусственная хромосома дрожжей (YAC), искусственная хромосома бактерий (BAC) или искусственная хромосома, полученная от P1, (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и животные вирусы. Примеры категорий животных вирусов, пригодных в качестве векторов, включают, без ограничения, ретровирус (в том числе лентивирус), аденовирус, адено-ассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого вируса), поксивирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (например, SV40). Примеры экспрессионных векторов представляют собой вектора бицистронной экспрессионной системы Lenti-X^{TM} (Neo) (Clontrch), вектора pClneo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих; pLenti4/V5-DEST.TM., pLenti6/V5-DEST.TM. и pLenti6.2N5-GW/lacZ (Invitrogen) для опосредованного лентивирусом переноса и экспрессии генов в клетках млекопитающих. Кодирующие последовательности CAR, описанных в данном документе, можно лигировать в такие экспрессионные вектора для экспрессии химерного белка в клетки млекопитающих.

[00177] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по данному изобретению, представлены в вирусном векторе. Вирусный вектор может представлять собой те, которые получены из ретровируса, лентивируса или пенящего вируса. При использовании в данном документе, термин «вирусный вектор» относится к конструкции вектора нуклеиновой кислоты, которая включает по меньшей мере один элемент вирусного происхождения и обладает способностью к упаковке в частицу вирусного вектора. Вирусный вектор может содержать кодирующую последовательность для различных химерных белков, описанных в данном документе, вместо несущественных вирусных генов. Вектор и/или частицу можно применять с целью переноса ДНК, РНК или другой нуклеиновой кислоты в клетку или in vitro, или in vivo. В данной области техники известны различные формы вирусных векторов.

[00178] В некоторых вариантах осуществления изобретения вирусный вектор, содержащий кодирующую последовательность для CAR, описанного в данном документе, представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Термин «ретровирусный вектор» относится к вектору, содержащему структурные и функциональные генетические элементы, которые получены главным образом от ретровируса. Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, содержащему структурные и функциональные генетические элементы вне LTR, которые получены главным образом от лентивируса.

[00179] Ретровирусные вектора для применения в данном документе могут быть получены от любого известного ретровируса (например, ретровирусов типа c, таких как вирус мышиной саркомы Молони (MoMSV), вирус мышиной саркомы Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV), вирус лейкоза котов (FLV), спумавирус, вирус Френда, вирус стволовых клеток мыши (MSCV) и вирус саркомы Рауса (RSV)). Ретровирусы по изобретению также включают вирусы Т-клеточного лейкоза человека, HTLV-1 и HTLV-2, и лентивирусное семейство ретровирусов, такое как вирусы иммунодефицита человека, ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус иммунодефицита котов (FIV), вирус иммунодефицита лошадей (EIV) и другие классы ретровирусов.

[00180] Лентивирусный вектор для применения в данном документе относится к вектору, полученному из лентивируса, группе (или роду) ретровирусов, которые дают начало медленной развивающимся заболеваниям. Вирусы, которые входят в эту группу, включают ВИЧ (вирус иммунодефицита человека; в том числе ВИЧ 1 типа и ВИЧ 2 типа); вирус висна-маэди; вирус козьего артрита-энцефалита; вирус инфекционной анемии лошадей; вирус иммунодефицита кошек (ВИК, FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV); и вирус иммунодефицита обезьян (ВИО, SIV). Получение рекомбинантного лентивируса можно осуществить с использованием способов в соответствии с Dull et al. и Zufferey et al. (Dull et al., J. Virol., 1998; 72: 8463-8471 и Zufferey et al., J. Virol. 1998; 72:9873-9880).

[00181] Ретровирусные вектора (т.е. как лентивирусные, так и нелентивирусные) для применения в данном изобретении можно получать с использованием стандартных методик клонирования путем объединения желаемых последовательностей ДНК в порядке и ориентации, описанных в данном документе (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), разделы 9.10-9.14 и другие стандартные лабораторные руководства; Eglitis, et al. (1985) Science 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et

al. (1993) J. Immunol 150:4104-4115; патент США № 4868116; патент США № 4980286; заявка PCT WO 89/07136; заявка PCT WO 89/02468; заявка PCT WO 89/05345; и заявка PCT WO 92/07573).

[00182] Пригодные источники для получения ретровирусных (т.е. как лентивирусных, так и не лентивирусных) последовательностей для применения при получении векторов включают, например, геномную РНК и кДНК, доступные из коммерческих источников, в том числе Коллекции типовых культур (ATCC), Роквилл, Мэриленд. Последовательности также можно синтезировать химически.

[00183] Для экспрессии CAR к HLA-A2:NY-ESO-1 вектор может быть введен в клетку-хозяина, чтобы обеспечить экспрессию полипептида в клетке-хозяине. Экспрессионные вектора могут содержать различные элементы для контроля экспрессии, в том числе, но не ограничиваясь этим, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, последовательности энхансеров, селектируемые маркеры и сигнальные последовательности. Эти элементы могут быть выбраны в зависимости от ситуации специалистом в данной области техники, как описано выше. Например, промоторные последовательности могут быть выбраны для стимуляции транскрипции полинуклеотида в вектор. Пригодные промоторные последовательности включают, без ограничения, промотор T7, промотор T3, промотор SP6, промотор бета-актина, промотор EF1a, промотор CMV и промотор SV40. Последовательности энхансеров могут быть выбраны для усиления транскрипции полинуклеотида. Селектируемые маркеры могут быть выбраны, чтобы обеспечить отбор клеток-хозяев, в которые введен вектор, например селектируемые маркеры могут представлять собой гены, которые придают устойчивость к антибиотикам. Сигнальные последовательности могут быть выбраны, чтобы обеспечить перемещение экспрессируемого полипептида из клетки-хозяина.

[00184] Для клонирования полинуклеотида вектор может быть введен в клетку-хозяина (выделенную клетку-хозяина), чтобы позволить репликацию самого вектора и таким образом амплифицировать копии полинуклеотида, содержащегося в нем. Клонирующие вектора могут содержать компоненты последовательности, которые обычно включают, без ограничения, начало репликации, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, последовательности энхансера и селектируемые маркеры. Эти элементы могут быть выбраны в зависимости от ситуации специалистом в данной области техники. Например, начало репликации может быть выбрано для стимуляции независимой репликации вектора в клетке-хозяине.

[00185] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены изолированные клетки-хозяева, содержащие вектора, представленные в данном документе. Клетки-хозяева, содержащие вектор, могут быть пригодны для экспрессии или клонирования полинуклеотида, содержащегося в векторе. Пригодные клетки-хозяева могут включать, без ограничения, прокариотические клетки, клетки грибов, клетки дрожжей или клетки высших эукариотов, такие как клетки млекопитающих. Пригодные

для этой цели прокариотические клетки включают, без ограничения, эубактерии, такие как грамм-отрицательные или грамм-положительные организмы, например энтеробактерии, такие как Escherichia, например E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например Salmonella typhimurium, Serratia, например Serratia marcescans, и Shigella, а также Bacilli, такая как *B. subtilis u B. licheniformis, Pseudomonas*, такая как P. Aeruginosa, и Streptomyces.

[00186] CAR по данному изобретению вводят в клетку-хозяина с использованием технологий трансфекции и/или трансдукции, известных в данной области техники. При использовании в данном документе, термины «трансфекция» и «трансдукция» относятся к способам, с помощью которых экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты вводят в клетку-хозяина. Нуклеиновую кислоту можно интегрировать в ДНК клетки-хозяина или можно поддерживать вне хромосомы. Нуклеиновую кислоту можно поддерживать временно, или это может быть стабильное введение. Трансфекцию можно осуществить путем различных способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, соосаждение ДНК с фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, трансфекцию, опосредованную полибреном, электропорацию, микроинъекцию, слияние с липосомами, липофекцию, слияние с протопластами, инфицирование ретровирусом и биолистику. Трансдукция относится к доставке гена(-ов) с использованием ретровирусного вектора скорее посредством вирусной инфекции, а не трансфекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения ретровирусные векторы трансдуцированы путем упаковки векторов в вирионы до контактирования с клеткой. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая CAR к HLA-A2:NY-ESO-1, переносимая ретровирусным вектором, может быть трансдуцирована в клетку посредством инфицирования и провирусной интеграции.

[00187] При использовании в данном документе, термин «генно-инженерный» относится к добавлению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал в клетке. Термин «генетически модифицированные клетки», «модифицированные клетки» и «перенаправленные клетки» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[00188] В частности, CAR по данному изобретению введены и экспрессируются в иммунных эффекторных клетках, чтобы перенаправить свою специфичность на целевой, представляющий интерес антиген, например конформационный эпитоп пептида NY-ESO-1, отображаемого с помощью HLA-A2, например аминокислотные остатки 157-165.

[00189] В данном изобретении предложены способы получения иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют CAR, как описано в данном документе. В одном варианте осуществления изобретения способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных клеток, выделенных от субъекта, такого как субъект, имеющий заболевание или расстройство, связанное с NY-ESO-1, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или более CAR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунные эффекторные клетки

выделяют от индивида и генетически модифицируют без дополнительных манипуляций in vitro. Такие клетки могут затем быть непосредственно снова введены тому же индивиду (в качестве аутологической терапии) или другому индивиду (в качестве аллогенной терапии). В дополнительных вариантах осуществления изобретения иммунные эффекторные клетки вначале активируют и стимулируют для пролиферации in vitro до генетической модификации для экспрессии CAR. В этом отношении иммунные эффекторные клетки можно культивировать до или после генетической модификации (т.е. трансдуцировать или трансфектировать для экспрессии CAR, как описано в данном документе).

[00190] До in vitro манипуляций или генетической модификации иммунных эффекторных клеток, описанных в данном документе, источник клеток может быть получен от субъекта. В частности, иммунные эффекторные клетки для применения с CAR, как описано в данном документе, включают Т-клетки. Такие рекомбинантные Т-клетки называются в данном документе «Т-телами».

[00191] В одном варианте осуществления данного изобретения Т-тело включает CAR по изобретению, содержащий внеклеточный мишень-специфичный связывающий домен, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен (такой как сигнальный домен, полученный из CD3-зета или FcR-гамма), и/или один или более костимулирующих сигнальных доменов, полученных из костимулирующей молекулы, такой как, но не ограничиваясь ими, CD28, CD137, CD134 или CD278. В другом варианте осуществления данного изобретения Т-тело включает CAR по изобретению, содержащий внеклеточный мишень-специфичный связывающий домен, трансмембранный домен, шарнирную или спейсерную область между внеклеточным связывающим доменом и трансмембранным доменом, внутриклеточный сигнальный домен (такой как сигнальный домен, полученный из CD3-зета или FcR-гамма) и/или один или более костимулирующих сигнальных доменов, полученных из костимулирующей молекулы. В другом варианте осуществления данного изобретения Т-тело включает конструкцию CAR Т-тела, содержащую внешнеклеточный мишень-специфичный связывающий домен и константный домен Т-клеточного рецептора. Внеклеточный мишень-специфичный связывающий домен, пригодный для применения в Т-теле, содержащем любой из CAR, описанных в данном документе, может содержать Fab, Fab', (Fab')2, Fv или одноцепочечный Fv (scFv) антиген-связывающего белка по изобретению.

[00192] Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфоузлов, пуповинную кровь, ткань вилочковой железы, ткань с места инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта с использованием любого из ряда способов, известных специалисту в данной области техники, как, например, разделение FICOLL. В одном варианте осуществления изобретения клетки из кровотока индивида получают с помощью афереза. Продукт

афереза, как правило, содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные белые кровяные тельца, эритроциты и тромбоциты. В одном варианте осуществления изобретения клетки, собранные путем афереза, можно промывать для удаления фракции плазмы и для помещения клеток в подходящий буфер или среду для последующей обработки. В одном варианте осуществления изобретения клетки промывают ФСБ. В альтернативном варианте осуществления изобретения в промывочном растворе отсутствует кальций и может отсутствовать магний или могут отсутствовать многие, если не все двухвалентные катионы. Как будет понятно специалистам в данной области техники, стадию промывания можно осуществлять способами, известными в данной области техники, такими как с использованием полуавтоматической проточной центрифуги. После промывания клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах или другом солевом растворе с буфером или без него. В некоторых вариантах осуществления изобретения нежелательные компоненты образца после афереза могут быть удалены в культуральной среде для непосредственного ресуспендирования клеток.

[00193] В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетки выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) путем лизирования эритроцитов и деплетирования моноцитов, например, путем центрифугирования посредством градиента PERCOLL™. Конкретную субпопуляцию Т-клеток, таких как CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и CD45RO+ Т-клетки, можно дополнительно выделять с помощью технологий положительной или отрицательной селекции. Например, обогащение популяции Т-клеток за счет отрицательной селекции можно осуществлять с помощью комбинации антител, направленных на маркеры поверхности, присущие только отрицательно селектированным клеткам. Один способ для применения в данном документе представляет собой сортировку клеток и/или отбор посредством отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, в которой используется смесь моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на отрицательно отобранных клетках. Например, для обогащения CD4+ клеток с помощью отрицательной селекции, смесь моноклональных антител, как правило, содержит антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Проточную цитометрию и сортировку клеток можно также применять для выделения клеточных популяций, представляющих интерес, для применения в данном изобретении.

[00194] МКПК можно использовать непосредственно для генетической модификации с помощью CAR с использованием способов, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения после выделения МКПК Т-лимфоциты дополнительно выделяют, а в некоторых вариантах осуществления изобретения как цитотоксические, так и хелперные Т-лимфоциты можно сортировать на субпопуляции интактных клеток, клеток памяти и эффекторных Т-клеток или до, или после генетической модификации и/или увеличения количества. CD8+ клетки можно получить с использованием стандартных способов. В некоторых вариантах

осуществления изобретения CD8+ клетки дополнительно сортируют на интактные, центральные клетки памяти и эффекторные клетки путем идентификации антигенов клеточной поверхности, которые связаны с каждым из указанных типов CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетки памяти присутствуют в обеих CD62L+ и CD62L- подгруппах CD8+ лимфоцитов периферической крови. МКПК сортируют на CD62L-CD8+ и CD62L+CD8+ фракции после окрашивания антителами к CD8 и CD62L. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия фенотипических маркеров центральных TCM памяти включает CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и CD127 и является отрицательной относительно гранзимов B. В некоторых вариантах осуществления изобретения центральные Т-клетки памяти представляют собой CD45RO+, CD62L+, CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторные Т-клетки являются отрицательными относительно CD62L, CCR7, CD28 и CD127 и положительными относительно гранзима B и перфорина. В некоторых вариантах осуществления изобретения интактные CD8+ Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров интактных Т-клеток, в том числе CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 и CD45RA.

[00195] В некоторых вариантах осуществления изобретения CD4+ Т-клетки дополнительно сортируют на субпопуляции. Например, CD4+ Т-хелперные клетки можно сортировать на интактные, центральные клетки памяти и эффекторные клетки путем установления клеточных популяций, которые обладают антигенами клеточной поверхности. CD4+ лимфоциты можно получить с использованием стандартных способов. В некоторых вариантах осуществления изобретения интактные CD4+ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO-, CD45RA+, CD62L+CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения центральные CD4+ клетки памяти являются CD62L-положительными и CD45RO-положительными. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторные CD4+ клетки являются CD62L- и CD45RO-отрицательными.

[00196] Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с использованием известных способов, или иммунные эффекторные клетки можно активировать и увеличить их количество (или дифференцировать в случае предшественников) in vitro до генетической модификации. В другом варианте осуществления изобретения иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицированы химерными антигенными рецепторами, описанными в данном документе (например, трансдуцированы вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем активированы и размножены in vitro. Способы активации и размножения Т-клеток известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 6905874; патенте США № 6867041; патенте США № 6797514; WO2012079000, US 2016/0175358. В общем, такие способы включают приведение в контакт МКПК или выделенных Т-клеток со стимулирующим агентом и костимулирующим агентом, таким как антитела к CD3 и к

CD28, обычно присоединенным к шарику или другой поверхности, в культуральной среде с подходящими цитокинами, такими как ИЛ-2. Антитела к CD3 и к CD28, присоединенные к тому же шарику, служат в качестве «заменителя» антиген-презентирующей клетки (APC). В других вариантах осуществления изобретения Т-клетки могут быть активированы и стимулированы для пролиферации с помощью питающих клеток и соответствующих антител и цитокинов с использованием таких способов, как описано в патенте США № 6040177; патенте США № 5827642; и WO2012129514.

[00197] В изобретении предложена популяция модифицированных иммунных эффекторных клеток для лечения заболевания или расстройства, связанного с NY-ESO-1, например рака, при этом модифицированные иммунные эффекторные клетки содержат CAR HLA-A2:NY-ESO-1, как описано в данном документе.

[00198] Иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие CAR, полученные как описано в данном документе, можно применять в способах и композициях для адаптивной иммунотерапии в соответствии с известными техниками или их вариантах, которые будут очевидны специалистам в данной области техники на основании данного описания. См., например, публикацию патентной заявки США № 2003/0170238, Gruenberg et al; см. также патент США № 4690915, Rosenberg.

[00199] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки вводят в состав путем первоначально их сбора из культуральной среды, а затем промывания и концентрирования клеток в среде и системе контейнеров, пригодных для введения («фармацевтически приемлемый» носитель), в количестве, эффективном для лечения. Пригодная среда для инфузии может представлять собой состав любой изотонической среды, как правило изотонический раствор хлорида натрия, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), но также можно использовать 5% декстрозы в воде или лактат Рингера. Среду для инфузии можно дополнять сывороточным альбумином человека.

[00200] Количество клеток, эффективное для лечения, в композиции составляет по меньшей мере 2 клетки (например, субпопуляцию из по меньшей мере 1 CD8+ Т-клетки центральной памяти и по меньшей мере 1 CD4+ хелперной Т-клетки) или обычно более чем 10^2 клеток и до 10^6, до и включая 10^8 или 10^9 клеток и может быть более чем 10^{10} клеток. Количество клеток будет зависеть от окончательного применения, для которого предназначена композиция, а также типа клеток, включенных в нее.

[00201] Клетки могут быть аутологичными или гетерологичными для пациента, которого подвергают терапии. Если необходимо, лечение может также включать введение митогенов (например, PHA) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (например, ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-12, ФНО-α, ИЛ-18 и ФНО-β, ГМКСФ, ИЛ-4, ИЛ-13, Flt3-L, RANTES, MIP1α и т.д.), как описано в данном документе для усиления индукции иммунного ответа.

[00202] Популяции иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих CAR, по данному изобретению можно вводить или отдельно, или в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как ИЛ-2 или другие цитокины или популяции клеток. Вкратце, фармацевтические композиции по

данному изобретению могут содержать популяцию иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих CAR, таких как Т-клетки, как описано в данном документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать буфера, такие как нейтрально-солевой буферный раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и тому подобное; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по данному изобретению предпочтительно составлены для внутривенного введения.

[00203] Противоопухолевый иммунный ответ, вызванный у субъекта введением Т-клеток, экспрессирующих CAR, описанных в данном документе, с использованием способов, описанных в данном документе, или других способов, известных в данной области техники, могут включать клеточные иммунные ответы, опосредованные цитотоксичными Т-клетками, способными уничтожать инфицированные клетки, регуляторными Т-клетками, и ответы хелперных Т-клеток. Также могут быть индуцированы гуморальные иммунные ответы, опосредованные главным образом хелперными Т-клетками, способными активировать В-клетки, приводя таким образом к продуцированию антител. Для анализа типа иммунных ответов, вызванных композициями по данному изобретению, можно использовать различные техники, которые хорошо описаны в данной области техники; например, Current Protocols in Immunology, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

[00204] Таким образом, в данном изобретении предложены способы лечения индивида, у которого диагностировано или подозревается, или который имеет риск развития заболевания или расстройства, связанного с NY-ESO-1, например NY-ESO-1-положительный рак, включающие введение индивиду терапевтически эффективного количества иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих CAR, как описано в данном документе.

[00205] В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения субъекта, у которого диагностирован NY-ESO-1-положительный рак, включающий отбор иммунных эффекторных клеток у субъекта, у которого диагностирован NY-ESO-1-положительный рак, генетическую модификацию указанных иммунных эффекторных клеток вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор по данному изобретению, продуцируя таким образом популяцию модифицированных иммунных эффекторных клеток, и введение популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток тому же субъекту. В одном варианте осуществления изобретения иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки.

[00206] Способы введения композиций клеток, описанных в данном документе, включают любой способ, который является эффективным для повторного введения ex vivo

генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые или непосредственно экспрессируют CAR по изобретению, у субъекта, или при повторном введении генетически модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые при введении субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, экспрессирущие CAR. Один способ включает трансдукцию Т-клеток периферической крови ex vivo с помощью конструкции нуклеиновой кислоты в соответствии с описанием и возвращение трансдуцированных клеток субъекту.

Терапевтическое введение и составы

[00207] В изобретении предложены терапевтические композиции, содержащие антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1, например антитела, или их антиген-связывающие фрагменты, или CARs, по данному изобретению. Терапевтические композиции в соответствии с изобретением будут введены с пригодными носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые включены в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и тому подобного. Большое количество подходящих составов можно найти в руководстве, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, липиды, везикулы, содержащие липиды (катионные или анионные) (такие как LIPOFECTIN™), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии «масло-в-воде» и «вода-в-масле», эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[00208] Размер дозы антиген-связывающего белка, например антитела или его антиген-связывающих фрагментов, может варьироваться в зависимости от возраста и размера субъекта, которому ее вводят, целевого заболевания, состояния, пути введения и тому подобного. Когда антиген-связывающий белок по данному изобретению применяют для лечения заболевания или расстройства у взрослого пациента или для профилактики такого заболевания, полезным будет вводить антиген-связывающий белок, например антитело или его антиген-связывающие фрагменты, по данному изобретению обычно в виде однократной дозы от около 0,1 до около 60 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 5 до около 60, от около 20 до около 50, от около 10 до около 50, от около 1 до около 10 или от около 0,8 до около 11 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести патологического состояния можно регулировать частоту и длительность лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок, например антитело или его антиген-связывающие фрагменты, по изобретению можно вводить в виде исходной дозы по меньшей мере от около 0,1 мг до около 800 мг, от около 1 до около 500 мг, от около 5 до около 300 мг или от около 10 до около 200 мг, до около 100 мг или до около 50 мг. В некоторых вариантах осуществления изобретения за исходной дозой можно осуществлять введение второй или нескольких последующих доз антиген-

связывающего белка, например антитела или его антиген-связывающих фрагментов, в количестве, которое может быть тем же или менее чем указанная исходная доза, при этом последующие дозы разделены периодом по меньшей мере от 1 дня до 3 дней; по меньшей мере одна неделя, по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель; или по меньшей мере 14 недель.

[00209] Известны различные системы доставки и их можно использовать для введения фармацевтической композиции по изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные к экспрессии мутантных вирусов, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но не ограничиваясь этим, интрадермальный, трансдермальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым традиционным путем, например с помощью инфузии или болюсной инъекции, с помощью абсорбции через эпителиальную и кожно-слизистую оболочки (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой и тонкой кишки и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Фармацевтическую композицию можно также доставлять в везикуле, в частности липосоме (см., например, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

[00210] Также в данном документе подразумевается применение наночастиц для доставки антиген-связывающих белков, например антитела или его антиген-связывающих фрагментов, по данному изобретению. Наночастицы, конъюгированные с антиген-связывающим белком, можно использовать как для терапевтического, так и для диагностического применения. Наночастицы, конъюгированные с антиген-связывающим белком, и способы получения и применения описаны подробно в Arruebo, M., et al. 2009 (“Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications” in J. Nanomat. Volume 2009, ID статьи 439389, 24 страницы, doi: 10.1155/2009/439389), включенном в данный документ посредством ссылки. Наночастицы могут быть разработаны и конъюгированы с антиген-связывающими белками, содержащимися в фармацевтических композициях, для нацеливания на опухолевые клетки, или аутоиммунные клетки тканей, или инфицированные вирусом клетки. Наночастицы для доставки лекарственного средства также были описаны, например, в патенте США № 8257740 или патенте США №. 8246995, каждый из которых включен в данный документ в полном объеме.

[00211] В некоторых ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления изобретения можно применять насос. В другом варианте осуществления изобретения можно применять полимерные материалы. В другом варианте осуществления изобретения

систему с контролируемым высвобождением можно поместить вблизи мишени композиции, таким образом используя только часть системной дозы.

[00212] Инъецируемые препараты могут включать лекарственные формы для внутривенной, подкожной, внутрикожной, внутричерепной, внутрибрюшинной и внутримышечной инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъецируемые препараты могут быть получены с помощью известных способов. Например, инъецируемые препараты могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антиген-связывающего белка или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или в маслянистой среде, традиционно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизирующим агентом, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт полиоксиэтилена (50 моль) с гидрогенизированным касторовым маслом)) и т.д. В качестве масляной среды применяют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизирующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Таким образом приготовленной инъекцией предпочтительно заполняют подходящую ампулу.

[00213] Фармацевтическую композицию по данному изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы или шприца. Кроме того, по отношению к подкожной доставке, устройство для введения в виде ручки явно имеет применения при доставке фармацевтической композиции по данному изобретению. Такое устройство для доставки в виде ручки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве для доставки в виде ручки используют заменяемый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция в картридже была введена, и картридж опустел, пустой картридж можно выбросить и заменить на новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Устройство для доставки в виде ручки можно использовать повторно. В одноразовом устройстве для доставки в виде ручки нет заменяемого картриджа. Скорее, одноразовое устройство для доставки в виде ручки поставляют предварительно заполненным фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре устройства. После опустошения резервуара с фармацевтической композицией устройство полностью выбрасывают.

[00214] Различные многоразовые ручки и автоинжекторные устройства доставки имеют применения при подкожной доставке фармацевтической композиции по данному изобретению. Примеры включают, но определенно не ограничиваются ими, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Соединенное Королевство), ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), ручку HUMALOG MIX 75/25™,

ручку HUMALOG™, ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), если упомянуть только несколько. Примеры одноразовых устройств доставки в виде ручки, имеющих применения для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению включают, но определенно не ограничиваются ими, ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Саузенд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Абботт-парк, Иллинойс), если упомянуть только несколько.

[00215] Предпочтительно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального использования, описанные выше, готовят в лекарственных формах с единичной дозой, соответствующей дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антиген-связывающего белка в общем составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; особенно в форме инъекции предпочтительно, что антиген-связывающий белок содержится в количестве от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения антиген-связывающих белков

[00216] Антитела по изобретению пригодны среди прочего для лечения, профилактики и/или ослабления любого заболевания или расстройства, связанного с или опосредованного NY-ESO-1. Например, в данном изобретении предложены способы лечения заболевания или расстройства, связанного с NY-ESO-1, такого как рак, связанный cNY-ESO-1, (например, NY-ESO-1-положительный рак) (ингибирование роста опухоли) путем введения антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 (или фармацевтической композиции, содержащей антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1), как описано в данном документе, пациенту, нуждающемуся в таком лечении, и антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1 (или фармацевтическая композиция, содержащая антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1) для применения в лечении рака, связанного с NY-ESO-1 (ингибирование роста опухоли). Антиген-связывающие белки по данному изобретению пригодны для лечения, профилактики и/или ослабления заболевания, или расстройства, или патологического состояния, такого как рак, связанный с NY-ESO-1, и/или для ослабления по меньшей мере одного симптома, связанного с таким заболеванием, расстройством или патологическим состоянием. В контексте способов лечения, описанных в данном документе, антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1 можно вводить в виде монотерапии (т.е. в качестве единственного терапевтического агента) или в комбинации с одним или более дополнительными

терапевтическими агентами (примеры которых описаны в другом месте в данном документе).

[00217] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, описанные в данном документе, пригодны для лечения субъектов, страдающих от первичного или рецидивирующего рака, в том числе, но не ограничиваясь этим, рака, связанного с NY-ESO-1, например, липосаркомы, нейробластомы, миеломы, метастатической меланомы, синовиальной саркомы, рака мочевого пузыря, рака пищевода, печеночно-клеточного рака, рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого, рака яичников, рака предстательной железы, рака молочной железы, астроцитарной опухоли, мультиформной глиобластомы, анапластической астроцитомы, опухоли мозга, рака фаллопиевых труб, эпителиального рака яичника, первичного рака полости брюшины, солидных опухолей в прогрессирующей стадии, саркомы мягких тканей, меланомы, саркомы, миелодиспластического синдрома, острого миелоидного лейкоза, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, болезни Ходжкина, множественной миеломы, синовиальной саркомы, метастатических солидных опухолей, рака пищевода, рабдомиосаркомы, миксоидной опухоли в прогрессирующей стадии, круглоклеточной липосаркомы, метастатической меланомы или рецидивирующего немелкоклеточного рака легкого.

[00218] Антиген-связывающие белки можно использовать для лечения симптомов ранней стадии или поздней стадии рака, связанного с NY-ESO-1. В одном варианте осуществления изобретения антитело или его фрагмент по изобретению можно использовать для лечения рака в прогрессирующей стадии или метастатического рака. Антиген-связывающие белки пригодны для снижения, или ингибирования, или снижения роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение с помощью антиген-связывающего белка по изобретению приводит к регрессии более чем на 40%, регрессии более чем на 50%, регрессии более чем на 60%, регрессии более чем на 70%, регрессии более чем на 80% или регрессии более чем на 90% опухоли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки можно применять для профилактики рецидива опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки пригодны для продления выживаемости без прогрессирования или общей выживаемости у субъекта, страдающего от рака, связанного с NY-ESO-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела пригодны для снижения токсичности вследствие химиотерапии или радиотерапии, при этом поддерживая длительное выживание у пациента, страдающего от рака, связанного с NY-ESO-1.

[00219] Одно или более антител по данному изобретению можно вводить для ослабления, или профилактики, или снижения тяжести одного или более симптомов или состояний заболевания или расстройства.

[00220] Также подразумевается в данном документе применение одного или более антител по данному изобретению профилактически у пациентов с риском развития

заболевания или расстройства, такого как заболевание или расстройство, связанное с NY-ESO-1, такое как рак, связанный с NY-ESO-1.

[00221] В дополнительном варианте осуществления изобретения антитела по данному изобретению применяют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от заболевания или расстройства, связанного с NY-ESO-1, такого как рак, связанный с NY-ESO-1. В другом варианте осуществления изобретения антитела по данному изобретению применяют в качестве вспомогательной терапии с любым другим агентом или любой другой терапией, известной специалистам в данной области техники, пригодной для лечения рака, связанного с NY-ESO-1.

Комбинированные терапии или препараты

[00222] Комбинированные терапии могут включать антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению, такой как CAR по изобретению (например, иммунная эффекторная клетка, содержащая CAR по изобретению), или фармацевтическую композицию по изобретению, и любой дополнительный терапевтический агент, который можно с пользой объединять с антиген-связывающим белком по изобретению. Антиген-связывающие белки по данному изобретению можно синергично объединять с одним или более противораковыми лекарственными средствами или терапиями, используемыми для лечения или ингибирования заболевания или расстройства, связанного с NY-ESO-1, такого как NY-ESO-1-положительный рак, например, липосаркома, нейробластома, миелома, метастатическая меланома, синовиальная саркома, рак мочевого пузыря, рак пищевода, печеночно-клеточный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарная опухоль, мультиформная глиобластома, анапластическая астроцитома, опухоль мозга, рак фаллопиевых труб, эпителиальный рак яичника, первичный рак полости брюшины, солидные опухоли в прогрессирующей стадии, саркома мягких тканей, меланома, саркома, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, болезнь Ходжкина, множественная миелома, синовиальная саркома, метастатические солидные опухоли, рак пищевода, рабдомиосаркома, миксоидная опухоль в прогрессирующей стадии, круглоклеточная липосаркома, метастатическая меланома или рецидивирующий немелкоклеточный рак легкого.

[00223] В данном документе подразумевается применение антиген-связывающих белков к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению в комбинации с иммуностимулирующими и/или иммуноподдерживающими терапиями для ингибирования роста опухоли и/или увеличения выживаемости пациентов с раком. Иммуностимулирующие терапии включают прямые иммуностимулирующие терапии для усиления активности иммунных клеток путем или «ослабления тормоза» на подавленных иммунных клетках, или «нажатия на газ» для активации иммунного ответа. Примеры включают нацеливание на другие рецепторы контрольных точек, вакцинацию и адъюванты. Иммуноподдерживающие режимы могут повышать антигенность опухоли путем

стимуляции иммуногенной клеточной смерти, воспаления или иметь другие непрямые эффекты, которые стимулируют противоопухолевый иммунный ответ. Примеры включают облучение, химиотерапию, анти-ангиогенные агенты и хирургическое вмешательство.

[00224] В различных вариантах осуществления изобретения один или более антиген-связывающих белков по данному изобретению можно применять в комбинации с ингибитором PD-1 (например, антитело к PD-1, такое как ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, BGB-A317 или REGN2810), ингибитором PD-L1 (например, антитело к PD-L1, такое как авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, MDX-1105 или REGN3504), ингибитором CTLA-4 (например, ипилимумаб), ингибитором TIM3, ингибитором BTLA, ингибитором TIGIT, ингибитором CD47, ингибитором GITR, антагонистом другого ко-ингибитора или лиганда Т-клеток (например, антитело к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонистом фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) (например, «ФРЭС-ловушка», такая как афлиберцепт или другой слитой белок, ингибирующий ФРЭС, как представлено в US 7087411, или антитело к РЭФР или его антиген-связывающий фрагмент (например, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный киназный ингибитор рецептора РЭФР (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), ингибитором Ang2 (например, несвакумаб), ингибитором трансформирующего фактора роста бета (TGFβ), ингибитором рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР) (например, эрлотиниб, цетуксимаб), ингибитором CD20 (например, антитело к CD20, такое как ритуксимаб), антителом к опухоль-специфичному антигену (например, CA9, CA125, связанный с меланомой антиген 3 (MAGE3), карциноэмбриональный антиген (CEA), виментин, опухоль-M2-PK, простатоспецифический антиген (PSA), муцин-1, MART-1 и CA19-9), вакциной (например, бацилл Кальмета-Герена, противораковая вакцина), адъювантом для усиления презентации антигена (например, гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор), биспецифическим антителом (например, биспецифическое антитело к CD3xCD20 или биспецифическое антитело к PSMAxCD3), цитотоксином, химиотерапевтическим агентом (например, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубицин, даунорубицин, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксель и винкристин), циклофосфамидом, радиотерапией, хирургическим вмешательством, ингибитором ИЛ-6R (например, сарилумаб), ингибитором ИЛ-4R (например, дупилумаб), ингибитором ИЛ-10, цитокином, таким как ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-21 и ИЛ-15, конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC) (например, ADC к CD19-DM4 и ADC к DS6-DM4), противовоспалительным лекарственным средством (например, кортикостероидами и нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами), диетическими добавками, такими как антиоксиданты, или любой другой терапией для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению можно применять в комбинации с

противораковыми вакцинами, в том числе вакцинами из дендритных клеток, онколитическими вирусами, вакцинами из опухолевых клеток и т.д. для усиления противоопухолевого ответа. Примеры противораковых вакцин, которые можно применять в комбинации с антиген-связывающими белками к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению включают вакцину MAGE3 для меланомы и рака мочевого пузыря, вакцину MUC1 для рака молочной железы, EGFRv3 (например, риндопепимут) для рака головного мозга (в том числе мультиформной глиобластомы) или ALVAC-CEA (для CEA+ раковых заболеваний).

[00225] В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению можно применять в комбинации с лучевой терапией в способах для получения длительных устойчивых противоопухолевых ответов и/или увеличения выживаемости пациентов с раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению можно вводить до, одновременно с или после применения лучевой терапии у пациента с раком. Например, лучевую терапию можно применять в одной или более дозах к опухолевым очагам после введения одной или более доз антиген-связывающих белков к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения лучевую терапию можно применять местно к опухолевому поражению для усиления локальной иммуногенности опухоли пациента (вспомогательное облучение) и/или для уничтожения опухолевых клеток (разрушающее излучение) после системного введения антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению. Например, интракраниальное облучение можно применять у пациента с раком головного мозга (например, мультиформной глиобластомой) в комбинации с системным введением антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению можно вводить в комбинации с лучевой терапией и химиотерапетвическим агентом (например, темозоломид) или антагонистом ФРЭС (например, афлиберцепт).

[00226] Дополнительный терапевтически активный агент(-ы)/компонент(-ы) можно вводить до, одновременно с или после введения антиген-связывающих белков к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению. Для целей данного изобретения такие режимы введения считают введением антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 «в комбинации» со вторым терапевтически активным компонентом.

[00227] Дополнительный терапевтически активный компонент(-ы) можно вводить субъекту до введения антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению. Например, считается, что первый компонент необходимо вводить «до» второго компонента, если первый компонент вводят за 1 неделю до, 72 часа до, 60 часов до, 48 часов до, 36 часов до, 24 часа до, 12 часов до, 6 часов до, 5 часов до, 4 часа до, 3 часа до, 2 часа до, 1 час до, 30 минут до, 15 минут до, 10 минут до, 5 минут до или менее чем 1 минуту до введения второго компонента. В других вариантах осуществления

изобретения дополнительный терапевтически активный компонент(-ы) можно вводить субъекту после введения антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению. Например, считается, что первый компонент необходимо вводить «после» второго компонента, если первый компонент вводят через 1 минуту после, 5 минут после, 10 минут после, 15 минут после, 30 минут после, 1 час после, 2 часа после, 3 часа после, 4 часа после, 5 часов после, 6 часов после, 12 часов после, 24 часа после, 36 часов после, 48 часов после, 60 часов после, 72 часа после или 1 неделю после введения второго компонента. В других вариантах осуществления изобретения дополнительный терапевтически активный компонент(-ы) можно вводить субъекту одновременно с введением антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению. «Одновременное» введение для целей данного изобретения включает, например, введение антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в одной лекарственной форме (например, введенные в один состав) или в отдельных лекарственных формах, которые вводят субъекту в течение около 30 минут или менее друг после друга. В случае введения в отдельных лекарственных формах, каждую лекарственную форму можно вводить посредством того же пути (например, как антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно, подкожно и т.д.); альтернативно, каждую лекарственную форму можно вводить отдельным путем (например, антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1 можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить подкожно). В любом случае все из введения компонентов в единой лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах тем же путем или в отдельных лекарственных формах различными путями считают «одновременным введением» для целей данного изобретения. Для целей данного изобретения введение антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 «до» , «одновременно с» или «после» (как эти термины определены в данном документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считают введением антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом.

[00228] Данное изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению вводят в состав с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в другом месте в данном документе, с использованием различных комбинаций дозировок.

Режимы введения

[00229] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения несколько доз антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 и любого из дополнительных терапевтически активных агентов, упомянутых в данном документе) можно вводить субъекту в течение определенного

периода времени. Способы в соответствии с этим аспектом изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению. При использовании в данном документе, «последовательное введение» означает, что каждую дозу антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 вводят субъекту в различные моменты времени, например в различные дни, разделенные заранее определенными интервалами (например, часами, днями, неделями или месяцами). Данное изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту однократной дозы антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 после одной или более вторых доз антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 и необязательно после одной или более третьих доз антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1. Антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1 можно вводить в дозе от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела субъекта.

[00230] Термины «исходная доза», «вторые дозы» и «третьи дозы» относятся к временной последовательности введения антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению. Таким образом, «исходная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале режима лечения (также называется в данном документе «базовая доза»); «вторые дозы» представляют собой дозы, которые вводят после исходной дозы; и «третьи дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторых доз. Исходная, вторые и третьи дозы могут все содержать то же количество антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 , но в общем могут отличаться друг от друга частотой введения. Однако, в некоторых вариантах осуществления изобретения количество антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 , содержащегося в исходной, вторых и/или третьих дозах, отличается друг от друга (например, выше или ниже, как уместно) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят вначале режима лечения в виде «насыщающих доз», а последующие дозы вводят реже (например, «поддерживающие дозы»).

[00231] В некоторых вариантах осуществления изобретения количество антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1 , содержащегося в исходной, второй и/или третьей дозах, может быть субоптимальным или субтерапевтическим. При использовании в данном документе, термины «субтерапевтический» или «субоптимальный» относятся к дозе антитела, вводимой на слишком низком уровне, чтобы получить терапевтический эффект, или ниже уровня, необходимого для лечения заболевания, такого как рак.

[00232] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения каждую вторую и/или третью дозу вводят через от 1 до 26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза», при использовании в данном документе, означает в последовательности нескольких введений дозу антиген-связывающего белка к

HLA-A2:NY-ESO-1 , которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[00233] Способы в соответствии с этим аспектом изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторых и/или третьих доз антиген-связывающего белка к HLA-A2:NY-ESO-1. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения пациенту вводят только одну вторую дозу. В других вариантах осуществления изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторых доз. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления изобретения пациенту вводят только одну третью дозу. В других вариантах осуществления изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третьих доз.

[00234] В вариантах осуществления изобретения, включающих несколько вторых доз, каждую вторую дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторые дозы. Например, каждую вторую дозу можно вводить пациенту через от 1 до 2 недель или от 1 до 2 месяцев после непосредственной предшествующей дозы. Подобно, в вариантах осуществления изобретения, включающих несколько вторых доз, каждую вторую дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третьи дозы. Например, каждую третью дозу можно вводить пациенту через от 2 до 12 недель после непосредственной предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения частота, с которой пациенту вводят вторые и/или третьи дозы, может изменяться в зависимости от режима лечения. Частота введения может также регулироваться врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей каждого пациента с последующим клиническим осмотром.

Диагностические применения антиген-связывающих белков

[00235] Антиген-связывающие белки к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению можно применять для детектирования и/или измерения NY-ESO-1 в образце, например, для диагностических целей. Некоторые варианты осуществления изобретения подразумевают применение одного или более антиген-связывающих белков по данному изобретению в анализах для детектирования заболевания или расстройства, такого как заболевание или расстройство, связанное с NY-ESO-1, такое как NY-ESO-1-положительный рак. Иллюстративные диагностические анализы для NY-ESO-1 могут включать, например, приведение в контакт образца, полученного от субъекта (например, пациента), с антиген-связывающим белком к HLA-A2:NY-ESO-1 по изобретению, при этом антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1 метят обнаружимой меткой или репортерной молекулой или применяют в качестве лиганда для захвата, чтобы селективно выделять NY-ESO-1 из образцов субъекта. Альтернативно, немеченый антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1 можно применять для диагностических целей в комбинации со вторичным антиген-связывающим белком, например антителом, которое само обнаружимо мечено. Обнаружимая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S или ^{125}I; флуоресцентный или

хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеина изотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно применять для обнаружения или измерения NY-ESO-1 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и флуоресцентную сортировку клеток (FACS).

[00236] Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах NY-ESO-1 в соответствии с данным изобретением, включают любой образец ткани или жидкости, который можно получить от субъекта, и который содержит обнаружимые количества или белка NY-ESO-1, или его фрагментов, в нормальных или патологических условиях. В общем, уровни NY-ESO-1 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего от заболевания или расстройства, связанного с NY-ESO-1, например NY-ESO-1-положительный рака), измеряют для первоначального установления исходного уровня или стандартного уровня NY-ESO-1. Этот исходный уровень NY-ESO-1 затем можно сравнивать с уровнями NY-ESO-1 , измеренными в образцах, полученных от индивидов, у которых подозревают наличие патологического состояния, связанного раком, или симптомов, связанных с таким патологическим состоянием.

[00237] Антиген-связывающие белки, специфичные к NY-ESO-1, могут не содержать дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания расположение метки (если есть) позволяет определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрывают авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован так, что C-концевая часть пептида будет отдалена от поверхности.

[00238] Аспекты изобретения относятся к применению раскрытых антиген-связывающих белков в качестве маркеров для предсказания прогноза NY-ESO-1-положительного рака у пациентов. Антиген-связывающие белки по данному изобретению можно применять в диагностических анализах для оценки прогноза рака у пациента и предсказания выживаемости.

ПРИМЕРЫ

[00239] Следующие примеры представлены, чтобы обеспечить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получить и применять способы и композиции по изобретению, и не предполагается, что они ограничивают объем того, что авторы изобретения считают своим изобретением. Были предприняты попытки по обеспечению точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу,

температура представлена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет около 25°C, а давление представляет собой атмосферное или около того.

Пример 1: Получение антител человека к HLA-A2:NY-ESO-1_157-165

[00240] Антитела человека к HLA-A2:NY-ESO-1 получали с использованием фрагмента пептида NY-ESO-1, связанного с HLA-A2 с номером доступа GenBank NP_001318.1 (SEQ ID №: 271), который включает аминокислоты 157-165, содержащие цистеин (C) в положении 165, замещенный на валин (V) (SLLMWITQV; «NY-ESO-1_V»); SEQ ID №: 291). Иммуноген вводили непосредственно с адъювантом для стимуляции иммунного ответа мышам VELOCIMMUNE® (т.е. искусственно разработанным мышам, содержащим ДНК, которая кодирует вариабельные области тяжелой и легкой каппа цепи иммуноглобулина человека), например, как описано в патенте США № 8502018. Иммунный ответ антител наблюдали с помощью иммуноанализа, специфичного к HLA-A2:NY-ESO-1. Когда желаемый иммунный ответ был получен, собирали спленоциты и соединяли с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и образования гибридомных клеточных линий. Гибридомные клеточные линии подвергали скринингу и отбирали для идентификации клеточных линий, которые продуцируют HLA-A2:NY-ESO-1-специфичные антитела. С использованием этой методики и иммуногена, описанного выше, было получено несколько химерных антител к NY-ESO-1 (т.е. антитела, обладающие вариабельными доменами человека и константными доменами мыши).

[00241] Антитела к HLA-A2:NY-ESO-1 также выделяли непосредственно из антиген-положительных B-клеток (от любой из иммунизированных мышей) без слияния с миеломными клетками, как описано в патенте США 7582298, специфически включенном в данный документ посредством ссылки в полном объеме. С использованием этой методики было получено несколько полных антител человека к HLA-A2:NY-ESO-1 (т.е. антитела, обладающие вариабельными доменами человека и константными доменами человека).

[00242] Иллюстративные антитела, полученные в соответствии с вышеупомянутыми способами, были обозначены следующим образом: mAb24955N; mAb24956N; mAb24958N; mAb24959N; mAb28042P; mAb28035P; mAb28037P2; mAb28075P; mAb28105P; mAb28113P; mAb28128P; mAb29814P; mAb24955N; и mAb29822P2.

[00243] Биологические свойства иллюстративных антител, полученных в соответствии со способами этого Примера, описаны подробно в Примерах, представленных ниже.

Пример 2: Аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей

[00244] В Таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепи, и CDR и тяжелых и легких цепей выбранных антител к HLA-A2:NY-ESO-1 по данному изобретению.

Соответствующие кодовые обозначения последовательностей нуклеиновой кислоты представлены в Таблице 2.

Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

	SEQ ID №:							
Обозначение антитела	**HCVR**	**HCDR1**	**HCDR2**	**HCDR3**	**LCVR**	**LCDR1**	**LCDR2**	**LCDR3**
mAb24955N	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb24956N	22	24	26	28	30	32	34	36
mAb24958N	42	44	46	48	50	52	54	56
mAb24959N	62	64	66	68	70	72	74	76
mAb28042P	82	84	86	88	90	92	94	96
mAb28035P	102	104	106	108	110	112	114	116
mAb28037P2	122	124	126	128	130	132	134	136
mAb28075P	142	144	146	148	150	152	154	156
mAb28105P	162	164	166	168	170	172	174	156
mAb28113P	180	144	182	184	186	188	154	190
mAb28128P	196	164	199	201	203	172	174	205
mAb29814P	211	213	215	217	219	221	174	224
mAb24955N2	230	232	234	236	238	240	242	244
mAb29822P2	250	252	254	256	258	260	262	264

Таблица 2: Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

	SEQ ID №:							
Обозначение антитела	**HCVR**	**HCDR1**	**HCDR2**	**HCDR3**	**LCVR**	**LCDR1**	**LCDR2**	**LCDR3**
mAb24955N	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb24956N	21	23	25	27	29	31	33	35
mAb24958N	41	43	45	47	49	51	53	55
mAb24959N	61	63	65	67	69	71	73	75
mAb28042P	81	83	85	87	89	91	93	95
mAb28035P	101	103	105	107	109	111	113	115
mAb28037P2	121	123	125	127	129	131	133	135
mAb28075P	141	143	145	147	149	151	153	155
mAb28105P	161	163	165	167	169	171	173	155
mAb28113P	179	143	181	183	185	187	153	189
mAb28128P	195	197	198	200	202	171	173	204
mAb29814P	210	212	214	216	218	220	222	223
mAb24955N2	229	231	233	235	237	239	241	243
mAb29822P2	249	251	253	255	257	259	261	263

[00245] Антитела, как правило, обозначают в данном документе в соответствии со следующей номенклатурой: приставка Fc (например, «mAb» и т.д.), затем численный идентификатор (например, «17670», «17930» и т.д., как показано в Таблице 1), затем суффикс «P», «N» или «N2». Следовательно, в соответствие с этой номенклатурой, антитело может называться в данном документе как, например, «mAb17670P», «mAb17930N», «mAb17368N2» и т.д. Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, можно превратить в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши можно превратить в антитело с IgG4 человека и т.д), но в любом случае вариабельные домены (в том числе CDR) - которые указаны численными идентификаторами, показанными в Таблице 1 - будут оставаться теми же, и ожидается, что свойства связывания с антигеном являются идентичными или по существу подобными вне зависимости от природы домена Fc.

[00246] В некоторых вариантах осуществления изобретения выбранные антитела с Fc IgG1 мыши превращали в антитела с Fc IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело содержит Fc IgG4 человека с 2 или более аминокислотными заменами, как раскрыто в патентной публикации США № 20100331527 (включена в данный документ в полном объеме). В одном варианте осуществления изобретения домен Fc IgG4 содержит мутацию серина на пролин в шарнирной области (S108P) для стимуляции стабилизации димера.

[00247] В Таблице 3 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи выбранных антител по данному изобретению.

Таблица 3: Идентификаторы последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи

	SEQ ID № (полипептид)		**SEQ ID № (ДНК)**		**Изотип Fc**
Обозначение антитела	**Тяжелая цепь**	**Легкая цепь**	**Тяжелая цепь**	**Легкая цепь**	
mAb24955N	18	20	17	19	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*
mAb24956N	38	40	37	39	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*
mAb24958N	58	60	57	59	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*
mAb24959N	78	80	77	79	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*

mAb28042P	98	100	97	99	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*
mAb28035P	118	120	117	119	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*
mAb28037P2	138	140	137	139	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*
mAb28075P	158	160	157	159	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*
mAb28105P	176	178	175	177	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*
mAb28113P	192	194	191	193	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*
mAb28128P	207	209	206	208	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*
mAb29814P	226	228	225	227	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*
mAb24955N2	246	248	245	247	IgG2a
mAb29822	266	268	265	267	IgG4 со сниженной эффекторной функцией*

* Как описано в, например, патенте США 9359437.

Пример 3: Аффинности связывания и кинетические константы моноклональных человеческих моноспецифических антител к HLA-A2:NY-ESO-1, полученные с помощью поверхностного плазмонного резонанса

[00248] Аффинности связывания и кинетические константы человеческих антител к HLA-A2:NY-ESO-1 определяли посредством поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени (SPR; Biacore 4000 производства GE Healthcare Life Sciences или MASS-1 производства Sierra Sensors) при 25°C и 37°C. Антитела к HLA-A2: NY-ESO-1, исследованные в этом примере, были двухвалентными моноспецифичными связывающими агентами к HLA-A2: NY-ESO-1 (экспрессируемые с константной областью (например, константная область hIgG4) со сниженной эффекторной функцией

(например, как описано в патенте США 9359437), с константной областью hIgG2a, с константной областью mIgG2a или с константной областью mIgG1). Эталонные антитела 1, 2 и 3 были получены из антител, описанных в Stewart-Jones et al., Proc Natl Acad Sci USA 106(14):5784-5788 (2009) и в международной патентной публикации № WO2010106431. Эталонное Ab 1 содержит домены VH и VL от антитела 3M4E5, описанного в тех публикациях с Fc IgG1 человека и легкой цепью лямбда человека; эталонное Ab 2 содержит домен VH 3M4E5 и домен VL Fab T1 из публикаций с Fc IgG1 человека и легкой цепью лямбда человека; эталонное Ab 3 содержит домен VH 3M4E5 и домен VL Fab T1 из публикаций с IgG4 человека со сниженной эффекторной функцией Fc (как описано в патенте США 9359437) и доменом VL лямбда человека. Антитела захватывали на поверхности сенсора CM5 Biacore (GE Healthcare Life Sciences), дериватизованного посредством аминного сочетания с моноклональным антителом к Fc человека (Jackson Immunoresearch) или на поверхности аминосенсора с высокой пропускной способностью (Sierra Sensors), дериватизованного посредством аминного сочетания с поликлональным антителом к Fc мыши (GE Life Sciences). Различные концентрации мономерного пептидного комплекса HLA-A2:NY-ESO-1(156-165) (SEQ ID №: 270 или 291; V в положении 165), 2906 (SEQ ID №: 272); инъецировали над поверхностью с захваченным антителом к HLA-A2:NY-ESO-1 при скорости потока 50 мкл/минута (MASS-1) или 30 мкл/минута (Biacore 4000). За ассоциацией антитела и реагента наблюдали в течение 4-5 минут, а за диссоциацией наблюдали в течение 10 минут. Все исследования связывания выполняли в буфере HBS-ET (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20).

[00249] Кинетические константы скорости ассоциации (ka) и диссоциации (kd) определяли путем аппроксимации сенсограмм в режиме реального времени моделью связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0c. Равновесные константы диссоциации связывания (KD) и периоды полупревращения при диссоциации ($t^{1}/_{2}$) рассчитывали из кинетических констант скорости как:

K_D (M)=(kd/ka), и $t^{1}/_{2}$ (мин)=(($ln_{(2)}$)/(60*kd))

[00250] Кинетические параметры связывания для моноспецифичных антител к HLA-A2:NY-ESO-1 с мономерным пептидным комплексом HLA-A2:NY-ESO-1 показаны ниже в Таблице 4.

Таблица 4: Аффинности связывания Biacore антител к HLA-A2:NY-ESO-1 при 25 °C.

	25 °C			
Антитело	**ka (1/мс)**	**kd (1/с)**	**KD (M)**	**t1/2 (мин.)**
mAbm24955N	5,69E+05	1,29E-03	2,27E-09	9,0
mAb24956N	9,43E+05	3,65E-04	3,87E-10	31,6
mAb24958N	6,37E+04	1,77E-04	2,77E-09	65,4
mAb24959N	4,21E+05	5,17E-04	1,23E-09	22,3

mAb28035P	4,45E+05	1,52E-04	3,42E-10	75,9
mAb28037P2	4,43E+05	3,07E-04	6,92E-10	37,7
mAb28042P	3,62E+05	1,99E-04	5,50E-10	58,0
mAb28075P	9,07E+05	3,52E-04	3,88E-10	32,8
mAb28105P	4,76E+05	1,84E-04	3,86E-10	62,8
mAb28113P	5,10E+05	3,26E-04	6,39E-10	35,5
mAb28128P	1,16E+06	1,85E-04	1,60E-10	62,5
Эталонное Ab 1	4,77E+05	2,19E-03	4,60E-9	5,3
Эталонное Ab 2	6,81E+05	6,69E-04	9,82E-10	17,3
Эталонное Ab 3	7,35E+05	7,05E-04	9,58E-10	16,4

Таблица 5: Аффинности связывания Biacore антител к HLA-A2:NY-ESO-1 при 37 °C.

	37 °C			
Антитела	**ka (1/мс)**	**kd (1/с)**	**KD (M)**	**t1/2 (мин.)**
mAb28035P	6,69E+05	2,53E-04	3,78E-10	45,7
mAb28037P2	6,64E+05	1,83E-03	2,76E-09	6,3
mAb28042P	5,61E+05	1,17E-03	2,09E-09	9,9
mAb28075P	1,26E+06	1,27E-03	1,00E-09	9,1
mAb28105P	9,23E+05	5,41E-04	5,86E-10	21,3
mAb28113P	7,51E+05	1,46E-03	1,94E-09	7,9
mAb28128P	1,50E+06	4,41E-04	2,93E-10	26,2
Эталонное Ab 1	8,81E+05	4,82E-03	5,47E-09	2,4
Эталонное Ab 2	1,36E+06	1,84E-03	1,41E-09	6,3
Эталонное Ab 3	1,16E+06	1,94E-03	1,72E-09	6,0

[00251] Данные демонстрируют, что большинство исследованных антител к HLA-A2: NY-ESO-1 селективно связываются с растворимым пептидным комплексом HLA-A2:NY-ESO-1, при этом некоторые демонстрируют аффинность в наномолярном или субнаномолярном диапазоне, и что многие имели более высокую аффинность к комплексу, чем эталонные антитела.

Пример 4: Связывание антител к HLA-A2:NY-ESO-1 с клетками T2, активированными пептидом NY-ESO-1_157-165, изученное с помощью FACS

[00252] Относительное связывание антител к NY-ESO-1:157-165 оценивали с помощью проточной цитометрии на клетках T2 (174 CEM.T2), активированных пептидом NY-ESO-1_157-165 (C165) (SEQ ID №: 269). Для активации клетки T2 (174 CEM.T2) ресуспендировали в среде AIM V при плотности 1×10^6 клеток/мл (кат. № Gibco. 31035-025). Клетки активировали путем добавления 10 мкг/мл hB2M (кат. № EMD Millipore 475828) и 100 мкг/мл указанного пептида. Клетки T2 затем инкубировали в течение ночи при 37°C, промывали в окрашивающем буфере и затем окрашивали.

[00253] Для окрашивания клеток клетки собирали из колб с использованием буфера для диссоциации клеток (Millipore, кат. № S-004-C) и подсчитывали. Клетки высевали в окрашивающем буфере (ФСБ, без кальция и магния (Corning, регистрационный № 21-031-CV) + 2% ФБС (Seradigm, № партии 238B15) при плотности

200000 клеток на лунку в 96-луночном планшете с V-образным дном и окрашивали при трехкратном последовательном разбавлении (1,7 пМ - 100 нМ) первичных антител в течение 30 минут при 4°C. После инкубации первичных антител клетки однократно промывали окрашивающим буфером и окрашивали вторичными антителами, конъюгированными с APC (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-136-170) при 5 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки промывали и фиксировали с использованием 50% раствора BD Cytofix (BD, кат. № 554655). Образцы анализировали на проточном цитометре Intellicyt iQue для расчета средней интенсивности флуоресценции (СИФ). Значения СИФ наносили на график с помощью Graphpad Prism с использованием четырех-параметрического логистического уравнения для 12-точечной кривой чувствительности для расчета величин EC_{50}. Вторичное антитело отдельно (т.е. без первичного антитела) для каждой кривой доза-ответ также включали в анализ как продолжение трех-кратного последовательного разбавления и представляли как наиболее низкую дозу. Эталонное Ab 2 и эталонное Ab 3, как описано выше, использовали в качестве контролей. Величины EC_{50} (M) представлены в Таблице 6.

Таблица 6: Связывание антител к HLA-A2: NY-ESO-1 с использованием FACS

Антитело	**T2, активированные NY-ESO-1_157-165, EC_{50} (M)**
mAb24955N	6,00E-10
mAb24956N	4,70E-10
mAb24958N	1,90E-08
mAb24959N	1,10E-09
mAb28035P	2,70E-09
mAb28037P2	7,80E-10
mAb28042P	1,60E-09
mAb28075P	3,80E-10
mAb28105P	1,80E-09
mAb28113P	6,00E-10
mAb28128P	3,20E-10
mAb29814P	1,10E-09
mAb29822P2	5,40E-09
Эталонное Ab 2	2,20E-10
Эталонное Ab 3	4,90E-10

Пример 5: Связывание антител к HLA-A2:NY-ESO-1 с клетками T2, активированными предсказанными нецелевыми пептидами, изученное с помощью FACS

[00254] Специфичность связывания антител к NY-ESO-1:157-165 оценивали с помощью проточной цитометрии на клетках T2 (174 CEM.T2), активированных пептидом NY-ESO-1(157-165) (C165; SEQ ID №: 269) или предсказанными нецелевыми пептидами (Таблица 7). Для активации клетки T2 (174 CEM.T2) ресуспендировали в среде AIM V при плотности 1×10^6 клеток/мл (кат. № Gibco. 31035-025). Клетки активировали путем добавления 10 мкг/мл hB2M (кат. № EMD Millipore 475828) и 100 мкг/мл указанного пептида. Клетки T2 затем инкубировали в течение ночи при 37 °C, промывали в окрашивающем буфере и окрашивали указанными антителами в концентрации 10 мкг/мл в соответствии с протоколом, описанным выше в Примере 4. Значения СИФ рассчитывали и представляли как отношение активированных клеток T2 к неактивированным клеткам. Результаты этих анализов представлены в Таблице 8. Эффективное вхождение пептида определяли путем сравнения повышения окрашивания поверхности HLA-A2 активированной клеточной линией с неактивированной клеточной линией с использованием антитела к HLA-A2. Для любого повышения, составляющего 1,4 или выше, считали, что произошло вхождение пептида. Вхождение не смогли подтвердить для одного пептида (ITCH (807-815)); однако два агента сравнения NY-ESO-1 mAb эталонное Ab 1 и эталонное Ab 2, как описано выше, связываются с клетками, активированными этим пептидом, указывая на то, что некоторое количества пептида вошло в клетки.

Таблица 7: Пептид NY-ESO-1_157-165 и предсказанные нецелевые пептиды.

Название пептида	**Аминокислотная последовательность пептида**
NY-ESO-1:157-165, дикого типа	SLLMWITQC (SEQ ID №: 269)
BCL9L: 1351-1359	SLLMWLTPL (SEQ ID №: 273)
GRID1: 7-15	WLLPWICQC (SEQ ID №: 274)
EARS2: 306-314	SLLDIITNC (SEQ ID №: 275)
ZDHHC1 (376-384)	LLAMWGPQA (SEQ ID №: 276)
ITCH (807-815)	KQIMWFWQF (SEQ ID №: 277)
MAGEH1:90-98	SLLMSILAL (SEQ ID №: 278)
FBXL22:4-12	LLTMHITQL (SEQ ID №: 279)
URB1:1853-1861	SLLTWILHI (SEQ ID №: 280)
NY-ESO-1:157-165, C165V	SLLMWITQV (SEQ ID №: 281)
NY-ESO-1:157-165, C165V, S157A	ALLMWITQV (SEQ ID №: 282)
NY-ESO-1:157-165, C165V, L158A	SALMWITQV (SEQ ID №: 283)
NY-ESO-1:157-165, C165V, L159A	SLAMWITQV (SEQ ID №: 284)
NY-ESO-1:157-165, C165V, M160A	SLLAWITQV (SEQ ID №: 285)
NY-ESO-1:157-165, C165V, W161A	SLLMAITQV (SEQ ID №: 286)
NY-ESO-1:157-165, C165V, I162A	SLLMWATQV (SEQ ID №: 287)
NY-ESO-1:157-165, C165V, T163A	SLLMWIAQV (SEQ ID №: 288)
NY-ESO-1:157-165, C165V, Q164A	SLLMWITAV (SEQ ID №: 289)
NY-ESO-1:157-165, C165A	SLLMWITQA (SEQ ID №: 290)

Таблица 8: Отношение связывания антител к HLA-A2:NY-ESO-1 с клетками T2, активированными предсказанными нецелевыми пептидами, к связыванию с неактивированными клетками

Антитело	Отношение NY-ESO-1:157-165 дикого типа к неактивированным	Отношение BCL9L: 1351-1359 к неактивированным	Отношение GRID1: 7-15 к неактивированным	Отношение EARS2: 306-314 к неактивированным	Отношение ZDHHC1 (376-384) к неактивированным	Отношение ITCH (807-815) к неактивированным	Отношение MAGEH1:90-98 к неактивированным	Отношение FBXL22:4-12 к неактивированным	Отношение URB1:1853-1861 к неактивированным
mAb24955N	110,1	0,4	1,1	0,6	0,4	1	0,5	0,5	0,6
mAb24956N	124,8	0,4	1	0,6	0,4	0,9	0,4	0,5	0,5
mAb24958N	98,6	0,4	0,7	0,6	0,4	1	0,5	0,5	0,6
mAb24959N	131	80,7	3,2	0,6	0,4	0,9	0,4	0,5	0,6
mAb28035P	131,4	170,1	1,4	0,6	0,9	1	0,4	0,5	0,5
mAb28037P2	136,6	52,3	0,7	0,6	0,5	1,3	0,4	0,5	0,6
mAb28042P	134,2	46,5	17,4	0,6	0,5	0,7	0,4	0,5	0,5
mAb28075P	58,8	1,5	1,4	0,5	0,4	1	0,5	0,5	0,5
mAb28105P	126,4	0,4	0,7	0,6	0,5	1	0,5	0,5	0,6
mAb28113P	114,7	1	0,9	0,5	0,4	0,9	0,4	0,5	0,6
mAb28128P	138,4	3	1,6	0,6	1,6	1	0,5	1,3	0,6
mAb29814P	124	150,1	1,6	0,6	0,6	0,9	0,4	0,5	7,9
mAb29822P2	36,7	0,8	0,7	0,5	0,3	0,8	0,4	0,4	0,4
Антитело к NY-ESO-1 3M4E5_VH.hIgG1 T1_Fab_VL.hLambda_opt	102,2	146,9	22,8	0,6	25,6	10,5	0,6	1,1	141,8
Антитело к NY-ESO-1 3M4E5_VH.hIgG4s	137,6	174,3	21	0,7	30,3	9,4	0,6	0,8	171,9

Антитело	Отношение NY-ESO-1:157-165 дикого типа к неактивированным	Отношение BCL9L: 1351-1359 к неактивированным	Отношение GRID1: 7-15 к неактивированным	Отношение EARS2: 306-314 к неактивированным	Отношение ZDHHC1 (376-384) к неактивированным	Отношение ITCH (807-815) к неактивированным	Отношение MAGEH1:90-98 к неактивированным	Отношение FBXL22:4-12 к неактивированным	Отношение URB1:1853-1861 к неактивированным
T1_Fab_VL.hLambda_opt									
Изотипический контроль IgG4s человека	0,7	1,4	0,7	0,6	1	1	0,5	0,6	2,4
Антитело к HLA-A2	2,1	2,8	1,4	2,6	1,8	0,5	2,3	2,2	2,9
Изотипический контроль IgG2a человека	0,6	1,1	1,7	1,9	1,1	0,8	1,7	1,5	2,1
Изотипический контроль IgG1 человека	0,8	1,1	0,8	0,6	0,8	0,9	0,5	0,6	1,5
Антитело к hFC	0,7	0,4	0,8	0,6	0,5	1	0,6	0,6	0,7
Антитело к mFC	1,9	0,8	1,0	0,9	1,0	1,1	0,7	0,9	0,9
Без окрашивания	0,9	0,9	1,1	1,1	1,1	1	1,1	1	0,8

[00255] Как видно из Таблицы 8, для ряда исследованных антител было

идентифицировано, что они не обладают значительным связыванием с клетками T2, активированными любым из предсказанных нецелевых пептидов, особенно в сравнении с двумя сравнительными антителами, которые обладали значительным связыванием с несколькими нецелевыми пептидами. Неспецифическое связывание может приводить к снижению терапевтической эффективности и/или усилению побочных эффектов (например, неспецифическая цитотоксичность, которая снижает активность уничтожения опухолевых клеток и/или вызывает побочные эффекты у субъектов). Таким образом, идентификация антиген-связывающих белков (например, антител), которые обладают минимальным нецелевым связыванием, может быть полезна для разработки терапевтических средств, которые нацелены на MAGE-A4, как описано в данном документе.

[00256] Сканирование аланином осуществляли для определения того, какие остатки в пептиде NY-ESO-1(157-165) были важны для связывания с клетками. Клетки T2 были активированы пептидами после сканирования аланином (Таблица 7) и окрашены антителами к NY-ESO-1 (157-165), как описано выше. Кратность изменения по сравнению с неактивированными клетками показана в Таблице 9. Все пептиды эффективно вошли, как определено поверхностным окрашиванием HLA.A2 (описано выше), за исключением NY-ESO-1:157-165, C165V, S157A и NY-ESO-1:157-165, C165V, I162A. Следующие остатки были важны для связывания исследованных mAb к NY-ESO-1 (определено как снижение связывания на 90% или более): лейцин 158, триптофан 161, треонин 163 и глутамин 164. Треонин 163 и глутамин 164 были необязательны для связывания сравнительного моноклонального антитела эталонного Ab 3, как описано выше. Метионин 160 был особенно важен для связывания mAb24956N, mAb24958N и mAb28105P.

Таблица 9: Отношение связывания антител к HLA-A2:NY-ESO-1 с клетками T2, активированными пептидами после сканирования аланином, к связыванию с неактивированными клетками

mAb	**NY-ESO-1 (SLLMWITQV (SEQ ID №: 281))**	**S157A (ALLMWITQV (SEQ ID №: 282))**	**L158A (SALMWITQV (SEQ ID №: 283))**	**L159A (SLAMWITQV (SEQ ID №: 284))**	**M160A (SLLAWITQV (SEQ ID №: 285))**	**W161A (SLLMAITQV (SEQ ID №: 286))**	**I162A (SLLMWATQV (SEQ ID №: 287))**	**T163A (SLLMWIAQV (SEQ ID №: 288))**	**Q164A (SLLMWITAV (SEQ ID №: 289))**	**C165A (SLLMWITQA (SEQ ID №: 290))**
mAb24955N	29,8	0,5	0,6	23,0	16,3	0,4	1,1	0,9	1,0	66,1
mAb24956N	32,6	0,4	0,4	27,8	0,7	0,4	0,7	1,7	0,8	53,5
mAb24958N	46,8	1,2	8,6	29,8	2,0	0,4	0,3	0,4	2,0	45,2

mAb28075P	29,3	1,6	5,1	25,0	27,1	0,4	2,3	7,5	2,1	25,4
mAb28105P	35,4	2,5	7,7	40,1	8,5	0,4	5,2	14,2	3,2	62,1
mAb28113P	44,6	2,5	7,6	34,5	27,9	0,4	5,0	16,0	9,1	45,1
mAb29822P2	5,3	0,3	0,3	10,3	10,3	0,4	0,3	0,4	0,4	14,2
Эталонное Ab 3	67,2	3,6	11,3	51,8	68,0	0,4	7,4	47,0	67,1	68,1
Антитело к HLA-A2	3,4	1,2	2,7	4,1	3,9	3,5	1,3	3,1	3,4	3,5
Изотипический контроль IgG4 человека со сниженной эффекторной функцией	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Антитело к FC мыши	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4
Антитело к FC человека	0,8	1,2	0,7	0,7	0,6	0,7	0,6	0,7	0,8	0,8
Выживаемость	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8	0,9	0,9

Пример 6: Преобразование антител к HLA-A2:NY-ESO-1 в ScFv для применения в химерных антигенных рецепторах

[00257] Четыре антитела к NY-ESO-1(157-165) (mAb24955N, mAb24956N, mAb24958N и mAb24959N) преобразовывали в химерный антигенный рецептор (CAR) с одноцепочечным вариабельным фрагментом VL-VH или VH-VL с использованием шарнирной области и трансмембранного домена CD8α, костимулирующего домена 4-1BB

и стимулирующего домена CD3ζ. CAR к NY-ESO-1:157-165 клонировали в лентивирусный экспрессионный вектор (бицистронная экспрессионная система Lenti-X™ (Neo), кат. № Clontech 632181), а лентивирусные частицы получали посредством упаковочной одноразовой системы (VSV-G) Lenti-X (кат. № Clontech 631276) в соответствии с протоколами производителя. Клетки Jurkat/NFATLuc cl. 3C7 (клетки для экспрессии репортера NFAT-люциферазы) затем трансдуцировали 8 различными CAR с использованием чашек, предварительно покрытых ретронецином (Clontech, кат. № T110a), в соответствии с протоколами производителя. После селекции в течение по меньшей мере 2 недель в концентрации 500 мкг/мл G418 (Gibco, кат. № 11811-098), были получены следующие CAR-T-клеточные линии: Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VH-VL; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VL-VH; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24956N VH-VL; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24956N VL-VH; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24958N VH-VL; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24958N VL-VH; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24959N VH-VL; и Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24959N VL-VH. Активность CAR-T-клеточных линий затем оценивали в биоанализе CAR-T/APC (антиген-презентирующая клетка). Для выполнения биоанализа 50000 CAR-T-клеток добавляли в 96-луночные белые планшеты Thermo-Nunc (Thermo Scientific, кат. № 136101) в 50 мл среды для анализа (среда RPMI с 10% ФБС и 1% P/S/G) с последующим добавлением APC в 3-кратном последовательном разбавлении (от 200000 до 274 клеток) в 50 мл среды для анализа. Использовали следующие APC: 3T3/HLA.A2/hB2M/NY-ESO-1: 157-165 дикого типа (клетки NIH3T3, сконструированные, чтобы экспессировать HLA.A2 человека (номер доступа P01892), B2M человека (номер доступа NP_004039.1) и убиквитин-пептидная кассета, содержащая пептид NY-ESO-1: 157-165, 3T3/HLA.A2/hB2M/HPV16E7 11-19 (как описано выше с убиквитин-пептидной кассетой (Lévy F, et al. (1996) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93(10):4907-4912; Valmori D, et l. (1999) J Exp Med. 189(6):895-906), содержащей пептид HPV16E7:11-19, IM9 (HLA.A2-положительные, NY-ESO-1: 157-165 положительные) и HEK293 (HLA.A2 положительные и NY-ESO-1: 157-165 отрицательные). Смесь клеток инкубировали в термостате при 37°C, 5% CO_2 и увлажнении в течение 5 часов. Активность NFAT-люциферазы измеряли с помощью Promega One-Glo (кат. № E6130) и планшет-ридера Perkin Elmer Envision. Получали относительные единицы люциферазы (RLU) и наносили на график с помощью Graphpad Prism с использованием четырех-параметрического логистического уравнения для 8-точечной кривой чувствительности для расчета величин EC_{50}. Нулевое состояние APC для каждой кривой доза-ответ также включали в анализ как продолжение трехкратного последовательного разбавления и представляли как наиболее низкую дозу. Максимальную кратность активации определяли с учетом соотношения наивысшего значения RLU на кривой к наиболее низкому. Все восемь клеточных линий CAR NY-ESO-1 активировали в присутствии клеток 3T3/HLA.A2/hB2M/NY-ESO-1: 157-165 дикого типа. Как продемонстрировано в Таблице 10, три клеточные линии NY-ESO-1 CAR активировали в присутствии клеток IM9

(Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VH-VL; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VL-VH; и Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24956N VL-VH).

Таблица 10: Активация NY-ESO-1: 157-165 CAR-T в биоанализе CAR-T/APC.

	3T3/HLA.A2/hB2M/NY-ESO-1 157-165 дикого типа		3T3/HLA.A2/hB2M/HPV16E7 11-19		IM9		HEK293	
	EC50 (количество клеток APC)	**Максимальное изменение (RLU)**	**EC50 (количество клеток APC)**	**Максимальное изменение (RLU)**	**EC50 (количество клеток APC)**	**Максимальное изменение (RLU)**	**EC50 (количество клеток APC)**	**Максимальное изменение (RLU)**
Jurkat/NFATLuc cl 3C7	н. д.	1	н. д.	1	н. д.	1	н. д.	1
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VH-VL	20306	39	н. д.	1	84852	3	н. д.	1
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VH-VL	88656	30,5	н. д.	1	253190	4,1	н. д.	0,8
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24956N VH-VL	47635	30,1	н. д.	1	н. д.	1,2	н. д.	0,8
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24956N VH-VL	25855	38,1	н. д.	0,9	111502	4,4	н. д.	0,7
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24958N VH-VL	24506	6,7	н. д.	1,1	н. д.	1	н. д.	0,7
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24958N VH-VL	19871	6,4	н. д.	1	н. д.	0,9	н. д.	0,7
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24959N VH-VL	14233	13,3	н. д.	1,1	н. д.	1,1	н. д.	0,7
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24959N VH-VL	24009	28,6	н. д.	0,9	н. д.	0,8	н. д.	0,6

Пример 7: Структурный анализ связывания Fab с пептидом HLA2:NY-ESO-1_157-165

[00258] Для лучшего понимания специфических взаимодействий между антителом и комплексом HLA-пептид, для фрагмента Fab антитела mAb28105P, связанного с HLA-A2/hB2M, отображающего пептид, содержащий остатки 157-165 из раково-тестикулярного антигена 1 (CTAG1B; NY-ESO-1), получали рентгеновскую кристаллическую структуру. Этот пептид был модифицирован путем замены остатка 165 с его природного цистеина на валин. Все 9 остатков пептида NY-ESO-1, отображаемого с помощью HLA, (C165V) были четко видны на карте электронной плотности этой структуры, и остатки HLA и Fab, которые окружают пептид, были также хорошо разрешены. Эту структуру уточняли с разрешением 3,3 Å, но более новые методики кристаллографического уточнения (деформируемая эластичная цепь или уточнение «желеобразного тела») помогли предотвратить переподгонку, обеспечивая точность результирующей модели.

[00259] Fab mAb28105P был связан с верхней частью комплекса HLA-пептид способом, подобным тому, как связан TCR. Этот Fab был центрирован на связанном пептиде, при этом HCDR3 контактировал с C-концевой половиной связанного пептида, а CDR легкой цепи контактировал с N-концевой половиной пептида. Остатки пептида M160 и W161 были в центре поверхности связывания Fab, осуществляя контакты с остатками CDR тяжелой и легкой цепи, как описано ниже. Другие опубликованные структуры комплекса антитела с пептидом в углублении (например, коды PDB 1W72 и 4WUU) показывают, что антитело не должно покрывать полностью пептид, отображаемый с помощью HLA; однако антитела лишь с частичным охватом пептида обладают плохой специфичностью, претерпевая значительные изменения в той части пептида, в которой нет контакта, с небольшим уменьшением аффинности связывания.

[00260] Структура показала, что тяжелая цепь Fab mAb28105P была в контакте с остатками 160, 161 и 164 в пептиде NY-ESO-1, связанном с HLA, тогда как легкая цепь Fab была в контакте с остатками 160 и 161. Все остатки пептида 157, 158, 159, 162 и 165 направлены к молекуле HLA. Остаток 163 был полностью скрыт от растворителя легкой цепью Fab, но не осуществлял никакого прямого взаимодействия с остатками антитела. Связанный пептид нумеровали в соответствии с положениями остатков в SEQ ID №: 271), как показано в SEQ ID №: 291:

Аминокислота	S	L	L	M	W	I	T	Q	V
Положение	157	158	159	160	161	162	163	164	165

(SEQ ID №: 291)

[00261] Все контакты Fab происходили с боковыми цепями пептида, связанного с HLA, а не с основной цепью.

[00262] Контакты пептидов, осуществляемые Fab mAb28105P, были сконцентрированы в HCDR3 с небольшими вкладами от LCDR1 и LCDR2. В частности, остатки тяжелой цепи 100, 101, 104, 105 и 111 (SEQ ID №: 162) и остатки легкой цепи 32 и

49 (SEQ ID №: 170) Fab взаимодействовали со связанным пептидом, тогда как остатки тяжелой цепи 100, 101, 107 и 109 (SEQ ID №: 162) и остаток легкой цепи 92 (SEQ ID №: 170) Fab взаимодействовали с HLA. При использовании в данном документе, термин «взаимодействует с» может включать прямые или опосредованные водой водородные связи, взаимодействия заряд-заряд или гидрофобные/ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

[00263] Все четыре из антител к NY-ESO-1_157-165 (mAb24955N, mAb24956N, mAb24958N и mAb24959N) были очень подобны по последовательности легкой цепи, но последовательности тяжелой цепи расходились в HCDR2 и HCDR3. Семь пептид-связывающих остатков были в целом консервативными: три остатка были идентичны во всех четырех антителах, а еще три были идентичны в трех из четырех последовательностей, свидетельствуя об общем способе связывания между антителами.

Пример 8: Анализ сигнальных доменов химерного антигенного рецептора

[00264] Химерные антигенные рецепторы, содержащие scFv к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ в ориентации V_H-V_L плюс или 1) шарнирный/трансмембранный домен CD8 (huCD8) человека, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-зета (BB/z CAR) (последовательность CAR полной длины: SEQ ID №: 301), или 2) шарнирный/трансмембранный/костимулирующий домены huCD28 и сигнальный домен CD3z (28/z CAR) (последовательность CAR полной длины: SEQ ID №: 302) конструировали с использованием последовательностей V_L и V_H антитела к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$, mAb28105P (V_L: SEQ ID №: 294; V_H: SEQ ID №: 293). В качестве несвязывающего контроля был разработан BB/z CAR с использованием несоответствующего scFv плюс шарнирный/трансмембранный домен huCD8, костимулирующий домен 4-1BB и сигнальный домен CD3z. Эти CAR клонировали в лентивирусный вектор pLVX с промотором EF1a и последовательностью P2A:eGFP (SEQ ID №: 300) для отслеживания клеток, трансдуцированных CAR, и был получен VSV-псевдотипированный лентивирус. См. на Фиг. 1A схему конструкции и в Таблице 11 краткий обзор конструкций.

[00265] CD3+ Т-клетки были выделены из мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) от здорового донора, которого стимулировали микрогранулами CD3/CD28 плюс 100 Ед./мл рекомбинатного ИЛ-2 человека, и трансдуцированы лентивирусом при MOI=5. Трансдуцированные клетки размножали в течение 19 дней с микрогранулами CD3/CD28 плюс 100 ед./мл рекомбинантного ИЛ-2 человека до замораживания перед использованием в in vivo эксперименте.

[00266] Для определения эффективности in vivo в Т-клетках с химерным антигенным рецептором (CAR) к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ осуществляли исследование ксеногенной опухоли. В день 0 иммунодефицитным мышам NOD.Cg-$Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}$/SzJ (NSG) подкожно вводили 5×10^6 HLA-$A2^+$NY-$ESO\text{-}1^+$ опухолевых клеток меланомы A375 человека. В день 3 после формирования опухолей мышам (n=5 на группу) внутривенно вводили 20×10^6 Т-клеток, которые экспрессируют или несвязывающий контроль BB/z CAR (контрольные CAR T), BB/z CAR к HLA-A2/NY-

ESO-$1_{157-165}$, или 28/z CAR к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ (как определено по частоте появления клеток, экспрессирующих GFP, который является маркером для тех клеток, которые были трансдуцированы CAR) от двух различных доноров. Рост опухолей оценивали к 21 дню путем измерения объемов опухолей.

[00267] Для того, чтобы определить объем опухоли с помощью внешнего штангенциркуля, определяли наибольший продольный диаметр (длина в мм) и наибольший поперечный диаметр (ширина в мм). Объемы опухолей на основании измерений штангенциркулем рассчитывали по формуле: Объем ($мм^3$)=(длина x $ширина^2$)/2.

Таблица 11: Конструкции CAR

Исходное mAb	Специфичность	Описание
Несоответствующее	Несвязывающий контроль	scFv к HLA-A2/HPV16E7$_{11-19}$ в ориентации VL-VH с шарнирным трансмембранным доменом huCD8, костимулирующим доменом 4-1BB и сигнальным доменом CD3z (контрольный CAR)
mAb28105P	HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$	scFv к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$, mAb28105P в ориентации VH-VL с шарнирным/трансмембранным доменом huCD8, костимулирующим доменом 4-1BB и сигнальным доменом CD3z (NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR)
mAb28105P	HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$	scFv к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$, mAb28105P в ориентации VH-VL с шарнирным/трансмембранным/костимулирующим доменами huCD28 и сигнальным доменом CD3z (NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR)

[00268] В совокупности эти результаты демонстрируют, что Т-клетки с 28/z CAR к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ демонстрируют превосходную in vivo противоопухолевую активность и противоопухолевую кинетику по сравнению с Т-клетками с BB/z CAR к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$, но что оба типа CAR демонстрируют противоопухолевую активность по сравнению с несвязывающим контролем. Опухоли A375 все больше росли у мышей, получавших Т-клетки с контрольным CAR. Мыши, получавшие Т-клетки с BB/z CAR к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$, демонстрировали некоторый контроль опухоли со снижением роста опухоли по сравнению с мышами, на которых воздействовали Т-клетками с контрольным CAR в дни 21 ($p<0,04$), 28 ($p<0,0001$) и 38 ($p<0,0001$) (статистический анализ с помощью 2-факторного ANOVA). Лечение Т-клетками с 28/z CAR к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ также приводила к подавлению роста сформировавшихся опухолей A375 в дни 16 ($p=0,03$), 19 ($p=0,0002$), 21 ($p<0,0001$), 28 ($p<0,0001$) и 38 ($p<0,0001$) (статистический анализ с помощью 2-факторного ANOVA). Увеличение эффективности 28/z CAR к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ в сравнении с BB/z CAR к HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ подтверждено, поскольку размеры опухолей в дни 21 ($p=0,002$), 28 ($p<0,0001$) и 38 ($p<0,0001$) являются статистически значимыми, ($p<0,0001$ в оба дня) с использованием 2-факторного ANOVA. См. Фиг. 1B и Фиг. 1C, и Таблицы 12-22.

Таблица 12: Эффективность CAR, 3 день

Лечение CAR T	**Средний размер опухоли ($мм^3$) в 3 день**	**Стандартная ошибка среднего (SEM) размера опухоли**	**Количество оставшихся в живых мышей (из 5) в 3 день**
Контрольные CAR T	57,2	7,1	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR T	69,1	11,4	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR T	79,4	4,0	5

Таблица 13: Эффективность CAR, 5 день

Лечение CAR T	**Средний размер опухоли ($мм^3$) в 5 день**	**Стандартная ошибка среднего (SEM) размера опухоли**	**Количество оставшихся в живых мышей (из 5) в 5 день**
Контрольные CAR T	78,8	7,0	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR T	65,9	10,9	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR T	80,7	8,0	5

Таблица 14: Эффективность CAR, 7 день

Лечение CAR T	**Средний размер опухоли ($мм^3$) в 7 день**	**Стандартная ошибка среднего (SEM) размера опухоли**	**Количество оставшихся в живых мышей (из 5) в 7 день**
Контрольные CAR T	118,4	12,2	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR T	69,8	8,4	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR T	77,6	7,1	5

Таблица 15: Эффективность CAR, 10 день

Лечение CAR T	**Средний размер опухоли ($мм^3$) в 10 день**	**Стандартная ошибка среднего (SEM) размера опухоли**	**Количество оставшихся в живых мышей (из 5) в 10 день**
Контрольные CAR T	134,0	12,1	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR T	81,8	10,4	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR T	43,7	2,5	5

Таблица 16: Эффективность CAR, 12 день

Лечение CAR T	**Средний размер опухоли ($мм^3$) в 12 день**	**Стандартная ошибка среднего (SEM) размера опухоли**	**Количество оставшихся в живых мышей (из 5) в 12 день**
Контрольные CAR T	224,6	23,7	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR T	92,1	12,0	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR T	43,8	8,1	5

Таблица 17: Эффективность CAR, 14 день

Лечение CAR T	**Средний размер опухоли ($мм^3$) в 14 день**	**Стандартная ошибка среднего (SEM) размера опухоли**	**Количество оставшихся в живых мышей (из 5) в 14 день**
Контрольные CAR T	281,8	31,8	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR T	98,3	16,4	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR T	56,6	5,6	5

Таблица 18: Эффективность CAR, 16 день

Лечение CAR T	**Средний размер опухоли ($мм^3$) в 16 день**	**Стандартная ошибка среднего (SEM) размера опухоли**	**Количество оставшихся в живых мышей (из 5) в 16 день**
Контрольные CAR T	409,8	44,5	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR T	157,9	16,7	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR T	70,5	6,0	5

Таблица 19: Эффективность CAR, 19 день

Лечение CAR T	**Средний размер опухоли ($мм^3$) в 19 день**	**Стандартная ошибка среднего (SEM) размера опухоли**	**Количество оставшихся в живых мышей (из 5) в 19 день**
Контрольные CAR T	657,3	81,3	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR T	359,8	41,9	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR T	106,6	14,5	5

Таблица 20: Эффективность CAR, 21 день

Лечение CAR T	**Средний размер опухоли ($мм^3$) в 21 день**	**Стандартная ошибка среднего (SEM) размера опухоли**	**Количество оставшихся в живых мышей (из 5) в 21 день**
Контрольные CAR T	943,1	110,5	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR T	607,6	57,8	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR T	142,7	12,6	5

Таблица 21: Эффективность CAR, 28 день

Лечение CAR T	**Средний размер опухоли ($мм^3$) в 28 день**	**Стандартная ошибка среднего (SEM) размера опухоли**	**Количество оставшихся в живых мышей (из 5) в 28 день**
Контрольные CAR T	2168,4	162,9	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR T	1351,5	154,6	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR T	523,8	57,7	5

Таблица 22: Эффективность CAR, 38 день

Лечение CAR T	**Средний размер опухоли ($мм^3$) в 38 день**	**Стандартная ошибка среднего (SEM) размера опухоли**	**Количество оставшихся в живых мышей (из 5) в 38 день**
Контрольные CAR T	3904,3	157,4	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ BB/z CAR T	2754,3	443,7	5
NY-ESO-$1_{157-165}$ 28/z CAR T	1696,4	144,0	5

[00269] Настоящее изобретение не ограничено рамками конкретных вариантов осуществления изобретения, представленных в данном документе. Действительно, для специалистов в данной области техники из предыдущего описания и сопутствующих графических материалов будут очевидны различные модификации изобретения, в дополнение к описанным в данном документе. Предполагается, что такие модификации попадают в рамки прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антиген-связывающий белок, который специфически связывается с комплексом HLA-A2:пептид нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (пептид NY-ESO-1) за счет по меньшей мере одной аминокислоты, соответствующей аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из M160, W161 и Q164 SEQ ID №: 271.

2. Антиген-связывающий белок по п. 1, отличающийся тем, что выделенный антиген-связывающий белок специфически связывается с конформационным эпитопом полипептида NY-ESO-1, презентируемого с помощью HLA-A2.

3. Антиген-связывающий белок по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна аминокислота представляет собой по меньшей мере две аминокислоты.

4. Антиген-связывающий белок по п. 3, отличающийся тем, что указанная по меньшей мере одна аминокислота представляет собой по меньшей мере три аминокислоты.

5. Антиген-связывающий белок, который специфически связывается с пептидным комплексом HLA-A2:NY-ESO-1 157-165, при этом указанный выделенный антиген-связывающий белок взаимодействует с аминокислотами M160, W161 и Q164 указанного пептида NY-ESO-1 157-165, как определено с помощью рентгеновской кристаллографии при разрешении 4,0 Å или более.

6. Антиген-связывающий белок по п. 5, отличающийся тем, что указанное разрешение составляет 3,5 Å или более.

7. Антиген-связывающий белок по п. 6, отличающийся тем, что указанное разрешение составляет 3,3 Å или более.

8. Антиген-связывающий белок, который специфически связывается с пептидным комплексом HLA-A2:NY-ESO-1 157-165, но не связывается специфически с одним или более нецелевыми пептидами, выбранными из группы, состоящей из BCL9L 1351-1359 (SEQ ID №: 273), GRID1 7-15 (SEQ ID №: 274), ZDHHC1 376-384 (SEQ ID №: 276), ITCH 807-815 (SEQ ID №: 277) и URB1 1853-1861 (SEQ ID №: 280), при этом отношение i) связывания указанного антиген-связывающего белка с клетками, активированными указанным одним или более нецелевыми пептидами, к ii) неактивированным клеткам составляет менее около девяти.

9. Антиген-связывающий белок по п. 8, отличающийся тем, что указанное отношение составляет менее около 8.

10. Антиген-связывающий белок по п. 9, отличающийся тем, что указанное отношение составляет менее около 7.

11. Антиген-связывающий белок по п. 10, отличающийся тем, что указанное отношение составляет менее около 6.

12. Антиген-связывающий белок по п. 11, отличающийся тем, что указанное отношение составляет менее около 5.

13. Антиген-связывающий белок по п. 12, отличающийся тем, что указанное отношение составляет менее около 4.

14. Антиген-связывающий белок по п. 13, отличающийся тем, что указанное отношение составляет менее около 3.

15. Антиген-связывающий белок по п. 14, отличающийся тем, что указанное отношение составляет менее около 2.

16. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что указанный антиген-связывающий белок связывается с мономерным пептидным комплексом HLA-A2:NY-ESO-1 157-165 с равновесной константой связывания-диссоциации (K_D), составляющей менее около 1 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

17. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что указанный пептид NY-ESO-1 содержит аминокислотную последовательность SLLMWITQC (SEQ ID №: 269) или SLLMWITQV (SEQ ID №: 291).

18. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что антиген-связывающий белок представляет собой антитело полной длины, Fab, Fab', (Fab')2, Fv, одноцепочечный Fv (scFv), конструкцию Т-тела или химерный антигенный рецептор (CAR).

19. Антиген-связывающий белок по п. 19, отличающийся тем, что антиген-связывающий белок представляет собой CAR.

20. CAR по п. 19, отличающийся тем, что CAR содержит вариабельную область тяжелой цепи (LCVR), вариабельную область легкой цепи (LCVR), шарнирную область, трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен.

21. CAR по п. 20, отличающийся тем, что костимулирующий домен представляет собой костимулирующий домен 4-1BB.

22. CAR по п. 20, отличающийся тем, что костимулирующий домен представляет собой костимулирующий домен CD28.

23. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что антиген-связывающий белок представляет собой моноклональное антитело человека или его антиген-связывающий фрагмент.

24. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-23, содержащий три гипервариабельные области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR), перечисленных в Таблице 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельных областей легкой цепи (LCVR), перечисленных в Таблице 1.

25. Антиген-связывающий белок по п. 24, отличающийся тем, что указанные последовательности HCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID №: 2, 22, 42, 142 и 250.

26. Антиген-связывающий белок по п. 24, отличающийся тем, что указанные последовательности LCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID №: 10, 30, 50, 150 и 260.

27. Антиген-связывающий белок по п. 24, отличающийся тем, что указанные последовательности HCVR/LCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID №: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/203, 211/219, 230/238 и 250/258.

28. Антиген-связывающий белок по п. 24, отличающийся тем, что указанные последовательности HCVR/LCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID №: 2/10, 22/30, 42/50, 142/150 и 250/258.

29. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-25, содержащий HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1.

30. Антиген-связывающий белок по п. 29, отличающийся тем, что указанные последовательности HCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID №: 2, 22, 42, 142 и 250.

31. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-30, содержащий LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

32. Антиген-связывающий белок по п. 31, отличающийся тем, что указанные последовательности LCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID №: 10, 30, 50, 150 и 260.

33. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-32, содержащий: (a) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; и (b) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

34. Антиген-связывающий белок по п. 33, отличающийся тем, что указанные последовательности HCVR/LCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID №: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/203, 211/219, 230/238 и 250/258.

35. Антиген-связывающий белок по п. 34, отличающийся тем, что указанные последовательности HCVR/LCVR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID №: 2/10, 22/30, 42/50, 142/150 и 250/258.

36. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-35, содержащий:

(a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 4, 24, 44, 64, 84, 104, 124, 144, 164, 213, 232 и 252;

(b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 6, 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 182, 199, 215, 234 и 254;

(c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168, 184, 201, 217, 236 и 256;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 12, 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 188, 221, 240 и 260;

(e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 14, 34, 54, 74, 94, 114, 134, 154, 174, 242 и 262; и

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 16, 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 190, 205, 224, 244 и 264.

37. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-28 и 36, отличающийся тем, что указанный антиген-связывающий белок содержит HCVR, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична последовательности HCVR, указанной в Таблице 1.

38. Антиген-связывающий белок по п. 37, отличающийся тем, что указанный антиген-связывающий белок содержит HCVR, последовательность которой по меньшей мере на 90% идентична последовательности HCVR, указанной в Таблице 1.

39. Антиген-связывающий белок по п. 38, отличающийся тем, что указанный выделенный антиген-связывающий белок содержит HCVR, последовательность которой по меньшей мере на 95% идентична последовательности HCVR, указанной в Таблице 1.

40. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-28 и 36-39, отличающийся тем, что указанный антиген-связывающий белок содержит LCVR, последовательность которой по меньшей мере на 80% идентична последовательности LCVR, указанной в Таблице 1.

41. Антиген-связывающий белок по п. 40, отличающийся тем, что указанный выделенный антиген-связывающий белок содержит LCVR, последовательность которой по меньшей мере на 90% идентична последовательности LCVR, указанной в Таблице 1.

42. Антиген-связывающий белок по п. 38, отличающийся тем, что указанный антиген-связывающий белок содержит LCVR, последовательность которой по меньшей мере на 95% идентична последовательности LCVR, указанной в Таблице 1.

43. Антиген-связывающий белок, который конкурирует за связывание с антиген-связывающим белком по любому из пп. 1-42.

44. Антиген-связывающий белок, который связывается с тем же эпитопом, что и антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-42.

45. Антиген-связывающий белок по любому из пп. 1-44, содержащий детектируемый фрагмент.

46. Фармацевтическая композиция, содержащая антиген-связывающий белок, который связывается с HLA-A2:NY-ESO-1 в соответствии с любым из пп. 1-45, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

47. Выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антиген-связывающего белка, как представлено в любом из пп. 1-45.

48. Выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антиген-связывающего белка, как представлено в любом из пп. 1-45.

49. Вектор, содержащий молекулу полинуклеотида по п. 47 или 48.

50. Клетка, экспрессирующая молекулу полинуклеотида по п. 47 или 48 или вектор по п. 49.

51. Способ лечения субъекта, страдающего от заболевания или расстройства, связанного с NY-ESO-1, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антиген-связывающего белка, как представлено в любом из пп. 1-45, или фармацевтической композиции по. 46, или клетки по п. 50, осуществляя таким образом лечение субъекта.

52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что NY-ESO-1-связанное заболевание или расстройство представляет собой NY-ESO-1-связанный рак.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что NY-ESO-связанный рак выбран из группы, состоящей из липосаркомы, нейробластомы, миеломы, метастатической меланомы, синовиальной саркомы, рака мочевого пузыря, рака пищевода, печеночно-клеточного рака, рака головы и шеи, немелкоклеточного рака легкого, рака яичников, рака предстательной железы, рака молочной железы, астроцитарной опухоли, мультиформной глиобластомы, анапластической астроцитомы, опухоли мозга, рака фаллопиевых труб, эпителиального рака яичника, первичного рака полости брюшины, солидных опухолей в прогрессирующей стадии, саркомы мягких тканей, меланомы, саркомы, миелодиспластического синдрома, острого миелоидного лейкоза, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, болезни Ходжкина, множественной миеломы, синовиальной саркомы, метастатических солидных опухолей, рака пищевода, рабдомиосаркомы, миксоидной опухоли в прогрессирующей стадии, круглоклеточной липосаркомы, метастатической меланомы или рецидивирующего немелкоклеточного рака легкого.

54. Способ по любому из пп. 51-53, отличающийся тем, что антиген-связывающий белок вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из ингибитора PD-1, ингибитора CTLA-4, антитела к опухолеспецифическому антигену, антитела к антигену клеток, инфицированных вирусом, ингибитора PD-L1, ингибитора CD20, биспецифического антитела против CD20 и CD3, диетической добавки, такой как антиоксидант, антагониста ФРЭС, химиотерапевтического агента, цитотоксического агента, хирургического вмешательства, излучения, НПВС, кортикостероида и любой другой терапии, пригодной для ослабления по меньшей мере одного симптома, связанного с заболеванием или расстройством.

56. Способ по любому из пп. 51-55, отличающийся тем, что антиген-связывающий белок вводят подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутрибрюшинно, перорально, внутримышечно или интракраниально.

57. Способ по любому из пп. 51-56, отличающийся тем, что антиген-связывающий белок вводят в дозе от около 0,1 мг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела субъекта.

58. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), при этом CAR содержит внеклеточный связывающий домен, который специфически связывается с конформационным эпитопом пептида нью-йоркской плоскоклеточной карциномы пищевода 1 (пептида NY-ESO-1), презентируемого с помощью HLA-A2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

59. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 58, отличающаяся тем, что внеклеточный связывающий домен представляет собой антиген-связывающий белок к HLA-A2:NY-ESO-1.

60. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 59, отличающаяся тем, что антиген-связывающий белок содержит три гипервариабельные области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR), перечисленных в Таблице 1; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей вариабельных областей легкой цепи (LCVR), перечисленных в Таблице 1.

61. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-60, отличающаяся тем, что антиген-связывающий белок содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1.

62. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-61, отличающаяся тем, что антиген-связывающий белок содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

63. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-62, отличающаяся тем, что антиген-связывающий белок содержит (a) HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей HCVR, перечисленных в Таблице 1; и (b) LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LCVR, перечисленных в Таблице 1.

64. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-63, отличающаяся тем, что антиген-связывающий белок содержит

(a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 4, 24, 44, 64, 84, 104, 124, 144, 164, 213, 232 и 252;

(b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 6, 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 182, 199, 215, 234 и 254;

(c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168, 184, 201, 217, 236 и 256;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 12, 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 188, 221, 240 и 260;

(e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 14, 34, 54, 74, 94, 114, 134, 154, 174, 242 и 262; и

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 16, 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 190, 205, 224, 244 и 264.

65. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-64, отличающаяся тем, что антиген-связывающий белок содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/203, 211/219, 230/238 и 250/258.

66. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-65, отличающаяся тем, что антиген-связывающий белок содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 2/10, 22/30, 42/50, 142/150 и 250/258.

67. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-66, содержащая любую из последовательностей, перечисленных в Таблице 2.

68. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-67, отличающаяся тем, что антиген-связывающий белок представляет собой scFv.

69. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-68.

70. Выделенная иммунная эффекторная клетка, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 58-68 или вектор по п. 69.

71. Выделенная иммунная эффекторная клетка по п. 70, которая представляет собой Т-тело.

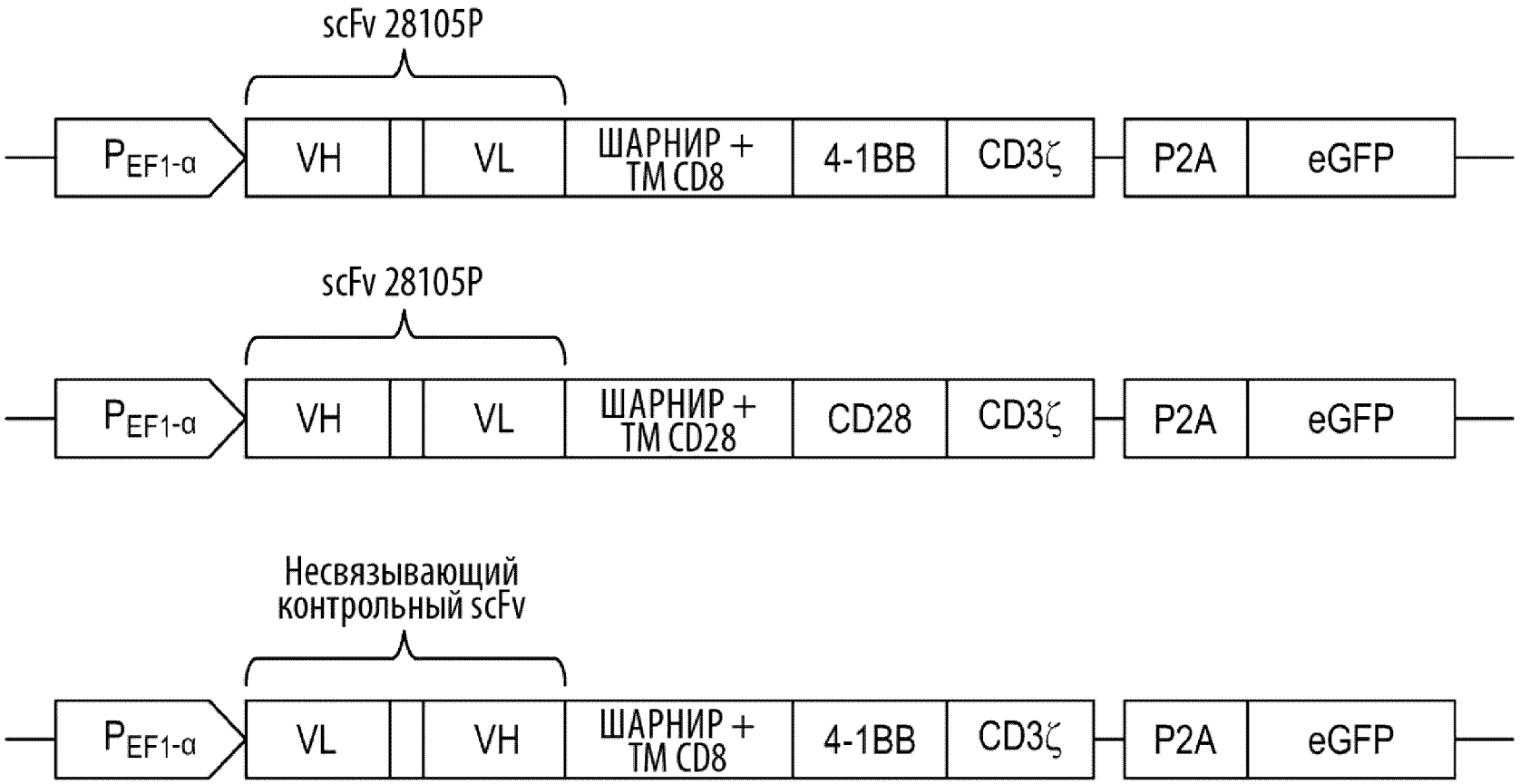
72. Выделенная иммунная эффекторная клетка по п. 70 или 71, отличающаяся тем, что указанная клетка экспрессирует указанный CAR.

73. Способ лечения субъекта, страдающего от NY-ESO-1-связанного заболевания или расстройства, включающий введение субъекту иммунной эффекторной клетки по любому из пп. 70-72.

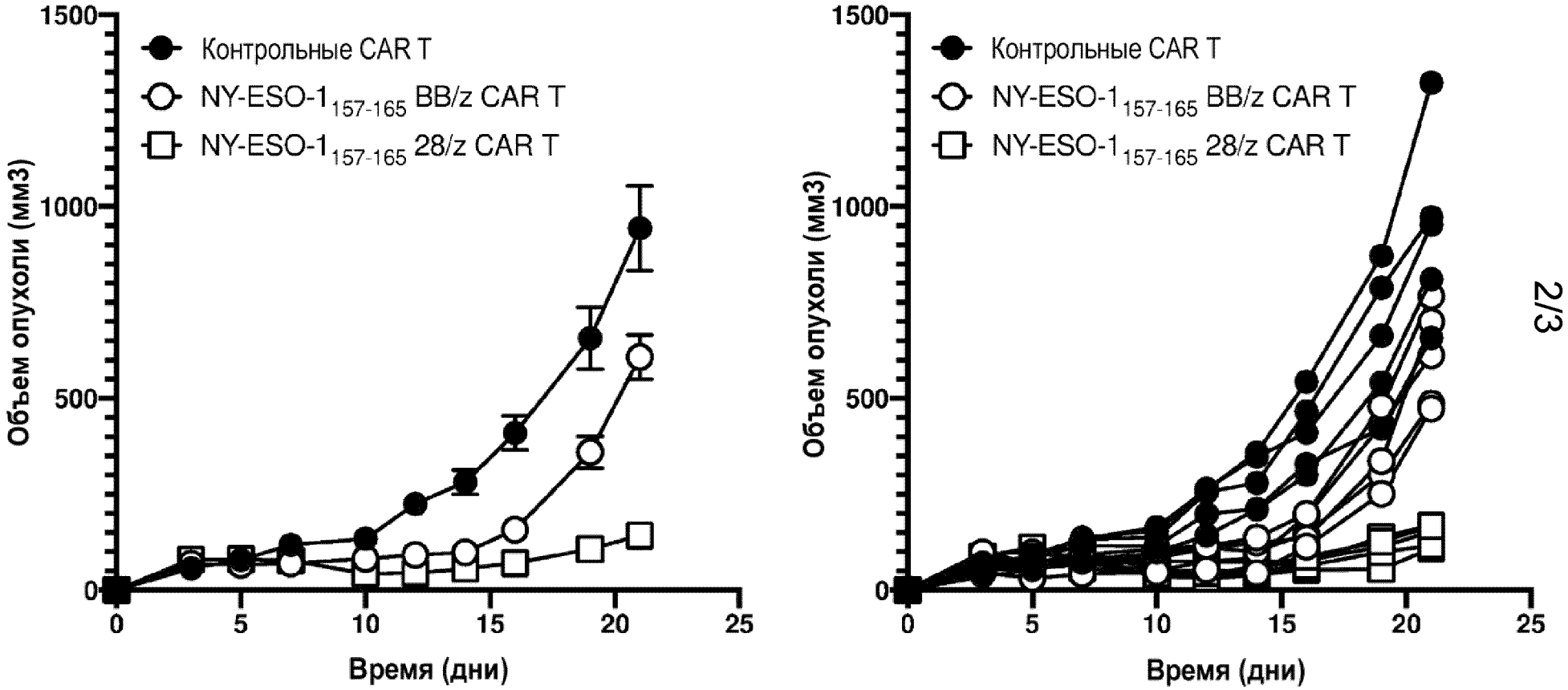
74. Способ по п. 73, отличающийся тем, что NY-ESO-1-связанное заболевание или расстройство представляет собой NY-ESO-1-связанный рак.

75. Способ по п. 73 или 74, отличающийся тем, что антиген-связывающий белок вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

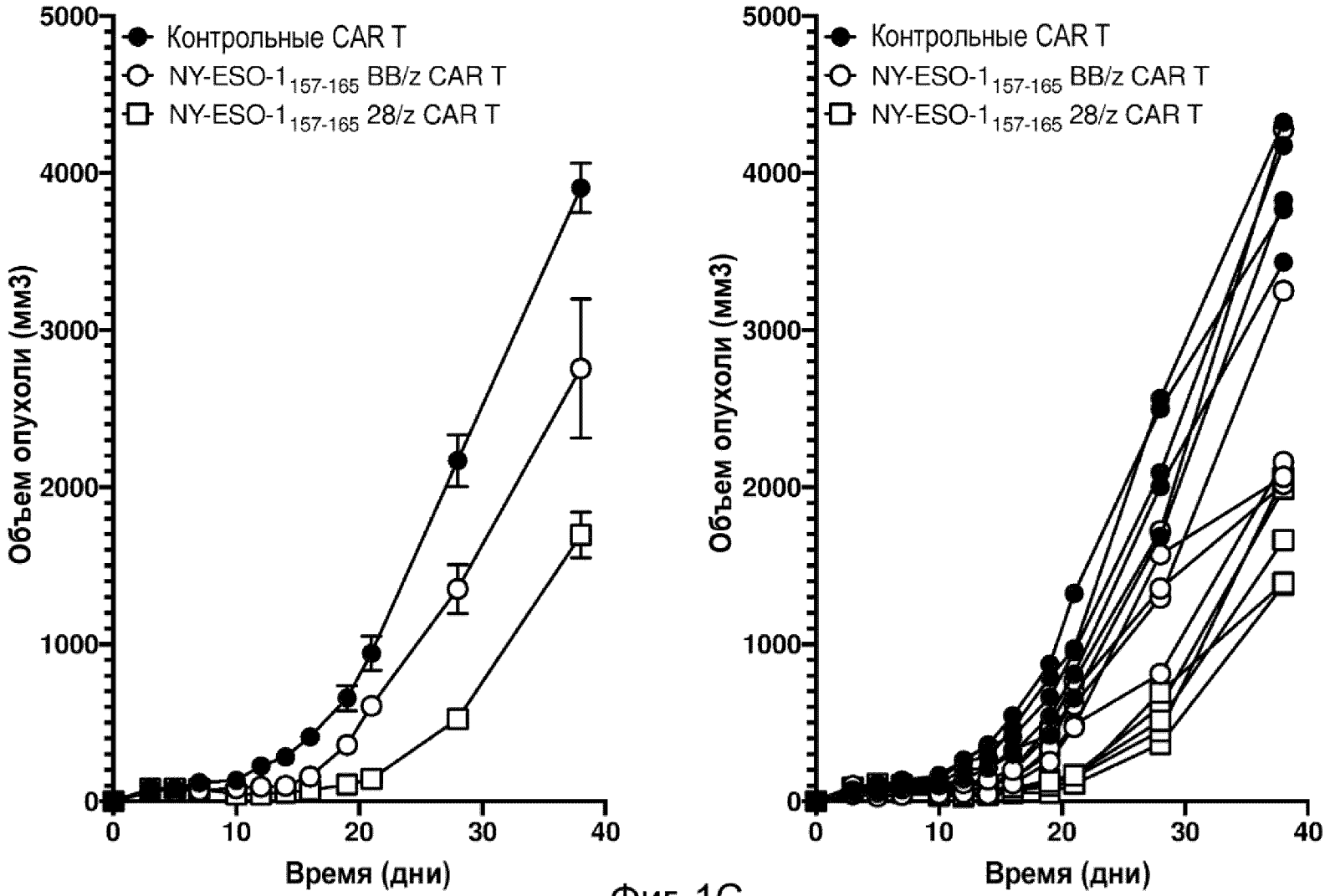
По доверенности


scFv 28105P
P EF1-α
VH
VL
ШАРНИР + TM CD8
4-1BB
CD3ζ
P2A
eGFP
scFv 28105P
P EF1-α
VH
VL
ШАРНИР + TM CD28
CD28
CD3ζ
P2A
eGFP
Несвязывающий контрольный scFv
P EF1-α
VL
VH
ШАРНИР + TM CD8
4-1BB
CD3ζ
P2A
eGFP

Фиг. 1A


1500
1000
500
0
Объем опухоли (мм3)
Контрольные CAR T
NY-ESO-1157-165 BB/z CAR T
NY-ESO-1157-165 28/z CAR T
0
5
10
15
20
25
Время (дни)
1500
1000
500
0
Объем опухоли (мм3)
Контрольные CAR T
NY-ESO-1157-165 BB/z CAR T
NY-ESO-1157-165 28/z CAR T
0
5
10
15
20
25
Время (дни)

Фиг. 1B


Контрольные CAR T
NY-ESO-1157-165 BB/z CAR T
NY-ESO-1157-165 28/z CAR T
Объем опухоли (мм3)
Время (дни)
0
1000
2000
3000
4000
5000
0
10
20
30
40

Фиг. 1C