

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202292764 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.11.17

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)  
C12N 5/0783 (2010.01)  
C12N 15/62 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.03.26

(54) Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

(31) 63/000,800

(72) Изобретатель:  
Мани Джасдип (US)

(32) 2020.03.27

(33) US

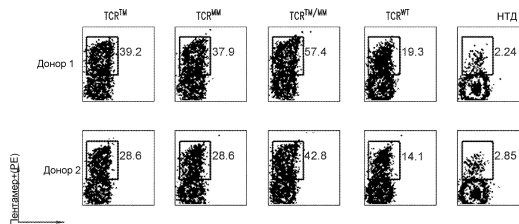
(74) Представитель:  
Кузнецова С.А. (RU)

(86) PCT/US2021/024370

(87) WO 2021/195503 2021.09.30

(71) Заявитель:  
2СЕВЕНТИ БАЙО, ИНК. (US)

(57) Согласно изобретению предложены улучшенные Т-клеточные рецепторы, полинуклеотиды, полипептиды, векторы, клетки и способы их применения.



A1

202292764

202292764

A1

## **Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ**

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно § 119(e) раздела 35 Свода законов США на основании предварительной заявки на патент США № 63000800, поданной 27 марта 2020 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

### **ЗАЯВЛЕНИЕ О ПЕРЕЧНЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и настоящим включен в описание посредством ссылки. Имя текстового файла, содержащего перечень последовательностей, — BLUE-130\_PC\_ST25.txt. Текстовый файл имеет размер 70 Кб, создан 25 марта 2021 г. и подается в электронном виде через EFS-Web одновременно с подачей описания.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

#### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к Т-клеточным рецепторам (TCR), сконструированным для улучшения экспрессии и функциональной avidности. Более конкретно, настоящее изобретение относится к TCR с аминокислотными заменами, которые улучшают экспрессию и функциональную avidность, кодирующим их нуклеотидам, векторам, клеткам, композициям, лекарственным препаратам и способам их применения.

#### **Описание уровня техники**

Технологические достижения в диагностике и лечении рака по-прежнему опережаются неблагоприятными прогнозами, с которыми сталкиваются многие пациенты с раком.

Адоптивная клеточная терапия (ACT) представляет собой перспективный подход для лечения злокачественных опухолей и вирусных инфекций. Адоптивный перенос Т-

лимфоцитов, генетически модифицированных с помощью антигенспецифических Т-клеточных рецепторов (TCR), является попыткой использования и усиления способности собственных Т-клеток пациента к уничтожению опухоли, не повреждая здоровую ткань. Теоретически Т-клетки иммунной системы способны распознавать белковые профили, характерные для опухолевых клеток, и опосредовать их разрушение посредством ряда эффекторных механизмов.

Однако этот подход не является новым в области онкоиммунологии, и многие недостатки предотвращали широкое применение адоптивной Т-клеточной терапии для лечения рака и других заболеваний. Существенным препятствием, с которым сталкивается генная терапия с помощью TCR, является неправильное спаривание TCR. Неправильное спаривание TCR представляет собой неправильное спаривание введенной  $\alpha$ - или  $\beta$ -цепи TCR и эндогенной  $\beta$ - или  $\alpha$ -цепи TCR, что приводит к ослабленной поверхностной экспрессии терапевтического  $\alpha\beta$ -TCR и потенциальной генерации Т-клеток с неизвестной специфичностью и токсичностью. Другим значимым ограничением генной терапии с помощью TCR является непредсказуемая экспрессия TCR, которая может приводить к нестабильности TCR и снижению функциональной avidности.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение в целом относится, в частности, к выделенным Т-клеточным рецепторам, которые были модифицированы (сконструированы) для повышения экспрессии, стабильности и функциональной avidности, полинуклеотиду, композициям, лекарственным средствам и их применениям.

В различных вариантах осуществления предложен выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены.

В различных вариантах осуществления предложен выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены, где TCR не связывает MAGEA4.

В частных вариантах осуществления выделенный Т-клеточный рецептор (TCR) содержит:  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной мураинизации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит

константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139.

В отдельных вариантах осуществления выделенный Т-клеточный рецептор (TCR) содержит:  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены P90S, E91D, S92V, S93P, S115L, G118V и F119L; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H.

В частных вариантах осуществления выделенный Т-клеточный рецептор (TCR) содержит:  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 4 аминокислотные замены для минимальной муринизации и по меньшей мере 3 гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене  $\alpha$ -цепи TCR, где константный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 5 аминокислотных замен для минимальной муринизации, где константный домен  $\beta$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119 константной области, где аминокислотная последовательность константной области TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константную область, содержащую аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139, где аминокислотная последовательность константной области TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В частных вариантах осуществления выделенный TCR содержит  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 4; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной мурализации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В частных вариантах осуществления выделенный Т-клеточный рецептор (TCR) содержит:  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; и  $\beta$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В частных вариантах осуществления TCR связывает целевой антиген, выбранный из группы, состоящей из следующих: альфа-фетопrotein (AFP), члены семейства В-антигенов меланомы (BAGE), BORIS (Brother of the regulator of imprinted sites), раково-тестикулярные антигены, раково-тестикулярный антиген 83 (CT-83), карбоангидраза IX (CA1X), карциноэмбриональный антиген (CEA), антигены цитомегаловируса (CMV), распознаваемый цитотоксическими Т-клетками (CTL) антиген на меланоме (CAMEL), антигены вируса Эпштейна-Барр (EBV), G антиген 1 (GAGE-1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, гликопротеин 100 (GP100), антигены вируса гепатита В (HBV), неструктурный белок 3 (NS3) вируса гепатита С (HCV), рецептор эпидермального фактора роста человека 2 типа (HER-2), вирус папилломы человека (HPV)-Е6, HPV-Е7, обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT), латентный мембранный белок 2 (LMP2), семейство антигенов меланомы А, 1 (MAGE-A1), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками (MART-1), мезотелин (MSLN), муцин 1 (MUC1), муцин 16 (MUC16), Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1 (NYESO-1), P53, члены семейства антигенов Р (PAGE), плацента-специфический 1 (PLAC1), антиген, экспрессируемый преимущественно при меланоме (PRAME), сурвивин, X 1 синовиальной саркомы (SSX1), X 2 синовиальной саркомы (SSX2), X 3 синовиальной саркомы (SSX3), X 4 синовиальной саркомы (SSX4), X 5 синовиальной саркомы (SSX5), X 8 синовиальной саркомы (SSX8), тиреоглобулин, тирозиназа, связанный с тирозиназой белок (TRP)1, TRP2, белок опухоли Вильмса (WT-1), член 1 семейства антигенов X (XAGE1) и член 2 семейства антигенов X (XAGE2).

В дополнительных вариантах осуществления экспрессия и avidность TCR повышены по сравнению с TCR, который содержит минимально мурализованную  $\alpha$ -цепь TCR и минимально мурализованную  $\beta$ -цепь TCR, но где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR не содержит гидрофобных аминокислотных замен.

В дополнительных вариантах осуществления экспрессия и avidность TCR повышены по сравнению с TCR, который не содержит минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, но где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены.

В частных предпочтительных вариантах осуществления выделенный TCR, предусмотренный в настоящем документе, не связывает MAGEA4.

В частных вариантах осуществления предложен слитый белок, содержащий  $\alpha$ -цепь TCR и  $\beta$ -цепь TCR, предусмотренные в настоящем документе.

В частных вариантах осуществления слитый белок содержит минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены; сигнал расщепления полипептида; и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR.

В отдельных вариантах осуществления слитый белок содержит:  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муриназации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119; сигнал расщепления полипептида; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муриназации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139.

В частных вариантах осуществления слитый белок содержит:  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены P90S, E91D, S92V, S93P, S115L, G118V и F119L; сигнал расщепления полипептида; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H.

В частных вариантах осуществления слитый белок содержит:  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 4 аминокислотные замены для минимальной муриназации и по меньшей мере 3 гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене  $\alpha$ -цепи TCR, где константный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; сигнал расщепления полипептида; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 5 аминокислотных замен для минимальной муриназации, где константный домен  $\beta$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В частных вариантах осуществления слитый белок содержит:  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119 константной области, где аминокислотная последовательность константной области TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; сигнал расщепления полипептида; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константную область, содержащую аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139, где аминокислотная последовательность константной области TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В частных вариантах осуществления слитый белок содержит:  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; сигнал расщепления полипептида; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В частных вариантах осуществления слитый белок содержит:  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; сигнал расщепления полипептида; и  $\beta$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой вирусный саморасщепляющийся пептид или последовательность проскока рибосомы.

В отдельных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой вирусный пептид 2A.

В дополнительных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой пептид 2А афтовируса, пептид 2А потивируса или пептид 2А кардиовируса.

В дополнительных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой вирусный пептид 2А, выбранный из группы, состоящей из: пептида 2А вируса ящура (FMDV), пептида 2А вируса ринита лошадей А (ERAV), пептида 2А вируса *Thosea asigna* (TaV), пептида 2А тешовируса свиней-1 (PTV-1), пептида 2А тейловируса и пептида 2А вируса энцефаломиокардита.

В частных предпочтительных вариантах осуществления слитый белок, предусмотренный в настоящем документе, не связывает MAGEA4.

В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует TCR или слитый белок, предусмотренные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит первый полинуклеотид, кодирующий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены; участок внутренней посадки рибосомы (IRES); и второй полинуклеотид, кодирующий минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR.

В частных вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит: первый полинуклеотид, кодирующий  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной мураинизации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119; IRES; и второй полинуклеотид, кодирующий  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной мураинизации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139.

В отдельных вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит: первый полинуклеотид, кодирующий  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены P90S, E91D, S92V, S93P, S115L, G118V и F119L; IRES; и второй полинуклеотид, кодирующий  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит: первый полинуклеотид, кодирующий  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 4 аминокислотные замены для минимальной мураинизации и по меньшей мере 3 гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене  $\alpha$ -цепи TCR, где константный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной



последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; IRES; и второй полинуклеотид, кодирующий  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 5 аминокислотных замен для минимальной муринизации, где константный домен  $\beta$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В предпочтительных вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит: первый полинуклеотид, кодирующий  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119 константной области, где аминокислотная последовательность константной области TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; IRES; и второй полинуклеотид, кодирующий  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константную область, содержащую аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139, где аминокислотная последовательность константной области TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В частных вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит: первый полинуклеотид, кодирующий  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; IRES; и второй полинуклеотид, кодирующий  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В отдельных вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит: первый полинуклеотид, кодирующий  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; IRES; и второй полинуклеотид, кодирующий  $\beta$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В частных предпочтительных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, предусмотренные в настоящем документе, не кодируют выделенные TCR или слитые белки, которые связывают MAGEA4.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR или слитый белок, предусмотренные в настоящем документе.

В частных вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, предусмотренную в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии.

В других вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

В частных вариантах осуществления клетка модифицирована для экспрессии TCR, предусмотренного в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления клетка модифицирована для экспрессии предусмотренного слитого белка.

В частных вариантах осуществления клетка модифицирована для экспрессии нуклеиновой кислоты, предусмотренной в настоящем документе.

В частных вариантах осуществления клетка содержит вектор, предусмотренный в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку.

В дополнительных вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку, выбранную из группы, состоящей из Т-клетки, естественной киллерной клетки (NK) или естественной киллерной Т-клетки (NKT).

В различных вариантах осуществления композиция содержит TCR, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку, предусмотренные в настоящем документе.

В различных вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и TCR, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку, предусмотренные в настоящем документе.

TCR, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор, клетка, композиция или фармацевтическая композиция, предусмотренные в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

TCR, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор, клетка, композиция, или фармацевтическая композиция, предусмотренные в настоящем документе, для применения для лечения рака, где рак предпочтительно представляет собой гематологический рак или солидную опухоль, более предпочтительно где рак выбран из группы, состоящей из саркомы,

рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака яичника, рака пищевода, немелкоклеточного рака легкого, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, гепатоклеточной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, колоректального рака, холангиокарциномы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, миелоидного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза, наиболее предпочтительно где рак выбран из группы, состоящей из НМРЛ (немелкоклеточный рак легкого), МРЛ (мелкоклеточный рак легкого), рака молочной железы, яичника или колоректального рака, саркомы или остеосаркомы.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ С ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1** показано влияние различных аминокислотных замен на экспрессию TCR к MAGEA4. Донорные клетки ( $n=2$ ) трансдуцировали лентивирусными конструкциями, кодирующими: TCR<sup>TM</sup> (гидрофобные мутации в трансмембранном домене), TCR<sup>MM</sup> (мутации для минимальной муринизации), TCR<sup>TM/MM</sup> (оба набора мутаций) или TCR<sup>WT</sup> (TCR человека), и культивировали в течение 10 дней. Нетрансдуцированные (НТД) Т-клетки использовали в качестве контроля. Экспрессию подтверждали путем мечения пептидом MAGEA4 (конфигурация пентамера) на 10 день.

На **фиг. 2А** показана повышенная экспрессия TCR в Т-клетках, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим TCR<sup>TM/MM</sup>, по сравнению с Т-клетками, трансдуцированными лентивирусным вектором, кодирующим TCR<sup>WT</sup>, при двух различных условиях трансдукции (Трансд) (левая панель).

На **фиг. 2В** показаны сопоставимые эффективности трансдукции донорных клеток ( $n=2$ ) лентивирусными конструкциями TCR, TCR<sup>TM/MM</sup> и TCR<sup>WT</sup>, при двух различных условиях Трансд (правая панель).

На **фиг. 3А** показано неправильное спаривание TCR в Т-клетке, экспрессирующей TCR<sup>WT</sup>. Спаривание выражено в виде процентной доли положительных клеток, выявленных с помощью окрашивания  $\gamma$ -бета и окрашивания тетрамерным антигеном. Специфичное спаривание TCR идентифицировали, если процентные доли положительных клеток, выявленных с помощью окрашивания  $\gamma$ -бета и окрашивания тетрамерным антигеном, были равными.

На **фиг. 3В** показано неправильное спаривание TCR в Т-клетке, экспрессирующей TCR<sup>TM/MM</sup> (правая панель). Спаривание выражено в виде процентной доли положительных клеток, выявленных с помощью окрашивания  $\gamma$ -бета и окрашивания тетрамерным антигеном.

Специфичное спаривание TCR идентифицировали, если процентные доли положительных клеток, выявленных с помощью окрашивания  $\gamma$ -бета и окрашивания тетрамерным антигеном, были равными.

На **фиг. 4A** показана продукция IFN $\gamma$  (интерферона-гамма) донорными Т-клетками, трансдуцированными лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> и TCR<sup>TM/MM</sup>. НТД Т-клетки, TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup> Т-клетки культивировали совместно с опухолевыми клетками, экспрессирующими MAGEA4, при соотношении Е:Т (эффектор:мишень) 1:1, и измеряли экспрессию IFN $\gamma$  через 24 часа (левая панель).

На **фиг. 4B** показана цитотоксичность донорных Т-клеток, трансдуцированных лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> и TCR<sup>TM/MM</sup>. НТД Т-клетки, TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup> Т-клетки культивировали совместно с опухолевыми клетками, экспрессирующими MAGEA4, при соотношении Е:Т 1:1, и измеряли цитотоксичность в течение 3 дней (правая панель).

На **фиг. 5A и 5B** показаны влияния различных мутаций на экспрессию TCR к NY-ESO-1. Донорные клетки (n=2) трансдуцировали лентивирусными конструкциями, кодирующими TCR<sup>WT</sup> (TCR человека), TCR<sup>MM</sup> (мутации для минимальной муринизации) или TCR<sup>TM/MM</sup> (гидрофобные мутации в трансмембранном домене и мутации для минимальной муринизации), и культивировали в течение 10 дней. Нетрансдуцированные (НТД) Т-клетки использовали в качестве контроля. На **фиг. 5A** показана экспрессия TCR к NY-ESO-1, подтвержденная путем мечения пептидом NY-ESO (конфигурация пентамера) на 10 день. На **фиг. 5B** показано среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) экспрессии TCR к NY-ESO-1 для каждого донора.

На **фиг. 6** показано неправильное спаривание TCR к NY-ESO-1 в НТД Т-клетках, TCR<sup>WT</sup> Т-клетках и TCR<sup>TM/MM</sup> Т-клетках. Спаривание выражено в виде процентной доли положительных клеток, выявленных с помощью окрашивания  $\gamma$ -бета и окрашивания тетрамерным антигеном.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИДЕНТИФИКАТОРОВ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**SEQ ID NO: 1** представляет собой аминокислотную последовательность константной области TCR $\alpha$  человека.

**SEQ ID NO: 2** представляет собой аминокислотную последовательность константной области 1 TCR $\beta$  человека.

**SEQ ID NO: 3** представляет собой аминокислотную последовательность константной области 2 TCR $\beta$  человека.

**SEQ ID NO: 4** представляет собой аминокислотную последовательность константной области TCR $\alpha$  человека, содержащей аминокислотные замены для минимальной муринизации и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене.

**SEQ ID NO: 5** представляет собой аминокислотную последовательность константной области 1 TCR $\beta$  человека, содержащей аминокислотные замены для минимальной муринизации.

**SEQ ID NO: 6** представляет собой аминокислотную последовательность константной области 2 TCR $\beta$  человека, содержащей аминокислотные замены для минимальной муринизации.

**SEQ ID NO: 7** представляет собой аминокислотную последовательность  $\alpha$ -цепи TCR к MART-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации и гидрофобными аминокислотными заменами в трансмембранном домене.

**SEQ ID NO: 8** представляет собой аминокислотную последовательность  $\beta$ -цепи TCR к MART-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации.

**SEQ ID NO: 9** представляет собой аминокислотную последовательность  $\alpha$ -цепи TCR к MART-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации и гидрофобными аминокислотными заменами в трансмембранном домене.

**SEQ ID NO: 10** представляет собой аминокислотную последовательность  $\beta$ -цепи TCR к MART-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации.

**SEQ ID NO: 11** представляет собой аминокислотную последовательность  $\alpha$ -цепи TCR WT-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации и гидрофобными аминокислотными заменами в трансмембранном домене.

**SEQ ID NO: 12** представляет собой аминокислотную последовательность  $\beta$ -цепи TCR WT-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации.

**SEQ ID NO: 13** представляет собой аминокислотную последовательность  $\alpha$ -цепи TCR к HPV16 E6 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации и гидрофобными аминокислотными заменами в трансмембранном домене.

**SEQ ID NO: 14** представляет собой аминокислотную последовательность  $\beta$ -цепи TCR к HPV16 E6 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации.

**SEQ ID NO: 15** представляет собой аминокислотную последовательность  $\alpha$ -цепи TCR к NY-ESO-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации и гидрофобными аминокислотными заменами в трансмембранном домене.

**SEQ ID NO: 16** представляет собой аминокислотную последовательность  $\beta$ -цепи TCR к NY-ESO-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации.

**SEQ ID NO: 17** представляет собой аминокислотную последовательность  $\alpha$ -цепи TCR к NY-ESO-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации и гидрофобными аминокислотными заменами в трансмембранном домене.

**SEQ ID NO: 18** представляет собой аминокислотную последовательность  $\beta$ -цепи TCR к NY-ESO-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации.

**SEQ ID NO: 19** представляет собой аминокислотную последовательность  $\alpha$ -цепи TCR к NY-ESO-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации и гидрофобными аминокислотными заменами в трансмембранном домене.

**SEQ ID NO: 20** представляет собой аминокислотную последовательность  $\beta$ -цепи TCR к NY-ESO-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации.

**SEQ ID NO: 21** представляет собой аминокислотную последовательность  $\alpha$ -цепи TCR к NY-ESO-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации и гидрофобными аминокислотными заменами в трансмембранном домене.

**SEQ ID NO: 22** представляет собой аминокислотную последовательность  $\beta$ -цепи TCR к NY-ESO-1 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации.

**SEQ ID NO: 23** представляет собой аминокислотную последовательность  $\alpha$ -цепи TCR к HPV16 E7 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринизации и гидрофобными аминокислотными заменами в трансмембранном домене.

**SEQ ID NO: 24** представляет собой аминокислотную последовательность  $\beta$ -цепи TCR к HPV16 E7 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринализации.

**SEQ ID NO: 25** представляет собой аминокислотную последовательность  $\alpha$ -цепи TCR к GP100 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринализации и гидрофобными аминокислотными заменами в трансмембранном домене.

**SEQ ID NO: 26** представляет собой аминокислотную последовательность  $\beta$ -цепи TCR к GP100 человека, содержащей константную область с аминокислотными заменами для минимальной муринализации.

**SEQ ID NO: 27-37** представляют собой аминокислотные последовательности различных линкеров.

**SEQ ID NO: 38-62** представляют собой аминокислотные последовательности сайтов расщепления протеазами и сайтов расщепления саморасщепляющихся полипептидов.

**SEQ ID NO: 63** представляет собой полинуклеотидную последовательность консенсусной последовательности Козак.

По всему тексту описания упоминаются аминокислотные положения в константных областях TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ . Аминокислотные положения пронумерованы на основании SEQ ID NO: 1 и 4 для TCR $\alpha$  и SEQ ID NO: 2, 3, 5 и 6 для TCR $\beta$ .

В вышеуказанных последовательностях X, если она присутствует, относится к любой аминокислоте или отсутствию аминокислоты.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **A. ОБЗОР**

Настоящее изобретение в целом относится, в частности, к Т-клеточным рецепторам, которые были модифицированы для повышения экспрессии, стабильности и функциональной avidности. Avidность TCR определяют по аффинности TCR к его целевому пептиду и экспрессии TCR. Аффинности TCR к целевым пептидам обычно находятся в диапазоне от 1 мкМ до 10 нМ. Однако, если аффинность TCR слишком высока, это может привести либо к отторжению тимусом, либо к нежелательной нецелевой активности. Avidность TCR также может быть увеличена за счет увеличения количества молекул TCR, экспрессируемых на клеточной поверхности, что потенциально может быть достигнуто за счет оптимизации

кодонов и оптимизации ориентации цепи для сбалансированной экспрессии. Стабильность TCR также может играть роль в экспрессии TCR.

Положительно заряженные остатки в трансмембранной области TCR могут способствовать нестабильности TCR и снижению экспрессии. Хотя изменение состава трансмембранных доменов может снижать нестабильность и повышать экспрессию, цепи не подлежат существенным изменениям, поскольку некоторые заряженные остатки являются ключевыми для взаимодействия с комплексом CD3.

Помимо нестабильности цепей TCR, низкая экспрессия также обусловлена конкуренцией с эндогенными цепями TCR. Неправильное спаривание трансгенных (экзогенных) цепей с эндогенными цепями приводит к низкой экспрессии TCR и сниженной функциональной avidности TCR, а также потенциальной нецелевой токсичности. Специалисты в данной области техники решали эту проблему посредством нокаута эндогенного локуса TCR и замены трансгенных константных доменов (например, человеческих) константными доменами от другого вида (например, мыши). Недостатком этих стратегий является неполная инактивация эндогенного локуса TCR и повышенный риск иммуногенности из-за присутствия чужеродных константных доменов.

Автор(-ы) настоящего изобретения неожиданно обнаружил(-и), что TCR, сконструированные с помощью комбинации аминокислотных замен для минимальной муринизации и гидрофобных аминокислотных замен в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , синергически повышают стабильность, экспрессию, специфичное спаривание и функциональную avidность TCR. Более того, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что конструирование константных доменов TCR может придавать многим TCR (как с высокой аффинностью, так и с низкой аффинностью) вышеуказанные характеристики, таким образом делая их более гибкой стратегией иммунотерапии. Кроме того, сконструированные TCR, предусмотренные в настоящем документе, обеспечивают другие преимущества по сравнению со сконструированными TCR Т-клетками, известными из уровня техники, в том числе упрощенный процесс производства, уменьшение количества TCR Т-клеток для достижения требуемой дозы и возможность дальнейшего конструирования без снижения экспрессии TCR.

В различных вариантах осуществления предложены Т-клеточные рецепторы (TCR), сконструированные для повышения стабильности, экспрессии и функциональной avidности. TCR, предусмотренные в настоящем документе, содержат одну или более аминокислотных замен для минимальной муринизации TCR и одну или более гидрофобных аминокислотных замен в трансмембранном домене. В частных вариантах осуществления TCR содержат  $\alpha$ -цепь TCR с константной областью, которая была минимально муринизирована, и которая



содержит гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене, и  $\alpha$ -цепь TCR с константной областью, которая была минимально мураинизирована.

В частных вариантах осуществления TCR, предусмотренный в настоящем документе, содержит 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены в константной области TCR $\alpha$  для минимальной мураинизации  $\alpha$ -цепи TCR; 1, 2 или 3 гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ ; и 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен в константной области TCR $\beta$  для минимальной мураинизации  $\beta$ -цепи TCR. В предпочтительных вариантах осуществления TCR, предусмотренный в настоящем документе, содержит 4 аминокислотные замены в константной области TCR $\alpha$  для минимальной мураинизации  $\alpha$ -цепи TCR; 3 гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ ; и 5 аминокислотных замен в константной области TCR $\beta$  для минимальной мураинизации  $\beta$ -цепи TCR.

TCR, предусмотренные в настоящем документе, как правило, связывают целевой антиген, презентруемый молекулой главного комплекса гистосовместимости (MHC). В частных вариантах осуществления TCR, предусмотренные в настоящем документе, связывают целевой антиген, который экспрессируется на раковой клетке, т. е. опухолевый антиген, включая, не ограничиваясь перечисленным, опухолеассоциированные антигены (TAA) и опухолеспецифические антигены (TSA).

В частных вариантах осуществления предусмотрены один или более полинуклеотидов, кодирующих сконструированный TCR.  $\alpha$ -цепь TCR и  $\beta$ -цепь TCR могут кодироваться разными полинуклеотидами или одним полинуклеотидом в виде полицистронного белка или в виде слитого полипептида, где цепи разделены полинуклеотидом, кодирующим линкерный полипептид, необязательно саморасщепляющийся полипептид. В частных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует  $\alpha$ -цепь TCR, саморасщепляющийся полипептид и полипептид TCR $\beta$ . В других частных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует  $\beta$ -цепь TCR, саморасщепляющийся полипептид и полипептид TCR $\alpha$ .

Дополнительно предусмотрено, что в частных вариантах осуществления полинуклеотиды TCR вводят в иммунные эффекторные клетки. Иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие TCR, предусмотренные в настоящем документе, могут быть представлены в виде композиций или фармацевтических композиций и могут применяться для производства лекарственного средства для лечения рака и/или в способах лечения рака.

В предпочтительных вариантах осуществления TCR, предусмотренные в настоящем документе, не связывают MAGEA4, включая, не ограничиваясь перечисленным, MAGEA4 приматов или человека.

Технологии рекомбинантных (т. е. сконструированных) ДНК, синтез пептидов и олигонуклеотидов, иммуноанализы, культуры тканей, трансформации (например, электропорация, липофекция), ферментативные реакции, очистка и связанные с ними методики и процедуры, как правило, могут быть осуществлены, как описано в различных общих и более конкретных источниках в области микробиологии, молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики, клеточной биологии, вирусологии и иммунологии, цитируемых и обсуждаемых в настоящем описании. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985); *Current Protocols in Immunology* (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, Edited by Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK; Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, Ed., 1984); *Nucleic Acid The Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, Ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Next-Generation Genome Sequencing* (Janitz, 2008 Wiley-VCH); *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Park, Ed., 3rd Edition, 2010 Humana Press); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV* (D. M. Weir and CC Blackwell, eds., 1986); Roitt, *Essential Immunology*, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); *Current Protocols in Immunology* (Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; а также монографии в журналах, таких как *Advances in Immunology*.

## **В. ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Перед изложением настоящего изобретения более подробно может быть полезным для его понимания привести определения некоторых терминов, которые будут использоваться в настоящем документе.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистами в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практическом осуществлении или тестировании частных вариантов осуществления могут применяться любые методы и материалы, схожие с описанными в настоящем документе или эквивалентные им, в настоящем документе описаны предпочтительные варианты осуществления композиций, методов и материалов. Для целей настоящего изобретения ниже даны определения следующим терминам.

Термины в единственном числе используются в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного или одного или более) такого термина. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или один или более элементов.

Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как одну из альтернатив, обе или любую их комбинацию.

Под термином «и/или» следует понимать одну из альтернатив или обе из них.

В контексте настоящего документа термин «приблизительно» или «примерно» относится к величине, уровню, значению, числу, частоте, проценту, измерению, размеру, количеству, массе или длине, которые варьируют на вплоть до 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от референсной величины, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, количества, массы или длины. В одном варианте осуществления термин «приблизительно» или «примерно» относится к диапазону величины, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, количества, массы или длины  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 9\%$ ,  $\pm 8\%$ ,  $\pm 7\%$ ,  $\pm 6\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 4\%$ ,  $\pm 3\%$ ,  $\pm 2\%$  или  $\pm 1\%$  от референсной величины, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, количества, массы или длины.

В одном варианте осуществления диапазон, например, от 1 до 5, от приблизительно 1 до 5 или от приблизительно 1 до приблизительно 5, относится к каждому численному значению, охватываемому диапазоном. Например, в одном неограничивающем и лишь иллюстративном варианте осуществления диапазон «от 1 до 5» эквивалентен указанию 1, 2, 3, 4, 5; или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 или 5,0; или 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9,

2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0.

В контексте настоящего документа термин «по существу» относится к величине, уровню, значению, числу, частоте, проценту, измерению, размеру, количеству, массе или длине, которые составляют 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более от референсной величины, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, количества, массы или длины. В одном варианте осуществления «по существу такой же» относится к величине, уровню, значению, числу, частоте, проценту, измерению, размеру, количеству, массе или длине, которые обеспечивают эффект, например, физиологический эффект, который является приблизительно таким же, как референсная величина, уровень, значение, число, частота, процент, измерение, размер, количество, масса или длина.

По всему тексту данного описания, если из контекста не следует иное, под словами «содержать», «содержит» и «содержащий» подразумевается включение указанной стадии или элемента, или группы стадий или элементов, но не исключение любой другой стадии или элемента, или группы стадий или элементов. Под термином «состоящий из» подразумевается включающий и ограниченный тем, что следует за фразой «состоящий из». Таким образом, фраза «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Под термином «по существу состоящий из» подразумевается включение любых элементов, перечисленных после этой фразы, и ограничиваясь другими элементами, которые не препятствуют или не вносят вклад в активность или действие, указанные в данном описании для перечисленных элементов. Таким образом, фраза «по существу состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, но при этом отсутствуют другие элементы, которые в существенной степени влияют на активность или действие перечисленных элементов.

Упоминание, по всему тексту данного описания, «одного варианта осуществления», «варианта осуществления», «частного варианта осуществления», «связанного варианта осуществления», «отдельного варианта осуществления», «дополнительного варианта осуществления» или «еще одного варианта осуществления», или их комбинаций, означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с данным вариантом осуществления, включены в по меньшей мере один вариант осуществления. Таким образом, вышеуказанные фразы, присутствующие в различных местах по всему тексту данного описания, необязательно все относятся к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть комбинированы любым подходящим образом в одном или более вариантах осуществления.

Также следует исходить из того, что утвердительное указание признака в одном варианте осуществления служит основанием для исключения признака в частном варианте осуществления.

«Экзогенная» молекула представляет собой молекулу, которая обычно не присутствует в клетке, но которую вводят в клетку с помощью одного или более генетических, биохимических или других методов. Иллюстративные экзогенные молекулы включают, не ограничиваясь перечисленным, малые органические молекулы, белок, нуклеиновую кислоту, углевод, липид, гликопротеин, липопротеин, полисахарид, любое модифицированное производное вышеуказанных молекул или любой комплекс, содержащий одну или более из вышеуказанных молекул. Способы введения экзогенных молекул в клетки известны специалистам в данной области техники и включают, не ограничиваясь перечисленным, опосредованный липидами перенос (т. е. липосомы, в том числе нейтральные и катионные липиды), электропорацию, прямую инъекцию, слияние клеток, бомбардировку частицами, биополимерную наночастицу, соосаждение с фосфатом кальция, перенос, опосредованный ДЭАЭ-декстраном, и перенос, опосредованный вирусным вектором.

«Эндогенная» молекула представляет собой молекулу, которая обычно присутствует в конкретной клетке на конкретной стадии развития при конкретных условиях окружающей среды. Дополнительные эндогенные молекулы могут включать белки.

Дополнительные определения изложены по всему тексту данного описания.

### **С. Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ**

Т-клеточные рецепторы (TCR) распознают пептидный фрагмент целевого антигена, когда он презентруется молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС). Существует два разных класса молекул МНС: МНС I и МНС II, которые доставляют пептиды из различных клеточных компартментов к клеточной поверхности. Взаимодействие TCR с антигеном и МНС приводит к активации иммунных эффекторных клеток посредством ряда биохимических событий, опосредованных ассоциированными ферментами, корецепторами и специализированными вспомогательными молекулами.

TCR, предусмотренный в настоящем документе, представляет собой гетеродимерный комплекс, содержащий альфа-цепь TCR ( $\alpha$ -цепь TCR) и бета-цепь TCR ( $\beta$ -цепь TCR). Лocus TCR $\alpha$  человека расположен на хромосоме 14 (14q11.2). Зрелая  $\alpha$ -цепь TCR содержит переменный домен, полученный в результате рекомбинации переменного (V) сегмента и соединительного (J) сегмента, и константный (C) домен. Термин «переменная область TCR $\alpha$ » или «переменная  $\alpha$ -цепь TCR» или «переменный домен TCR $\alpha$ » относится к

вариабельной области  $\alpha$ -цепи TCR. Лocus TCR $\beta$  человека расположен на хромосоме 7 (7q34). Зрелая  $\beta$ -цепь TCR содержит вариабельный домен, полученный в результате рекомбинации вариабельного (V) сегмента, сегмента разнообразия (D) и соединительного (J) сегмента, и один из двух константных (C) доменов. Термин «вариабельная область TCR  $\beta$ » или «вариабельная  $\beta$ -цепь TCR» или «вариабельный домен TCR $\beta$ » относится к вариабельной области  $\beta$ -цепи TCR.

После реаранжировки каждая из областей V(D)J как  $\alpha$ -цепи TCR, так и  $\beta$ -цепи TCR содержит три гипервариабельных области, известных как определяющие комплементарность области (CDR). CDR3 является основной CDR, ответственной за распознавание процессированного антигена, хотя CDR1 альфа-цепи также, как было показано, взаимодействует с N-концевой частью антигенного пептида, тогда как CDR1 бета-цепи взаимодействует с C-концевой частью пептида. Считается, что CDR2 распознает молекулу MHC. Каркасные области (FR) расположены между CDR. Эти области обеспечивают структуру вариабельной области TCR.

Константный домен или константная область цепи TCR также вносит вклад в структуру TCR и состоит из внеклеточного домена, трансмембранного домена и короткого цитоплазматического домена.

Структура TCR обеспечивает образование комплекса TCR, который включает  $\alpha$ -цепь TCR,  $\beta$ -цепь TCR и вспомогательные молекулы CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  и CD3 $\zeta$ . Сигнал от T-клеточного комплекса усиливается путем одновременного связывания молекул MHC специфичным корцептором. CD4 является корцептором для молекул MHC II, экспрессируемых на хелперных T-клетках, а CD8 является корцептором для молекул MHC I, экспрессируемых на цитотоксических T-клетках. Корцептор не только обеспечивает специфичность TCR в отношении антигена, но также обеспечивает продолжительное взаимодействие между антигенпрезентирующей клеткой и T-клеткой и рекрутирует необходимые молекулы (например, LCK) внутрь клетки, участвующей в передаче сигнала активированного T-лимфоцита.

TCR, предусмотренные в настоящем документе, можно применять для перенаправления иммунных эффекторных клеток на целевые клетки. TCR, предусмотренные в настоящем документе, сконструированы для повышения стабильности TCR, экспрессии TCR, специфичного спаривания TCR и функциональной avidности.

В частных вариантах осуществления константные домены  $\alpha$ -цепей и  $\beta$ -цепей TCR сконструированы или модифицированы для повышения стабильности TCR, экспрессии TCR, специфичного спаривания TCR и функциональной avidности.

Для эффективного усиления правильного спаривания сконструированных последовательностей TCR и для предотвращения неправильного спаривания с эндогенными цепями TCR сконструированные последовательности TCR модифицируют для минимальной муринизации константных доменов TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ . Муринизация TCR относится к замене константных доменов TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  человека на их мышинные аналоги. Выявлены девять аминокислот, ответственных за улучшенную экспрессию муринизированных TCR. «Минимальная муринизация» обеспечивает преимущество усиления экспрессии на клеточной поверхности при одновременном снижении количества «чужеродных» аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности и, таким образом, снижении риска иммуногенности. Минимальная муринизация относится к замене 1, 2, 3 или 4 аминокислот, предпочтительно всех 4 аминокислот, в константном домене TCR $\alpha$  и замене 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, предпочтительно всех 5 аминокислот, в константном домене TCR $\beta$ , которые отвечают за улучшенную экспрессию в муринизированных TCR. В предпочтительных вариантах осуществления минимальная муринизация относится к замене 4 аминокислот в константном домене TCR $\alpha$  человека и замене 5 аминокислот в константном домене TCR $\beta$  человека, которые отвечают за улучшенную экспрессию в муринизированных TCR.

Сконструированные или модифицированные TCR, предусмотренные в настоящем документе, содержат минимально муринизированные константные домены TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  и дополнительно содержат гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$  для повышения стабильности TCR, экспрессии TCR и функциональной avidности. Было показано, что трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR вносит вклад в отсутствие стабильности всей цепи и, таким образом, влияет на образование и поверхностную экспрессию всего комплекса TCR–CD3. В частных вариантах осуществления замена 1, 2 или 3 аминокислот, предпочтительно всех 3 аминокислот, в трансмембранном домене TCR  $\alpha$  на гидрофобные аминокислоты улучшает стабильность, экспрессию и avidность TCR. В предпочтительных вариантах осуществления трансмембранный домен TCR  $\alpha$  содержит 3 гидрофобные аминокислотные замены для улучшения стабильности, экспрессии и avidности TCR.

Иллюстративные примеры гидрофобных аминокислот, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, включают аланин (A), валин (V), изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W). В предпочтительных вариантах осуществления гидрофобные аминокислоты выбраны из группы, состоящей из аланина (A), валина (V), изолейцина (I) и лейцина (L). В более предпочтительных вариантах осуществления гидрофобные аминокислоты выбраны из группы, состоящей из валина (V),

изолейцина (I) и лейцина (L). В еще более предпочтительных вариантах осуществления гидрофобные аминокислоты представляют собой валин (V) и лейцин (L).

В частных вариантах осуществления сконструированный TCR содержит минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены.

В предпочтительных вариантах осуществления сконструированный TCR содержит минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую 4 аминокислотные замены в константной области TCR $\alpha$ , и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, содержащую 5 аминокислотных замен в константной области TCR $\beta$ , где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR дополнительно содержит три гидрофобные аминокислотные замены.

В предпочтительных вариантах осуществления сконструированный TCR содержит  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муриназации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119 константной области; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муриназации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139.

В предпочтительных вариантах осуществления сконструированный TCR содержит  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муриназации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене константной области: S115L, G118V и F119L; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муриназации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H.

В предпочтительных вариантах осуществления сконструированный TCR содержит  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муриназации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119 константной области, где аминокислотная последовательность константной области TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константную область, содержащую аминокислотные замены для минимальной муриназации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139, где аминокислотная последовательность константной области TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.



В частных вариантах осуществления сконструированный TCR содержит  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В частных предпочтительных вариантах осуществления сконструированный TCR содержит  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В частных вариантах осуществления сконструированный TCR содержит переменные домены, которые связывают антиген. В предпочтительных вариантах осуществления антиген не представляет собой MAGEA4.

#### **D. ЦЕЛЕВЫЕ АНТИГЕНЫ**

Сконструированные T-клеточные рецепторы (TCR), предусмотренные в настоящем документе, связывают полипептидный антиген, презентруемый молекулой главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса I или MHC класса II, преимущественно полипептидный антиген, презентруемый молекулой MHC класса I.

«Главный комплекс гистосовместимости» (MHC) относится к гликопротеинам, которые доставляют пептидные антигены к клеточной поверхности. Молекулы MHC класса I представляют собой гетеродимеры, имеющие трансмембранную  $\alpha$ -цепь (с тремя  $\alpha$ -доменами) и нековалентно связаный  $\beta$ 2-микроглобулин. Молекулы MHC класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов,  $\alpha$  и  $\beta$ , оба из которых являются трансмембранными. Каждая цепь имеет два домена. Молекулы MHC класса I доставляют пептиды, происходящие из цитозоля, к клеточной поверхности, где комплекс пептид:MHC распознается CD8<sup>+</sup> T-клетками. Молекулы MHC класса II доставляют пептиды, происходящие из везикулярной системы, к клеточной поверхности, где они распознаются CD4<sup>+</sup> T-клетками. MHC человека называется человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA).

«Антиген (Ag)», «целевой антиген» и «полипептидный антиген» используются взаимозаменяемо в предпочтительных вариантах осуществления и все относятся к подвергнутой естественному процессингу или полученной синтетическим путем части антигенного белка, например, опухолеассоциированному антигену (ТАА) или опухолеспецифическому антигену (TSA), имеющей длину от приблизительно 7 аминокислот до приблизительно 15 аминокислот, способной образовывать комплекс с молекулой МНС (например, HLA), образуя комплекс целевой антиген:МНС (например, HLA).

Принципы процессинга антигена антигенпрезентирующими клетками (APC) (такими как дендритные клетки, макрофаги, лимфоциты или другие типы клеток) и презентации антигена с помощью APC Т-клеткам, включая презентацию, рестриктированную главным комплексом гистосовместимости (МНС), между иммуносовместимыми (например, с по меньшей мере одной общей аллельной формой гена МНС, релевантной для презентации антигена) APC и Т-клетками, хорошо известны (см., например, Murphy, Janeway's Immunobiology (8th Ed.) 2011 Garland Science, NY; главы 6, 9 и 16). Например, процессированные антигенные пептиды, происходящие из цитозоля (например, опухолевый антиген, внутриклеточный патоген), обычно имеют длину от приблизительно 7 аминокислот до приблизительно 11 аминокислот и будут ассоциироваться с молекулами МНС класса I, тогда как пептиды, процессированные в везикулярной системе (например, бактериальные, вирусные), как правило, варьируют по длине от приблизительно 10 аминокислот до приблизительно 25 аминокислот и ассоциируются с молекулами МНС класса II.

В частных вариантах осуществления сконструированный TCR, предусмотренный в настоящем документе, связывает опухолевый антиген, например, ТАА или TSA. «Опухлеассоциированные антигены» или «ТАА» включают, не ограничиваясь перечисленным, онкофетальные антигены, сверхэкспрессированные антигены, линейно-специфические антигены и раково-тестикулярные антигены. ТАА относительно ограничены опухолевыми клетками. ТАА характеризуются повышенными уровнями экспрессии на опухолевых клетках, но также экспрессируются на более низких уровнях на здоровых клетках. «Опухолеспецифические антигены» или «TSA» включают, не ограничиваясь перечисленным, неоантигены и онковирусные антигены. TSA присущи только опухолевым клеткам. TSA экспрессируются в раковых клетках, а не в нормальных клетках.

В частных вариантах осуществления сконструированные TCR, предусмотренные в настоящем документе, связывают антигенную часть полипептида, выбранного из группы, состоящей из следующих: альфа-фетопротейн (AFP), члены семейства В-антигенов меланомы (BAGE), BORIS (Brother of the regulator of imprinted sites), раково-тестикулярные антигены, раково-тестикулярный антиген 83 (CT-83), карбоангидраза IX (CA1X),

карциноэмбриональный антиген (CEA), антигены цитомегаловируса (CMV), распознаваемый цитотоксическими Т-клетками (CTL) антиген на меланоме (CAMEL), антигены вируса Эпштейна-Барр (EBV), G антиген 1 (GAGE-1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, гликопротеин 100 (GP100), антигены вируса гепатита В (HBV), неструктурный белок 3 (NS3) вируса гепатита С (HCV), рецептор эпидермального фактора роста человека 2 типа (HER-2), вирус папилломы человека (HPV)-E6, HPV-E7, обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT), латентный мембранный белок 2 (LMP2), семейство антигенов меланомы А, 1 (MAGE-A1), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками (MART-1), мезотелин (MSLN), муцин 1 (MUC1), муцин 16 (MUC16), Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1 (NYESO-1), P53, члены семейства антигенов Р (PAGE), плацента-специфический 1 (PLAC1), антиген, экспрессируемый преимущественно при меланоме (PRAME), сурвивин, X 1 синовиальной саркомы (SSX1), X 2 синовиальной саркомы (SSX2), X 3 синовиальной саркомы (SSX3), X 4 синовиальной саркомы (SSX4), X 5 синовиальной саркомы (SSX5), X 8 синовиальной саркомы (SSX8), тиреоглобулин, тирозиназа, связанный с тирозиназой белок (TRP)1, TRP2, белок опухоли Вильмса (WT-1), член 1 семейства антигенов X (XAGE1) и член 2 семейства антигенов X (XAGE2).

В частных вариантах осуществления сконструированные TCR, предусмотренные в настоящем документе, связывают антигенную часть полипептида, выбранного из группы, состоящей из: CT-83, MAGE-A3, MART-1, MUC16, NY-ESO-1, PLAC-1, PRAME, SSX2, Survivin и WT-1

В частных вариантах осуществления сконструированные TCR, предусмотренные в настоящем документе, связывают антигенную часть NY-ESO-1.

## **Е. Полипептиды**

В настоящем документе предусмотрены различные полипептиды, слитые полипептиды и полипептидные варианты, включая, не ограничиваясь перечисленным, полипептиды TCR, полипептиды  $\alpha$ -цепи TCR, полипептиды  $\beta$ -цепи TCR, слитые полипептиды TCR и их фрагменты. В частных вариантах осуществления иллюстративные полипептиды, предусмотренные в настоящем документе, включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 4-26.

«Полипептид», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо, если не указано иное, и в соответствии с общепринятым значением, т. е. в качестве последовательности аминокислот. Полипептиды не ограничены определенной длиной,

например, они могут содержать полноразмерный полипептид или полипептидный фрагмент и могут включать одну или более посттрансляционных модификаций полипептида, например, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и т. п., а также другие модификации, известные в данной области техники, как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе.

Термины «выделенный полипептид» и т. п. в контексте настоящего документа относятся к синтезу *in vitro*, выделению и/или очистке пептидной или полипептидной молекулы из клеточной среды, а также из ассоциации с другими компонентами клетки, т. е., он не является в существенной степени связанным с веществами *in vivo*. В частных вариантах осуществления выделенный полипептид представляет собой синтетический полипептид, рекомбинантный полипептид или полусинтетический полипептид, или полипептид, полученный или происходящий из рекомбинантного источника.

Полипептиды включают «полипептидные варианты». Полипептидные варианты могут отличаться от встречающегося в природе полипептида одной или более аминокислотными заменами, делециями, добавлениями и/или вставками. Такие варианты могут встречаться в природе или могут быть получены синтетически, например, путем модификации одной или более полипептидных последовательностей, предусмотренных в настоящем документе. Например, в частных вариантах осуществления может быть желательным улучшение аффинности связывания, стабильности, экспрессии, специфичного спаривания, функциональной avidности и/или других биологических свойств TCR путем введения одной или более замен, делеций, добавлений и/или вставок в  $\alpha$ -цепь TCR и/или  $\beta$ -цепь TCR. В частных вариантах осуществления полипептиды включают полипептиды, обладающие по меньшей мере приблизительно 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 86%, 97%, 98% или 99% идентичностью аминокислот любым из полипептидных последовательностей, предусмотренных в настоящем документе, как правило, где вариант сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность референсной последовательности.

Полипептиды включают «полипептидные фрагменты». Полипептидные фрагменты относятся к полипептиду, который может быть мономерным или мультимерным, который имеет аминоконцевую делецию, карбоксиконцевую делецию и/или внутреннюю делецию или замену, встречающегося в природе или полученного рекомбинантным путем полипептида. В контексте настоящего документа термин «биологически активный фрагмент» или «минимальный биологически активный фрагмент» относится к полипептидному фрагменту, который сохраняет по меньшей мере

100%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 10% или по меньшей мере 5% активности встречающегося в природе полипептида. В отдельных вариантах осуществления полипептидный фрагмент может содержать аминокислотную цепь длиной от по меньшей мере 5 до приблизительно 500 аминокислот. Следует принимать во внимание, что в отдельных вариантах осуществления длина фрагментов составляет по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот.

Как указано выше, в частных вариантах осуществления полипептиды можно изменять различными способами, включая аминокислотные замены, делеции, усечения и вставки. Методы таких манипуляций общеизвестны из уровня техники. Например, варианты аминокислотных последовательностей референсного полипептида могут быть получены посредством мутаций в ДНК. Методы мутагенеза и изменений нуклеотидной последовательности хорошо известны из уровня техники. См., например, Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488-492), Kunkel *et al.*, (1987, *Methods in Enzymol*, 154: 367-382), патент США № 4873192, Watson, J. D. *et al.*, (*Molecular Biology of the Gene*, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) и источники, цитируемые в них. Рекомендации относительно подходящих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность представляющего интерес белка, можно найти в модели Дэйхофф *et al.*, (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

В предпочтительных вариантах осуществления в настоящем документе предусмотрены слитые полипептиды. Слитые полипептиды и слитые белки относятся к полипептиду, содержащему по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять, или более полипептидных сегментов. Слитые полипептиды обычно связаны С-концом с N-концом, хотя они также могут быть связаны С-концом с С-концом, N-концом с N-концом или N-концом с С-концом. В частных вариантах осуществления полипептиды в составе слитого белка могут быть расположены в любом порядке или в определенном порядке.

В частных вариантах осуществления TCR, предусмотренный в настоящем документе, экспрессируется в виде слитого полипептида, который содержит  $\alpha$ -цепь TCR, полипептидный линкер и  $\beta$ -цепь TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR экспрессируется в виде слитого белка, который содержит, в направлении от 5' к 3',  $\alpha$ -цепь

TCR, полипептидный линкер и  $\beta$ -цепь TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR экспрессируется в виде слитого белка, который содержит, в направлении от 5' к 3',  $\beta$ -цепь TCR, полипептидный линкер и  $\alpha$ -цепь TCR.

«Линкер» представляет собой аминокислотную последовательность, которая соединяет соседние домены полипептида или слитого полипептида. Иллюстративные примеры линкеров включают полимеры глицина ( $G$ )<sub>n</sub>; полимеры глицин-серин ( $G_{1-5}S_{1-5}$ )<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере один, два, три, четыре или пять; полимеры глицин-аланин; полимеры аланин-серин; и другие гибкие линкеры, известные из уровня техники. Глицин охватывает значительно большее пространство  $\phi$ - $\psi$ , даже по сравнению с аланином, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Линкер может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот. Другие иллюстративные линкеры включают, не ограничиваясь перечисленным, следующие аминокислотные последовательности: DGGGS (SEQ ID NO: 27); TGEKP (SEQ ID NO: 28) (см., например, Liu et al., PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO: 29) (Pomerantz et al. 1995, см. выше); (GGGS)<sub>n</sub>, где n = 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 30) (Kim et al., PNAS 93, 1156-1160 (1996.)); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 31) (Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 32) (Bird et al., 1988, Science 242:423-426), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 33); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 34); LRQKDGGSERP (SEQ ID NO: 35); LRQKD(GGGS)<sub>2</sub> ERP (SEQ ID NO: 36). В качестве альтернативы, гибкие линкеры могут быть рационально сконструированы с использованием компьютерной программы, способной моделировать как сайты связывания ДНК, так и сами пептиды (Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994), или методами фагового дисплея. В частных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 37) (Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).

В частных вариантах осуществления слитый полипептид содержит минимально мураинизованную  $\alpha$ -цепь TCR, полипептидный линкер и минимально мураинизованную  $\beta$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3', минимально мураинизованную  $\alpha$ -цепь TCR, полипептидный линкер и минимально мураинизованную  $\beta$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит

гидрофобные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3', минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, полипептидный линкер и минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены.

В частных вариантах осуществления слитый полипептид содержит минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую 4 аминокислотные замены в константной области TCR $\alpha$ , полипептидный линкер и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, содержащую 5 аминокислотных замен в константной области TCR $\beta$ , где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR дополнительно содержит три гидрофобные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит, в направлении от 5' к 3', минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую 4 аминокислотные замены в константной области TCR $\alpha$ , полипептидный линкер и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, содержащую 5 аминокислотных замен в константной области TCR $\beta$ , где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR дополнительно содержит три гидрофобные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3', минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, содержащую 5 аминокислотных замен в константной области TCR $\beta$ , полипептидный линкер и минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую 4 аминокислотные замены в константной области TCR $\alpha$ , где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR дополнительно содержит три гидрофобные аминокислотные замены.

В частных вариантах осуществления слитый полипептид содержит минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR (*например*, SEQ ID NOs: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 и 25), содержащую следующие аминокислотные замены для минимальной муриназации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена TCR $\alpha$ , полипептидный линкер и  $\beta$ -цепь TCR (*например*, SEQ ID NOs: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 и 26), которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муриназации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит, в направлении от 5' к 3',  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муриназации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена TCR $\alpha$ , полипептидный линкер и  $\beta$ -цепь TCR,

которая содержат константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3',  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, полипептидный линкер и  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена TCR $\alpha$ .

В частных вариантах осуществления слитый полипептид содержит  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119 константного домена TCR $\alpha$ , где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, полипептидный линкер и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит, в направлении от 5' к 3',  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119 константного домена TCR $\alpha$ , где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, полипептидный линкер и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3',  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136, и 139, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на



95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, полипептидный линкер и  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муриназации в положениях 90, 91, 92, и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118, и 119 константного домена TCR $\alpha$ , где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4.

В частных вариантах осуществления слитый полипептид содержит  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муриназации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, полипептидный линкер и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муриназации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит, в направлении от 5' к 3',  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муриназации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, полипептидный линкер и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муриназации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3',  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муриназации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, где

аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, полипептидный линкер и  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной мурализации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой сигнал расщепления полипептида. Иллюстративные примеры сигналов расщепления полипептидов включают сайты распознавания для расщепления полипептидов, такие как сайты расщепления для протеаз, сайты расщепления для нуклеаз (например, сайты распознавания для редких рестриктаз, сайты распознавания для саморасщепляющегося рибозима) и саморасщепляющиеся вирусные олигопептиды (см. deFelipe and Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26).

Подходящие сайты расщепления для протеаз и саморасщепляющиеся пептиды известны специалисту в данной области техники (см., например, в Ryan *et al.*, 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722; Scymczak *et al.* (2004) *Nature Biotech.* 5, 589-594).

Иллюстративные сайты расщепления для протеаз включают, не ограничиваясь перечисленным, сайты расщепления для N1a-протеаз потивируса (например, протеазы вируса гравировки табака), HC-протеаз потивируса, P1 (P35)-протеаз потивируса, N1a-протеаз бимовируса, PНК-2-кодируемых протеаз бимовируса, L-протеаз афтоввируса, 2A-протеаз энтеровируса, 2A-протеаз риновируса, 3C-протеаз пикорнавируса, 24K-протеаз комовируса, 24K-протеаз неповируса, 3C-подобной протеазы RTSV (сферический вирус риса tungro), 3C-подобной протеазы PYVF (вирус желтой пятнистости пастернака), гепарина, тромбина, фактора Ха и энтерокиназы. Из-за высокой точности расщепления сайты расщепления для протеаз TEV (вирус гравировки табака) являются предпочтительными в одном варианте осуществления, например, EXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO: 38), например, ENLYFQG (SEQ ID NO: 39) и ENLYFQS (SEQ ID NO: 40), где X представляет собой любую аминокислоту (расщепление посредством TEV происходит между Q и G или Q и S).

В частных вариантах осуществления сигнал расщепления полипептида представляет собой вирусный саморасщепляющийся пептид или последовательность проскока рибосомы.

Иллюстративные примеры последовательностей проскока рибосомы включают, не ограничиваясь перечисленным, 2A или 2A-подобный сайт, последовательность или домен (Donnelly et al., 2001. J. Gen. Virol. 82:1027-1041). В частном варианте осуществления вирусный пептид 2A представляет собой пептид 2A афтовируса, пептид 2A потивируса или пептид 2A кардиовируса.

В одном варианте осуществления вирусный пептид 2A выбран из группы, состоящей из: пептида 2A вируса ящура (FMDV), пептида 2A вируса ринита лошадей А (ERAV), пептида 2A вируса *Thosea asigna* (TaV), пептида 2A тешовируса свиней-1 (PTV-1), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита.

Иллюстративные примеры сайтов 2A представлены в таблице 1.

**ТАБЛИЦА 1**

SEQ ID NO: 41	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 42	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 43	LLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 44	GSGEGRGSLTTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 45	EGRGSLTTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 46	LLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 47	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 48	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 49	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 50	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 51	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 52	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 53	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 54	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 55	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 56	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 57	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 58	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 59	VTELLYRMKRAETYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
SEQ ID NO: 60	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 61	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO: 62	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
---------------	-----------------------------------

В частных вариантах осуществления слитый полипептид содержит минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR, сигнал расщепления полипептида и минимально муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3', минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR, сигнал расщепления полипептида и минимально муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3', минимально муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, сигнал расщепления полипептида и минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены.

В частных вариантах осуществления слитый полипептид содержит минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую 4 аминокислотные замены в константной области TCR $\alpha$ , сигнал расщепления полипептида и минимально муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, содержащую 5 аминокислотных замен в константной области TCR $\beta$ , где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR дополнительно содержит три гидрофобные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит, в направлении от 5' к 3', минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую 4 аминокислотные замены в константной области TCR $\alpha$ , сигнал расщепления полипептида и минимально муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, содержащую 5 аминокислотных замен в константной области TCR $\beta$ , где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR дополнительно содержит три гидрофобные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3', минимально муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, содержащую 5 аминокислотных замен в константной области TCR $\beta$ , сигнал расщепления полипептида и минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую 4 аминокислотные замены в константной области TCR $\alpha$ , где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR дополнительно содержит три гидрофобные аминокислотные замены.

В частных вариантах осуществления слитый полипептид содержит минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные

аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена TCR $\alpha$ , сигнал расщепления полипептида и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержат константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит, в направлении от 5' к 3',  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена TCR $\alpha$ , сигнал расщепления полипептида и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержат константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3',  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, сигнал расщепления полипептида и  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена TCR $\alpha$ .

В частных вариантах осуществления слитый полипептид содержит  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119 константного домена TCR $\alpha$ , где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, сигнал расщепления полипептида и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит, в направлении от 5' к 3',  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119 константного домена TCR $\alpha$ , где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:

4, сигнал расщепления полипептида и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3',  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136, и 139, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, сигнал расщепления полипептида и  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 90, 91, 92, и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118, и 119 константного домена TCR $\alpha$ , где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4.

В частных вариантах осуществления слитый полипептид содержит  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, сигнал расщепления полипептида и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит, в направлении от 5' к 3',  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной муринизации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, сигнал расщепления полипептида и  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной мурализации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления предложен слитый белок, который содержит, в направлении от 5' к 3',  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной мурализации: E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\beta$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, сигнал расщепления полипептида и  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий следующие аминокислотные замены для минимальной мурализации: P90S, E91D, S92V и S93P, и следующие гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене: S115L, G118V и F119L, константного домена, где аминокислотная последовательность константного домена TCR $\alpha$  по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4.

В частных вариантах осуществления слитый белок содержит сигнал расщепления полипептида, который представляет собой вирусный саморасщепляющийся пептид или последовательность проскока рибосомы.

В частных вариантах осуществления слитый белок содержит сигнал расщепления полипептида, который представляет собой вирусный пептид 2A.

В частных вариантах осуществления слитый белок содержит сигнал расщепления полипептида, который представляет собой пептид 2A афтовируса, пептид 2A потивируса или пептид 2A кардиовируса.

В частных вариантах осуществления слитый белок содержит сигнал расщепления полипептида, который представляет собой вирусный пептид 2A, выбранный из группы, состоящей из: пептида 2A вируса ящура (FMDV), пептида 2A вируса ринита лошадей A (ERAV), пептида 2A вируса *Thosea asigna* (TaV), пептида 2A тешовируса свиней-1 (PTV-1), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита.

## **F. Полинуклеотиды**

В частных вариантах осуществления предложены один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более полипептидов TCR, полипептидов  $\alpha$ -цепи

TCR, полипептидов  $\beta$ -цепи TCR, слитых полипептидов TCR и их фрагменты. В контексте настоящего документа термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» относятся к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК), рибонуклеиновой кислоте (РНК) и гибридам ДНК/РНК. Полинуклеотиды могут быть моноцистронными или полицистронными, одноцепочечными или двухцепочечными и рекомбинантными, синтетическими или выделенными. Полинуклеотиды включают, не ограничиваясь перечисленным, пре-матричную РНК (пре-мРНК), матричную РНК (мРНК), РНК, геномную ДНК (гДНК), ПЦР-амплифицированную ДНК, комплементарную ДНК (кДНК), синтетическую ДНК или рекомбинантную ДНК. Полинуклеотиды относятся к полимерной форме нуклеотидов, имеющей длину по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 10000 или по меньшей мере 15000, или более, нуклеотидов - рибонуклеотидов либо нуклеотидов, или модифицированной формы любого из указанных типов нуклеотидов, а также любую промежуточную длину. Нетрудно понять, что «промежуточная длина» в данном контексте означает любую длину между указанными значениями, например, 6, 7, 8, 9 и т. д., 101, 102, 103 и т. д.; 151, 152, 153 и т. д.; 201, 202, 203 и т. д. В частных вариантах осуществления полинуклеотиды или варианты обладают по меньшей мере или приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью референсной последовательности.

Иллюстративные примеры полинуклеотидов включают, не ограничиваясь перечисленным, полинуклеотиды, кодирующие SEQ ID NO: 4-26.

В контексте настоящего документа термин «выделенный полинуклеотид» относится к полинуклеотиду, который был очищен от последовательностей, которые фланкируют его в естественном состоянии, например, фрагменту ДНК, который был удален из последовательностей, которые обычно примыкают к указанному фрагменту. В частных вариантах осуществления «выделенный полинуклеотид» также относится к комплементарной ДНК (кДНК), рекомбинантной ДНК или другому полинуклеотиду, который не существует в природе и который был получен человеком. В частных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид представляет собой синтетический полинуклеотид, рекомбинантный полинуклеотид, полусинтетический полинуклеотид или полинуклеотид, полученный или происходящий из рекомбинантного источника.



В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит мРНК, кодирующую полипептид, предусмотренный в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления мРНК содержит кэп, один или более нуклеотидов и поли(А)-хвост.

В частных вариантах осуществления полинуклеотиды могут быть кодон-оптимизированными. В контексте настоящего документа термин «кодон-оптимизированный» относится к замене кодонов в полинуклеотиде, кодирующем полипептид, с целью повышения экспрессии, стабильности и/или активности полипептида. Факторы, влияющие на оптимизацию кодонов, включают, не ограничиваясь перечисленным, один или более из: (i) вариации предпочтения кодонов между двумя или более организмами или генами или синтетически сконструированными таблицами предпочтения, (ii) вариации степени предпочтения кодонов в организме, гене, или наборе генов, (iii) систематической вариации кодонов, включая контекст, (iv) вариации кодонов в соответствии с их декодирующими тРНК, (v) вариации кодонов в соответствии с % GC, либо в целом, либо в одном положении триплета, (vi) вариации степени сходства с референсной последовательностью, например, встречающейся в природе последовательностью, (vii) вариации порогового значения частоты кодонов, (viii) структурных свойств мРНК, транскрибированных с последовательности ДНК, (ix) известной информации о функции последовательностей ДНК, на которых должно основываться конструирование набора кодонных замен, (x) систематической вариации наборов кодонов для каждой аминокислоты, и/или (xi) изолированного удаления ложных сайтов инициации трансляции.

В контексте настоящего документа термины «полинуклеотидный вариант» и «вариант», и т. п., относятся к полинуклеотидам, демонстрирующим значительную идентичность последовательности референсной полинуклеотидной последовательности или полинуклеотидам, которые гибридизируются с референсной последовательностью в жестких условиях, которые определены ниже. Эти термины включают полинуклеотиды, в которых один или более нуклеотидов были добавлены, удалены или заменены нуклеотидами, отличными от референсного полинуклеотида. В связи с этим в данной области техники хорошо известно, что определенные изменения, включающие мутации, добавления, делеции и замены, могут быть внесены в референсный полинуклеотид, при этом измененный полинуклеотид будет сохранять биологическую функцию или активность референсного полинуклеотида.

Полинуклеотидные варианты включают полинуклеотидные фрагменты, которые кодируют биологически активные полипептидные фрагменты или варианты. В контексте настоящего документа термин «полинуклеотидный фрагмент» относится к

полинуклеотидному фрагменту длиной по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 или более нуклеотидов, который кодирует полипептидный вариант, который сохраняет по меньшей мере 100%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 10%, или по меньшей мере 5% активности встречающегося в природе полипептида. Полинуклеотидные фрагменты относятся к полинуклеотиду, который кодирует полипептид, который имеет аминоконцевую делецию, карбоксиконцевую делецию и/или внутреннюю делецию или замену одной или более аминокислот встречающегося в природе или полученного рекомбинантным путем полипептида.

Формулировки «идентичность последовательностей» или, например, содержащие «последовательность, на 50% идентичную», в контексте настоящего документа относятся к той степени, в которой последовательности идентичны по нуклеотидам или по аминокислотам в пределах окна сравнения. Таким образом, «процент идентичности последовательностей» можно рассчитать путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в пределах окна сравнения, определения количества положений, в которых в обеих последовательностях присутствует идентичное основание нуклеиновой кислоты (например, A, T, C, G, I) или идентичный аминокислотный остаток (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met), с получением количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения (т. е. размер окна), и умножения результата на 100, с получением процента идентичности последовательностей. Включены нуклеотиды и полипептиды, обладающие по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 86%, 97%, 98% или 99% идентичностью любой из референсных последовательностей, описанных в настоящем документе, как правило, где полипептидный вариант сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность референсного полипептида.

Термины, используемые для описания отношений последовательностей между двумя или более полинуклеотидами или полипептидами, включают «референсную последовательность», «окно сравнения», «идентичность последовательностей», «процент

идентичности последовательностей» и «по существу идентичность». Длина «референсной последовательности» составляет по меньшей мере 12, но часто 15-18 и часто по меньшей мере 25 мономерных звеньев, включая нуклеотиды и аминокислотные остатки.

Поскольку каждый из двух полинуклеотидов может содержать (1) последовательность (т. е. только часть полной полинуклеотидной последовательности), схожую в двух полинуклеотидах, и (2) последовательность, которая отличается в двух полинуклеотидах, сравнения последовательностей между двумя (или более) полинуклеотидами обычно осуществляют путем сравнения последовательностей этих двух полинуклеотидов в пределах «окна сравнения» для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей. «Окно сравнения» относится к концептуальному сегменту, состоящему из по меньшей мере 6 смежных положений, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 100, чаще от приблизительно 100 до приблизительно 150, в котором последовательность сравнивают с референсной последовательностью с таким же количеством смежных положений после оптимального выравнивания двух указанных последовательностей. Окно сравнения может содержать добавления или делеции (т. е. гэпы) в количестве приблизительно 20% или менее по сравнению с референсной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух указанных последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна сравнения можно проводить с помощью компьютеризированных реализаций алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения для генетики Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Висконсин, США) или путем проверки и наилучшего выравнивания (т. е. в результате которого достигается наивысшая процентная гомология в пределах окна сравнения), полученного любым из различных выбранных методов. Также можно упомянуть семейство программ BLAST, как, например, раскрыто Altschul *et al.*, 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389. Подробное обсуждение анализа последовательностей можно найти в Unit 19.3 of Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, глава 15.

Термины, которые описывают ориентацию полинуклеотидов, включают: 5' (обычно конец полинуклеотида, имеющий свободную фосфатную группу) и 3' (обычно конец полинуклеотида, имеющий свободную гидроксильную (ОН) группу).

Полинуклеотидные последовательности могут быть аннотированы в направлении от 5' к 3' или в направлении от 3' к 5'. Для ДНК и мРНК цепь с направлением от 5' к 3' называют «смысловой», «положительной» или «кодирующей» цепью, потому что ее последовательность идентична последовательности пре-матричной (пре-мРНК) [за

исключением урацила (U) в РНК вместо тимина (T) в ДНК]. Для ДНК и мРНК комплементарную цепь с направлением от 3' к 5', которая представляет собой цепь, транскрибируемую РНК-полимеразой, называют «матричной», «антисмысловой», «отрицательной» или «некодирующей» цепью. В контексте настоящего документа термин «обратная ориентация» относится к последовательности с направлением от 5' к 3', записанной в направлении от 3' к 5', или последовательности с направлением от 3' к 5', записанной в направлении от 5' к 3'.

Более того, специалистам в данной области будет ясно, что в результате вырожденности генетического кода существует множество нуклеотидных последовательностей, которые кодируют полипептид или его фрагмент, описанные в настоящем документе. Некоторые из этих полинуклеотидов обладают минимальной гомологией нуклеотидной последовательности любого нативного гена. Тем не менее, полинуклеотиды, которые варьируются из-за различий в использовании кодонов, специально рассматриваются в частных вариантах осуществления, например, полинуклеотиды, которые оптимизированы для выбора кодонов человека и/или приматов. Кроме того, можно также использовать аллели генов, содержащих полинуклеотидные последовательности, предложенные в настоящем документе. Аллели представляют собой эндогенные гены, изменяемые в результате одной или более мутаций, таких как делеции, добавления и/или замены нуклеотидов.

Термин «кассета нуклеиновой кислоты» или «кассета экспрессии» в контексте настоящего документа относится к генетическим последовательностям внутри вектора, которые могут экспрессировать РНК, а затем полипептид. В одном варианте осуществления кассета нуклеиновой кислоты содержит представляющий интерес ген(-ы), например, представляющий интерес полинуклеотид(-ы). В другом варианте осуществления кассета нуклеиновой кислоты содержит одну или более последовательностей контроля экспрессии, например, промотор, энхансер, последовательность поли(А) и представляющий интерес ген(-ы), например, представляющий интерес полинуклеотид(-ы). Векторы могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, или более кассет нуклеиновой кислоты. Кассета нуклеиновой кислоты позиционно и последовательно ориентирована в векторе таким образом, что нуклеиновая кислота в кассете может быть транскрибирована в РНК и при необходимости транслирована в белок или полипептид, может подвергаться соответствующим посттрансляционным модификациям, необходимым для активности в трансформированной клетке, и транслонироваться в соответствующий компартмент для биологической активности путем нацеливания на соответствующие внутриклеточные компартменты или секретиции во внеклеточные компартменты. Предпочтительно, чтобы 3'- и 5'-концы кассеты были

адаптированы для легкой вставки в вектор, например, чтобы она имела сайты для рестрикционных эндонуклеаз на каждом конце. В предпочтительном варианте осуществления кассета нуклеиновой кислоты кодирует одну или более цепей TCR. Кассета может быть извлечена и вставлена в плазмиду или вирусный вектор в виде единого целого.

Полинуклеотиды включают представляющий интерес полинуклеотид(-ы). В контексте настоящего документа термин «представляющий интерес полинуклеотид» относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, вариант полипептида или слитый полипептид. Вектор может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 представляющих интерес полинуклеотидов. В отдельных вариантах осуществления представляющий интерес полинуклеотид кодирует полипептид, который обеспечивает терапевтический эффект при лечении или предупреждении заболевания или расстройства. Представляющие интерес полинуклеотиды и кодируемые ими полипептиды включают как полинуклеотиды, которые кодируют полипептиды дикого типа, так и их функциональные варианты и фрагменты. В частных вариантах осуществления функциональный вариант обладает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью соответствующей последовательности референсного полинуклеотида или полипептида дикого типа. В отдельных вариантах осуществления функциональный вариант или фрагмент имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% биологической активности соответствующего полипептида дикого типа.

Полинуклеотиды, предусмотренные в настоящем документе, независимо от длины самой кодирующей последовательности, могут быть объединены с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы и/или энхансеры, нетранслируемые области (UTR), сигнальные последовательности, последовательности Козак, сигналы полиаденилирования, дополнительные сайты для рестриктаз, несколько сайтов клонирования, участки внутренней посадки рибосомы (IRES), сайты распознавания для рекомбиназ (например, сайты LoxP, FRT и Att), стоп-кодона, сигналы терминации транскрипции и полинуклеотиды, кодирующие саморасщепляющиеся полипептиды, эпитопные метки, как раскрыто в других местах настоящего документа или как известно из уровня техники, таким образом, что их общая длина может значительно варьировать. Следовательно, предусмотрено, что в частных вариантах осуществления может быть использован полинуклеотидный фрагмент практически любой длины, при этом общая длина предпочтительно ограничивается легкостью получения и применения в предполагаемом протоколе рекомбинантной ДНК.

Полинуклеотиды могут быть получены, подвергнуты манипуляциям и/или экспрессированы с применением любой из ряда хорошо зарекомендовавших себя методик, известных и доступных в данной области техники. Для экспрессии необходимого полипептида нуклеотидную последовательность, кодирующую этот полипептид, можно вставить в соответствующий вектор.

Иллюстративные примеры векторов включают, не ограничиваясь перечисленным, плазмиду, автономно реплицирующиеся последовательности и транспозируемые элементы, например, piggyBac, Sleeping Beauty, Mos1, Tc1/mariner, Tol2, mini-Tol2, Tc3, MuA, Himar I, Frog Prince и их производные.

Дополнительные иллюстративные примеры векторов включают, не ограничиваясь перечисленным, плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как искусственная хромосома дрожжей (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома на основе P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных.

Иллюстративные примеры вирусов, пригодных в качестве векторов, включают, не ограничиваясь перечисленным, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (например, SV40).

Иллюстративные примеры векторов экспрессии включают, не ограничиваясь перечисленным, векторы pCIneo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ и pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) для опосредованного лентивирусами переноса генов и экспрессии в клетках млекопитающих. В частных вариантах осуществления кодирующие последовательности полипептидов, раскрытых в настоящем документе, могут быть лигированы в такие векторы экспрессии для экспрессии указанных полипептидов в клетках млекопитающих.

В частных вариантах осуществления вектор представляет собой эписомный вектор или вектор, который поддерживается внехромосомно. В контексте настоящего документа термин «эписомный» относится к вектору, который способен реплицироваться без интеграции в хромосомную ДНК хозяина и без постепенной потери из делящейся клетки-хозяина, что также означает, что указанный вектор реплицируется внехромосомно или эписомально.

«Контрольные элементы» или «регуляторные последовательности», присутствующие в векторе экспрессии, представляют собой нетранслируемые области вектора — точку начала репликации, кассеты селекции, промоторы, энхансеры, сигналы инициации трансляции (последовательность Шайна-Дальгарно или последовательность

Козак), интроны, последовательность полиаденилирования, 5'- и 3'-нетранслируемые области, — которые взаимодействуют с клеточными белками хозяина для осуществления транскрипции и трансляции. Такие элементы могут варьироваться по силе и специфичности. В зависимости от используемой векторной системы и хозяина можно использовать любое количество подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая универсальные промоторы и индуцибельные промоторы.

В частных вариантах осуществления векторы включают, не ограничиваясь перечисленным, векторы экспрессии и вирусные векторы и будут включать экзогенные, эндогенные или гетерологичные контрольные последовательности, такие как промоторы и/или энхансеры. «Эндогенная» контрольная последовательность представляет собой последовательность, которая в природе связана с данным геном в геноме. «Экзогенная» контрольная последовательность представляет собой последовательность, которую размещают непосредственно рядом с геном с помощью генетической манипуляции (т. е. молекулярно-биологических методик), так что транскрипция этого гена управляется связанным энхансером/промотором. «Гетерологичная» контрольная последовательность представляет собой экзогенную последовательность, которая происходит от вида, отличного от вида, к которому относится клетка, подвергаемая генетической манипуляции.

В контексте настоящего документа термин «промотор» относится к сайту распознавания полинуклеотида (ДНК или РНК), с которым связывается РНК-полимераза. РНК-полимераза инициирует и осуществляет транскрипцию полинуклеотидов, функционально связанных с промотором. В частных вариантах осуществления промоторы, функционирующие в клетках млекопитающих, содержат область, богатую АТ, расположенную примерно на расстоянии 25-30 оснований против хода транскрипции от сайта, где инициируется транскрипция, и/или другую последовательность, расположенную на 70-80 оснований против хода транскрипции от начала транскрипции - область CNCAAT, где N может представлять собой любой нуклеотид.

Термин «энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать усиленную транскрипцию, и в некоторых случаях может функционировать независимо от его ориентации относительно другой контрольной последовательности. Энхансер может функционировать совместно или аддитивно с промоторами и/или другими энхансерными элементами. Термин «промотор/энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать как промоторные, так и энхансерные функции.

Термин «функционально связанный» относится к размещению в непосредственной близости, при котором описанные компоненты находятся в отношении, позволяющем им функционировать их предполагаемым образом. В одном варианте осуществления данный термин относится к функциональной связи между последовательностью контроля экспрессии нуклеиновой кислоты (такой как промотор и/или энхансер) и второй полинуклеотидной последовательностью, например, представляющим интерес полинуклеотидом, где последовательность контроля экспрессии управляет транскрипцией нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

В контексте настоящего документа термин «последовательность конститутивного контроля экспрессии» относится к промотору, энхансеру или промотору/энхансеру, который постоянно или непрерывно обеспечивает транскрипцию функционально связанной последовательности. Последовательность конститутивного контроля экспрессии может представлять собой «универсальный» промотор, энхансер или промотор/энхансер, который обеспечивает возможность экспрессии в широком спектре типов клеток и тканей, или «клеточноспецифический», «специфический для типа клеток», «специфический для линии клеток» или «тканеспецифический» промотор, или промотор/энхансер, который обеспечивает возможность экспрессии в ограниченном ряде типов клеток и тканей, соответственно.

Иллюстративные универсальные последовательности контроля экспрессии, подходящие для применения в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, немедленно ранний промотор цитомегаловируса (CMV), вирусный промотор вируса обезьян 40 (SV40) (например, ранний или поздний), промотор LTR вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), LTR вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса простого герпеса (HSV) (тимидинкиназы), промоторы H5, P7.5 и P11 вируса осповакцины, промотор фактора удлинения 1-альфа (EF1a), фактор раннего ростового ответа 1 (EGR1), ферритин H (FerH), ферритин L (FerL), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH), фактор инициации трансляции эукариот 4A1 (EIF4A1), белок теплового шока 570 кДа (HSPA5), член 1 семейства белков теплового шока 90 кДа бета (HSP90B1), белок теплового шока 70 кДа (HSP70),  $\beta$ -кинезин ( $\beta$ -KIN), локус ROSA 26 человека (Grigons *et al.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477 - 1482 (2007)), промотор убиквитина С (UBC), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), энхансер цитомегаловируса/промотор куриного  $\beta$ -актина (CAG), промотор  $\beta$ -актина и энхансер вируса миелолифферативной саркомы, промотор U3 с удаленным участком отрицательного контроля, с сайтом связывания праймера, замещенным на



последовательность из dl587rev (MND) (Haas *et al. Journal of Virology*. 2003;77(17): 9439-9450).

В одном варианте осуществления вектор содержит промотор MNDU3.

В одном варианте осуществления вектор содержит промотор EF1a, содержащий первый интрон гена EF1a человека.

В одном варианте осуществления вектор содержит промотор EF1a, в котором отсутствует первый интрон гена EF1a человека.

В контексте настоящего документа термин «условная экспрессия» может относиться к любому типу условной экспрессии, включая, не ограничиваясь перечисленным, индуцибельную экспрессию; репресслируемую экспрессию; экспрессию в клетках или тканях, имеющих определенное физиологическое, биологическое или патологическое состояние, и т. д. Это определение не подразумевает исключения специфической для типа клеток или тканеспецифической экспрессии. В отдельных вариантах осуществления предложена условная экспрессия представляющего интерес полинуклеотида, например, экспрессию контролируют путем подвергания клетки, ткани, организма и т. д. воздействию или условию, которые вызывают экспрессию полинуклеотида или вызывают повышение или снижение экспрессии полинуклеотида, кодируемого представляющим интерес полинуклеотидом.

Иллюстративные примеры индуцибельных промоторов/систем включают, не ограничиваясь перечисленным, индуцируемые стероидами промоторы, такие как промоторы для генов, кодирующих глюкокортикоидные или эстрогеновые рецепторы (индуцируемые введением соответствующего гормона), промотор металлотронеина (индуцируемый введением различных тяжелых металлов), промотор MX-1 (индуцируемый интерфероном), мифепристон-регулируемая система «GenSwitch» (Sirin *et al.*, 2003, *Gene*, 323:67), индуцируемый куматом переключатель генов (WO 2002/088346), тетрациклин-зависимые регуляторные системы, и т. д.

В контексте настоящего документа термин «участок внутренней посадки рибосомы» или «IRES» относится к элементу, который способствует прямой внутренней посадке рибосомы на инициаторный кодон, такой как ATG, цистрона (область, кодирующая белок), тем самым приводя к кэп-независимой трансляции гена. См., например, Jackson *et al.*, 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83) и Jackson and Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000. В частных вариантах осуществления векторы включают один или более представляющих интерес полинуклеотидов, которые кодируют один или более полипептидов. В частных вариантах осуществления для достижения эффективной трансляции каждого из множества полипептидов полинуклеотидные последовательности

могут быть разделены одной или более последовательностями IRES или полинуклеотидными последовательностями, кодирующими саморасщепляющиеся полипептиды. В одном варианте осуществления IRES, используемый в полинуклеотидах, предусмотренных в настоящем документе, представляет собой IRES EMCV.

В контексте настоящего документа термин «последовательность Козак» относится к короткой нуклеотидной последовательности, которая значительно облегчает начальное связывание мРНК с малой субъединицей рибосомы и увеличивает трансляцию.

Консенсусная последовательность Козак представляет собой (GCC)RCCATGG (SEQ ID NO:63), где R представляет собой пурин (A или G) (Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92, и Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48). В частных вариантах осуществления векторы содержат полинуклеотиды, которые имеют консенсусную последовательность Козак и которые кодируют требуемый полипептид, например, TCR.

Элементы, управляющие эффективной терминацией и полиаденилированием гетерологичных транскриптов нуклеиновых кислот, повышают экспрессию гетерологичных генов. Сигналы терминации транскрипции обычно находятся по ходу транскрипции от сигнала полиаденилирования. В частных вариантах осуществления векторы содержат последовательность полиаденилирования с 3'-конца от полинуклеотида, кодирующего полипептид, подлежащий экспрессии. Термин «полиА-сайт» или «полиА-последовательность» в контексте настоящего документа означает последовательность ДНК, которая управляет как терминацией, так и полиаденилированием транскрипта растущей цепи РНК с помощью РНК-полимеразы II. Последовательности полиаденилирования могут способствовать стабильности мРНК путем добавления полиА-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности и, таким образом, способствовать повышению эффективности трансляции. Расщепление и полиаденилирование управляется поли(А)-последовательностью в РНК. Коровая поли(А)-последовательность для пре-мРНК млекопитающих содержит два элемента распознавания, фланкирующие сайт расщепления и полиаденилирования. Как правило, почти инвариантный гексамер AAUAAA состоит из 20-50 нуклеотидов, расположенных против хода транскрипции от более переменного элемента, богатого остатками U или GU. Расщепление растущей цепи транскрипта происходит между этими двумя элементами и связано с добавлением до 250 аденозинов к 5'-продукту расщепления. В частных вариантах осуществления коровая поли(А)-последовательность представляет собой идеальную полиА-последовательность (например, AATAAA, ATATAA, AGATAA). В частных вариантах осуществления поли(А)-последовательность представляет собой полиА-последовательность SV40, полиА-последовательность бычьего гормона роста (BGHPA),

полиА-последовательность  $\beta$ -глобина кролика ( $\beta$ ggrA), ее варианты или другую подходящую гетерологичную или эндогенную полиА-последовательность, известную из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления в полинуклеотиде или клетке, несущей полинуклеотид, используется суицидальный ген, включая индуцибельный суицидальный ген, для снижения риска прямой токсичности и/или неконтролируемой пролиферации. В конкретных аспектах суицидальный ген не является иммуногенным для хозяина, несущего полинуклеотид или клетку. Отдельным примером суицидального гена, который может быть использован, является каспаза-9, каспаза-8 или цитозиндеаминаза. Каспаза-9 может быть активирована с применением специфического химического индуктора димеризации (CID).

В частных вариантах осуществления один или более полинуклеотидов, кодирующих  $\alpha$ -цепь TCR и  $\beta$ -цепь TCR, вводят в клетку (например, иммунную эффекторную клетку) с помощью невирусных или вирусных векторов. Термин «вектор» используется в настоящем документе для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Перенесенная нуклеиновая кислота обычно связана с молекулой нуклеиновой кислоты вектора, например, вставлена в нее. Вектор может включать последовательности, которые управляют автономной репликацией в клетке, или может включать последовательности, достаточные для обеспечения интеграции в ДНК клетки-хозяина. В частных вариантах осуществления для доставки одного или более полинуклеотидов, предусмотренных в настоящем документе, в Т-клетку, применяют невирусные векторы.

Иллюстративные примеры невирусных векторов включают, не ограничиваясь перечисленным, мРНК, плазмиды (например, ДНК-плазмиды или РНК-плазмиды), транспозоны, космиды и бактериальные искусственные хромосомы.

Иллюстративные способы невирусной доставки полинуклеотидов, предусмотренных в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, электропорацию, сонопорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, наночастицы, конъюгаты поликатионов или липидов с нуклеиновыми кислотами, голую ДНК, искусственные вирионы, перенос, опосредованный ДЭАЭ-декстраном, генную пушку и тепловой шок.

Иллюстративные примеры систем доставки полинуклеотидов, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, предусмотренных в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, системы от Amaha Biosystems, Maxcyte, Inc., BTX Molecular Delivery Systems и Copernicus Therapeutics Inc. Реагенты для липофекции доступны на рынке (например, Transfectam<sup>TM</sup> и Lipofectin<sup>TM</sup>). В

литературе описаны катионные и нейтральные липиды, которые подходят для эффективной рецептор-распознающей липофекции полинуклеотидов. См., например, Liu *et al.* (2003) *Gene Therapy*. 10:180–187; и Balazs *et al.* (2011) *Journal of Drug Delivery*. 2011:1–12. В частных вариантах осуществления также предусмотрена нацеленная с помощью антител доставка на основе неживых наноклеток, полученных из бактерий.

В различных вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой мРНК, которую вводят в клетку с целью временной экспрессии требуемого полипептида. В контексте настоящего документа термин «временный» относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение нескольких часов, дней или недель, где период экспрессии меньше периода экспрессии полинуклеотида, если он интегрирован в геном или содержится в стабильном плазмидном репликоне в клетке.

В частных вариантах осуществления для доставки одного или более полинуклеотидов, предусмотренных в настоящем документе, в Т-клетку применяют вирусные векторы.

Иллюстративные примеры векторных систем на основе вирусов, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, предусмотренных в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), ретровируса (в том числе лентивируса), вируса простого герпеса, аденовируса и вируса осповакцины.

В частных вариантах осуществления полицистронный полинуклеотид, кодирующий TCR, содержащий  $\alpha$ -цепь TCR и  $\beta$ -цепь TCR, вводят в клетку с помощью невирусного или вирусного вектора. В частных вариантах осуществления предложен полицистронный полинуклеотид, кодирующий слитый белок, кодирующий TCR, предусмотренный в настоящем документе, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , сигнал расщепления полипептида и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR.

В частных вариантах осуществления полицистронный полинуклеотид, кодирующий TCR, содержащий  $\alpha$ -цепь TCR и  $\beta$ -цепь TCR, вводят в клетку с помощью невирусного или вирусного вектора. В частных вариантах осуществления предложен полицистронный полинуклеотид, кодирующий слитый белок, кодирующий TCR, предусмотренный в настоящем документе, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , IRES и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR.

В частных вариантах осуществления полицистронный полинуклеотид содержит  $\alpha$ -цепь TCR, расположенную с 5'-конца от  $\beta$ -цепи TCR. В других вариантах осуществления

полистронный полинуклеотид содержит  $\alpha$ -цепь TCR, расположенную с 3'-конца от  $\beta$ -цепи TCR.

### **G. ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ**

В различных вариантах осуществления предложены клетки, генетически модифицированные для экспрессии TCR, предусмотренного в настоящем документе, содержащего минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, для применения для лечения рака. В различных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки, генетически модифицированные для экспрессии TCR, предусмотренного в настоящем документе, содержащего минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, применяют для получения или производства лекарственного средства для лечения рака.

В частных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TCR, предусмотренный в настоящем документе, вводят в иммунные эффекторные клетки таким образом, чтобы обеспечить экспрессию TCR, предусмотренного в настоящем документе, и перенаправление иммунных эффекторных клеток на целевые клетки, экспрессирующие целевой антиген. В частных вариантах осуществления один или более полинуклеотидов, кодирующих TCR, предусмотренный в настоящем документе, содержащий минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, вводят в одну или более иммунных эффекторных клеток. В частных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий слитый белок, содержащий минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , полипептидный линкер, например, сигнал расщепления полипептида, и минимальную муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, вводят в одну или более иммунных эффекторных клеток.

«Иммунная эффекторная клетка» представляет собой любую клетку иммунной системы, которая имеет одну или более эффекторных функций (например, цитотоксическую активность уничтожения клеток, секрецию цитокинов, индукцию ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность) и/или CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность)). Иллюстративные иммунные эффекторные клетки, предусмотренные в настоящем документе, представляют собой Т-лимфоциты, включая, не ограничиваясь перечисленным, цитотоксические Т-клетки (CTL; CD8<sup>+</sup> Т-клетки), TIL и

хелперные Т-клетки (HTL; CD4<sup>+</sup> Т-клетки). В частном варианте осуществления клетки включают αβ-Т-клетки. В частном варианте осуществления клетки включают γδ-Т-клетки, модифицированные для экспрессии αβ-TCR. В одном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки включают естественные киллерные клетки (NK). В одном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки включают естественные киллерные Т-клетки (NKT).

Иммунные эффекторные клетки могут быть аутологичными/аутогенными («собственными») или неаутологичными («чужеродными», например, аллогенными, сингенными или ксеногенными). «Аутологичный» в контексте настоящего документа относится к клеткам от того же субъекта. «Аллогенный» в контексте настоящего документа относится к клеткам того же биологического вида, которые генетически отличаются от сравниваемой клетки. «Сингенный» в контексте настоящего документа относится к клеткам от другого субъекта, генетически идентичным со сравниваемой клеткой. «Ксеногенный» в контексте настоящего документа относится к клеткам биологического вида, отличного от сравниваемой клетки. В предпочтительных вариантах осуществления клетки являются аутологичными.

Иллюстративные иммунные эффекторные клетки, применяемые с TCR, предусмотренными в частных вариантах осуществления, включают Т-лимфоциты. Термины «Т-клетка» или «Т-лимфоцит» являются принятыми в данной области техники и подразумевают включение тимоцитов, незрелых Т-лимфоцитов, зрелых Т-лимфоцитов, покоящихся Т-лимфоцитов или активированных Т-лимфоцитов. Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (Th), например, Т-хелпера 1 (Th1) или Т-хелпера 2 (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; CD4<sup>+</sup> Т-клетку), CD4<sup>+</sup> Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (CTL; CD8<sup>+</sup> Т-клетку), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Т-клетку или любую другую субпопуляцию Т-клеток. Другие иллюстративные популяции Т-клеток, подходящих для применения в частных вариантах осуществления, включают наивные Т-клетки (T<sub>N</sub>), стволовые Т-клетки памяти (T<sub>SCM</sub>), Т-клетки центральной памяти (T<sub>CM</sub>), Т-клетки эффекторной памяти (T<sub>EM</sub>) и эффекторные Т-клетки (T<sub>EFF</sub>).

Как будет ясно специалисту в данной области техники, другие клетки также можно применять в качестве иммунных эффекторных клеток с TCR, предусмотренными в настоящем документе. В частности, иммунные эффекторные клетки также включают NK-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы и макрофаги. Иммунные эффекторные клетки также включают предшественников эффекторных клеток, где такие клетки-предшественники могут быть индуцированы для дифференцировки в иммунные эффекторные клетки *in vivo*

или *in vitro*. Таким образом, в частных вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка включает предшественников иммунных эффекторных клеток, таких как гемопоэтические стволовые клетки (HSC), содержащиеся в популяции CD34<sup>+</sup> клеток, полученных из пуповинной крови, костного мозга или мобилизованной периферической крови, которые при введении в организм субъекта дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, или которые могут быть индуцированы *in vitro* для дифференцировки в зрелые иммунные эффекторные клетки.

Термин «CD34<sup>+</sup> клетка» в контексте настоящего документа относится к клетке, экспрессирующей белок CD34 на своей клеточной поверхности. «CD34» в контексте настоящего документа относится к гликопротеину клеточной поверхности (например, сиаломуциновому белку), который часто выполняет функцию фактора адгезии клеток и участвует во входе Т-клеток в лимфатические узлы. Популяция CD34<sup>+</sup> клеток содержит гемопоэтические стволовые клетки (HSC), которые после введения пациенту дифференцируются и вносят вклад во все гемопоэтические линии, включая Т-клетки, NK-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы и клетки моноцитарно-макрофагальной линии.

Способы получения иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют TCR, предусмотренные в настоящем документе, представлены в частных вариантах осуществления. В одном варианте осуществления способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от индивидуума, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют полицистронный транскрипт, кодирующий TCR, содержащий модифицированную  $\alpha$ -цепь TCR и модифицированную  $\beta$ -цепь TCR, или слитый белок, кодирующий TCR, предусмотренный в настоящем документе, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , полипептидный линкер и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR.

В предпочтительном варианте осуществления способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от индивидуума, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют полицистронный транскрипт, кодирующий TCR, предусмотренный в настоящем документе, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , саморасщепляющийся полипептид 2A и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR. В частных вариантах осуществления трансдуцированные клетки впоследствии культивируют для их размножения перед введением субъекту.

В отдельных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки выделяют от индивидуума и генетически модифицируют без проведения дополнительных

манипуляций *in vitro*. Затем такие клетки могут быть непосредственно повторно введены индивидууму. В дополнительных вариантах осуществления иммунные эффекторныe клетки сначала активируют и стимулируют для пролиферации *in vitro* перед генетической модификацией для экспрессии TCR, предусмотренного в настоящем документе, содержащего минимально муринализованную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , линкер и минимально муринализованную  $\beta$ -цепь TCR. В этой связи иммунные эффекторныe клетки могут быть культивированы до и/или после генетической модификации.

В частных вариантах осуществления перед проведением манипуляции *in vitro* или генетической модификации иммунных эффекторных клеток, описанных в настоящем документе, источник клеток получают от субъекта. В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторныe клетки включают Т-клетки.

В частных вариантах осуществления РВМС могут быть непосредственно генетически модифицированы для экспрессии полицистронного транскрипта, кодирующего TCR, предусмотренный в настоящем документе, содержащий минимально муринализованную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , полипептидный линкер и минимально муринализованную  $\beta$ -цепь TCR, с применением способов, предусмотренных в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления после выделения РВМС Т-лимфоциты дополнительно выделяют и в отдельных вариантах осуществления как цитотоксические, так и хелперные Т-лимфоциты могут быть отсортированы на субпопуляции наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток до или после генетической модификации и/или размножения.

Иммунные эффекторныe клетки, такие как Т-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с помощью известных методов, или иммунные эффекторныe клетки могут быть активированы и размножены (или дифференцированы в случае предшественников) *in vitro* перевод проведением генетической модификации. В частном варианте осуществления иммунные эффекторныe клетки, такие как Т-клетки, активируют и стимулируют для размножения, а затем генетически модифицируют TCR, предусмотренными в настоящем документе (например, трансдуцируют вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полицистронный транскрипт, кодирующий TCR, предусмотренный в настоящем документе, содержащий минимально муринализованную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , полипептидный линкер и минимально муринализованную  $\beta$ -цепь TCR), а затем активируют и размножают *in vitro*. В различных



вариантах осуществления Т-клетки могут быть активированы и размножены до или после проведения генетической модификации с помощью методов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694, 6534055, 6905680, 6692964, 5858358, 6887466, 6905681, 7144575, 7067318, 7172869, 7232566, 7175843, 5883223, 6905874, 6797514, 6867041, и публикации заявки на патент США № 20060121005.

В одном варианте осуществления клетки CD34<sup>+</sup> трансдуцируют конструкцией нуклеиновой кислоты, предусмотренной в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления трансдуцированные CD34<sup>+</sup> клетки дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки *in vivo* после введения субъекту, как правило, субъекту, от которого клетки были первоначально выделены. В другом варианте осуществления CD34<sup>+</sup> клетки могут быть стимулированы *in vitro* до воздействия или после проведения генетической модификации с помощью одного или более из следующих цитокинов: лиганда Flt-3 (FLT3), фактора стволовых клеток (SCF), фактора роста и дифференцировки мегакариоцитов (TPO), IL-3 и IL-6, согласно методам, описанным ранее (Asheuer *et al.*, 2004; Imgen, *et al.*, 2004).

В частных вариантах осуществления популяция модифицированных иммунных эффекторных клеток для лечения рака содержит CAR и CCR, предусмотренные в настоящем документе. Например, популяцию модифицированных иммунных эффекторных клеток получают из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученных от пациента, у которого диагностировано В-клеточное злокачественное новообразование, описанное в настоящем документе (аутологичные доноры). PBMC образуют гетерогенную популяцию Т-лимфоцитов, которая может быть CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>.

## **Н. Композиции и составы**

Композиции, предусмотренные в настоящем документе, могут содержать один или более полипептидов TCR, полипептидов α-цепи TCR, полипептидов β-цепи TCR, слитых полипептидов TCR, полинуклеотидов, содержащих их векторов, генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток и т. д., как предусмотрено в настоящем документе. Композиции включают, не ограничиваясь перечисленным, фармацевтические композиции. В предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит одну или более клеток, модифицированных для экспрессии сконструированного TCR, содержащего минимально муринизированную α-цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCRα, и минимально муринизированную β-цепь TCR, или слитого белка, содержащего TCR, содержащий

минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , полипептидный линкер, например, сигнал расщепления полипептида, и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR. В предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит одну или более клеток, модифицированных для экспрессии слитого белка, содержащего TCR, содержащий минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , саморасщепляющийся полипептид 2A и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR.

«Фармацевтическая композиция» относится к композиции, представленной в фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых растворах для введения в клетку или в организм животного, либо отдельно, либо в комбинации с одним или более других видов терапии. Также понятно, что при необходимости композиции также можно вводить в комбинации с другими средствами, такими как, например, цитокины, факторы роста, гормоны, малые молекулы, химиотерапевтические средства, пролекарства, лекарственные средства, антитела или другие различные фармацевтически активные средства. Практически нет никаких ограничений по другим компонентам, которые также могут быть включены в композиции, при условии, что дополнительные средства не оказывают отрицательного влияния на способность композиции осуществлять предполагаемую терапию. В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество и одну или более клеток, которые были модифицированы для экспрессии сконструированного TCR, содержащего минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, или слитого белка, содержащего TCR, содержащий минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , полипептидный линкер и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR.

Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в настоящем документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые, в рамках объективного медицинского суждения, подходят для применения в контакте с тканями людей и животных, не вызывая при этом чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно разумному соотношению польза/риск.

В контексте настоящего документа «фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество» включает, не ограничиваясь

перечисленным, изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; и любые другие совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

В частных вариантах осуществления композиции содержат количество иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих TCR, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR. В контексте настоящего документа термин «количество» относится к «количеству, эффективному» или «эффективному количеству» генетически модифицированной терапевтической клетки, например, T-клетки, для достижения благоприятного или необходимого профилактического или терапевтического результата, включая результаты клинических исследований.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству генетически модифицированных терапевтических клеток, эффективному для достижения необходимого профилактического результата. Как правило, но необязательно, поскольку профилактическую дозу применяют у субъектов до развития заболевания или на ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество меньше, чем терапевтически эффективное количество.

«Терапевтически эффективное количество» генетически модифицированной терапевтической клетки может варьировать в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность стволовых клеток и клеток-предшественников вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, в котором терапевтически благоприятные эффекты превосходят любые токсические или вредные эффекты вируса или трансдуцированных терапевтических клеток. Термин «терапевтически эффективное количество» включает количество, которое является эффективным для «лечения» субъекта (например, пациента). При указании терапевтического количества точное количество композиций, подлежащих введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени инфицирования или метастазирования и состоянии пациента (субъекта).

Как правило, можно утверждать, что фармацевтическую композицию, содержащую T-клетки, описанные в настоящем документе, можно вводить в дозировке от  $10^6$  до  $10^{13}$  клеток/кг массы тела, предпочтительно от  $10^8$  до  $10^{13}$  клеток/кг массы тела, включая все целые значения в этих диапазонах. Количество клеток будет зависеть от

конечного применения, для которого предназначена композиция, а также типа клеток, включенных в нее. Для применений, предусмотренных в настоящем документе, клетки обычно находятся в объеме, составляющем литр или менее, и который может составлять 500 мл или менее, даже 250 мл или 100 мл, или менее. Следовательно, плотность требуемых клеток, как правило, превышает  $10^6$  клеток/мл и, как правило, составляет более  $10^7$  клеток/мл, как правило,  $10^8$  клеток/мл или более. Клинически значимое количество иммунных клеток может быть распределено на несколько инфузий, которые в совокупности равны или превышают  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  или  $10^{13}$  клеток. Композиции могут быть введены несколько раз в дозировках, находящихся в этих диапазонах. Клетки могут быть аллогенными, сингенными, ксеногенными или аутологичными для пациента, подвергающегося терапии.

Композиции предпочтительно представлены в форме для парентерального введения, например, внутрисосудистого (внутривенного или внутриартериального), внутривнутрибрюшинного или внутримышечного введения.

Жидкие фармацевтические композиции, независимо от того, являются ли они растворами, суспензиями или другой подобной формой, могут включать одно или более из следующего: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера или изотонический раствор хлорида натрия. Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластика. Инъекционная фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

В одном варианте осуществления композиции Т-клеток, предусмотренные в настоящем документе, представлены в фармацевтически приемлемой среде для культивирования клеток. Такие композиции являются подходящими для введения людям. В частных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду.

Бессывороточная среда имеет несколько преимуществ по сравнению со средой, содержащей сыворотку, среди которых упрощенный и более точно определенный состав, сниженная степень загрязнения, устранение потенциального источника инфекционных агентов и более низкая стоимость. В различных вариантах осуществления бессывороточная среда не содержит компонентов животного происхождения и необязательно может не содержать белок. Необязательно среда может содержать биофармацевтически приемлемые рекомбинантные белки. Среда, «не содержащая компонентов животного происхождения», относится к среде, в которой компоненты

получены из источников, отличных от животных. Рекомбинантные белки заменяют нативные белки животных в среде, не содержащей компонентов животного происхождения, и питательные вещества получены из синтетических, растительных или микробиологических источников. Среда, «не содержащая белков», напротив, определена как по существу не содержащая белков.

Иллюстративные примеры бессывороточных сред, применяемых в конкретных композициях, включают, не ограничиваясь перечисленным, QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), StemPro-34 (Life Technologies) и X-VIVO 10.

В одном предпочтительном варианте осуществления композиции, содержащие иммунные эффекторный клетки, предусмотренные в настоящем документе, представлены в растворе, содержащем PlasmaLyte A.

В другом предпочтительном варианте осуществления композиции, содержащие иммунные эффекторный клетки, предусмотренные в настоящем документе, представлены в растворе, содержащем среду для криоконсервации. Например, среду для криоконсервации с криоконсервирующими средствами можно применять для поддержания высокого результата жизнеспособности клеток после размораживания. Иллюстративные примеры сред для криоконсервации, применяемых в конкретных композициях, включают, не ограничиваясь перечисленным, CryoStor CS10, CryoStor CS5 и CryoStor CS2.

В более предпочтительном варианте осуществления композиции, содержащие иммунные эффекторный клетки, предусмотренные в настоящем документе, представлены в растворе, содержащем PlasmaLyte A и CryoStor CS10 в соотношении 50:50.

В частном варианте осуществления композиции содержат эффективное количество иммунных эффекторных клеток с отредактированным геномом, модифицированных для экспрессии TCR, содержащего минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR, отдельно или в комбинации с одним или более терапевтическими средствами. Таким образом, композиции иммунных эффекторных клеток могут быть введены отдельно или в комбинации с другими известными видами противоракового лечения, такими как лучевая терапия, химиотерапия, трансплантация, иммунотерапия, гормональная терапия, фотодинамическая терапия и т. д. Композиции также могут быть введены в комбинации с антибиотиками. Такие терапевтические средства могут быть приняты в данной области техники в качестве стандартного средства лечения конкретного патологического состояния, как описано в настоящем документе, такого как конкретный рак.

Иллюстративные терапевтические средства, предусмотренные в частных вариантах осуществления, включают цитокины, факторы роста, стероиды, НПВП (нестероидные противовоспалительные препараты), DMARD (болезнь-модифицирующие антиревматические препараты), противовоспалительные средства, химиотерапевтические средства, радиотерапевтические средства, терапевтические антитела или другие активные и вспомогательные средства.

В отдельных вариантах осуществления композиции, содержащие иммунные эффекторныe клетки с отредактированным геномом, модифицированные для экспрессии TCR, содержащего минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, могут быть введены в сочетании с любым количеством химиотерапевтических средств.

В частных вариантах осуществления композицию, содержащую иммунный эффектор, модифицированный для экспрессии TCR, содержащего минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, вводят с терапевтическим антителом. Иллюстративные примеры терапевтических антител, подходящих для комбинирования с CAR-модифицированными Т-клетками, предусмотренными в частных вариантах осуществления, включают, не ограничиваясь перечисленным, атезолизумаб, авелумаб, бавитуксимаб, бевацизумаб (авастин), биватузумаб, блинатумомаб, конатумумаб, кризотиниб, даратумумаб, дулиготумаб, дацетузумаб, далотузумаб, дурвалумаб, элотузумаб (HuLuc63), гемтузумаб, ибритумомаб, индатуксимаб, инотузумаб, ипилимумаб, лорвотузумаб, лукатумумаб, милатузумаб, моксетумомаб, ниволумаб, окаратузумаб, офатумумаб, пембролизумаб, ритуксимаб, силтуксимаб, тепротумумаб и ублитуксимаб.

В частных вариантах осуществления разработка составов фармацевтически приемлемых растворов-носителей хорошо известна специалистам в данной области техники, как и разработка подходящих режимов дозирования и лечения для применения конкретных композиций, описанных в настоящем документе, во множестве режимов лечения, включая, например, энтеральные и парентеральные, например, внутрисосудистые, внутривенные, внутриартериальные, внутрикостные, внутрижелудочковые, интрацеребральные, внутричерепные, интраспинальные, интратекальные и интрамедуллярные введение и состав. Специалисту в данной области будет ясно, что частные варианты осуществления, предусмотренные в настоящем документе, могут включать другие составы, такие как составы, которые хорошо известны

в области фармацевтики и описаны, например, в источнике *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, том I и том II. 22<sup>nd</sup> Edition. Edited by Loyd V. Allen Jr. Philadelphia, PA: Pharmaceutical Press; 2012, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

## I. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

Генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие TCR, содержащий минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, предусмотренный в настоящем документе, обеспечивают улучшенные способы адоптивной иммунотерапии для применения для предупреждения, лечения и уменьшения выраженности раковых заболеваний, или для предупреждения, лечения или уменьшения выраженности по меньшей мере одного симптома, связанного с раком.

В одном варианте осуществления предложен вид клеточной терапии, при котором Т-клетки, генетически модифицированные для экспрессии TCR, содержащего минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Клетка, введенная путем инфузии, способна уничтожать клетки, вызывающие заболевание, у реципиента. В отличие от видов антителотерапии, виды Т-клеточной терапии способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к длительной персистенции, которая может обеспечивать устойчивую противораковую терапию.

В одном варианте осуществления Т-клетки, которые экспрессируют TCR, содержащий минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, могут претерпевать устойчивое размножение Т-клеток *in vivo* и могут персистировать в течение длительного периода времени. В другом варианте осуществления Т-клетки, которые экспрессируют TCR, содержащий минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, превращаются в специфические Т-клетки памяти или стволовые Т-клетки памяти, которые могут быть реактивированы для ингибирования любого дополнительного образования или роста опухоли.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторские клетки, которые экспрессируют TCR, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR, предусмотренные в настоящем документе, применяют для лечения солидных опухолей или раковых заболеваний.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторские клетки, предусмотренные в настоящем документе, применяют для лечения солидных опухолей или раковых заболеваний, включающих, не ограничиваясь перечисленным: рак надпочечников, карциному коры надпочечников, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного мозга/ЦНС, рак молочной железы, бронхиальные опухоли, опухоли сердца, рак шейки матки, холангиокарциному, хондросаркому, хордому, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, протоковую карциному *in situ* (DCIS), рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, эстезионеробластому, саркому Юинга, экстракраниальную герминогенную опухоль, внегонадную герминогенную опухоль, рак глаза, рак фаллопиевых труб, фиброзную гистиосаркому, фибросаркому, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидные опухоли желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта (GIST), герминогенные опухоли, глиому, глиобластому, рак головы и шеи, гемангиобластому, гепатоклеточный рак, гипофарингеальный рак, внутриглазную меланому, саркому Капоши, рак почки, рак гортани, лейомиосаркому, рак губы, липосаркому, рак печени, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, карциноидную опухоль легкого, злокачественную мезотелиому, медуллярную карциному, медуллобластому, менангиому, меланому, карциному из клеток Меркеля, карциному средней линии, рак ротовой полости, миксосаркому, миелодиспластический синдром, миелопролиферативные новообразования, рак носовой полости и околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластому, олигодендроглиому, оральный рак, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, опухоли островковых клеток поджелудочной железы, папиллярную карциному, параганглиому, рак паращитовидной железы, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитому, пинеалому, опухоль гипофиза, плеврорёгочную бластому, первичный перитонеальный рак, рак предстательной железы, рак прямой кишки, ретинобластому, почечно-клеточную карциному, рак почечной лоханки и мочеточника, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, карциному слюнных желез, рак кожи, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, рак желудка, карциному



потовых желёз, синовиому, рак яичка, рак горла, рак вилочковой железы, рак щитовидной железы, рак уретры, рак матки, саркому матки, рак влагалища, рак сосудов, рак вульвы, и опухоль Вильмса.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, предусмотренные в настоящем документе, применяют для лечения солидных опухолей или раковых заболеваний, включая, не ограничиваясь перечисленным, немелкоклеточную карциному легкого, плоскоклеточную карциному головы и шеи, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак пищевода, рак яичника, рак желудка, рак эндометрия, глиомы, глиобластомы и олигодендроглиому.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, предусмотренные в настоящем документе, применяют для лечения солидных опухолей или раковых заболеваний, включая, не ограничиваясь перечисленным, немелкоклеточный рак легкого, метастатический колоректальный рак, глиобластому, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы и рак молочной железы.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, предусмотренные в настоящем документе, применяют для лечения глиобластомы.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, которые экспрессируют TCR, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR, предусмотренные в настоящем документе, применяют для лечения гемобластозов или гематологических злокачественных новообразований.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, предусмотренные в настоящем документе, применяют для лечения В-клеточных злокачественных новообразований, включая, не ограничиваясь перечисленным: лейкозы, лимфомы и множественную миелому.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, предусмотренные в настоящем документе, применяют для лечения гемобластозов, включая, не ограничиваясь перечисленным, лейкозы, лимфомы и множественные миеломы: острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный, эритролейкоз, волосатоклеточный лейкоз (HCL), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML) и истинную полицитемию, лимфому Ходжкина, нодулярную лимфому

Ходжкина с лимфоидным преобладанием, лимфому Беркитта, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников, мантийноклеточную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны, фунгоидный микоза, анапластическую крупноклеточную лимфому, синдром Сезари, Т-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников, множественную миелому, выраженную множественную миелому, вялотекущую множественную миелому, плазмоклеточный лейкоз, несекретирующую миелому, IgD-миелому, остеосклеротическую миелому, солитарную плазмоцитому кости и экстрamedуллярную плазмоцитому.

В частных вариантах осуществления модифицированные иммунные эффекторные клетки, предусмотренные в настоящем документе, применяют для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

В контексте настоящего документа термины «индивидуум» и «субъект» часто используются взаимозаменяемо и относятся к любому животному, у которого проявляется симптом заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению векторами для генной терапии, методами клеточной терапии и способами, предусмотренными в других местах настоящего документа. В предпочтительных вариантах осуществления субъект включает любое животное, у которого проявляются симптомы заболевания, расстройства или состояния, связанного с раком, подлежащего лечению векторами для генной терапии, методами клеточной терапии и способами, предусмотренными в других местах настоящего документа. Подходящие субъекты (например, пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или питомцев (таких как кошка или собака). Включены приматы, отличные от человека, и, предпочтительно, пациенты-люди.

В контексте настоящего документа термин «пациент» относится к субъекту, у которого было диагностировано определенное заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению векторами для генной терапии, методами клеточной терапии и способами, раскрытыми в других местах настоящего документа.

В контексте настоящего документа термин «лечение» или «лечить» включает любой благоприятный или желательный эффект в отношении симптомов или патологии заболевания или патологического состояния и может включать даже минимальное уменьшение одного или более измеримых маркеров заболевания или состояния, лечение которого осуществляют. Лечение может предусматривать необязательно либо

уменьшение заболевания или состояния, либо задержку прогрессирования заболевания или состояния. «Лечение» необязательно указывает на полное устранение или излечение заболевания или состояния или связанных с ними симптомов.

В контексте настоящего документа термин «предупреждать» и подобные слова, такие как «предупрежденный», «предупреждение» и т. д., указывают на подход для предупреждения, подавления или снижения вероятности возникновения или рецидива заболевания или состояния. Он также относится к задержке начала или рецидива заболевания или состояния или задержке возникновения или рецидива симптомов заболевания или состояния. В контексте настоящего документа «предупреждение» и подобные слова также включает уменьшение интенсивности, эффекта, симптомов и/или нагрузки заболевания или состояния до начала или рецидива заболевания или состояния.

В контексте настоящего документа фраза «уменьшение выраженности по меньшей мере одного симптома» относится к снижению одного или более симптомов заболевания или состояния, от которых лечат субъекта. В частных вариантах осуществления заболевание или состояние, подлежащее лечению, представляют собой рак, при этом один или более симптомов, выраженность которых снижают, включают, не ограничиваясь перечисленным, слабость, утомляемость, одышку, легкое образование синяков и кровотечение, частые инфекции, увеличенные лимфатические узлы, вздутый или болезненный живот (из-за увеличенных органов брюшной полости), боль в костях или суставах, переломы, незапланированную потерю веса, плохой аппетит, ночные поты, постоянную легкую лихорадку и пониженное мочеиспускание (из-за нарушения функции почек).

«Увеличение», или «способствование», или «повышение», или «расширение» в целом относится к способности композиции, предусмотренной в настоящем документе, например, генетически модифицированных Т-клеток, которые экспрессируют TCR, содержащий минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, производить, вызывать или обуславливать больший физиологический ответ (т. е. последующие эффекты) по сравнению с ответом, вызываемым либо средой-носителем, либо контрольной молекулой/композицией. Поддающийся измерению физиологический ответ может включать повышение размножения, активации, персистенции и/или повышение способности Т-клеток к уничтожению раковых клеток, среди прочего, очевидное из сведений, в данной области техники и описания в настоящем документе. «Повышенное» или «увеличенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество и

может включать повышение в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные значения между указанными числами и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) относительно ответа, полученного с помощью носителя или контрольной композиции.

«Снижение», или «понижение», или «уменьшение», или «сокращение», или «ослабление» в целом относится к способности композиции, предусмотренной в настоящем документе, производить, вызывать или обуславливать меньший физиологический ответ (т. е. последующие эффекты) по сравнению с ответом, вызываемым либо средой-носителем, либо контрольной молекулой/композицией. «Сниженное» или «уменьшенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество и может включать снижение в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные значения между указанными числами и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) относительно ответа (референсного ответа), вызванного носителем, контрольной композицией или ответа в определенной линии клеток.

«Поддерживать», или «сохранять», или «поддержание», или «отсутствие изменений», или «по существу отсутствие изменений» в целом относится к способности композиции, предусмотренной в настоящем документе, производить, вызывать или обуславливать схожий физиологический ответ (т. е. последующие эффекты) в клетке по сравнению с ответом, вызываемым средой-носителем, контрольной молекулой/композицией, либо ответом в определенной линии клеток. Сопоставимый ответ — это ответ, который не имеет существенного или измеримого отличия от референсного ответа.

В одном варианте осуществления способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта включает введение эффективного количества, например, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей генетически модифицированные иммунные эффекторных клетки, предусмотренные в настоящем документе. Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и степень тяжести заболевания пациента, хотя подходящие дозы могут быть определены в клинических исследованиях.

В одном варианте осуществления количество иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которые экспрессируют TCR, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR, в композиции, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере  $1 \times 10^7$  клеток, по меньшей

мере  $0,5 \times 10^8$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^8$  клеток, по меньшей мере  $0,5 \times 10^9$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^9$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^{10}$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^{11}$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^{12}$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^{12}$  клеток или по меньшей мере  $1 \times 10^{13}$  клеток.

В частных вариантах осуществления субъекту вводят от приблизительно  $1 \times 10^7$  Т-клеток до приблизительно  $1 \times 10^{13}$  Т-клеток, от приблизительно  $1 \times 10^8$  Т-клеток до приблизительно  $1 \times 10^{13}$  Т-клеток, от приблизительно  $1 \times 10^9$  Т-клеток до приблизительно  $1 \times 10^{13}$  Т-клеток, от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  Т-клеток до приблизительно  $1 \times 10^{13}$  Т-клеток, от приблизительно  $1 \times 10^{11}$  Т-клеток до приблизительно  $1 \times 10^{13}$  Т-клеток или от приблизительно  $1 \times 10^{12}$  Т-клеток до приблизительно  $1 \times 10^{13}$  Т-клеток.

В одном варианте осуществления количество иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которые экспрессируют TCR, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR, в композиции, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере  $0,1 \times 10^4$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $0,5 \times 10^4$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $1 \times 10^4$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $5 \times 10^4$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $1 \times 10^5$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $0,5 \times 10^6$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $1 \times 10^6$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $0,5 \times 10^7$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $1 \times 10^7$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $0,5 \times 10^8$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $1 \times 10^8$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $2 \times 10^8$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $3 \times 10^8$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $4 \times 10^8$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $5 \times 10^8$  клеток/кг массы тела или по меньшей мере  $1 \times 10^9$  клеток/кг массы тела.

В частных вариантах осуществления субъекту вводят от приблизительно  $1 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $1 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно  $2 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $0,9 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно  $3 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $0,8 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно  $4 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $0,7 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно  $5 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $0,6 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела или от приблизительно  $5 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $0,5 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что для осуществления требуемой терапии может потребоваться несколько введений композиций, предусмотренных в настоящем документе. Например, композиция может быть введена 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или

10 или более раз в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5 лет, 10 лет или более.

В отдельных вариантах осуществления может быть желательным введение субъекту активированных иммунных эффекторных клеток, а затем повторное взятие крови (или выполнение афереза), активация полученных таким образом иммунных эффекторных клеток и повторная инфузия пациенту этих активированных и размноженных иммунных эффекторных клеток. Этот процесс может проводиться несколько раз каждые несколько недель. В отдельных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки могут быть активированы из образцов крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В отдельных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки активируют из образцов крови объемом 20 куб. см, 30 куб. см, 40 куб. см, 50 куб. см, 60 куб. см, 70 куб. см, 80 куб. см, 90 куб. см, 100 куб. см, 150 куб. см, 200 куб. см, 250 куб. см, 300 куб. см, 350 куб. см или 400 куб. см, или более. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что использование этого протокола многократного взятия крови/многократной повторной инфузии может служить для отбора определенных популяций иммунных эффекторных клеток.

Введение композиций, предусмотренных в настоящем документе, можно осуществлять любым удобным способом, в том числе путем ингаляции аэрозоля, инъекции, проглатывания, переливания крови, имплантации или трансплантации. В предпочтительном варианте осуществления композиции вводят парентерально. Фразы «парентеральное введение» и «введение парентерально» в контексте настоящего документа относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, не ограничиваясь перечисленным, внутрисосудистую, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутриопухолевую, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную и внутригрудинную инъекцию и инфузию. В одном варианте осуществления композиции, предусмотренные в настоящем документе, вводят субъекту посредством прямой инъекции в опухоль, лимфатический узел или место инфекции.

В одном варианте осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят эффективное количество композиции для повышения клеточного иммунного ответа на состояние, связанное с В-клетками, у субъекта. Иммунный ответ может включать клеточные иммунные ответы, опосредованные цитотоксическими Т-клетками, способными уничтожать инфицированные клетки, ответы регуляторных Т-клеток и

хелперных Т-клеток. Также могут быть индуцированы гуморальные иммунные ответы, опосредованные преимущественно хелперными Т-клетками, способными активировать В-клетки, что приводит к продуцированию антител. Для анализа типа иммунных ответов, индуцированных композициями, может быть использован ряд методик, 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.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения субъекта, у которого диагностирован рак, включающий взятие иммунных эффекторных клеток у субъекта, генетическое модифицирующие указанных иммунных эффекторных клеток вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , полипептидный линкер и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR, предусмотренный в настоящем документе, с получением таким образом популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток, и введение указанной популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток тому же субъекту. В предпочтительном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки.

В отдельных вариантах осуществления предложены способы стимуляции опосредованного иммунными эффекторными клетками иммуномодулирующего ответа на популяцию целевых клеток у субъекта, включающие стадии введения указанному субъекту популяции иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую TCR, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , полипептидный линкер и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR, предусмотренный в настоящем документе.

Способы введения композиций клеток, предусмотренных в частных вариантах осуществления, включают любой способ, который эффективен для повторного введения генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток *ex vivo*, которые либо непосредственно экспрессируют TCR, содержащий минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене TCR $\alpha$ , полипептидный линкер и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR, предусмотренный в настоящем документе, субъекту, или для повторного введения генетически модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые при введении субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, которые

экспрессируют TCR. Один способ предусматривает трансдукцию Т-клеток периферической крови *ex vivo* конструкцией нуклеиновой кислоты, предусмотренной в настоящем документе, и возвращение трансдуцированных клеток субъекту.

Все публикации, патентные заявки и выданные патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация, патентная заявка или выданный патент были специально и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки.

Несмотря на то, что вышеприведенные варианты осуществления были описаны с приведением некоторых подробностей в качестве иллюстрации и примера для ясности понимания, специалисту в данной области техники будет очевидным в свете информации, представленной в настоящем документе, что в них могут внесены определенные изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены только в целях иллюстрации и не имеют ограничительного характера. Специалистам в данной области техники будет ясен ряд некритических параметров, которые можно изменять или модифицировать для получения по существу аналогичных результатов.



## ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В КОНСТАНТНЫХ ОБЛАСТЯХ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА (TCR)  
СИНЕРГИЧЕСКИ ПОВЫШАЮТ ЭКСПРЕССИЮ TCR

Последовательности TCR к MAGEA4 клонировали в лентивирусные векторы с применением стандартных методик клонирования и модифицировали. Конструкция TCR<sup>WT</sup> представляет собой немодифицированную исходную конструкцию. Конструкция TCR<sup>TM</sup> содержит три гидрофобные аминокислотные замены (S115L, G118V, F119L; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) в трансмембранном домене  $\alpha$ -цепи TCR. Конструкция TCR<sup>MM</sup> содержит четыре мураинизирующие аминокислотные замены (P90S, E91D, S92V, S93P; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) в константной области  $\alpha$ -цепи TCR, а также содержит пять мураинизирующих аминокислотных замен (E18K, S22A, F133I, E/V136A, Q139H; пронумерованные относительно константной области TCR $\beta$ ) в константной области  $\beta$ -цепи TCR. Конструкция TCR<sup>TM/MM</sup> содержит девять мураинизирующих аминокислотных замен в константных областях  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи TCR, а также три гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене  $\alpha$ -цепи TCR.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух нормальных доноров активировали с помощью антител к CD3 и CD28 и трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup>, TCR<sup>TM</sup>, TCR<sup>MM</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, и культивировали в течение 10 дней. Через 10 дней НТД Т-клетки или Т-клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup>, TCR<sup>TM</sup>, TCR<sup>MM</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, окрашивали с помощью пентамер-пептидного метящего реагента MAGEA4 при разведении 1:20 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе и анализировали на проточном цитометре для определения флуоресценции PE. Анализ методом проточной цитометрии показал 2-кратное повышение экспрессии TCR в Т-клетках, трансдуцированных лентивирусными векторами с TCR<sup>TM</sup> и TCR<sup>MM</sup>, и синергическое 4-кратное повышение в Т-клетках, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим TCR<sup>TM/MM</sup>, по сравнению с Т-клетками, трансдуцированными лентивирусным вектором, кодирующим TCR<sup>WT</sup>. Фиг. 1. Т-клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, показали эквивалентные числа копий вектора (VCN).

### ПРИМЕР 2

Т-КЛЕТКИ, ТРАНСДУЦИРОВАННЫЕ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ TCR, ХАРАКТЕРИЗУЮТСЯ ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ПО СРАВНЕНИЮ С Т-КЛЕТКАМИ, ТРАНСДУЦИРОВАННЫМИ НЕМОДИФИЦИРОВАННЫМ TCR

PBMC от двух нормальных доноров активировали с помощью антител к CD3 и CD28 и трансдуцировали с использованием двух различных условий трансдукции (Трансд 1 – улучшенный процесс трансд, Трансд 2 - базовый процесс трансд) лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, и культивировали в течение 10 дней. Нетрансдуцированные (НТД) Т-клетки использовали в качестве контроля.

Через 10 дней клетки окрашивали с помощью пентамер-пептидного метящего реагента MAGEA4 при разведении 1:20 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе и анализировали на проточном цитометре для определения флуоресценции PE. Анализ методом проточной цитометрии показал 4-кратное увеличение Т-клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим TCR<sup>TM/MM</sup>, по сравнению с Т-клетками, трансдуцированными лентивирусным вектором, кодирующим TCR<sup>WT</sup>, при обоих условиях трансдукции. Фиг. 2А.

Использовали ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) для измерения числа копий вектора (VCN) и оценки интеграции LVV (лентивирусного вектора) при каждом условии трансдукции. VCN были сопоставимы при каждом условии трансдукции. Фиг. 2В.

### ПРИМЕР 3

Т-КЛЕТКИ, ТРАНСДУЦИРОВАННЫЕ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ TCR, УСТРАНЯЮТ ОШИБОЧНОЕ СПАРИВАНИЕ TCR

PBMC активировали с помощью антител к CD3 и CD28 и трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, и культивировали в течение 10 дней.

Через 10 дней Т-клетки, трансдуцированные TCR<sup>WT</sup> и TCR<sup>TM/MM</sup>, оценивали в отношении специфичного спаривания TCR с помощью двойного окрашивания пентамер-пептидным метящим реагентом, конъюгированным с PE, при разведении 1:20 и флуорофором FITC для мечения  $\gamma$ -бета-цепи при разведении 1:100 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе. Специфично спаренные TCR идентифицировали, если процентные доли положительных клеток, выявленных с помощью окрашивания  $\gamma$ -бета и окрашивания тетрамерным антигеном, были равными.

Трансдуцированные TCR<sup>TM/MM</sup> Т-клетки демонстрировали >90% специфического спаривания по сравнению с Т-клетками, трансдуцированными TCR<sup>WT</sup>. Эти данные свидетельствуют о том, что неправильное спаривание TCR было устранено с помощью модификаций, присутствующих в TCR<sup>TM/MM</sup>. Фиг. 3А и фиг. 3В.

#### ПРИМЕР 4

Т-КЛЕТКИ, ТРАНСДУЦИРОВАННЫЕ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ TCR, ОБЛАДАЮТ СИЛЬНЫМИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ СВОЙСТВАМИ

РВМС от двух нормальных доноров активировали с помощью антител к CD3 и CD28 и трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, и культивировали в течение 10 дней.

*Анализы IFN $\gamma$* : НТД Т-клетки или Т-клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, совместно культивировали в течение 24 часов с MAGEA4-положительными опухолевыми клетками A549, экспрессирующими Nuc-red, при соотношении Е:Т 1:1, нормированном на основании экспрессии TCR. Через 24 ч из этих образцов отбирали супернатант и анализировали с применением анализа Meso Scale Discovery (MSD) для измерения продукции цитокинов. Т-клетки, экспрессирующие TCR<sup>TM/MM</sup>, показали значительное (4-кратное) увеличение продукции IFN-гамма по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими TCR<sup>WT</sup>. Фиг. 4А.

*Анализы цитотоксичности*: НТД Т-клетки или Т-клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, совместно культивировали с MAGEA4-положительными опухолевыми клетками A549, экспрессирующими Nuc-red, при соотношении Е:Т 1:1, нормированном на основании экспрессии TCR. Мониторинг цитотоксичности осуществляли в течение трех дней с применением Incucyte S3. Т-клетки, экспрессирующие TCR<sup>TM/MM</sup>, показали более крутую кривую уничтожения по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими TCR<sup>WT</sup>, или НТД Т-клетками. Фиг. 4В.

ПРИМЕР 5

АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В КОНСТАНТНЫХ ОБЛАСТЯХ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА (TCR) СИНЕРГИЧЕСКИ ПОВЫШАЮТ ЭКСПРЕССИЮ TCR И СПЕЦИФИЧНОЕ СПАРИВАНИЕ TCR В TCR К NY-ESO-1

Последовательности TCR к NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 15 и 16) клонировали в лентивирусные векторы с применением стандартных методик клонирования и модифицировали. Конструкция TCR<sup>MM</sup> содержит четыре мураинизирующие аминокислотные замены (P90S, E91D, S92V, S93P; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) в константной области  $\alpha$ -цепи TCR, а также содержит пять мураинизирующих аминокислотных замен (E18K, S22A, F133I, E/V136A, Q139H; пронумерованные относительно константной области TCR $\beta$ ) в константной области  $\beta$ -цепи TCR. Конструкция TCR<sup>TM/</sup><sup>MM</sup> содержит девять мураинизирующих аминокислотных замен в константных областях  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи TCR, а также три гидрофобные аминокислотные замены (S115L, G118V, F119L; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) в трансмембранном домене  $\alpha$ -цепи TCR.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух нормальных доноров активировали с помощью антител к CD3 и CD28 и трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup>, TCR<sup>MM</sup> или TCR<sup>TM/</sup><sup>MM</sup>, и культивировали в течение 10 дней.

*Экспрессия:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup>, TCR<sup>MM</sup> или TCR<sup>TM/</sup><sup>MM</sup>, окрашивали с помощью пентамер-пептидного метящего реагента NY-ESO-1 при разведении 1:20 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе и анализировали на проточном цитометре для определения флуоресценции PE. Анализ методом проточной цитометрии показал повышенную экспрессию TCR в Т-клетках, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим TCR<sup>TM/</sup><sup>MM</sup>, по сравнению с НТД Т-клетками или Т-клетками, трансдуцированными лентивирусным вектором, кодирующим TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>MM</sup>. Фиг. 5А. Средняя интенсивность флуоресценции окрашивания TCR для каждого донора показана на фиг. 5В.

*Спаривание:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup>, TCR<sup>MM</sup> или TCR<sup>TM/</sup><sup>MM</sup>, оценивали в отношении специфичного спаривания TCR с помощью двойного окрашивания пентамер-пептидным метящим реагентом NY-ESO-1, конъюгированным с PE, при разведении 1:20 и флуорофором FITC для мечения  $\gamma$ -бета-цепи при разведении 1:100 в буфере для окрашивания

при проточном цитометрическом анализе. Специфично спаренные TCR идентифицировали, если процентные доли положительных клеток, выявленных с помощью окрашивания  $\gamma$ -бета и окрашивания тетрамерным антигеном, были равными. Т-клетки, трансдуцированные TCR<sup>TM/MM</sup>, показали повышенное специфичное спаривание по сравнению с НТД Т-клетками или Т-клетками, трансдуцированными лентивирусным вектором, кодирующим TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>MM</sup>. Фиг. 6.

#### ПРИМЕР 6

#### АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В КОНСТАНТНЫХ ОБЛАСТЯХ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА (TCR) в TCR к MART-1

Получали последовательности  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи TCR к MART-1 (SEQ ID NO: 7 и 8; SEQ ID NO: 9 и 10) с мутациями для повышенного спаривания (TCR<sup>TM/MM</sup>), которые будут клонированы в лентивирусные векторы с применением стандартных методик клонирования. TCR<sup>TM/MM</sup> содержит четыре мураинизирующие аминокислотные замены (P90S, E91D, S92V, S93P; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) и три гидрофобные аминокислотные замены (S115L, G118V, F119L; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) в константной области  $\alpha$ -цепи TCR, а также содержит пять мураинизирующих аминокислотных замен (E18K, S22A, F133I, E/V136A, Q139H; пронумерованные относительно константной области TCR $\beta$ ) в константной области  $\beta$ -цепи TCR.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух нормальных доноров будут активированы с помощью антител к CD3 и CD28 и трансдуцированы лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, и культивированы в течение 10 дней.

*Экспрессия:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, будут окрашены с помощью пентамер-пептидного метящего реагента MART-1 при разведении 1:20 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе и анализированы на проточном цитометре для определения флуоресценции PE.

*Спаривание:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, будут оценены в отношении специфичного спаривания TCR с помощью двойного окрашивания пентамер-пептидным метящим реагентом MART-1, конъюгированным с PE, при разведении 1:20 и флуорофором FITC для мечения  $\gamma$ -бета-цепи при разведении 1:100 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе.

ПРИМЕР 7АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В КОНСТАНТНЫХ ОБЛАСТЯХ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА (TCR)  
в TCR WT-1

Получали последовательности  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи TCR WT-1 (SEQ ID NO: 11 и 12) с мутациями для повышенного спаривания (TCR<sup>TM/MM</sup>), которые будут клонированы в лентивирусные векторы с применением стандартных методик клонирования. TCR<sup>TM/MM</sup> содержит четыре мураинизирующие аминокислотные замены (P90S, E91D, S92V, S93P; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) и три гидрофобные аминокислотные замены (S115L, G118V, F119L; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) в константной области  $\alpha$ -цепи TCR, а также содержит пять мураинизирующих аминокислотных замен (E18K, S22A, F133I, E/V136A, Q139H; пронумерованные относительно константной области TCR $\beta$ ) в константной области  $\beta$ -цепи TCR.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух нормальных доноров будут активированы с помощью антител к CD3 и CD28 и трансдуцированы лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, и культивированы в течение 10 дней.

*Экспрессия:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, будут окрашены с помощью пентамер-пептидного метящего реагента WT-1 при разведении 1:20 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе и анализированы на проточном цитометре для определения флуоресценции PE.

*Спаривание:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, будут оценены в отношении специфичного спаривания TCR с помощью двойного окрашивания пентамер-пептидным метящим реагентом WT-1, конъюгированным с PE, при разведении 1:20 и флуорофором FITC для мечения  $\gamma$ -бета-цепи при разведении 1:100 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе.

ПРИМЕР 8АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В КОНСТАНТНЫХ ОБЛАСТЯХ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА (TCR)  
в TCR к HPV16 E6

Получали последовательности  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи TCR к HPV16 E6 (SEQ ID NO: 13 и 14) с мутациями для повышенного спаривания (TCR<sup>TM/MM</sup>), которые будут клонированы в

лентивирусные векторы с применением стандартных методик клонирования. TCR<sup>TM/MM</sup> содержит четыре мураинизирующие аминокислотные замены (P90S, E91D, S92V, S93P; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) и три гидрофобные аминокислотные замены (S115L, G118V, F119L; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) в константной области  $\alpha$ -цепи TCR, а также содержит пять мураинизирующих аминокислотных замен (E18K, S22A, F133I, E/V136A, Q139H; пронумерованные относительно константной области TCR $\beta$ ) в константной области  $\beta$ -цепи TCR.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух нормальных доноров будут активированы с помощью антител к CD3 и CD28 и трансдуцированы лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, и культивированы в течение 10 дней.

*Экспрессия:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, будут окрашены с помощью пентамер-пептидного метящего реагента HPV16 Е6 при разведении 1:20 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе и анализированы на проточном цитометре для определения флуоресценции PE.

*Спаривание:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, будут оценены в отношении специфичного спаривания TCR с помощью двойного окрашивания пентамер-пептидным метящим реагентом HPV16 Е6, конъюгированным с PE, при разведении 1:20 и флуорофором FITC для мечения  $\nu$ -бета-цепи при разведении 1:100 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе.

#### ПРИМЕР 9

##### АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В КОНСТАНТНЫХ ОБЛАСТЯХ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА (TCR) в TCR к NY-ESO-1

Получали последовательности  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи TCR к NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 17 и 18; SEQ ID NO: 19 и 20; SEQ ID NO: 21 и 22) с мутациями для повышенного спаривания (TCR<sup>TM/MM</sup>), которые будут клонированы в лентивирусные векторы с применением стандартных методик клонирования. TCR<sup>TM/MM</sup> содержит четыре мураинизирующие аминокислотные замены (P90S, E91D, S92V, S93P; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) и три гидрофобные аминокислотные замены (S115L, G118V, F119L; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) в константной области  $\alpha$ -цепи TCR, а также содержит пять мураинизирующих аминокислотных замен (E18K, S22A,

F133I, E/V136A, Q139H; пронумерованные относительно константной области TCR $\beta$ ) в константной области  $\beta$ -цепи TCR.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух нормальных доноров будут активированы с помощью антител к CD3 и CD28 и трансдуцированы лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, и культивированы в течение 10 дней.

*Экспрессия:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, будут окрашены с помощью пентамер-пептидного метящего реагента NY-ESO-1 при разведении 1:20 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе и анализированы на проточном цитометре для определения флуоресценции PE.

*Спаривание:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, будут оценены в отношении специфичного спаривания TCR с помощью двойного окрашивания пентамер-пептидным метящим реагентом NY-ESO-1, конъюгированным с PE, при разведении 1:20 и флуорофором FITC для мечения  $\nu$ -бета-цепи при разведении 1:100 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе.

#### ПРИМЕР 10

##### АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В КОНСТАНТНЫХ ОБЛАСТЯХ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА (TCR) В TCR к HPV16 E7

Получали последовательности  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи TCR к HPV16 E7 (SEQ ID NO: 23 и 24) с мутациями для повышенного спаривания (TCR<sup>TM/MM</sup>), которые будут клонированы в лентивирусные векторы с применением стандартных методик клонирования. TCR<sup>TM/MM</sup> содержит четыре мураинизирующие аминокислотные замены (P90S, E91D, S92V, S93P; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) и три гидрофобные аминокислотные замены (S115L, G118V, F119L; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) в константной области  $\alpha$ -цепи TCR, а также содержит пять мураинизирующих аминокислотных замен (E18K, S22A, F133I, E/V136A, Q139H; пронумерованные относительно константной области TCR $\beta$ ) в константной области  $\beta$ -цепи TCR.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух нормальных доноров будут активированы с помощью антител к CD3 и CD28 и трансдуцированы лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, и культивированы в течение 10 дней.



*Экспрессия:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, будут окрашены с помощью пентамер-пептидного метящего реагента HPV16 E7 при разведении 1:20 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе и анализированы на проточном цитометре для определения флуоресценции PE.

*Спаривание:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, будут оценены в отношении специфичного спаривания TCR с помощью двойного окрашивания пентамер-пептидным метящим реагентом HPV16 E7, конъюгированным с PE, при разведении 1:20 и флуорофором FITC для мечения  $\nu$ -бета-цепи при разведении 1:100 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе.

#### ПРИМЕР 11

#### АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В КОНСТАНТНЫХ ОБЛАСТЯХ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА (TCR) В TCR К GP100

Получали последовательности  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи TCR к GP100 (SEQ ID NO: 25 и 26) с мутациями для повышенного спаривания (TCR<sup>TM/MM</sup>), которые будут клонированы в лентивирусные векторы с применением стандартных методик клонирования. TCR<sup>TM/MM</sup> содержит четыре мураинизирующие аминокислотные замены (P90S, E91D, S92V, S93P; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) и три гидрофобные аминокислотные замены (S115L, G118V, F119L; пронумерованные относительно константной области TCR $\alpha$ ) в константной области  $\alpha$ -цепи TCR, а также содержит пять мураинизирующих аминокислотных замен (E18K, S22A, F133I, E/V136A, Q139H; пронумерованные относительно константной области TCR $\beta$ ) в константной области  $\beta$ -цепи TCR.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от двух нормальных доноров будут активированы с помощью антител к CD3 и CD28 и трансдуцированы лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, и культивированы в течение 10 дней.

*Экспрессия:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>TM/MM</sup>, будут окрашены с помощью пентамер-пептидного метящего реагента GP100 при разведении 1:20 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе и анализированы на проточном цитометре для определения флуоресценции PE.

*Спаривание:* через 10 дней НТД Т-клетки или клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими TCR<sup>WT</sup> или TCR<sup>ТМММ</sup>, будут оценены в отношении специфичного спаривания TCR с помощью двойного окрашивания пентамер-пептидным метящим реагентом GP100, конъюгированным с PE, при разведении 1:20 и флуорофором FITC для мечения γ-бета-цепи при разведении 1:100 в буфере для окрашивания при проточном цитометрическом анализе.

В общем случае в следующей формуле изобретения используемые термины не следует истолковывать как ограничивающие формулу изобретения частными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, но их следует истолковывать как включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, охватываемых такой формулой изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничена настоящим раскрытием.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR и минимально муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены, где TCR не связывает MAGEA4.

2. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий:

(a)  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119; и

(b)  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139.

3. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий:

(a)  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены P90S, E91D, S92V, S93P, S115L, G118V и F119L; и

(b)  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H.

4. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий:

(a)  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 4 аминокислотные замены для минимальной муринизации и по меньшей мере 3 гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене  $\alpha$ -цепи TCR, где константный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4; и

(b)  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 5 аминокислотных замен для минимальной муринизации, где константный домен  $\beta$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

5. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий:

(a)  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; и

(b)  $\beta$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

6. Выделенный TCR по любому из пп. 1-5, где TCR связывает целевой антиген, выбранный из группы, состоящей из следующих: альфа-фетопротейн (AFP), члены семейства В-антигенов меланомы (BAGE), BORIS (Brother of the regulator of imprinted sites), раково-тестикулярные антигены, раково-тестикулярный антиген 83 (CT-83), карбоангидраза IX (CAIX), карциноэмбриональный антиген (CEA), антигены цитомегаловируса (CMV), распознаваемый цитотоксическими Т-клетками (CTL) антиген на меланоме (CAMEL), антигены вируса Эпштейна-Барр (EBV), G антиген 1 (GAGE-1), GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, гликопротеин 100 (GP100), антигены вируса гепатита В (HBV), неструктурный белок 3 (NS3) вируса гепатита С (HCV), рецептор эпидермального фактора роста человека 2 типа (HER-2), вирус папилломы человека (HPV)-Е6, HPV-Е7, обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT), латентный мембранный белок 2 (LMP2), семейство антигенов меланомы А, 1 (MAGE-A1), MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками (MART-1), мезотелин (MSLN), муцин 1 (MUC1), муцин 16 (MUC16), Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1 (NYESO-1), P53, члены семейства антигенов Р (PAGE), плацента-специфический 1 (PLAC1), антиген, экспрессируемый преимущественно при меланоме (PRAME), сурвивин, X 1 синовиальной саркомы (SSX1), X 2 синовиальной саркомы (SSX2), X 3 синовиальной саркомы (SSX3), X 4 синовиальной саркомы (SSX4), X 5 синовиальной саркомы (SSX5), X 8 синовиальной саркомы (SSX8), тиреоглобулин, тирозиназа, связанный с тирозиназой белок (TRP)1, TRP2, белок опухоли Вильмса (WT-1), член 1 семейства антигенов X (XAGE1) и член 2 семейства антигенов X (XAGE2).

7. Выделенный TCR по любому из пп. 1-6, где экспрессия и авидность TCR повышены по сравнению с TCR, который содержит минимально мураинизированную  $\alpha$ -цепь TCR и минимально мураинизированную  $\beta$ -цепь TCR, но где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR не содержит гидрофобных аминокислотных замен.

8. Выделенный TCR по любому из пп. 1-6, где экспрессия и авидность TCR повышены по сравнению с TCR, который не содержит минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, но где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены.

9. Слитый белок, содержащий  $\alpha$ -цепь TCR и  $\beta$ -цепь TCR, как определено в любом из пп. 1-8.

10. Слитый белок, содержащий минимально муриназированную  $\alpha$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены; сигнал расщепления полипептида; и минимально муриназированную  $\beta$ -цепь TCR, где слитый белок не связывает MAGEA4.

11. Слитый белок, содержащий:

(a)  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муриназации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119;

(b) сигнал расщепления полипептида; и

(c)  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муриназации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139;

где слитый белок не связывает MAGEA4.

12. Слитый белок, содержащий:

(a)  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены P90S, E91D, S92V, S93P, S115L, G118V и F119L;

(b) сигнал расщепления полипептида; и

(c)  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H;

где слитый белок не связывает MAGEA4.

13. Слитый белок, содержащий:

(a)  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 4 аминокислотные замены для минимальной мурализации и по меньшей мере 3 гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене  $\alpha$ -цепи TCR, где константный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4;

(b) сигнал расщепления полипептида; и

(c)  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 5 аминокислотных замен для минимальной мурализации, где константный домен  $\beta$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6;

где слитый белок не связывает MAGEA4.

14. Слитый белок, содержащий:

(a)  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

(b) сигнал расщепления полипептида; и

(c)  $\beta$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6;

где слитый белок не связывает MAGEA4.

15. Слитый полипептид по любому из пп. 9-14, где сигнал расщепления полипептида представляет собой вирусный саморасщепляющийся пептид или последовательность проскока рибосомы.

16. Слитый полипептид по любому из пп. 9-15, где сигнал расщепления полипептида представляет собой вирусный пептид 2A.

17. Слитый полипептид по любому из пп. 9-16, где сигнал расщепления полипептида представляет собой пептид 2A афтовируса, пептид 2A потивируса или пептид 2A кардиовируса.

18. Слитый полипептид по любому из пп. 9-17, где сигнал расщепления полипептида представляет собой вирусный пептид 2A, выбранный из группы, состоящей из: пептида 2A вируса ящура (FMDV), пептида 2A вируса ринита лошадей А (ERAV), пептида 2A вируса *Thosea asigna* (TaV), пептида 2A тешовируса свиней-1 (PTV-1), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита.

19. Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR по любому из пп. 1-8 или слитый белок по любому из пп. 9-18.

20. Нуклеиновая кислота, содержащая первый полинуклеотид, кодирующий минимально муринизированную  $\alpha$ -цепь TCR, где трансмембранный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит гидрофобные аминокислотные замены; участок внутренней посадки рибосомы (IRES); и второй полинуклеотид, кодирующий муринизированную  $\beta$ -цепь TCR, где слитый белок не связывает MAGEA4.

21. Нуклеиновая кислота, содержащая:

(a) первый полинуклеотид, кодирующий  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 90, 91, 92 и 93 и гидрофобные аминокислотные замены в положениях 115, 118 и 119;

(b) IRES; и

(c) второй полинуклеотид, кодирующий  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены для минимальной муринизации в положениях 18, 22, 133, 136 и 139.

где слитый белок не связывает MAGEA4.

22. Нуклеиновая кислота, содержащая:

(a) первый полинуклеотид, кодирующий  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены P90S, E91D, S92V, S93P, S115L, G118V и F119L;

(b) IRES; и

(с) второй полинуклеотид, кодирующий  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий аминокислотные замены E18K, S22A, F133I, E/V136A и Q139H.

где слитый белок не связывает MAGEA4.

23. Нуклеиновая кислота, содержащая:

(а) первый полинуклеотид, кодирующий  $\alpha$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 4 аминокислотные замены для минимальной мурализации и по меньшей мере 3 гидрофобные аминокислотные замены в трансмембранном домене  $\alpha$ -цепи TCR, где константный домен  $\alpha$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4;

(b) IRES; и

(с) второй полинуклеотид, кодирующий  $\beta$ -цепь TCR, которая содержит константный домен, содержащий по меньшей мере 5 аминокислотных замен для минимальной мурализации, где константный домен  $\beta$ -цепи TCR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6,

где слитый белок не связывает MAGEA4.

24. Нуклеиновая кислота, содержащая:

(а) первый полинуклеотид, кодирующий  $\alpha$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

(b) IRES; и

(с) второй полинуклеотид, кодирующий  $\beta$ -цепь TCR, содержащую константный домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6,

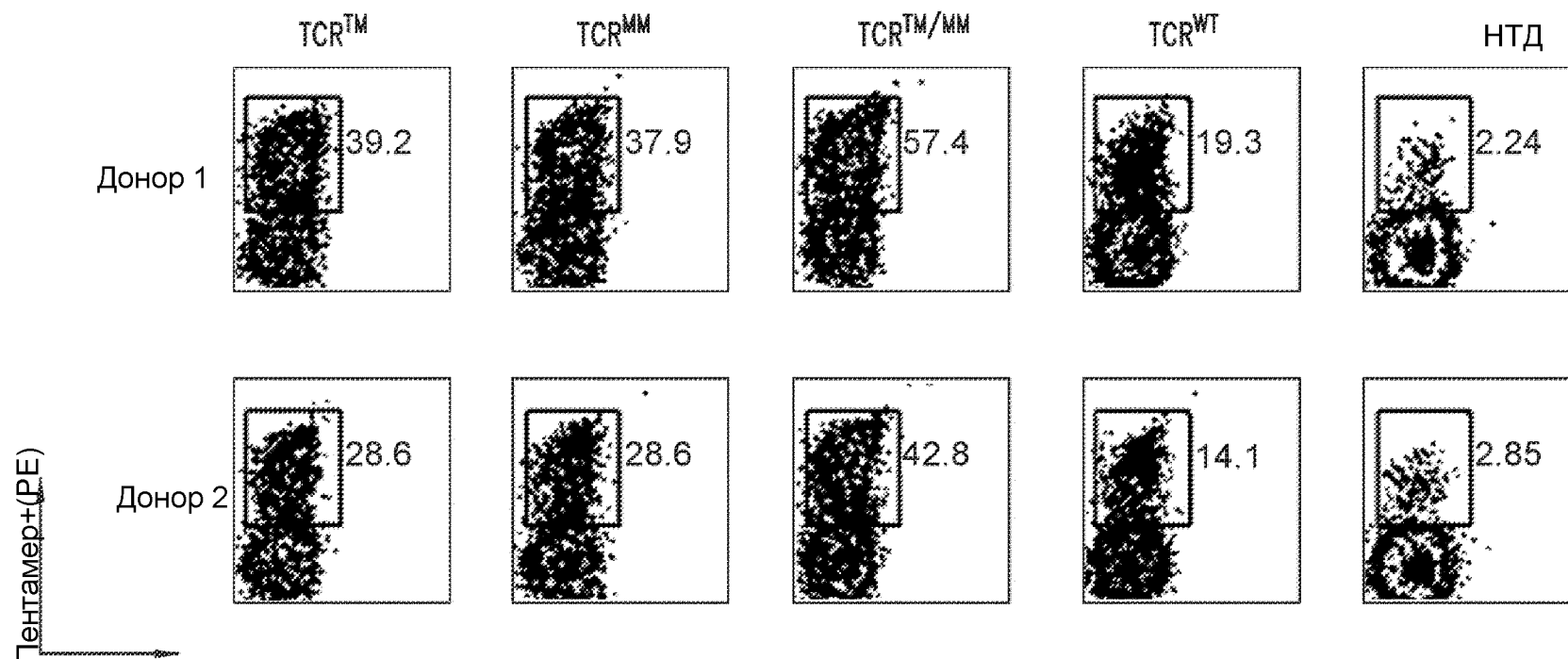
где слитый белок не связывает MAGEA4.

25. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR по любому из пп. 1-8 или слитый белок по любому из пп. 9-18.

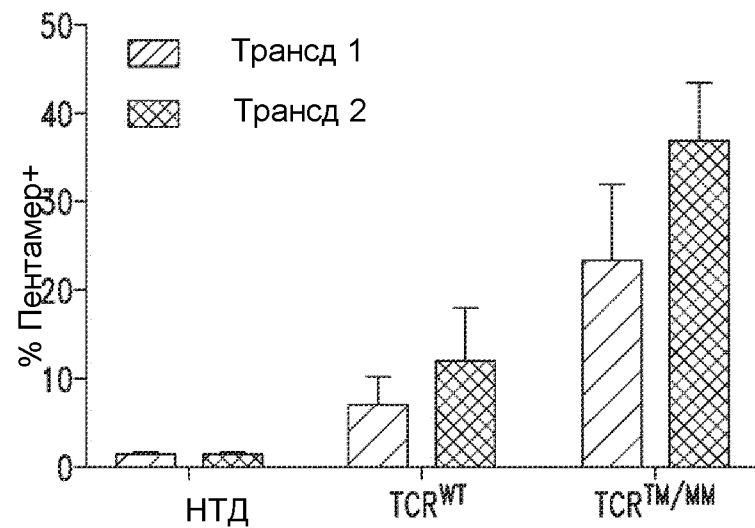


26. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 19-24, где вектор предпочтительно представляет собой вектор экспрессии, более предпочтительно ретровирусный вектор или еще более предпочтительно лентивирусный вектор.
27. Клетка, экспрессирующая TCR по любому из пп. 1-8.
28. Клетка, экспрессирующая слитый белок по любому из пп. 9-18.
29. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп. 19-24.
30. Клетка, содержащая вектор по п. 25 или п. 26.
31. Клетка по любому из пп. 27-30, где клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку.
32. Клетка по любому из пп. 27-31, где клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку, выбранную из группы, состоящей из Т-клетки, естественной киллерной клетки (НК) или естественной киллерной Т-клетки (NKT).
33. Композиция, содержащая TCR по любому из пп. 1-8, слитый белок по любому из пп. 9-18, нуклеиновую кислоту по любому из пп. 19-24, вектор по п. 25 или п. 26 или клетку по любому из пп. 27-32.
34. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и TCR по любому из пп. 1-8, слитый белок по любому из пп. 9-18, нуклеиновую кислоту по любому из пп. 19-24, вектор по п. 25 или п. 26 или клетку по любому из пп. 27-32.
35. TCR по любому из пп. 1-8, слитый белок по любому из пп. 9-18, нуклеиновая кислота по любому из пп. 19-24, вектор по п. 25 или п. 26 или клетка по любому из пп. 27-32, композиция по п. 33 или фармацевтическая композиция по п. 34 для применения в качестве лекарственного средства.

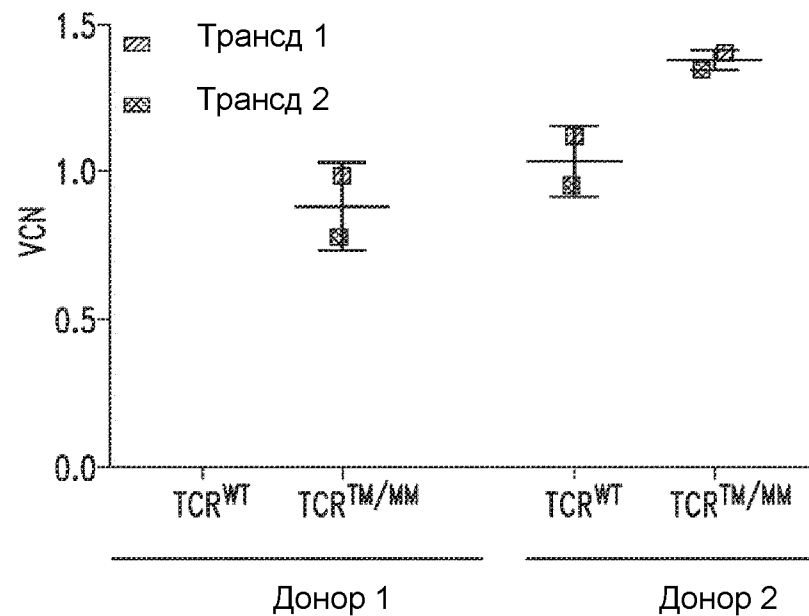
36. TCR по любому из пп. 1-8, слитый белок по любому из пп. 9-18, нуклеиновая кислота по любому из пп. 19-24, вектор по п. 25 или п. 26 или клетка по любому из пп. 27-32, композиция по п. 33 или фармацевтическая композиция по п. 34 для применения для лечения рака, где рак предпочтительно представляет собой гематологический рак или солидную опухоль, более предпочтительно где рак выбран из группы, состоящей из саркомы, рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака яичника, рака пищевода, немелкоклеточного рака легкого, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, гепатоклеточной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, колоректального рака, холангиокарциномы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, миелоидного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза, наиболее предпочтительно где рак выбран из группы, состоящей из НМРЛ (немелкоклеточный рак легкого), МРЛ (мелкоклеточный рак легкого), рака молочной железы, яичника или колоректального рака, саркомы или остеосаркомы.



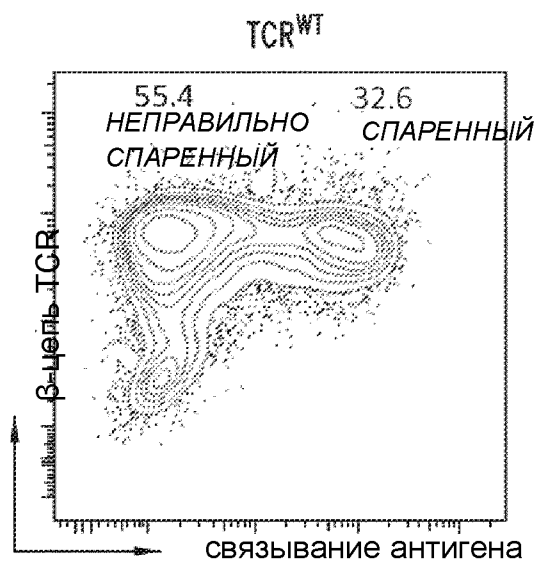
ФИГ. 1



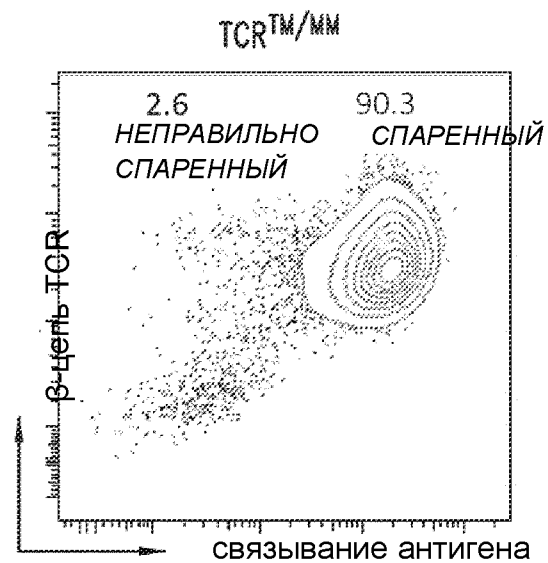
ФИГ. 2А



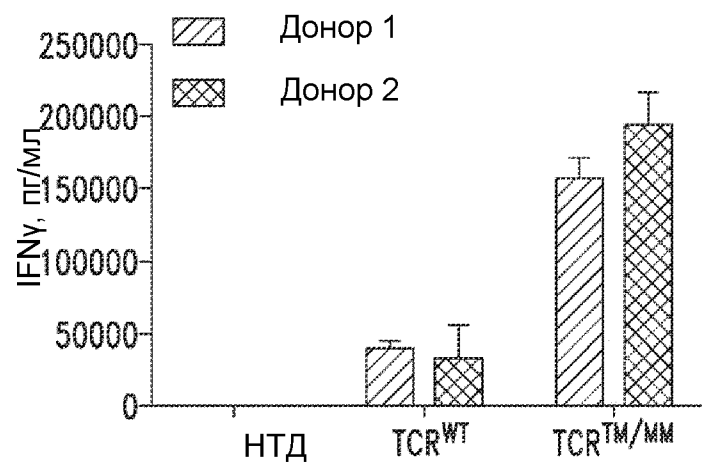
ФИГ. 2В



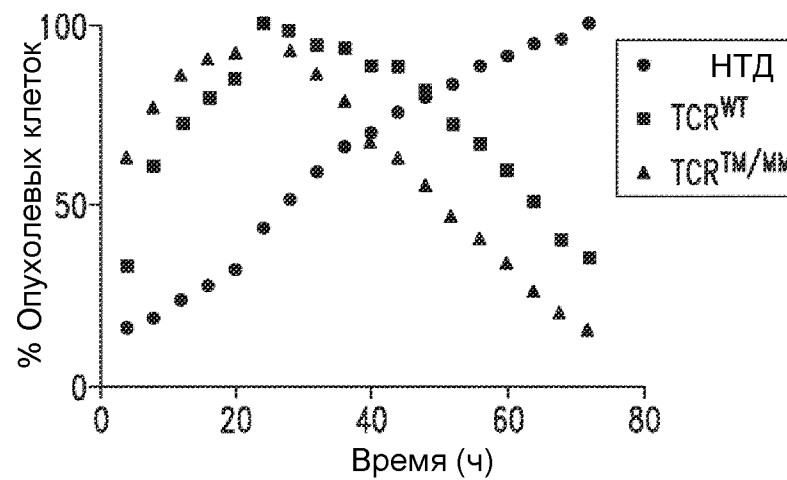
ФИГ. 3А



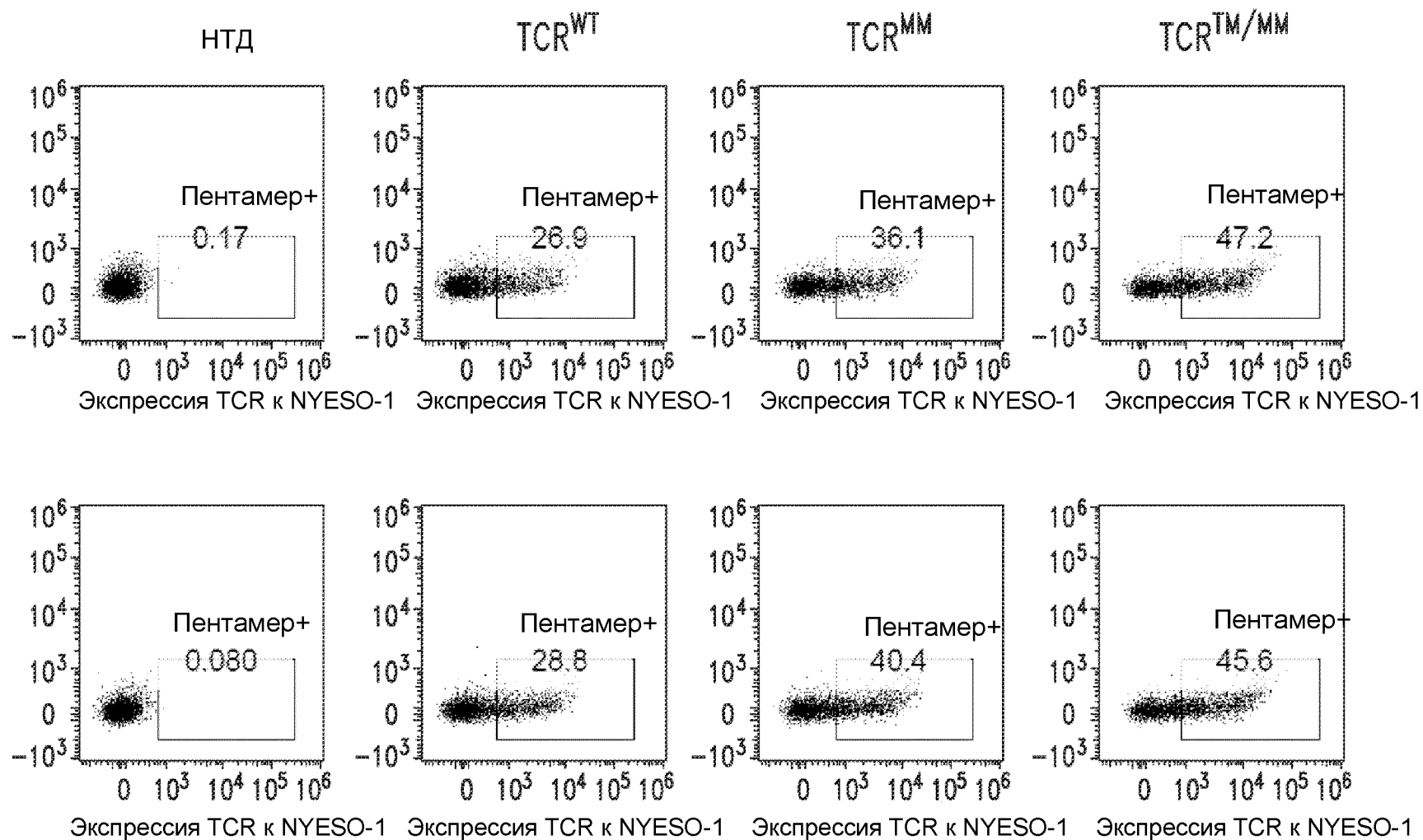
ФИГ. 3В



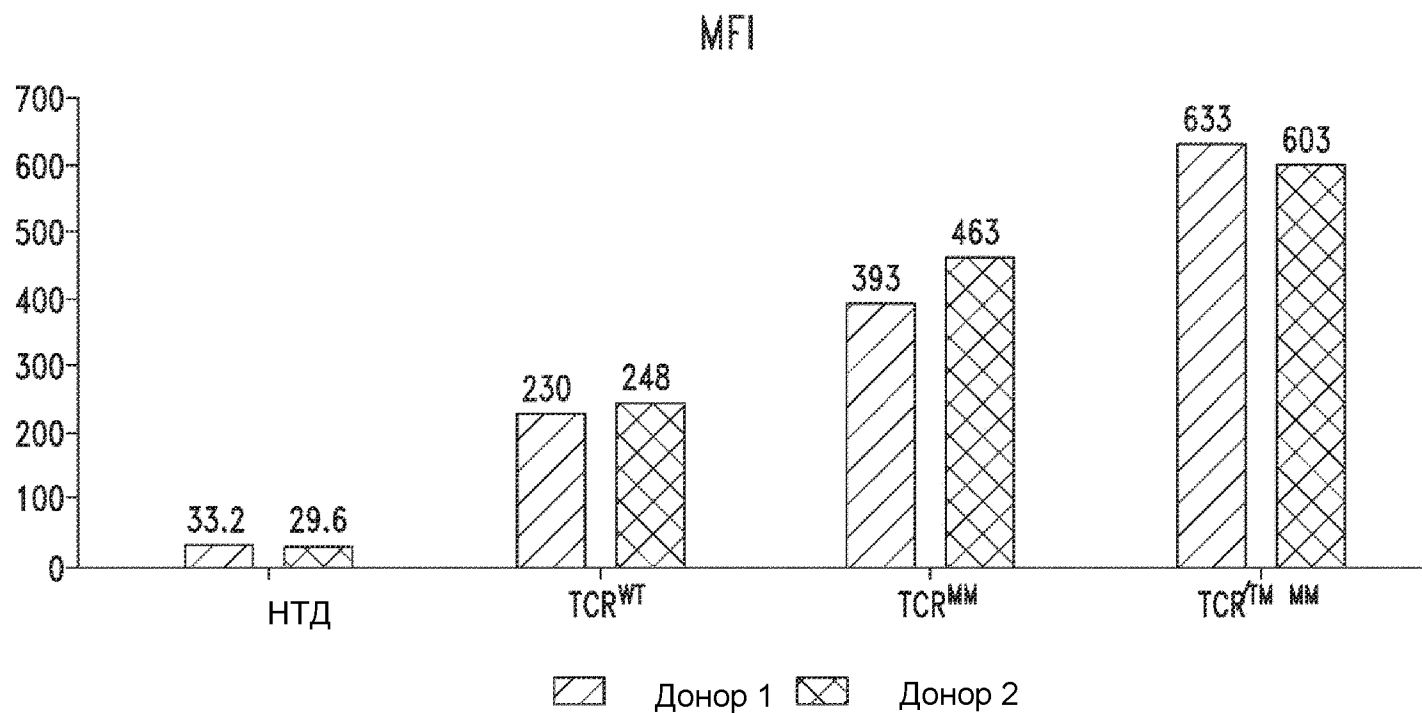
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В

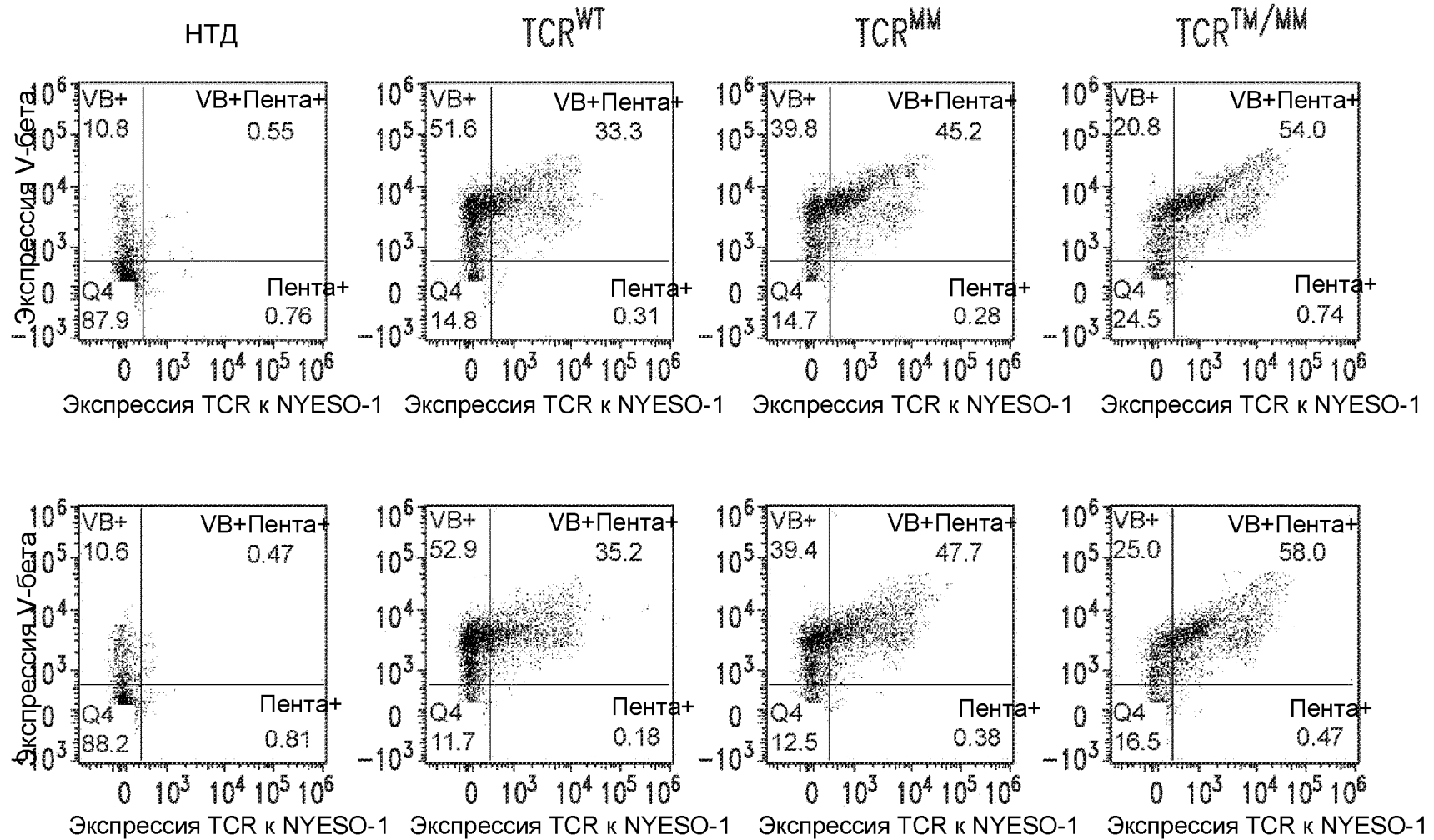


ФИГ. 5А



ФИГ. 5В





ФИГ. 6