

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043021**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.19

(21) Номер заявки
201892021

(22) Дата подачи заявки
2017.03.16

(51) Int. Cl. **C07K 14/435** (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/66 (2015.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(54) ТРАНСФИЦИРОВАННЫЕ Т-КЛЕТКИ И Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) **1604492.7; 62/308,975**

(32) **2016.03.16**

(33) **GB; US**

(43) **2019.02.28**

(86) **PCT/EP2017/056260**

(87) **WO 2017/158103 2017.09.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Алтен Леони, Маурер Доминик, Бунк
Себастьян (DE)**

(74) Представитель:
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Дементьев
В.Н., Строкова О.В., Христофоров
А.А., Гизатуллина Е.М. (RU)**

(56) EP-A1-1930433
WO-A1-2015075939
EP-A1-2752198
US-A1-2010034841
OHKURI T. ET AL.: "Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumour antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells", BRITISH JOURNAL OF CANCER, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 100, no. 7, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 1135-1143, XP002630781, ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/SJ.BJC.6604966 [retrieved on 2009-03-10], abstract
DATABASE UniProt [Online], 1 November 1995 (1995-11-01), "RecName: Full=Melanoma-associated antigen 4; AltName: Full=Cancer/testis antigen 1.4; Short=CT1.4; AltName: Full=MAGE-4 antigen; AltName: Full=MAGE-41 antigen; AltName: Full=MAGE-X2 antigen;", XP055374176, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P43358, Database accession no. P43358 sequence

(57) Изобретение относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), связывающимся с опухолеассоциированными антигенами (ТАА) для нацеливания на раковые клетки, Т-клеткам, экспрессирующим их, способам их получения и способам лечения раковых заболеваний с их применением. В частности, настоящее изобретение относится к ТКР и их вариантам, которые связываются с молекулами HLA I или II класса с пептидом, таким как MAG-003, имеющим аминокислотную последовательность KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1). Настоящее изобретение, кроме того, относится к пептидам, белкам, нуклеиновым кислотам и клеткам для применения в иммунотерапевтических методах. В частности, изобретение относится к иммунотерапии рака. Настоящее изобретение относится, кроме того, к опухолеассоциированным пептидным эпитопам Т-клеток, в отдельности или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, которые могут, например, служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, стимулирующих противоопухолевые иммунные ответы, или стимулировать Т-клетки ex vivo с их перенесением в организм пациента. Пептиды, связанные с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), или пептиды в отдельности могут быть также мишенями антител, растворимых Т-клеточных рецепторов и других связывающих молекул.

B1**043021****043021****B1**

Уровень техники

Мишенями иммунотерапии, основанной на Т-клетках, являются пептидные эпитопы, полученные из опухолеассоциированных или опухолеспецифических белков, которые презентуются молекулами главного комплекса гистосовместимости человека (МНС). Данные опухолеассоциированные антигены (ТАА) могут быть пептидами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т.д., которые экспрессируются и обычно имеют, по сравнению с не измененными клетками того же происхождения, повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение Т-клеток из популяций опухоль-инфильтрирующих клеток или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют важную роль в естественной иммунной защите против рака. В частности, CD8-положительные Т-клетки, которые распознают пептиды, связанные с молекулами I класса главного комплекса гистосовместимости (МНС), играют важную роль в этом ответе. Эти пептиды обычно состоят из 8-10 аминокислотных остатков, полученных из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRIP), находящихся в цитозоле. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

MAGEA4 является членом семейства генов MAGEA. Экспрессия белка и мРНК MAGEA4 связана с развитием различных видов рака и составлением прогноза для них. Пептид MAG-003, т.е. KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1), является HLA-A*0201-рестриктированным эпитопом MAGEA4 (аминокислоты 286-294) цитотоксического Т-лимфоцита (ЦТЛ). (Jia et al. 2010; Wu et al. 2011), содержание которых в полном объеме включено по ссылке. MAG-003 активирует пептид-специфические ЦТЛ как *in vitro* из HLA-A 0201-положительных МПКК, так и у HLA-A0201/Kb трансгенной мыши. Индуцированные MAG-003 ЦТЛ лизируют клетки-мишени по HLA-A*0201-рестрикционной модели, демонстрируя, что MAG-003 является HLA-A*0201-рестриктированным эпитопом ЦТЛ.

Существуют два класса молекул МНС, МНС I класса и МНС II класса. Комплексы пептида и молекул МНС I класса распознаются CD8-положительными Т-клетками, несущими подходящий Т-клеточный рецептор (ТКР), тогда как комплексы пептида и молекул МНС II класса распознаются CD4-положительными хелперными Т-клетками, несущими подходящий ТКР. Поскольку оба вида ответов, зависящие от клеток CD8 и CD4, вносят свой вклад в противоопухолевый эффект сообща и синергически, то идентификация и характеристика опухолеассоциированных антигенов и соответствующих Т-клеточных рецепторов являются важными при разработке видов противораковой иммунотерапии, таких как вакцины и клеточная терапия.

В зависящей от МНС I класса иммунной реакции пептиды не только должны быть в состоянии связываться с конкретными молекулами МНС I класса, экспрессируемыми опухолевыми клетками, но они также должны затем распознаваться Т-клетками, несущими специфические Т-клеточные рецепторы (ТКР). Поэтому антигены ТАА являются отправной точкой для разработки терапии на основе Т-клеток, включающей противоопухолевые вакцины и средства клеточной терапии, но не ограничивающейся ими.

В случае нацеливания на комплексы пептида с МНС специфических ТКР (например, растворимых ТКР или ТКР поверхности клетки) и антител или других связывающихся с ними молекул (комплексов) в соответствии с описанием иммуногенность лежащих в основе пептидов является второстепенной. В таких случаях презентация является определяющим фактором.

Тогда как были сделаны достижения в разработке молекулярно-таргетных препаратов для противораковой терапии, в этой области техники остается потребность в развитии новых противораковых препаратов, мишенями которых были бы молекулы, высоко специфические для раковых клеток. Настоящее описание направлено на удовлетворение этой потребности, предлагая новые MAG-003-специфичные ТКР, нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева, которые специфически связываются с MAG-003; и способы применения таких молекул в лечении рака.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее описание относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), включающим альфа-цепь и/или бета-цепь ("альфа/бета-ТКР"). В другом варианте осуществления настоящее описание относится к ТКР, включающим гамма-цепь и/или дельта-цепь ("гамма/дельта-ТКР").

Настоящее описание, кроме того, относится к ТКР, отдельным субъединицам ТКР (отдельно или в комбинации) и их субдоменам, растворимым ТКР (рТКР), например, растворимым альфа-/бета-димерным ТКР, имеющим по меньшей мере одну дисульфидную межцепочечную связь между остатками константного домена, которые не представлены в природных ТКР, и клонированным ТКР, причем указанные ТКР встроены в аутологичные или аллогенные Т-клетки или клетки-предшественники Т-клеток, и способам их получения, а также к другим клеткам, несущим указанный ТКР.

Настоящее описание далее относится к ТКР, который специфически связывается с комплексом пептида MAG-003 и молекулы HLA, где пептид MAG-003 выбран из последовательности KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1) и ее вариантов, таких как представленные последовательностями с SEQ ID NO: 2 по SEQ ID NO: 24. В одном варианте осуществления молекула HLA является HLA-A*02.

Настоящее описание далее относится к ТКР, включающим альфа-вариабельный домен ТКР, последовательность которого по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99%, предпочтительно на

90% идентична последовательности альфа-вариабельного домена ТКР, представленного в табл. 2; и последовательность бета-вариабельного домена ТКР по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99%, предпочтительно на 90% идентична последовательности бета-вариабельного домена ТКР, представленного в табл. 2.

В одном варианте осуществления альфа-вариабельный домен ТКР имеет по меньшей мере одну мутацию по отношению к альфа-домену ТКР, представленного в табл. 2; и/или бета-вариабельный домен ТКР имеет по меньшей мере одну мутацию по отношению к альфа-домену ТКР, представленного в табл. 2. В одном варианте осуществления ТКР, содержащий по меньшей мере одну мутацию в альфа-вариабельном домене ТКР и/или бета-вариабельном домене ТКР, имеет аффинность связывания по отношению к и/или полупериод связывания с комплексом пептида MAG-003 и молекулы HLA, которые по меньшей мере вдвое выше, чем у ТКР, содержащего альфа-домен ТКР без мутаций и/или бета-домен ТКР без мутаций.

Альфа-цепи ТКР согласно настоящему описанию могут далее включать альфа-константный домен ТКР, последовательность которого по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности альфа-константного домена ТКР, представленного в табл. 2. Бета-цепи ТКР согласно настоящему описанию могут далее включать бета-константный домен ТКР, последовательность которого по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности бета-константного домена ТКР, представленного в табл. 2.

Альфа-цепи ТКР согласно настоящему описанию могут далее включать трансмембранный домен альфа-цепи ТКР и/или внутриклеточный домен альфа-цепи ТКР. Бета-цепи ТКР согласно настоящему описанию могут далее включать трансмембранный домен бета-цепи ТКР и/или внутриклеточный домен бета-цепи ТКР.

Описание далее относится к альфа-цепям ТКР, включающим один или несколько участков, определяющих комплементарность (CDR), альфа-цепи, раскрытых в табл. 2, и их вариантам, имеющим один, два, три или четыре замены по отношению к CDR, представленным в табл. 2. Далее описаны альфа-цепи ТКР, включающие по меньшей мере один участок CDR, выбранный из CDR1, CDR2 и CDR3, представленных в табл. 2. Далее описаны альфа-цепи ТКР, включающие CDR3 альфа-цепи, представленный в табл. 2.

Описание далее относится к бета-цепям ТКР, включающим один или несколько участков, определяющих комплементарность (CDR), бета-цепи, раскрытых в табл. 2, и их вариантам, имеющим один, два, три или четыре замены по отношению к CDR, представленным в табл. 2. Далее описаны бета-цепи ТКР, включающие по меньшей мере один участок CDR, выбранный из CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи, представленных в табл. 2. Далее описаны бета-цепи ТКР, включающие CDR3 бета-цепи, представленный в табл. 2.

Описание далее относится к выделенной или рекомбинантной нуклеиновой кислоте, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую ТКР согласно настоящему описанию. В одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты согласно описанию кодируют альфа-цепь ТКР и/или бета-цепь ТКР, как представлено в табл. 2.

Описание далее относится к рекомбинантному вектору экспрессии, включающему нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа-цепь, бета-цепь или обе цепи ТКР согласно настоящему описанию.

Описание далее относится к выделенной клетке-хозяину, включающей рекомбинант-ный вектор экспрессии, экспрессирующий нуклеиновую кислоту, кодирующую альфа-цепь, бета-цепь или обе цепи ТКР согласно настоящему описанию.

Описание далее относится к выделенной клетке-хозяину, включающей рекомбинант-ный вектор экспрессии согласно настоящему описанию, предпочтительно где клетка является клеткой человека, предпочтительно лимфоцитом периферической крови (ЛПК), более предпочтительно - CD4- или CD8-положительным Т-лимфоцитом.

Описание далее относится к выделенному ЛПК, включающему рекомбинант-ный вектор экспрессии согласно описанию, где ЛПК является CD8+ Т-клеткой или CD4+ Т-клеткой.

Описание далее относится к популяции клеток, включающих по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в настоящем документе.

Описание далее относится к ТКР и клеткам-хозяевам согласно настоящему описанию для применения при лечении пролиферативных заболеваний, таких как немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, почечноклеточный рак, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, гепатоклеточный рак, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоз, рак молочной железы, карцинома клеток Меркеля, меланома, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря и желчных протоков и рак пищевода.

В одном аспекте клетка-хозяин является CD8+ Т-клеткой или CD4+ Т-клеткой, трансфицированной нуклеиновой кислотой, кодирующей по меньшей мере один ТКР в соответствии с описанием, где ТКР включает по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, раскрытую в табл. 2. В другом аспекте такие клетки-хозяева применяются в иммунотерапии мелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, почечноклеточного рака, рака головного мозга, рака желудка, колорек-

тального рака, гепатоклеточного рака, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, лейкоза, рака молочной железы, карциномы клеток Меркеля, меланомы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака матки, рака желчного пузыря и желчных протоков и рака пищевода и, предпочтительно, клетками немелкоклеточного рака легких.

Описание далее относится к способам уничтожения или снижения числа раковых клеток, включающим контактирование раковых клеток с ТКР, нуклеиновой кислотой, вектором или клеткой-хозяином согласно настоящему описанию. Также предложены способы лечения рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, ТКР, нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина согласно настоящему описанию.

В другом аспекте настоящее описание относится к пептиду MAG-003, например, выделенному пептиду, включающему аминокислотную последовательность в соответствии со следующей общей формулой I:



где X_1 выбран из аминокислот K и Y, X_2 выбран из аминокислот V, L и A, и X_3 выбран из V, L, A, и I, где указанный пептид связывается с молекулой HLA I класса или II класса и/или вызывает перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом или его фармацевтически приемлемой солью. В одном аспекте указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Предпочтительной является последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 или ее вариантной последовательности, которая по меньшей мере на 66%, предпочтительно, по меньшей мере на 77% и более предпочтительно по меньшей мере на 88% гомологична (предпочтительно, по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентична) последовательности с SEQ ID NO: 1, где указанный вариант связывается с молекулой HLA I или II класса и/или индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемой солью, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее описание относится далее к пептиду согласно настоящему описанию, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательности с SEQ ID NO: 1 или ее вариант, который по меньшей мере на 66%, предпочтительно, по меньшей мере на 77% и более предпочтительно по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 8-100, предпочтительно 8-30 и, наиболее предпочтительно, 8-14 аминокислот.

В последующих таблицах представлены примеры пептидов в соответствии с настоящим описанием и их соответствующие SEQ ID NO. В одном аспекте пептиды в табл. 1 могут связываться с HLA-A*02. В другом аспекте ТКР, описываемые в настоящем документе, способны связываться или специфически связываться с одним или несколькими пептидами из табл. 1.

Таблица 1

Пептиды в соответствии с настоящим описанием

SEQ ID NO:	Последовательность
1	KVLEHVVRV
2	KVLEHVRL
3	KVLEHVRA
4	KVLEHVRI
5	KLLEHVVRV
6	KLLEHVRL
7	KLLEHVRA
8	KLLEHVRI
9	KALEHVVRV

10	KALEHVRL
11	KALEHVRA
12	KALEHVRI
13	YLLEHVVRV
14	YLLEHVRL
15	YLLEHVRA
16	YLLEHVRI
17	YALEHVVRV
18	YALEHVRL
19	YALEHVRA
20	YALEHVRI
21	YVLEHVVRV
22	YVLEHVRL
23	YVLEHVRA
24	YVLEHVRI

В одном аспекте настоящее описание относится к лечению пролиферативных заболеваний, таких как немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, почечно-клеточный рак, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, гепатоклеточный рак, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоз, рак молочной железы, карцинома клеток Меркеля, меланома, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря и желчных протоков и рак пищевода за счет использования одного или нескольких пептидов, описываемых в настоящем документе.

Особенно предпочтительными являются пептиды - в отдельности или в комбинации - в соответствии с настоящим описанием, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 24. Более предпочтительными являются пептиды - в отдельности или в комбинации - выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 24 (см. табл. 1) и их применение в иммунотерапии немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, почечно-клеточного рака, рака головного мозга, рака желудка, колоректального рака, гепато-клеточного рака, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, лейкоза, рака молочной железы, карциномы клеток Меркеля, меланомы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака матки, рака желчного пузыря и желчных протоков и рака пищевода и, предпочтительно, немелкоклеточного рака легких.

В одном аспекте настоящее описание относится к пептидам в соответствии с настоящим описанием, имеющим способность связываться с молекулой HLA I класса или - в удлиненной форме, такой как вариант по длине - HLA II класса.

В одном аспекте настоящее описание относится к пептидам в соответствии с настоящим описанием, где указанные пептиды (каждый из них) включают, состоят или состоят по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 24.

Настоящее описание далее относится к пептидам в соответствии с настоящим описанием, где указанный пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.

Настоящее описание далее относится к пептидам в соответствии с настоящим описанием, где указанный пептид является частью слитого белка, в частности слитого с N-терминальными аминокислотами HLA-DR антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii), предпочтительно, их 80 N-терминальными аминокислотами, или слитого с антителом (или встроенный в его последовательность), таким как, например, антителом, специфичным для дендритных клеток.

Описание далее относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пептиды в соответствии с описанием. Описание далее относится к нуклеиновой кислоте в соответствии с описанием, которая является ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями.

Описание далее относится к вектору экспрессии, способному к экспрессии и/или экспрессирующему нуклеиновую кислоту в соответствии с описанием.

Описание далее относится к пептиду в соответствии с описанием, к нуклеиновой кислоте в соответствии с описанием или к вектору экспрессии в соответствии с описанием для применения в лечении заболеваний и в медицине, в частности, в лечении рака.

Описание далее относится к антителам, которые специфически связывают с пептиды в соответствии с настоящим описанием или комплексы указанных пептидов в соответствии с описанием и МНС и способам получения таких антител.

Описание далее относится к клетке-хозяину, включающей нуклеиновую кислоту в соответствии с описанием или вектор экспрессии, описанный ранее.

Описание далее относится к клетке-хозяину в соответствии с описанием, которая является антиген-

презентирующей клеткой, предпочтительно - дендритной клеткой.

Описание далее относится к способу получения пептида в соответствии с описанием, причем способ включает культивацию клетки-хозяина в соответствии с описанием и выделение пептида из указанной клетки-хозяина или ее культуральной среды.

Описание далее относится к способам в соответствии с настоящим описанием, где антиген нагружен на молекулы МНС I или II класса, экспрессированные на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной антигенпрезентирующей клетки, при контактировании достаточного количества антигена с антигенпрезентирующей клеткой, или же антиген нагружен на тетрамеры МНС I или II класса путем тетрамеризации мономерных комплексов антиген-МНС I или II класса.

Описание далее относится к способу в соответствии с описанием, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать или экспрессирующий указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 24, предпочтительно содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 24 или ее вариантную аминокислотную последовательность.

Описание далее относится к активированным Т-лимфоцитам, полученным способом в соответствии с настоящим описанием, где Т-клетка селективно распознают клетку, которая экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность в соответствии с описанием.

Описание далее относится к способам уничтожения раковых клеток и/или подавления клеток у пациента, чьи раковые клетки aberrантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность в соответствии с описанием, причем данные способы включают введение пациенту эффективного числа Т-клеток, полученных в соответствии с описанием.

Описание далее относится к применению любого описанного в настоящем документе пептида, нуклеиновых кислот в соответствии с описанием в настоящем документе, описанного в настоящем документе векторов экспрессии, описанных в настоящем документе клеток, описанных в настоящем документе активированных Т-лимфоцитов, описанных в настоящем документе Т-клеточных рецепторов, антител или других молекул, связывающихся с пептидом и/или комплексом пептид-МНС в соответствии с настоящим описанием в качестве медикамента или в производстве медикамента. В одном аспекте этот медикамент обладает активным противораковым действием.

Предпочтительно, если указанный медикамент предназначен для клеточной терапии, является вакциной или белком на основе ТКР, растворимого ТКР или антитела.

Настоящее описание далее относится к применению в соответствии с настоящим описанием, где раковые клетки являются клетками немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, почечноклеточного рака, рака головного мозга, рака желудка, колоректального рака, гепатоклеточного рака, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, лейкоза, рака молочной железы, карциномы клеток Меркеля, меланомы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака матки, рака желчного пузыря и желчных протоков и рака пищевода и, предпочтительно, клетками немелкоклеточного рака легких.

Настоящее описание далее относится к биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, в контексте описания называемые "мишенями", которые могут быть использованы при постановке диагноза рака, предпочтительно немелкоклеточного рака легких. В роли маркера может выступать избыточная презентация самого(их) пептида(ов) или избыточная экспрессия соответствующего(их) гена(ов). Эти маркеры могут также использоваться для предсказания вероятности успеха лечения, предпочтительно иммунотерапии, и, наиболее предпочтительно, иммунотерапии, направленной на ту же мишень, которая была идентифицирована биомаркером. Например, для окрашивания срезов опухоли для выявления присутствия интересующего пептида в комплексе с МНС может использоваться антитело или растворимый ТКР. Факультативно антитело или растворимый ТКР обладает дополнительной эффекторной функцией, например, несет иммуностимулирующий домен или токсин.

Настоящее описание далее относится к применению данных новых мишеней в целях идентификации ТКР, которые распознают по меньшей мере одну из указанных мишеней и предпочтительно идентификации указанных ТКР, которые активируют Т-клетки.

Настоящее описание относится также к применению этих новых мишеней в контексте лечения рака.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена презентация пептида MAG-003 в здоровых и раковых тканях. На фиг. 2-4 представлена экспрессия MAG-003 в раковых и здоровых тканях.

На фиг. 5-7 представлено высвобождение IFN γ из CD8 $^{+}$ Т-клеток с введенной с помощью электропорации РНК альфа- и бета-цепи ТКР R7P1D5, R20P1H7 и R10P2G12 (табл. 2) соответственно, после совместной инкубации с клетками-мишенями, нагруженными пептидом MAG-003 (SEQ ID NO: 1) или гомологичным, но не родственным пептидом RABGAP1L-001 (SEQ ID NO: 91), AXIN1-001 (SEQ ID NO: 92), ANO5-001 (SEQ ID NO: 93), TPX2-001 (SEQ ID NO: 94), SYNE3-001 (SEQ ID NO: 95), MIA3-001 (SEQ ID NO: 96), HERC4-001 (SEQ ID NO: 97), PSME2-001 (SEQ ID NO: 98), HEATR5A-001 (SEQ ID NO: 99) или CNOT1-003 (SEQ ID NO: 100) или контрольным пептидом NYESO1-001 (SEQ ID NO: 101). Данные по высвобождению IFN γ были получены с помощью CD8 $^{+}$ Т-клеток, полученных от двух различных

доноров (донор 1 показан на правой оси X, донор 2 - на левой оси X). CD8+ Т-клетки с введенной с помощью электропорации РНК в отдельности или после совместной инкубации с ненагруженными клетками-мишенями служили в качестве контроля.

На фиг. 8 представлено окрашивание тетрамера МНС/MAG-003 или тетрамера МНС/NYESO1-001 CD8+ Т-клеток с введенной с помощью электропорации РНК альфа- и бета-цепи ТКР R7P1D5, R20P1H7 и R10P2G12 (табл. 2), соответственно. CD8+ Т-клетки с введенной с помощью электропорации РНК ТКР 1G4, который специфически связывается с комплексом МНС/NYESO1-001, и CD8+ Т-клетки после имитации элек-тропорации, служили в качестве контроля.

На фиг. 9-11 показано высвобождение IFN γ CD8+ Т-клетками с введенной с помощью электропорации РНК альфа- и бета-цепи ТКР R7P1D5, R20P1H7 и R10P2G12 (табл. 2), соответственно, после совместного инкубации с клетками-мишенями, нагруженными пептидом MAG-003 (SEQ ID NO: 1) или различными вариантами MAG-003 с вариантами замен аланина в позициях 1-9 последовательности SEQ ID NO: 1. CD8+ Т-клетки с введенной с помощью электропорации РНК в отдельности или после совместной инкубации с клетками-мишенями, нагруженными контрольным пептидом NYESO1-001, или ненагруженные клетки-мишени служили в качестве контроля. Данные по высвобождению IFN γ были получены с помощью CD8+ Т-клеток, полученных от двух различных доноров (донор 1 показан на правой оси X, донор 2 - на левой оси X).

Фиг. 12: Высвобождение IFN γ CD8+ Т-клетками с введенной с помощью электропорации РНК альфа- и бета-цепи ТКР (А) R7P1D5, (В) R20P1H7 и (С) R10P2G12 после совместной инкубации с линией клеток меланомы А-375, линией клеток глиобластомы Т98G и линией клеток рака молочной железы SK-BR-3, соответственно. CD8+ Т-клетки с введенной с помощью электропорации РНК в отдельности служили в качестве контроля.

Фиг. 13: Т-клетки, трансфицированные РНК, кодирующей ТКР R7P1D5, R10P2G12, R20P1H7, имитированный или контрольный ТКР 1G4 (SEQ ID NO: X) культивировали совместно с различными первичными клетками здоровой ткани человека (расшифровку аббревиатур см. в табл. 13), отрицательной по отношению к мишени линией опухолевых клеток MCF-7 и MAGEA4 - и NY-ESO1-положительными линиями клеток А-375 и NCI-H1755. Экспрессия ТКР R7P1D5, R10P2G12, R20P1H7 и 1G4 в Т-клетках была получена за счет электропорации с применением РНК-вектора. Культуры клеток здоровых тканей человека не привели к значимому ТКР-опосредованному распознаванию и активации Т-клеток по отношению к ТКР R7P1D5, R10P2G12 или R20P1H7. Показано соотношение Е:Т (клеток-эффекторов и клеток-мишеней) 1:1, по 20 000 клеток каждого вида, средний показатель высвобождения IFN- γ после 20 ч из репликатов, измеренное методом ELISA. На планках погрешностей показано стандартное отклонение. Результаты были нормализованы путем вычитания уровня высвобождения IFN- γ , полученного для трансфицированных ТКР Т-клеток в отдельности и уровня высвобождения IFN- γ в результате совместной культивации клеток-мишеней и Т-клеток, не экспрессирующих интересующий ТКР.

Фиг. 14: Суммарные данные 4 доноров, исследованных на наличие трансгенной экспрессии ТКР R7P1D5 после трансдукции 6 различными лентивирусными конструкциями (R71-R78). CD3+/CD8+ Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии относительно соотношения клеток, связывающихся с тетрамером МНС/MAG-003, во временной точке 96 часов после трансдукции. Нетрансдуцированные Т-клетки (NT), окрашенные тетрамером МНС/MAG-003, и Т-клетки, трансдуцированные вариантом гена ТКР 1G4 (NY-ESO1) Т-клетки, окрашенные тетрамером МНС/NYESO1-001, использовали в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно. Для клеток устанавливали гейт популяции живых CD3+CD8+ клеток.

Фиг. 15А: Ответ эффекторов в популяции трансдуцированных ТКР R7P1D5 Т-клеток, измеренный с помощью высвобождения IFN γ после совместной культивации с линией клеток А375, экспрессирующей MAGEA4 и MAGEA4-отрицательной линией клеток MCF-7. Т-клетки, трансдуцированные концентрированным супернатантом лентивирусной конструкции R73, кодирующей ТКР R7P1D5, сравнивали с нетрансдуцированными клетками (NT), полученные в обоих случаях из МКПК 4 здоровых доноров. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ среднеквадратическая ошибка среднего значения (SEM) трех повторных измерений. В. Ответ в виде высвобождения IFN γ трансдуцированными ТКР R7P1D5 (лентивирусная конструкция R73) Т-клетками из МКПК 2 здоровых доноров (донор 6 и 7) после совместной инкубации с клетками-мишенями Т2, нагруженными пептидом MAG-003 со снижением концентраций. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM трех повторных измерений через 96 ч после трансдукции.

Фиг. 16 (А, В): Цитотоксический ответ трансдуцированных геном ТКР R7P1D5 (лентивирусная конструкция R73) и нетрансдуцированных Т-клеток (NT), измеренный в сравнении с линией клеток А375, экспрессирующей MAGEA4, при различных соотношениях Е:Т в рамках 4-часового анализа с высвобождением Cr51. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM 3-4 повторных измерений. (С) Комбинированные данные 7 продуктов Т-клеток, трансдуцированных геном ТКР R7P1D5 (лентивирусная конструкция R73), полученных у 5 доноров, демонстрирующие антиген-специфическое уничтожение MAGEA4-экспрессирующих (А375) и MAGEA4-отрицательных (MCF-7) опухолевых мишеней

при соотношении E:T 40:1.

Подробное описание

Настоящее описание относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), включающим альфа-цепь и/или бета-цепь ("альфа/бета-ТКР"). Также предложены пептиды MAG-003, способные связываться с ТКР и антителами, если они презентуются молекулой МНС. Настоящее описание также относится к нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам для экспрессии ТКР и пептидам по настоящему изобретению; и методам их применения.

Задача изобретения, таким образом, в первом аспекте решена с помощью антигенраспознающей структуры, включающей по меньшей мере один комплементарный детер-минантный участок (CDR) 3, последовательность которого по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или предпочтительно на 100% идентична последовательности аминокислоты, выбранной из последовательностей с SEQ ID NO. 44, 52, 60, 68, 76 и 84.

Антигенраспознающая структура в соответствии с изобретением предпочтительно выбрана из антитела или его производного или его фрагмента, или Т-клеточного рецептора (ТКР) или его производного или его фрагмента. Производное или его фрагмент антитела или ТКР по изобретению предпочтительно сохраняет способность связываться/распознавать антиген родительской молекулы, в частности, ее специфичность и/или селективность, как поясняется выше. Такая функциональность по связыванию может быть сохранена за счет присутствия участка CDR3, как определено в контексте настоящего изобретения.

В одном из вариантов осуществления изобретения ТКР по изобретению способны распознавать антигены ТАА за счет главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса. Понятие "за счет главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса" в контексте настоящего изобретения обозначает, что ТКР вызывает иммунный ответ при связывании с антигенами ТАА в контексте молекулы МНС I класса. Молекула МНС I класса может быть любой молекулой МНС I класса, известной в области техники, например, молекулами HLA-A. В предпочтительном варианте осуществления изобретения молекула МНС I класса является молекулой HLA-A*02.

В изобретении предложены как одноцепочечная антигенраспознающая структура, так и двухцепочечные распознающие структуры.

В одном варианте осуществления альфа-вариабельный домен ТКР имеет по меньшей мере одну мутацию по отношению к альфа-домену ТКР, представленному в табл. 2; и/или бета-вариабельный домен ТКР имеет по меньшей мере одну мутацию по отношению к альфа-домену ТКР, представленному в табл. 2. В одном варианте осуществления ТКР, содержащий по меньшей мере одну мутацию в альфа-вариабельном домене ТКР и/или бета-вариабельном домене ТКР, имеет аффинность связывания по отношению к и/или полупериод связывания с комплексом пептида ТАА и молекулы HLA, которые по меньшей мере вдвое выше, чем у ТКР, содержащего альфа-домен ТКР без мутаций и/или бета-домен ТКР без мутаций.

Альфа-цепи ТКР согласно настоящему описанию могут далее включать альфа-трансмембранный домен ТКР и/или альфа-внутриклеточный домен ТКР. Бета-цепи ТКР согласно настоящему описанию могут далее включать трансмембранный домен бета-цепи ТКР и/или внутриклеточный домен бета-цепи ТКР.

В изобретении, в частности, в качестве антигенраспознающей структуры предложен ТКР или его фрагмент или его производное. Предпочтительно, если это ТКР человека, что подразумевает, что он получен из человеческого локуса ТКР и, таким образом, включает последовательности человеческого ТКР. Более того, ТКР по изобретению может быть охарактеризован таким образом, что он имеет человеческое происхождение и специфически распознает антиген ТАА по изобретению, который упомянут в табл. 1.

В другом варианте осуществления изобретения дополнительно или в качестве альтернативы предложена антигенраспознающая структура, описанная выше, которая вызывает иммунный ответ, предпочтительно, где иммунный ответ характеризуется увеличением уровней интерферона (ИФН)-гамма.

ТКР по изобретению могут быть предложены в виде одноцепочечных α или β , или γ и δ , молекул или, в качестве альтернативы, в виде двухцепочечной структуры, состоящей из обеих цепей, α - и β -цепи, или γ - и δ -цепи.

Наиболее предпочтительно в некоторых дополнительных вариантах осуществления, где раскрытие сущности изобретения относится к антигенраспознающим структурам, включающим любые один, два или все участки CDR1-CDR3 раскрытых в настоящем документе цепей ТКР (см. табл. 2), предпочтительными могут быть такие антигенраспознающие структуры, которые включают соответствующую последовательность CDR по изобретению, имеющую не более трех, двух и, предпочтительно, одного модифицированного аминокислотного остатка. Модифицированный аминокислотный остаток может быть выбран из вставки, делеции или замещения аминокислоты. Наиболее предпочтительно, когда все три, два, предпочтительно один модифицированный аминокислотный остаток является первым или последним аминокислотным остатком соответствующей последовательности CDR. Если модификация является замещением, тогда в некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы замещение было кон-

сервативным замещением аминокислоты.

ТКР согласно изобретению могут далее включать константную область, полученную от любых подходящих видов, таких как любое млекопитающее, например, человек, крыса, обезьяна, кролик, осел или мышь. В одном варианте осуществления изобретения ТКР согласно изобретению далее включают константную область человека. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления константная область ТКР по изобретению может быть незначительно модифицирован, например, за счет введения гетерологич-ных последовательностей, предпочтительно, последовательностей мыши, что может повышать экспрессию и стабильность ТКР.

В одном варианте осуществления изобретения предложены химерные ТКР, где цепи ТКР включают последовательности нескольких биологических видов. Предпочтительно, когда ТКР согласно изобретению может включать α -цепь, включающую человеческую переменную область α -цепи и, например, мышиную константную область α -цепи ТКР мыши.

В одном варианте осуществления ТКР по изобретению является человеческим ТКР, включающим человеческие переменные области в соответствии с представленными выше вариантами осуществления и человеческие константные области.

В некоторых вариантах осуществления антиген распознающая структура мураинизирована или гуманизирована. Эти понятия используются, когда аминокислотные последовательности чужеродных видов введены в структуру по изобретению.

ТКР по изобретению может быть предложен в виде одноцепочечного ТКР. Одноцепочечный ТКР в соответствии с изобретением будет включать в одной полипептидной цепи целиком или частично последовательность альфа-цепи и целиком или частично последовательность бета-цепи, предпочтительно, связанные за счет пептидного линкера. Одноцепочечный ТКР может включать полипептид переменной области первой цепи ТКР (например, альфа-цепи) и полипептид всей (полной длины) второй цепи ТКР целиком (например, бета-цепи), или наоборот. Более того, одноцепочечный ТКР может, факультативно, включать один или несколько линкеров, которые соединяют два или более полипептидов друг с другом. Линкер может быть, например, пептидом, который соединяет две одиночные цепи согласно описанию в данном документе. Также предложен такой одноцепочечный ТКР по изобретению, который слит с человеческим цитокином, таким как ИЛ-2, ИЛ-7 или ИЛ-15.

Антигенраспознающая структура в соответствии с изобретением может быть также предложена в форме мультимерного комплекса, включающего по меньшей мере две молекулы одноцепочечных ТКР, где каждая из указанных молекул одноцепочечных ТКР слита по меньшей мере с одним биотинным компонентом или другой связывающей молекулой/линкером, и где указанные одноцепочечные ТКР соединены между собой за счет взаимодействия биотин-стрептавидина, позволяя образовываться указанному мультимерному комплексу. Возможными являются также похожие подходы, известные в области техники для получения мультимерных ТКР, и они включены в настоящее изобретение. Также предложены мультимерные комплексы более высокого порядка, включающие более чем два двухцепочечных ТКР по изобретению.

В целях настоящего изобретения ТКР является компонентом, имеющим по меньшей мере один переменный домен альфа- или гамма-цепи ТКР и/или переменный домен бета- или дельта-цепи ТКР. В общем, они включают как альфа-переменный домен ТКР, так и бета-переменный домен ТКР, альтернативно как гамма-переменный домен ТКР, так и дельта-переменный домен ТКР. Они могут быть гетеродимерами $\alpha\beta/\gamma\delta$ или могут быть в форме отдельной цепи. Для применения в рамках адоптивной терапии $\alpha\beta$ - или $\gamma\delta$ -гетеродимерные ТКР могут быть, например, трансфицированы как цепи полной длины, имеющие как цитоплазматические, так и трансмембранные домены. По желанию может присутствовать введенная дисульфидная связь между остатками соответствующих константных доменов.

В предпочтительном варианте осуществления антигенраспознающая структура является ТКР человека или его фрагментом или его производным. ТКР человека или его фрагмент или его производное является ТКР, который включает свыше 50% соответствующей последовательности ТКР человека. Предпочтительно, если только малая часть последовательности ТКР искусственного происхождения или получена от других видов. Тем не менее, известно, что преимущества имеют химерные ТКР, например, человеческого происхождения с мышинными последовательностями в константных доменах. Поэтому особенно предпочтительными является ТКР в соответствии с настоящим изобретением, который содержит мышинные последовательности во внеклеточной части их константных доменов.

Таким образом, также предпочтительным является то, что антигенраспознающая структура по изобретению способна распознавать свой антиген по зависимому от человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) механизму, предпочтительно по HLA-A02-зависимому механизму. Понятие "по HLA-зависимому механизму" в контексте настоящего описания означает, что антигенраспознающая структура связывается с антигеном только в том случае, если антигенный пептид презентруется указанным HLA.

Антигенраспознающая структура в соответствии с изобретением в одном варианте осуществления предпочтительно индуцирует иммунный ответ, предпочтительно где иммунный ответ характеризуется повышением уровней интерферона (ИФН)-гамма.

В изобретении также предложен полипептид, включающий функциональный участок любого из ТКР (или его функциональных вариантов), описанных в настоящем контексте, например, любого из ТКР, предложенных в разделе примеров и табл. 2. Понятие "полипептид" в контексте настоящего описания включает олигопептиды и относится к одиночной цепи аминокислот, связанных одной или несколькими пептидными связями. В отношении полипептидов по изобретению функциональный участок может быть любым участком, включающим смежные аминокислоты ТКР (или его функционального варианта), частью которого он является, при условии, что функциональный участок специфически связывается с антигеном ТАА, предпочтительно, как раскрыто в настоящем описании в табл. 1. Понятие "функциональный участок", когда оно используется в отношении ТКР (или его функционального варианта), относится к любой части или фрагменту ТКР (или его функционального варианта) по изобретению, часть или фрагмент которого сохраняет биологическую активность ТКР (или его функционального варианта), частью которого он является (исходный ТКР или его исходный функциональный вариант). Функциональные участки охватывают, например, те части ТКР (или его функционального варианта), которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном ТАА (по HLA-зависимому механизму) или выявлять, лечить или предотвращать рак в подобной степени, в равной степени или в большей степени, чем исходный ТКР (или его функциональный вариант). В отношении исходного ТКР (или его функционального варианта) функциональный участок может включать, например, около 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% или более переменных последовательностей исходного ТКР (или его функционального варианта).

Функциональный участок может включать дополнительные аминокислоты на аминном или карбоксильном конце участка или на обоих концах, на которых дополнительные аминокислоты не обнаруживаются в аминокислотной последовательности исходного ТКР или его функционального варианта. Желательно, чтобы дополнительные аминокислоты не интерферировали с биологической функцией функционального участка, например, специфическим связыванием с антигенами ТАА; и/или имеющейся способностью выявлять рак, лечить или предотвращать рак и т.д. Более желательно, чтобы дополнительные аминокислоты усиливали биологическую активность по сравнению с биологической активностью исходного ТКР или его функционального варианта.

В некоторых случаях структура по изобретению может включать одну или две полипептидные цепи, включающие последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 39 по 86 (последовательности CDR, константные и переменные области и последовательности полной длины), или их функциональные фрагменты, и далее включает(ют) другие аминокислотные последовательности, например, аминокислотную последовательность, кодирующую иммуноглобулин или его фрагмент, тогда белок по изобретению может быть слитым белком. В этом отношении в изобретении также предложен слитый белок, включающий по меньшей мере один из полипептидов по изобретению, описанный в данном контексте наряду с по меньшей мере одним другим полипептидом. Другой полипептид может существовать как отдельный полипептид слитого белка, или может существовать в качестве полипептида, который экспрессирован в рамке (в тандеме) с одним из полипептидов по изобретению, описанных в данном контексте. Другой полипептид может включать любую пептидную или белковоподобную молекулу или ее фрагмент, включая, иммуноглобулин, CD3, CD4, CD8, молекулу MHC, молекулу CD1, например, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, и т.д., но без ограничения ими.

Слитый белок может включать одну или несколько копий полипептида по изобретению и/или одну или несколько копий другого полипептида. Например, слитый белок может включать 1, 2, 3, 4, 5 или более копий полипептида по изобретению и/или другого полипептида. Подходящие способы получения слитых белков известны из области техники и включают, например, рекомбинантные способы. В некоторых вариантах осуществления изобретения ТКР (и их функциональные участки и их функциональные варианты), полипептиды и белки по изобретению могут быть экспрессированы в виде отдельного белка, включающего линкерный пептид, связывающий α -цепь и β -цепь и связывающий γ -цепь и δ -цепь. В этом отношении ТКР (и их функциональные участки и их функциональные варианты), полипептиды и белки по изобретению, включающие аминокислотные последовательности переменных областей ТКР по изобретению, и могут далее включать линкерный пептид. Линкерный пептид может с пользой способствовать экспрессии рекомбинантного ТКР (включая его функциональные участки и его функциональные варианты), полипептида и/или белка в клетке-хозяине. Линкерный пептид может включать любую подходящую аминокислотную последовательность. Линкерные последовательности для одноцепочечных ТКР-структур хорошо известны из уровня техники. Так, одноцепочечная структура может далее включать одну или две последовательности константного домена. При экспрессии структуры, включающей линкерный пептид, в клетке-хозяине линкерный пептид также может быть расщеплен, приводя к образованию отдельных α - и β -цепей и отдельных γ - и δ -цепей.

Как уже упоминалось выше, функциональность по связыванию ТКР по изобретению может быть обеспечена за счет каркаса антитела. Например, последовательности CDR ТКР по изобретению, включающие, возможно, дополнительные 3, 2 или 1 N- и/или C-концевые каркасные остатки, могут быть непосредственно встроены в последовательность переменной области тяжелой/легкой цепи антитела.

Понятие "антитело" в своих различных грамматических формах используется в настоящем контексте для обозначения молекул иммуноглобулина и иммунологически активных участков молекул иммуноглобулина, т.е. молекул, которые содержат антиген-связывающий центр или паратоп. Такие молекулы называются также "антиген-связывающие фрагменты" молекул иммуноглобулина. В изобретении далее предложено антитело или его антиген-связывающий участок, который специфически связывается с антигенами, описанными в настоящем документе. Антитело может быть иммуноглобулином любого вида, известного из уровня техники. Например, антитело может быть любого изотипа, например, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM и т.д. Антитело может быть моноклональным или поликлональным. Антитело может быть встречавшимся в природе антителом, например, антителом, выделенным и/или очищенным из клеток млекопитающего, например, мыши, кролика, козы, лошади, курицы, хомяка, человека и т.д. В качестве альтернативы антитело может быть получено методами генной инженерии, например, гуманизированным антителом или химерным антителом. Антитело может быть в форме мономера или полимера.

Понятие "антитело" включает, но без ограничения, полученные методами генной инженерии или модифицированные другими способами формы иммуноглобулинов, такие как интратела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела (например, полученные с помощью "трансплантации CDR"), фрагменты антител и гетероконъюгированные антитела (например, биспецифические антитела, диатела, триатела, тетратела и т.д.). Понятие "антитело" включает цис-диатела и мини-антитела. Таким образом, все без исключения варианты осуществления, предложенные в данном контексте в отношении "антител" или "подобных антителам структур" также предполагают в качестве варианта осуществления биспецифические антитела, диатела, scFv-фрагменты, конструкции рецептора химерных антител (CAR), диатела и/или мини-антитела, если не было явно указано иное. Понятие "антитело" включает полипептид из семейства иммуноглобулинов или полипептид, включающий фрагменты иммуноглобулина, который способен нековалентно, обратимо и специфическим образом связываться с соответствующим антигеном, предпочтительно, ТАА по изобретению согласно раскрытию сущности в данном контексте. Типичные структурные единицы антитела включают тетрамер. В некоторых вариантах осуществления антитело полной длины может состоять из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну "легкую" и одну "тяжелую" цепь (связанную посредством дисульфидной связи). Структура и изотипы антител хорошо известны опытному специалисту данной области (например, из работы Janeway, Immunobiology, издание 9-ое, 2016 г.).

Известные гены иммуноглобулинов млекопитающих включают гены константной области каппа-, лямбда-, альфа-, гамма-, дельта-, эpsilon- и мю-цепей в равной степени, как и большое число генов вариабельной области иммуноглобулинов (более подробную информацию о генах иммуноглобулинов см. в международной информационной системе Im-MunoGeneTics information system®, Lefranc M-P et al, Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D413-22; и <http://www.imgt.org/>). В случае цепей полной длины легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда. В случае цепей полной длины тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, которые, в свою очередь, определяют собой классы иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. N-конец каждой из цепей определяет вариабельную область из примерно 100-110 или более аминокислот, отвечающих, в первую очередь, за распознавание антигена. Понятия вариабельная область легкой цепи (VL) и вариабельная область тяжелой цепи (VH) относятся к этим областям легкой или тяжелой цепи, соответственно. Согласно использованию в контексте настоящего изобретения "антитело" включает в себя все вариации антител и их фрагментов. Таким образом, в пределы данной концепции входят все антитела полной длины, химерные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела (scFv), Fab, Fab' и мультимерные варианты этих фрагментов (например, F(ab')₂) с такой же, по существу такой же или подобной специфичностью связывания. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с пептидом ТАА по изобретению. Предпочтительные антигенраспознающие структуры в соответствии с изобретением включают тяжелую цепь антитела, предпочтительно ее вариабельный домен или ее антиген-связывающий фрагмент, и/или легкую цепь антитела, предпочтительно ее вариабельный домен или ее антиген-связывающий фрагмент. Подобным образом стабилизированные дисульфидной связью фрагменты вариабельной области (dsFv) могут быть получены по технологии рекомбинантной ДНК, фрагменты антител по изобретению, тем не менее, не ограничены этими отдельными типами фрагментов антител. Также антитело или его антиген-связывающий участок могут быть модифицированы таким образом, чтобы включать поддающуюся обнаружению метку, такую как, например, радиоизотоп, флуорофор (например, флуоресцеин изотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE)), фермент (например, щелочную фосфатазу, пероксидазу хрена) и частицы элементов (например, частицы золота). В некоторых случаях последовательность CDR3 ТКР может иметь несущественные модификации, но, предпочтительно, не более чем 3 аминокислотных остатков, предпочтительно только в двух и - наиболее предпочтительно - только в одной аминокислотной позиции в сравнении с последовательностями CDR3, предложенными в SEQ ID No. 44, 52, 60, 68, 76 и 84. Предпочтительно, если антитела включают CDR3, предпочтительно, все области CDR1 по CDR3 в комбинации, как указано для ТКР по изобретению в табл. 2, в каждом случае независимо, факультативно - с не более чем тремя или двумя, предпочтительно одной заменой(ами), вставкой(ами) и/или делецией(ами) аминокислоты по сравнению с этими последовательностями.

Подходящие способы получения антител известны из уровня техники. Например, стандартные гибридомные технологии описаны, например, в работе Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol, 5, 51 1-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988) и C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 8 Ed., Garland Publishing, New York, NY (2011)). В качестве альтернативы, другие способы, такие как технологии гибридомы EBV (Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984) и Roder et al., Methods Enzymol, 121, 140-67 (1986)), и векторные системы экспрессии на основе бактериофагов (см., например, Huse et al., Science, 246, 1275-81 (1989)) известны из уровня техники. Кроме того, способы получения антител у животных нечеловеческого происхождения описаны, например, в патентах США 5545806, 5569825 и 5714352 и патентной заявке США № 2002/0197266.

Некоторые варианты осуществления изобретения также относятся к ТКР или их функциональным фрагментам или их полипептидам, которые являются растворимыми ТКР. В контексте настоящего описания понятие "растворимый Т-клеточный рецептор" относится к гетеродимерным усеченным вариантам природных ТКР, которые включают внеклеточные участки α -цепи и β -цепи ТКР, например, связанные дисульфидной связью, но не имеющих трансмембранный и цитозольный домены природного белка. Понятия "последовательность α -цепи растворимого Т-клеточного рецептора" и "последовательность β -цепи растворимого Т-клеточного рецептора" относятся к последовательностям α -цепи и β -цепи ТКР, в которых отсутствуют трансмембранный и цитозольный домены. Последовательность (аминокислот или нуклеиновых кислот) α -цепи и β -цепи растворимого ТКР могут быть идентичны соответствующим последовательностям природного ТКР или могут включать варианты последовательностей α -цепи и β -цепи растворимого ТКР по сравнению с соответствующими последовательностями природного ТКР. Понятие "растворимый Т-клеточный рецептор", используемое в настоящем контексте, включает растворимые ТКР с вариантными или невариантными последовательностями α -цепи и β -цепи растворимого ТКР. Вариации могут быть в вариабельных или константных областях последовательностей α -цепи и β -цепи растворимого ТКР и могут включать, но без ограничения, мутации аминокислотной делеции, вставки, замещения, а также изменения в последовательности нуклеиновой кислоты, которые не изменяют аминокислотную последовательность. Растворимый ТКР по изобретению в любом случае сохраняет функциональность по связыванию своих исходных молекул.

Определения

Все термины, используемые здесь, если не указано иное, имеют значения, данные ниже.

Понятие "Т-клеточный рецептор" (аббревиатура ТКР) относится к гетеродимерной молекуле, включающей альфа-полипептидную цепь (альфа-цепь) и бета-полипептидную цепь (бета-цепь), где гетеродимерный рецептор способен связываться с пептидным антигеном, презентуемым молекулой НЛА.

Понятие "Т-клеточный ответ" означает специфическую пролиферацию и активацию эффекторных функций, индуцированных пептидом *in vitro* или *in vivo*. Для цитотоксических Т-клеток, рестриктированных по МНС I класса, эффекторными функциями может быть лизис клеток-мишеней, нагруженных пептидом, нагруженных предшественником пептида, или клеток-мишеней, естественно презентующих пептид; секреция цитокинов, предпочтительно интерферона-гамма, TNF-альфа или ИЛ-2, индуцированная пептидом; секреция эффекторных молекул, предпочтительно гранзимов или пер-форинов, индуцированная пептидом, или дегрануляция.

Понятие "пептид" в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Пептиды предпочтительно имеют длину в 9 аминокислот, но могут быть короче - 8 аминокислот в длину, и длиннее - 10, 11 или 12 или длиннее, а в случае пептидов, связанных с молекулами МНС II класса (более длинные варианты пептидов по описанию), они могут иметь длину в 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или более аминокислот.

Кроме того, понятие "пептид" включает в себя соли серий аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Предпочтительно, если соли являются фармацевтически приемлемыми солями пептидов, такими как, например, хлорид или ацетат (трифторацетат). Было замечено, что соли пептидов в соответствии с настоящим описанием существенно отличаются от пептидов в их состоянии(ях) *in vivo*, так как пептиды не являются солями *in vivo*.

Понятие "пептид" включает также понятие "олигопептид". Понятие "олигопептид" в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Длина олигопептида не особенно важна для описания до тех пор, пока в нем сохраняются надлежащие эпитопы или эпитопы. Олигопептиды обычно бывают менее чем около 30 аминокислотных остатков в длину и более чем около 15 аминокислот в длину.

Понятие "полипептид" обозначает серии аминокислотных остатков, обычно связанных друг с другом пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Длина полипептида не особенно важна для описания до тех пор, пока сохраняются надлежащие эпитопы. В отличие от терминов "пептид" или "олигопептид", термин "полипептид" введен для обозначения моле-

кул, содержащих более приблизительно 30 аминокислотных остатков.

Пептид, олигопептид, белок или полинуклеотид, кодирующий такую молекулу, является "иммуногенным" (и, таким образом, "иммуногеном" в рамках настоящего описания), если он способен индуцировать иммунный ответ. В случае настоящего описания иммуногенность получает более специфическое определение как способность индуцировать Т-клеточный ответ. Таким образом, "иммуноген" будет представлять собой молекулу, которая способна индуцировать иммунный ответ, и, в случае настоящего описания, молекулу, способную индуцировать Т-клеточный ответ. В другом аспекте иммуноген может быть пептидом, комплексом пептида и МНС, олигопептидом и/или белком, используемым для получения специфических антител или ТКР против него.

Для Т-клеточного "эпитопа" I класса необходим короткий пептид, который связан с рецептором МНС I класса, образующим трехчленный комплекс (альфа-цепь МНС I класса, бета-2-микроглобулин и пептид), который может быть распознан Т-клеткой, несущей подходящий Т-клеточный рецептор, связывающийся с комплексом МНС/пептид с подходящей аффинностью. Пептиды, связывающиеся с молекулами МНС I класса, типично имеют длину в 8-14 аминокислот и, особенно типично, длину в 9 аминокислот.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая конкретный пептид, олигопептид или полипептид, может быть встречающейся в природе или может быть синтезирована. В целом, сегменты ДНК, кодирующие пептиды, полипептиды и белки данного описания, собраны из фрагментов кДНК и коротких олигонуклеотидных линкеров или же из серий олигонуклеотидов для получения синтетического гена, который способен экспрессироваться в рекомбинантной транскрипционной единице, включающей регуляторные элементы, образованные из микробного или вирусного оперона.

В контексте настоящего описания понятие "нуклеотид, кодирующий пептид", относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид, включая искусственные (сделанные человеком) старт- и стоп-кодоны, совместимые с биологической системой, которой должна экспрессироваться последовательность, например, дендритная клетка или другая клеточная система, пригодная для получения ТКР.

В контексте настоящего описания понятие "нуклеотид, кодирующий ТКР", относится к одной или нескольким нуклеотидным последовательностям, кодирующим ТКР, включая искусственные (сделанные человеком) старт- и стоп-кодоны, совместимые с биологической системой, которой должна экспрессироваться последовательность, например, Т-клетка или другая клеточная система, пригодная для получения ТКР.

Используемая в контексте данного описания ссылка на последовательность нуклеиновой кислоты включает как одонитевую, так и двухнитевую нуклеиновую кислоту. Таким образом, например, для ДНК специфическая последовательность, если в контексте не указано иное, относится к одонитевой ДНК такой последовательности, дуплексу такой последовательности с его комплементом (двухнитевая ДНК) и комплементу такой последовательности.

Понятие "кодирующая область" относится к тому участку гена, который в естественных или обычных условиях кодирует продукт экспрессии того гена в его естественном геномном окружении, т.е., участку, кодирующему *in vivo* нативный продукт экспрессии гена.

Кодирующая область может быть получена из не мутировавшего ("нормального"), мутировавшего или измененного гена или может даже быть получена из последовательности ДНК, или же гена, целиком синтезированного в лаборатории с использованием методов, хорошо известных специалистам области синтеза ДНК.

Понятие "продукт экспрессии" означает полипептид или белок, являющийся природным продуктом трансляции гена и любой последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует эквиваленты, образующиеся в результате вырождения генетического кода и, таким образом, кодирует ту/те же самую(ые) аминокислоту(ы).

Понятие "фрагмент", если относится к кодирующей последовательности, означает участок ДНК, включающий меньше, чем полную кодирующую область, продукт экспрессии которого по существу сохраняет ту же самую биологическую функцию или активность, что и продукт экспрессии полной кодирующей области.

Понятие "сегмент ДНК" относится к полимеру ДНК в виде отдельного фрагмента или в качестве компонента более крупной конструкции ДНК, которая была образована из ДНК, выделенной по меньшей мере один раз в по существу чистой форме, т.е., без контаминирующих эндогенных материалов и в количестве или с концентрацией, позволяющей идентификацию, манипуляцию и восстановление сегмента и его составных нуклеотидных последовательностей стандартными биохимическими методами, например, с использованием вектора для клонирования. Такие сегменты предлагаются в форме открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними нетранслированными последовательностями или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслированной ДНК могут присутствовать за открытой рамкой считывания, где она не интерферирует с манипуляцией или экспрессией кодирующих областей.

Понятие "праймер" означает короткую последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть спарена с одной нитью ДНК с получением свободного конца 3'ОН, на котором ДНК-полимераза

начинает синтезировать дезоксирибонуклеотидную цепь.

Понятие "промотор" означает участок ДНК, задействованный в связывании РНК-полимеразы для инициации транскрипции.

Понятие "выделенный" означает, что материал удален из его исходного окружения (к примеру, естественного окружения, если он встречается в природе). Например, встречающийся в природе полинуклеотид или полипептид, представленный в живых организмах, не является выделенным, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенный от некоторых или всех сосуществующих материалов природной системы, является выделенным. В одном из аспектов такие полинуклеотиды являются частью вектора и/или такие полинуклеотиды или полипептиды являются частью композиции и все-таки выделены, так что такой вектор или композиция не является частью своего естественного окружения.

Полинуклеотиды и рекомбинантные или иммуногенные полипептиды, раскрытые в соответствии с настоящим описанием, могут также быть в "очищенной" форме. Понятие "очищенный" не требует абсолютной чистоты; скорее оно предназначено для дачи относительного определения и может включать препараты с высокой очисткой или препараты только с частичной очисткой, в соответствии с тем, как эти термины понимаются специалистами соответствующей области. Например, отдельные клоны, выделенные из библиотеки кДНК, как обычно очищались до электрофоретической гомогенности. Очистка исходного материала или природного материала от примесей по меньшей мере на один порядок величины, предпочтительно два или три порядка, и, более предпочтительно, четыре или пять порядков величины определенно рассматривается в изобретении. Более того, определенно включен заявленный полипептид, чистота которого составляет, предпочтительно, 99,999% или по меньшей мере 99,99% или 99,9%; и даже желательно 99% по массе или более.

Нуклеиновые кислоты и полипептиды как продукты экспрессии, раскрываемые в соответствии с настоящим описанием, в равной степени, как и векторы экспрессии, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или такие полипептиды, могут быть в "обогащенной форме". Используемый здесь термин "обогащенный" означает, что концентрация материала по меньшей мере приблизительно в 2, 5, 10, 100 или 1000 раз выше его естественной концентрации (например), преимущественно 0,01%, по массе, предпочтительно по меньшей мере около 0,1% по массе. Рассматриваются также обогащенные препараты с концентрацией примерно 0,5%, 1%, 5%, 10% и 20% по массе. Последовательности, конструкции, векторы, клоны и другие материалы, включенные в настоящее описание, могут быть предпочтительно в обогащенной форме или выделенными. Понятие "активный фрагмент" означает фрагмент - обычно пептида, полипептида или последовательности нуклеиновой кислоты, - который дает иммунный ответ (т.е. обладает иммуногенной активностью), если он введен отдельно или факультативно с подходящим адъювантом или в векторе животному, такому как млекопитающее, например, кролику или мыши, также включая человека; причем такой иммунный ответ принимает форму стимуляции Т-клеточного ответа у животного-реципиента, такого как человек. Альтернативно "активный фрагмент" может также быть использован для инициации ответа Т-клетки *in vitro*.

В контексте настоящего описания понятия "участок", "сегмент" и "фрагмент", если они использованы по отношению к полипептидам, относятся к непрерывной последовательности остатков, таких как аминокислотные остатки, последовательность которых формирует подкласс более крупной последовательности. Например, если полипептид был подвергнут обработке любой из известных эндопептидаз, таких как трипсин или химотрипсин, то полученные в результате такой обработки олигопептиды будут представлять участки, сегменты или фрагменты исходного полипептида. При использовании по отношению к полинуклеотидам эти понятия относятся к продуктам, полученным при обработке указанных полинуклеотидов любой из эндонуклеаз.

В соответствии с настоящим описанием понятие "процентная доля идентичности" или "идентичный с процентной долей", если оно относится к последовательности, означает, что последовательность сравнивается с заявленной или описанной последовательностью после выравнивания сравниваемой последовательности ("Сравниваемая последовательность") с описанной или заявленной последовательностью ("Контрольная последовательность"). Процентная доля идентичности определяется затем по следующей формуле:

$$\text{процентная доля идентичности} = 100[1 - (C/R)]$$

где "C" является числом различий между Контрольной последовательностью и Сравниваемой последовательностью по длине выравнивания между Контрольной последовательностью и Сравниваемой последовательностью, где

- (i) каждое основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые не имеют соответствующего выровненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности и
- (ii) каждая брешь в Контрольной последовательности и
- (iii) каждое выровненное основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые отличаются от выровненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности, представляют собой различие; и
- (iv) выравнивание должно начинаться с позиции 1 выровненных последовательностей; и "R" - это число оснований или аминокислот в Контрольной последовательности по длине выравнивания со Сравниваемой последовательностью.

ниваемой последовательностью с любой брешью, образующейся в Контрольной последовательности, считающейся также за основание или аминокислоту.

Если существует противопоставление между Сравнимой последовательностью и Контрольной последовательностью, для которых процентная доля идентичности, по расчетам выше, приблизительно равна или выше установленной минимальной Процентной доли идентичности, тогда Сравнимая последовательность имеет установленную минимальную процентную долю идентичности с Контрольной последовательностью, если даже могут существовать выравнивания, в которых подсчитанная здесь выше процентная доля идентичности меньше, чем установленная процентная доля идентичности.

В описании термин "гомологичный" относится к степени идентичности (см. выше, Процентная доля идентичности) между последовательностями двух аминокислотных последовательностей, т.е. пептидных или полипептидных последовательностей. Упомянутая ранее "гомология" определяется при сравнении двух последовательностей, сопоставляемых в оптимальных условиях для сравниваемых последовательностей. Такая гомология последовательностей может быть подсчитана с помощью создания выравнивания, например, по алгоритму ClustalW. Широко распространено программное обеспечение для анализа последовательностей, в частности, Vector NTI, GENETYX или другие инструменты, предоставляемые банками данных свободного доступа.

Специалист данной области будет в состоянии оценить, будут ли Т-клетки, индуцированные вариантом конкретного пептида, способны к перекрестной реакции с самим пептидом (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

Под "вариантом" данной аминокислотной последовательности авторы изобретения имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков, изменены (например, путем их замещения боковой цепью остатка другой встречающейся в природе аминокислоты или какой-либо другой боковой цепью) так, что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, имеющий данную аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 24. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы МНС, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-лимфоцитов. Подобным образом ТКР может быть модифицирован так, что он, по меньшей мере, сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться с подходящим комплексом молекула МНС (такая как HLA-A*02 или -DR)-KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1), и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность активировать Т-клетки.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, такого как KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1), как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к соединительному элементу рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. В одном аспекте специалист данной области будет в состоянии с учетом раскрытых в данном описании идей модифицировать аминокислотные последовательности ТКР, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохраняют ли такие варианты ТКР способность связывать комплексы молекул МНС I или II класса-KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1). Варианты ТКР согласно описанию сохраняют способность связываться с комплексами молекул МНС I или II класса-KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1). Т-клетки, экспрессирующие варианты ТКР согласно описанию, могут затем уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, содержащий природную аминокислотную последовательность родственного пептида, такого как KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте пептиды или ТКР, раскрываемые в данном описании, могут быть модифицированы путем замены одного или нескольких остатков в различных, возможно селективных, участках по длине пептидной цепи, если не заявлено иное. Предпочтительно, если такие замены расположены на конце аминокислотной цепи указанного пептида. В случае ТКР, предпочтительно, если такие замены расположены в вариабельных доменах альфа-цепи ТКР и бета-цепи ТКР. Такие замены могут носить консервативный характер, например, когда одна аминокислота заменяется аминокислотой с похожей структурой и характеристиками, так же как при замене гидрофобной аминокислоты на другую гидрофобную аминокислоту. Еще более консервативной будет замена аминокислот одинакового или похожего размера и химического характера, как, например, при замене лейцина на изолейцин. В исследованиях вариаций последовательностей внутри семейств встречающихся в природе гомологичных белков определенные замены аминокислот допускаются чаще, чем другие, и они часто связаны со сходствами по размеру, заряду, полярности и гидрофобности между исходной аминокислотой и ее заменой; и таковой является основа определения "консервативных замен".

Консервативные замены определены в контексте настоящего описания как обмены внутри одной из последующих пяти групп: группа 1 - малые, алифатические, неполярные или слабо полярные остатки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); группа 2 - полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды (Asp, Asn, Glu, Gln); группа 3 - полярные, положительно заряженные остатки (His, Arg, Lys); группа 4 - крупные, алифатические, неполярные остатки (Met, Leu, Ile, Val, Cys); и группа 5 - крупные, ароматические остатки (Phe, Tyr, Trp).

Менее консервативные замены могут охватывать замену одной аминокислоты другой, имеющей похожие характеристики, но отличающейся в какой-то степени по размеру, как в случае замены аланина остатком изолейцина. Высоко неконсервативные замены могут охватывать замену кислой аминокислоты полярной, или даже такой, которая имеет основной характер. Такие "радикальные" замены не могут, однако, быть отвергнуты как потенциально неэффективные из-за того, что химические эффекты не полностью предсказуемы, и радикальные замены могут неожиданно привести к благоприятным эффектам, не предсказуемым исходя из обычных химических принципов.

В одном аспекте в таких заменах могут участвовать другие структуры, отличающиеся от обычных L-аминокислот. Таким образом, D-аминокислоты могут быть заменены L-аминокислотами, обычно встречающимися в антигенных пептидах согласно описанию и всё же охватываемые настоящим раскрытием сущности изобретения. Кроме того, нестандартные аминокислоты (т.е. отличающиеся от повсеместно встречающихся протеиногенных аминокислот) могут быть также использованы в целях замены для получения иммуногенов и иммуногенных полипептидов в соответствии с настоящим описанием.

Если были произведены замены в более чем одной позиции с получением пептида с по существу эквивалентной или большей антигенной активностью, как определено ниже, то комбинации таких замен будут проанализированы для определения того, приведут ли эти комбинации замен к дополнительным или синергическим эффектам по отношению к антигенности пептида. По большей части не более 4 позиций внутри пептида должны замещаться одновременно.

В контексте настоящего описания понятия "мышинный" или "человеческий", когда они относятся к антигенраспознающей структуре или к ТКР, или к любому из компонентов ТКР, описанных в настоящем контексте (например, участок, определяющий комплементарность (CDR), варибельная область, константная область, α -цепь и/или β -цепь), обозначают ТКР (или его компонент), который получен из локуса мышинного или человеческого ТКР без перегруппировок, соответственно.

Т-клеточные рецепторы (ТКР)

В предпочтительном варианте осуществления описание относится к ТКР, включающему альфа-цепь ТКР, представленную в табл. 2, и ее варианты; и бета-цепь ТКР, представленную в табл. 2, и ее варианты. В одном аспекте ТКР, описываемый в настоящем контексте, обладает способностью связываться или специфически связываться с комплексом молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса и пептида KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1) или комплексом II класса и пептида KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1).

Таблица 2
Репрезентативные ТКР в соответствии с настоящим описанием

Идентификатор ТКР	Описание	Последовательность
альфа-цепь R20P1H7	альфа-цепь	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPALRLQEGESSLNCSY TVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKEKERLKATLTKKESFL HITAPKPEDSATYLCVQGENSGYSTLTFGKGTMLLVSPDIQNPDP VYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRS MDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVE KSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:39)
	L-сегмент (TRAV20)	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSG (SEQ ID NO:40)
	V-цепь (TRAV20)	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPALRLQEGESSLNCSY TVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKEKERLKATLTKKESFL HITAPKPEDSATYLCVQ (SEQ ID NO:41)
	CDR1	VSGLRG (SEQ ID NO:42)
	CDR2	LYS (SEQ ID NO:43)
	CDR3	CAVQGENSGYSTLT (SEQ ID NO:44)
	J-сегмент (TRAJ11)	NSGYSTLTFGKGTMLLVSP (SEQ ID NO:45)
	Константная область (TRAC)	DIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITD KTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:46)
бета-цепь R20P1H7	бета-цепь	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQTQNPRLITVTGKLTVCNQNM NHEYMSWYRQDPGLRLQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKVSKEKR NFPLILESPSPNQTSLYFCASSLGPGLAAYNEQFFGPGTRTLVLEDLK NVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKE VHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPRNHFRCQ VQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGV LSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:47)
	L-сегмент (TRAV27)	MGPQLLGYVVLCLLGAGPL (SEQ ID NO:48)

	V-цепь (TRAV27)	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKCLTVTCSQNM NHEYMSWYRQDPGLRLQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKVSKEKR NFPLILESPSPNQTSLYFCASSL (SEQ ID NO:49)
	CDR1	MNHEY (SEQ ID NO:50)
	CDR2	SMNVEV (SEQ ID NO:51)
	CDR3	CASSLGPLAAYNEQF (SEQ ID NO:52)
	J-цепь (TRBJ2-1)	YNEQFFGPGTRLTVL (SEQ ID NO:53)
	Константная область (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCVQVQFYGLSENDEWTQDRAKPTQIVSAEAWGRADCGFTSESY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:54)
альфа-цепь R7P1D5	альфа-цепь	MKTFAGFSFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTD SSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHL SLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRPNIQNPDPVYQ LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDF KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFE TDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:55)
	L-сегмент (TRAV5)	MKTFAGFSFLWLQLDCMSR (SEQ ID NO:56)
	V-цепь (TRAV5)	MKTFAGFSFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTD SSSTLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHL SLRIADTQTGDSAIYFCAE (SEQ ID NO:57)
	CDR1	DSSSTY (SEQ ID NO:58)
	CDR2	IFS (SEQ ID NO:59)
	CDR3	CAEYSSASKIIF ((SEQ ID NO:60)
	J-сегмент (TRAJ3)	YSSASKIIFGSGTRLSIRP (SEQ ID NO:61)
	Константная область (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITD KTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:62)

бета-цепь R7P1D5	бета-цепь	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISG HDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSKMPNASF STLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPE VAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGV STDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYG LSENDEWTQDRAKPTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATIL YEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:63)
	L-сегмент (TRBV12-4)	MGSWTLCCVSLCILVAKHT (SEQ ID NO:64)
	V-цепь (TRBV12-4)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISG HDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSKMPNASF STLKIQPSEPRDSAVYFCAS (SEQ ID NO:65)
	CDR1	SGHDY (SEQ ID NO:66)
	CDR2	FNNNVP (SEQ ID NO:67)
	CDR3	CASRANTGELFF (SEQ ID NO:68)
	J-цепь (TRBJ2-1)	NTGELFFGEGSRLTVL (SEQ ID NO:69)
	Константная область (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНH FRСQVQFYGLSENDEWTQDRAKPTQIVSAEAWGRADCGFTSESY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:70)
альфа-цепь R10P2G12	альфа-цепь	MLTASLLRAVIASICVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDCVYET RDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRRNSFDEQNEISGRYSWNFQKSTSS FNFTITASQVWDSAVYFCALSEGNSGNTPLVFGKGRLSVIANIQNPD PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKTVLDM RSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:71)
	L-сегмент (TRAV19)	MLTASLLRAVIASICVSSM (SEQ ID NO:72)
	V-цепь (TRAV19)	MLTASLLRAVIASICVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDCVYET RDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRRNSFDEQNEISGRYSWNFQKSTSS FNFTITASQVWDSAVYFCALSE (SEQ ID NO:73)

	CDR1	TRDTTYY (SEQ ID NO:74)
	CDR2	RNSF (SEQ ID NO:75)
	CDR3	CALSEGNSGNTPLVF (SEQ ID NO:76)
	J-сегмент (TRAJ29)	NSGNTPLVFGKGTRLSVIA (SEQ ID NO:77)
	Константная область (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:78)
	бета-цепь	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMD HENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPGYSVSREKKERF SLILESASTNQTSMYLCASSLSSGSHQETQYFGPGTRLLVLEDLKNVF PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHS GVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRQVQF YGLSENDEWTQDRAKPTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSA TILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:79)
	L-сегмент (TRAV28)	MGIRLLCRVAFCLAVGLV (SEQ ID NO:80)
	V-цепь (TRAV28)	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMD HENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPGYSVSREKKERF SLILESASTNQTSMYLCASSL (SEQ ID NO:81)
	CDR1	MDHEN (SEQ ID NO:82)
	CDR2	SYDVKM (SEQ ID NO:83)
Бета-цепь R10P2G12	CDR3	CASSLSSGSHQETQYF (SEQ ID NO:84)
	J-цепь (TRBJ2-5)	QETQYFGPGTRLLVL (SEQ ID NO:85)
	Константная область (TRBC2)	EDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPTQIVSAEAWGRADCGFTSESY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:86)

Альфа- и бета-цепи альфа-/бета-ТКР и гамма- и дельта-цепи гамма-/дельта-ТКР, как правило, считаются такими, что каждая из них имеет два "домена", а именно варибельные и константные домены. Варибельный домен состоит из последовательно расположенных варибельного сегмента (V) и соединительного сегмента (J). Варибельный домен может также включать лидерный сегмент (L). Бета- и дельта-цепи могут также включать сегменты разнообразия (D). Константные домены альфа и бета могут также включать С-терминальные трансмембранные (TM) домены, которые заякоривают альфа- и бета-цепи на клеточной мембране.

В настоящем описании понятие "альфа-варибельный домен ТКР" относится, таким образом, к соединению сегмента альфа V (TRAV) ТКР без лидерного сегмента (L) и сегмента альфа J (TRAJ) ТКР, а понятие "альфа-константный домен ТКР" относится к внеклеточному сегменту TRAC или к С-терминальной усеченной последовательности TRAC и, факультативно, к трансмембранному домену альфа (VIGFRILLKLVAGFNLLMTL (SEQ ID NO: 87)).

В равной степени понятие "бета-варибельный домен ТКР" относится к соединению сегмента бета V (TRBV) ТКР без лидерного сегмента (L) и сегмента бета D/J (TRBD/TRBJ) ТКР, а понятие "бета-константный домен ТКР" относится к внеклеточному сегменту TRBC или к С-терминальной усеченной последовательности TRBC и, факультативно, к трансмембранному домену бета (TILYEILLGKATLYAVLVLSALVL (SEQ ID NO: 88)).

В отношении гамма-/дельта-ТКР, понятие "гамма-варибельный домен ТКР", используемый в контексте данного изобретения, относится к соединению сегментов гамма V (TRGV) ТКР без лидерного сегмента (L) и гамма J (TRGJ) ТКР, а понятие "гамма-константный домен ТКР" относится к внеклеточному сегменту TRGC или к С-терминальной усеченной последовательности TRGC. В равной степени понятие "дельта-варибельный домен ТКР" относится к соединению сегментов дельта V (TRDV) ТКР без лидерного сегмента (L) и дельта D/J (TRDD/TRDJ) ТКР, а понятие "дельта-константный домен ТКР" относится к внеклеточному сегменту TRDC или к С-терминальной усеченной последовательности TRDC.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из альфа-цепи ТКР, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична альфа-цепи ТКР, представленной в табл. 2. Альфа-цепи ТКР, представленные в табл. 2, содержат лидерный (L) сегмент;

V-цепь; три комплементарных детерминантных участка (CDR1, CDR2 и CDR3); соединительный сегмент (J) и константную область, как определено в табл. 2.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из альфа-вариабельного домена ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен альфа-вариабельному домену ТКР, представленному в табл. 2.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из альфа-константного домена ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 75% идентичен альфа-константному домену ТКР, представленному в табл. 2.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из альфа-вариабельного домена ТКР, включающего по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), альфа-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи, представленных в табл. 2. В предпочтительном варианте осуществления альфа-вариабельный домен ТКР включает CDR3 альфа-цепи, представленный в табл. 2. В другом предпочтительном варианте осуществления альфа-вариабельный домен ТКР включает CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи, представленные в табл. 2.

В особенно предпочтительном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из альфа-вариабельного домена ТКР, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична альфа-вариабельному домену ТКР из табл. 2, и включает CDR1, CDR2 и CDR3 того же самого альфа-вариабельного домена из табл. 2.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из бета-цепи ТКР, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична бета-цепи ТКР, представленной в табл. 2. Бета-цепи ТКР, представленные в табл. 2, содержат лидерный (L) сегмент; V-цепь; три комплементарных детерминантных участка (CDR1, CDR2 и CDR3); соединительный сегмент (J) и константную область, как определено в табл. 2.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из бета-вариабельного домена ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен бета-вариабельному домену ТКР, представленному в табл. 2.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из бета-константного домена ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 75% идентичен бета-константному домену ТКР, представленному в табл. 2.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из бета-вариабельного домена ТКР, включающего по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), бета-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи, представленных в табл. 2. В предпочтительном варианте осуществления бета-вариабельный домен ТКР включает CDR3 бета-цепи, представленный в табл. 2. В другом предпочтительном варианте осуществления бета-вариабельный домен ТКР включает CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи, представленные в табл. 2.

В особенно предпочтительном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из бета-вариабельного домена ТКР, последовательность которого по меньшей мере на 90% или 95% идентична бета-вариабельному домену ТКР из табл. 2, и включает CDR1, CDR2 и CDR3 того же самого бета-вариабельного домена ТКР из табл. 2.

Альфа-вариабельный домен альфа может включать один или несколько доменов CDR-альфа-цепи, имеющих одну, две, три или четыре аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности CDR, представленной в табл. 2. В равной степени бета-вариабельный домен бета может включать один или несколько доменов CDR-бета-цепи, имеющих одну, две, три или четыре аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности CDR-бета, представленной в табл. 2.

Альфа-цепь ТКР и бета-цепь ТКР могут быть слиты с получением одноцепочечного ТКР. В качестве альтернативы, альфа- и бета-цепи ТКР могут экспрессироваться как отдельные белки, которые могут быть собраны в гетеродимер.

В одном варианте осуществления любая альфа-цепь ТКР из табл. 2 спарена с любой бета-цепью ТКР из табл. 2 для получения ТКР, который специфически связывается с комплексом пептида MAG-003 и молекулы HLA.

TCR R20P1H7

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из альфа-цепи и/или бета-цепи ТКР R20P1H7, соответствующих последовательностям с SEQ ID NO: 39 и 47 соответственно.

Альфа-вариабельный домен альфа ТКР R20P1H7 включает или - альтернативно - состоит из аминокислот с 22 по 133 с SEQ ID NO: 39; альфа-константный домен ТКР R20P1H7 включает или - альтерна-

тивно - состоит из аминокислот 134-275 последовательности SEQ ID NO: 39; бета-вариабельный домен ТКР R20P1H7 включает или - альтернативно - состоит из аминокислот с 20 по 135 с SEQ ID NO: 47; и бета-константный домен ТКР включает или - альтернативно - состоит из аминокислот с 136 по 315 с SEQ ID NO: 47.

В одном конкретном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-цепь ТКР, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична альфа-цепи ТКР с SEQ ID NO: 39.

В другом варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-вариабельный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен альфа-вариабельному домену ТКР с SEQ ID NO: 39.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-константный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 75% идентичен альфа-константному домену ТКР с SEQ ID NO: 39.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-вариабельный домен ТКР, включающего по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), альфа-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 39. В предпочтительном варианте осуществления альфа-вариабельный домен ТКР включает CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 39. В другом предпочтительном варианте осуществления альфа-вариабельный домен ТКР включает CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 39.

В особенно предпочтительном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-вариабельный домен ТКР, последовательность которого по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности альфа-вариабельного домена ТКР с SEQ ID NO: 39, и включает CDR1, CDR2 и CDR3 с SEQ ID NO: 39.

В другом конкретном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-цепь ТКР, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична бета-цепи ТКР с SEQ ID NO: 47.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-вариабельный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен бета-вариабельному домену ТКР с SEQ ID NO: 47.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-константный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 75% идентичен бета-константному домену ТКР с SEQ ID NO: 47.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-вариабельный домен ТКР, включающего по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), бета-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 47. В предпочтительном варианте осуществления бета-вариабельный домен ТКР включает CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 47. В другом предпочтительном варианте осуществления бета-вариабельный домен ТКР включает CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 47.

В особенно предпочтительном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-вариабельный домен ТКР, последовательность которого по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности бета-вариабельного домена ТКР с SEQ ID NO: 47, и включает CDR1, CDR2 и CDR3 с SEQ ID NO: 47.

Вариабельный домен альфа-цепи может включать один или несколько доменов CDR-альфа, имеющих одну, две, три или четыре аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности CDR SEQ ID NO: 39. В равной степени вариабельный домен бета-цепи может включать один или несколько доменов CDR-бета, имеющих одну, две, три или четыре аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности CDR-бета с SEQ ID NO: 47.

TCR R7P1D5

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из альфа-цепи и/или бета-цепи ТКР R7P1D5, соответствующих последовательности с SEQ ID NO: 55 и 63, соответственно.

Альфа-вариабельный домен ТКР R7P1D5 включает или - альтернативно - состоит из аминокислот с 22 по 131 последовательности SEQ ID NO: 55; альфа-константный домен ТКР R7P1D5 включает или - альтернативно - состоит из аминокислот с 132 по 272 последовательности SEQ ID NO: 55; бета-вариабельный домен ТКР R7P1D5 включает или - альтернативно - состоит из аминокислот с 20 по 131 с SEQ ID NO: 63; и бета-константный домен ТКР включает или - альтернативно - состоит из аминокислот с 132 по 310 последовательности SEQ ID NO: 63.

В одном конкретном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-

цепь ТКР, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична альфа-цепи ТКР с SEQ ID NO: 55.

В другом варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-вариабельный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен альфа-вариабельному домену ТКР с SEQ ID NO: 55.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-константный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 75% идентичен альфа-константному домену ТКР с SEQ ID NO: 55.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-вариабельный домен ТКР, включающего по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), альфа-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 55. В предпочтительном варианте осуществления альфа-вариабельный домен ТКР включает CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 55. В другом предпочтительном варианте осуществления альфа-вариабельный домен ТКР включает CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 55.

В особенно предпочтительном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-вариабельный домен ТКР, последовательность которого по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности альфа-вариабельного домена ТКР с SEQ ID NO: 55, и включает CDR1, CDR2 и CDR3 с SEQ ID NO: 55.

В другом конкретном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-цепь ТКР, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, предпочтительно на 90%, или 95% идентична бета-цепи ТКР с SEQ ID NO: 63.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-вариабельный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен бета-вариабельному домену ТКР с SEQ ID NO: 63.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-константный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 75% идентичен бета-константному домену ТКР с SEQ ID NO: 63.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-вариабельный домен ТКР, включающего по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), бета-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 63. В предпочтительном варианте осуществления бета-вариабельный домен ТКР включает CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 63. В другом предпочтительном варианте осуществления бета-вариабельный домен ТКР включает CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 63.

В особенно предпочтительном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-вариабельный домен ТКР, последовательность которого по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности бета-вариабельного домена ТКР с SEQ ID NO: 63, и включает CDR1, CDR2 и CDR3 с SEQ ID NO: 63.

Вариабельный домен альфа-цепи может включать один или несколько доменов CDR-альфа, имеющих одну, две, три или четыре аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности CDR SEQ ID NO: 55. В равной степени вариабельный домен бета-цепи может включать один или несколько доменов CDR-бета, имеющих одну, две, три или четыре аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности CDR-бета с SEQ ID NO: 63.

TCR R10P2G12

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает или состоит из альфа-цепи и/или бета-цепи ТКР R10P2G12, соответствующих последовательности с SEQ ID NO: 71 и 79, соответственно.

Альфа-вариабельный домен ТКР R10P2G12 включает или - альтернативно - состоит из аминокислот с 21 по 136 последовательности SEQ ID NO: 71; альфа-константный домен ТКР R10P2G12 включает или - альтернативно - состоит из аминокислот с 137 по 277 последовательности SEQ ID NO: 71; бета-вариабельный домен ТКР R10P2G12 включает или - альтернативно - состоит из аминокислот с 20 по 134 последовательности SEQ ID NO: 79; и бета-константный домен ТКР включает или - альтернативно - состоит из аминокислот с 135 по 313 последовательности SEQ ID NO: 79.

В одном конкретном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-цепь ТКР, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична альфа-цепи ТКР с SEQ ID NO: 71.

В другом варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-вариабельный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен альфа-вариабельному

домену ТКР с SEQ ID NO: 71.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-константный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 75% идентичен альфа-константному домену ТКР с SEQ ID NO: 71.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-вариабельный домен ТКР, включающего по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), альфа-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 71. В предпочтительном варианте осуществления альфа-вариабельный домен ТКР включает CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 71. В другом предпочтительном варианте осуществления альфа-вариабельный домен ТКР включает CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 71.

В особенно предпочтительном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает альфа-вариабельный домен ТКР, последовательность которого по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности альфа-вариабельного домена ТКР с SEQ ID NO: 71 и включает CDR1, CDR2 и CDR3 с SEQ ID NO: 71.

В другом конкретном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-цепь ТКР, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична бета-цепи ТКР с SEQ ID NO: 79.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-вариабельный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен бета-вариабельному домену ТКР с SEQ ID NO: 79.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-константный домен ТКР, который по меньшей мере на 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен, предпочтительно на 75% идентичен бета-константному домену ТКР с SEQ ID NO: 79.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-вариабельный домен ТКР, включающего по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), бета-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 79. В предпочтительном варианте осуществления бета-вариабельный домен ТКР включает CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 79. В другом предпочтительном варианте осуществления бета-вариабельный домен ТКР включает CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 79.

В особенно предпочтительном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению включает бета-вариабельный домен ТКР, последовательность которого по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности бета-вариабельного домена ТКР с SEQ ID NO: 79, и включает CDR1, CDR2 и CDR3 с SEQ ID NO: 79.

Вариабельный домен альфа-цепи может включать один или несколько доменов CDR-альфа, имеющих одну, две, три или четыре аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности CDR SEQ ID NO: 71. В равной степени вариабельный домен бета-цепи может включать один или несколько доменов CDR-бета, имеющих одну, две, три или четыре аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности CDR-бета с SEQ ID NO: 79.

В другом предпочтительном варианте осуществления ТКР согласно настоящему описанию специфически связывается с комплексом пептида MAG-003 и молекулы HLA, где пептид MAG-003 выбран из KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1) и его вариантов, таких как представленные последовательностями с SEQ ID NO: 2 по SEQ ID NO: 24. В одном варианте осуществления молекулой МНС I класса является молекула HLA, выбранная из группы, состоящей из молекул HLA-A, HLA-B и HLA-C. В одном варианте осуществления молекула HLA является HLA-A*02. В другом варианте осуществления молекула HLA является молекулой II класса МНС, выбранной из группы, состоящей из молекул HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR.

ТКР по настоящему изобретению предпочтительно связываются с комплексом пептида MAG-003 и молекулы HLA с аффинностью связывания (K_D) около 100 мкМ или ниже, около 50 мкМ или ниже, около 25 мкМ или ниже или около 10 мкМ или ниже. Более предпочтительными являются высокоаффинные ТКР с аффинностью связывания, составляющей около 1 мкМ или ниже, около 100 нМ или ниже, около 50 нМ или ниже, около 25 нМ или ниже. Неограничивающие примеры диапазонов предпочтительной аффинности связывания для ТКР согласно настоящему описанию включают значения от около 1 до около 10 нМ; от около 10 до около 20 нМ; от около 20 до около 30 нМ; от около 30 до около 40 нМ; от около 40 до около 50 нМ; от около 50 до около 60 нМ; от около 60 до около 70 нМ; от около 70 до около 80 нМ; от около 80 до около 90 нМ и от около 90 до около 100 нМ.

Используемое в связи с ТКР по настоящему изобретению понятие "специфическое связывание" и его грамматические варианты используются для обозначения ТКР с аффинностью связывания (K_D) для комплекса пептида MAG-003 и молекулы HLA 100 мкМ или ниже.

Альфа/бета гетеродимерные ТКР согласно настоящему описанию могут иметь введенную дисульфидную связь между их константными доменами. Предпочтительные ТКР этого вида включают те, что

имеют последовательность константного домена TRAC и последовательность константного домена TRBC1 или TRBC2, кроме тех случаев, когда Thr 48 домена TRAC и Ser 57 доменов TRBC1 или TRBC2 замещены остатками цистеина, причем указанные остатки цистеина образуют дисульфидную связь между последовательностью константного домена TRAC и последовательностью константного домена TRBC1 или TRBC2 ТКР.

С введением межцепочечной связи, упомянутой выше, или без нее альфа/бета гетеро-димерные ТКР по настоящему изобретению могут иметь последовательность константного домена TRAC и последовательность константного домена TRBC1 или TRBC2, и последовательность константного домена TRAC и последовательность константного домена TRBC1 или TRBC2 ТКР могут быть связаны встречающейся в природе дисульфидной связью между Cys4 экзона 2 и Cys2 экзона 2 домена TRBC1 или TRBC2.

ТКР по настоящему изобретению могут включать поддающуюся обнаружению метку, выбранную из группы, состоящей из радионуклида, флуорофора и биотина. ТКР по настоящему изобретению могут конъюгированы с терапевтически активным ингредиентом, таким как радионуклид, химиотерапевтическим средством или токсином.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению, имеющий по меньшей мере одну мутацию альфа-цепи и/или имеющий по меньшей мере одну мутацию бета-цепи, обладает модифицированным гликозилированием в сравнении с ТКР без мутаций.

В одном варианте осуществления ТКР, содержащий по меньшей мере одну мутацию в альфа-цепи ТКР и/или бета-цепи ТКР, имеет аффинность связывания по отношению к и/или полупериод связывания с комплексом пептида MAG-003 и молекулы HLA, которые по меньшей мере вдвое выше, чем у ТКР, содержащего альфа-цепь ТКР без мутаций и/или бета-цепь ТКР без мутаций. Усиление аффинности опухолеспецифических ТКР, а также ее использование, опирается на существование "окна" с оптимальными показателями аффинности для ТКР. Существование такого окна основано на наблюдениях, что ТКР, специфические к HLA-A2-рестриктированным патогенам, обладают показателями KD, которые, в основном, примерно в 10 раз ниже по сравнению с ТКР, специфическими к HLA-A2-рестриктированным опухолессоциированным аутоантигенам (Aleksic et al. 2012; Kunert et al. 2013). Сейчас известно, хотя опухолеспецифические антигены имеют иммуногенный потенциал, поскольку опухоли возникают из собственных клеток индивида, только мутантные белки или белки с изменениями в трансляционном процессинге будут восприниматься иммунной системой как чужеродные. Антигены, уровень которых повышен или которые экспрессируются в избытке (так называемые ауто-антигены), не будут в обязательном порядке вызывать функциональный иммунный ответ против опухоли: Т-клетки, экспрессирующие ТКР, которые являются высоко активными по отношению к данным антигенам, будут подвергаться отрицательному отбору внутри вилочковой железы в процессе, известном как центральная толерантность (Xing et al. 2012; Ruella et al. 2014; Sharpe et al. 2015), что означает, что останутся лишь Т-клетки с низкоаффинными ТКР к ауто-антигенам. Поэтому аффинность ТКР или вариантов согласно настоящему описанию по отношению к MAG-003 усилена описываемыми далее способами, хорошо известными из уровня техники.

Пептиды MAG-003

В настоящем описании предложен пептид, включающий последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 24 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 24, или его вариант, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с пептидом, описанным в настоящем документе. В одном аспекте пептиды согласно описанию обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или более длинные версии пептида, описанного в настоящем документе - с МНС II класса. В одном аспекте ТКР, описанный в настоящем документе, способен связываться или специфически связываться с пептидом, описанным в настоящем документе.

У человека имеется три различных генетических локуса, которые кодируют молекулы МНС I класса (молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA)): HLA-A, HLA-B и HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 и HLA-A*07 являются примерами различных аллелей МНС I класса, которые могут экспрессироваться из этих локусов.

Таблица 3: Частоты экспрессии F HLA-A*02 и HLA-A*24 и наиболее частых серологических видов HLA-DR. Частоты экспрессии выведены из частот гаплотипа Gf среди американцев, приводимых в работе Mori и соавт. (Mori et al., 1997), с использованием формулы Харди-Вейнберга $F=1-(1-Gf)^2$. Комбинации A*02 или A*24 с определенными аллелями HLA-DR вследствие неравномерного распределения связей могут быть обогащенными или менее частыми, чем ожидается от их индивидуальных частот выявления. Более подробная информация представлена в работе Chanock и соавт. (Chanock et al., 2004).

Таблица 3

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля
A*02	Европеоидная раса (Северная Америка)	49,1%
A*02	Афроамериканцы (Северная Америка)	34,1%
A*02	Монголоиды (Северная Америка)	43,2%
A*02	Латиноамериканцы (Северная Америка)	48,3%
DR1	Европеоидная раса (Северная Америка)	19,4%
DR2	Европеоидная раса (Северная Америка)	28,2%
DR3	Европеоидная раса (Северная Америка)	20,6%
DR4	Европеоидная раса (Северная Америка)	30,7%
DR5	Европеоидная раса (Северная Америка)	23,3%
DR6	Европеоидная раса (Северная Америка)	26,7%
DR7	Европеоидная раса (Северная Америка)	24,8%
DR8	Европеоидная раса (Северная Америка)	5,7%
DR9	Европеоидная раса (Северная Америка)	2,1%
DR1	Афроамериканцы (Северная Америка)	13,20%
DR2	Афроамериканцы (Северная Америка)	29,80%
DR3	Афроамериканцы (Северная Америка)	24,80%
DR4	Афроамериканцы (Северная Америка)	11,10%
DR5	Афроамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR6	Афроамериканцы (Северная Америка)	33,70%
DR7	Афроамериканцы (Северная Америка)	19,20%
DR8	Афроамериканцы (Северная Америка)	12,10%
DR9	Афроамериканцы (Северная Америка)	5,80%
DR1	Монголоиды (Северная Америка)	6,80%
DR2	Монголоиды (Северная Америка)	33,80%
DR3	Монголоиды (Северная Америка)	9,20%
DR4	Монголоиды (Северная Америка)	28,60%
DR5	Монголоиды (Северная Америка)	30,00%
DR6	Монголоиды (Северная Америка)	25,10%
DR7	Монголоиды (Северная Америка)	13,40%
DR8	Монголоиды (Северная Америка)	12,70%
DR9	Монголоиды (Северная Америка)	18,60%
DR1	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,30%
DR2	Латиноамериканцы (Северная Америка)	21,20%
DR3	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,20%
DR4	Латиноамериканцы (Северная Америка)	36,80%
DR5	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,00%
DR6	Латиноамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR7	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,20%
DR8	Латиноамериканцы (Северная Америка)	18,60%
DR9	Латиноамериканцы (Северная Америка)	2,10%
A*24	Филиппины	65%
A*24	Русские ненцы	61%
A*24:02	Япония	59%
A*24	Малайзия	58%
A*24:02	Филиппины	54%
A*24	Индия	47%
A*24	Южная Корея	40%
A*24	Шри-Ланка	37%
A*24	Китай	32%
A*24:02	Индия	29%
A*24	Западная Австралия	22%
A*24	США	22%
A*24	Россия, Самара	20%
A*24	Южная Америка	20%
A*24	Европа	18%

Ген MAGEA4

Этот ген является членом семейства генов MAGEA. Члены этого семейства кодируют белки, имеющие между собой идентичность последовательностей на 50-80%. Промоторы и первые экзоны генов MAGEA обладают значительной вариабельностью, позволяя предположить, что существование этого

семейства генов обеспечивает экспрессию соединений с одной и той же функцией под различным транскрипционным контролем. Кластер генов MAGEA локализован на участке хромосомы Xq28. Они задействованы в нескольких наследственных нарушениях, таких как врожденный дискератоз. Для этого гена было обнаружено по меньшей мере четыре варианта, кодирующих один и тот же белок. [согласно RefSeq, июль 2008 г.]

Для MAGEA4 описывали цитоплазматическую локализацию (Kim et al., 2015). Тем не менее, окрашивание для MAGEA4 было обнаружено также в ядрах с различным распределением между ядром и цитоплазмой в клетках хорошо дифференцированного рака по сравнению с формами рака с меньшей дифференциацией (Sarcevic et al., 2003).

MAGEA4 используется в качестве маркера мужских половых клеток. Он не экспрессируется гонцитами, но экспрессируется в предшественниках сперматогоний и зрелых половых клетках (Mitchell et al., 2014).

Таблица 4
Общая мишень для противораковых препаратов

Характеристики антигена	Оценка
Избыточная экспрессия при [исследуемом раковом заболевании], о которой сообщалось в литературе	
Избыточная экспрессия при других раковых заболеваниях, о которых сообщалось в литературе	+
Описанные Т-клеточные ответы на мишени, полученные из исходных белков	+
Картина экспрессии онкофетального антигена	+
Экспрессия раковыми стволовыми клетками	(-)
Роли в ходе клеточного цикла и пролиферации опухолевых клеток	(-)
Участие в инвазии, миграции и метастазировании опухоли	
Связь с сигнальными путями, ассоциированными с раком ¹	
Антиапоптотические эффекты	(-)
Проангиогенный эффект / неоваскуляризация	
Избыточная экспрессия, связанная с неблагоприятным прогнозом при раке	+
Избыточная экспрессия, ассоциирующаяся с поздними стадиями рака	+
Общая мишень для противораковых препаратов	
Субклеточная локализация ²	ЦП
Характеристика исходного белка в литературе (-, +, ++, +++)	+
Ассоциация с видом клеток ³	ОК

¹ TGF=трансформирующий фактор роста; PI3K=фосфатидилинозитид-3-киназы; p53 =клеточный опухолевый антиген p53; EGFR=рецептор эпителиального фактора роста; FGF2=фактор роста фибробластов 2; Wnt=Wnt/сигнальный путь бета-катенина (эмбриогенез); Ras=протоонкоген саркомы крыс; NF-kB=ядерный фактор каппа-B (эукариотический фактор транскрипции)

² ЦП=цитоплазма;

³ ОК=опухолевые клетки

рМНС в качестве мишени

В клиническом исследовании I фазы изучался адоптивный перенос генетически модифицированных аутологичных ЦТЛ, экспрессирующих ТКР, реагирующих с MAGEA4 (143-151), связанным с HLA-A*24:02, у пациентов с раком пищевода. Пациентам вводили однократно ТКР-трансдуцированные лимфоциты, без преколонизирования, затем подкожной иммунизацией пептидом MAGEA4 через 2 и 4 недели. Объективной регрессии опухоли не наблюдалось, возможно, в связи с отсутствием схемы лечения с деструкцией лимфоцитов и введением ИЛ-2 (Kageyama et al., 2015). Доклинические исследования на мышах показали, что перенесенные Т-клетки ингибировали рост линий опухолевых клеток, экспрессирующих MAGEA4, привитых мышам, и что дополнительная вакцинация пептидом усиливала это противоопухолевое действие (Shirakura et al., 2012).

MAGEA4 как мишень адоптивного переноса ЦТЛ предлагается в качестве варианта лечения EBV-отрицательной лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы. Сообщалось, что введенные в виде инфузии ЦТЛ, мишенью которых являются полученные из EBV пептиды, вызывали полную ремиссию у EBV(+) пациентов с лимфомами. Таким образом, использование в виде мишеней других антигенов, экспрессируемых лимфомой, в том числе MAGEA4, исследуется в качестве возможного варианта лечения (Cruz et al., 2011; Gerdemann et al., 2011).

В нескольких исследованиях была продемонстрирована выработка MAGEA4-специфических CD4(+) Т-клеток от здоровых доноров и пациентов, больных раком, после инкубации с аутологичными антигенпрезентирующими клетками, нагруженными перекрывающими пулами пептидов (Cesson et al.,

2011; Gerdemann et al., 2011; Ohkuri et al., 2009).

Пептид MAG-003, т.е., KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1), является HLA-A*0201-рестриктивным эпитопом MAGEA4 (аминокислоты 286-294) цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). (Jia et al. 2010; Wu et al. 2011), содержание которых в полном объеме включено путем ссылки. В одном аспекте MAG-003 вызывает выработку пептид-специфических ЦТЛ как *in vitro* из HLA-A*0201-положительных МПКК, так и у HLA-A*0201/Kb трансгенных мышей. В другом аспекте индуцированные ЦТЛ вызывают лизис клеток-мишеней по HLA-A*0201-рестрикционному механизму, демонстрируя, что MAG-003 является HLA-A*0201-рестриктивным эпитопом ЦТЛ и служит в качестве мишени для терапевтической противоопухолевой вакцинации (Jia et al. 2010), содержание которой включено во всей полноте путем ссылки.

На фиг. 1 представлена презентация пептида MAG-003 в здоровых и раковых тканях. Результаты обобщены в табл. 5. Конкретнее, в опухолевых тканях рака яичника (РЯ) и немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) предполагается наличие около 4000 и 2000 копий MAG-003 на клетку, соответственно.

Таблица 5

Презентация MAG-003 в здоровых тканях и при раке

A*02	Образцы	Средняя интенсивность	jScore
Здоровые ткани	0 из 245	---	---
Раковые образцы	14 из 397	1,1e+07	0,000
ГКК	1 из 16	2,9e+06	0,000
МЕЛ	0 из 3	0,0e+00	
РЯ	2 из 20	4,0e+07	0,000
НМРЛ	11 из 91	1,0e+07	0,000

Определение профиля экспрессии генов, кодирующих пептиды согласно описанию

Избыточной презентации или специфической презентации ТАА на опухолевых клетках по сравнению со здоровыми клетками достаточно для его пригодности в иммунотерапии, и некоторые пептиды являются опухолеспецифическими, несмотря на присутствие их исходных белков также и в здоровых тканях. Тем не менее, выявление профилей экспрессии мРНК приносит дополнительный уровень безопасности при отборе пептидных мишеней для иммунотерапии. В особенности в случае терапевтических методов с высокой степенью риска для безопасности, таких как ТКР с созревшей аффинностью, где идеальный целевой пептид будет получен из белка, являющегося уникальным для опухоли и не встречающегося на здоровых тканях.

Источники и приготовление РНК

Хирургически удаленные тканевые препараты были предоставлены различными организациями, которые перечислены выше после получения письменной формы информированного согласия от каждого пациента. Препараты опухолевой ткани были мгновенно заморожены после операции и впоследствии гомогенизированы с помощью ступки и пестика в жидком азоте. Суммарная РНК была приготовлена из данных образцов с использованием реагента TRI (Ambion, Дармштадт, Германия) с последующей очисткой на RNeasy (QIAGEN, Хильден, Германия); оба метода осуществлялись в соответствии с указаниями производителей.

Эксперименты по секвенированию РНК

Анализ экспрессии гена в образцах РНК опухолевой и здоровой ткани проводили способом секвенирования следующего поколения (RNAseq) лабораторией CeGaT (Тюбинген, Германия). Библиотеки секвенирования подготавливали при использовании набора реактивов Illumina HiSeq v4 согласно протоколу производителя (Illumina Inc, Сан-Диего, Калифорния, США), в который входит фрагментация РНК, синтез кДНК и добавление адаптеров секвенирования. Библиотеки, полученные из многочисленных образцов, смешивали в эквимольном соотношении и секвенировали на системе компании Illumina HiSeq 2500 согласно инструкциям производителя, получая одиночные риды длиной 50 пар оснований. Обработанные риды картируют на человеческий геном (GRCh38) с помощью программного обеспечения STAR. Данные по экспрессии представляются на уровне транскриптов в виде RPKM (число ридов на тысячу пар нуклеотидов, отнесенное на миллион картированных ридов с помощью программного обеспечения Cufflinks) и на уровне экзонов (общее число ридов, получаемых с помощью программного обеспечения Bedtools), на основании идентификаций по банку данных последовательностей ensembl (Ensembl77). Для получения значений RPKM риды экзонов нормализованы по длине экзона и размеру выравнивания.

Как показано на фиг. 2-4, MAG-003 экспрессируется на высоком уровне в раковых тканях и здоровых тканях низкого уровня риска, таких как семенник, по сравнению со здоровыми тканями высокого и среднего уровня риска.

В табл. 6-8 представлены данные RNASeq (показатели экспрессии) экспрессии MAG-003 при различных видах рака

Таблица 6
Показатель RNASeq 1

Вид опухоли	tgScore	exonScore (27242)	exonScore (317034)	exonScore (593984)
РМЖ	1,57	1,23	1,23	1,51
КРК	1,65	1,00	1,00	1,76
ГКК	12,10	11,98	11,97	6,15
РЯ	56,60	18,45	18,44	57,74
РП	58,42	3,49	3,49	60,40
РПЖ	12,10	10,78	10,77	4,74
пГБ	0,88	0,95	0,95	0,74
пНМРЛ	100,83	1,52	1,52	98,57
ПКК	0,93	0,95	0,95	0,77
МРЛ	56,41	28,32	28,30	152,27

Таблица 7
Показатель RNASeq 3

Вид опухоли	tgScore	exonScore (27242)	exonScore (317034)	exonScore (593984)
РМЖ	7,48	5,11	5,11	6,01
КРК	8,35	1,05	1,05	7,90
ГКК	123,03	210,33	210,30	42,22
РЯ	612,59	333,74	333,69	447,29
РП	632,95	47,41	47,40	468,45
РПЖ	122,95	187,07	187,05	31,15
пГБ	0,31	0,18	0,18	0,25
пНМРЛ	1100,05	10,26	10,25	768,23
ПКК	0,78	0,18	0,18	0,43
МРЛ	611,00	524,23	524,17	1190,36

Таблица 8
Экспрессия в опухоли

Вид опухоли	tgumor40	Exontumor40 (27242)	Exontumor40 (317034)	Exontumor40 (593984)
РМЖ	0,12	0,04	0,04	0,17
КРК	0,14	0,01	0,01	0,22
ГКК	2,05	1,82	1,82	1,18
РЯ	11,19	3,16	3,16	13,72
РП	10,89	0,42	0,42	13,11
РПЖ	2,09	1,65	1,65	0,89
пГБ	0,00	0,00	0,00	0,01
пНМРЛ	19,25	0,09	0,09	22,58
ПКК	0,01	0,00	0,00	0,01
МРЛ	10,18	4,53	4,53	33,35

В одном аспекте пептид, состоящий по существу из аминокислотной последовательности, как указано в настоящей заявке, может иметь замену одной или двух неякорных аминокислот (см. ниже относительно якорного мотива), так что способность связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса не будет существенно изменена или подвергнута негативному влиянию по сравнению с немодифицированным пептидом. В другом варианте осуществления в пептиде, состоящем, по существу, из аминокислотной последовательности, как указано в настоящей заявке, одна или две аминокислоты могут быть заменены партнерами по консервативной замене (см. информацию ниже), так что способность связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса не будет существенно изменена или подвергнута негативному влиянию по сравнению с немодифицированным пептидом.

Аминокислотные остатки, которые не вносят существенный вклад во взаимодействие с ТКР, могут быть модифицированы заменой на другие аминокислоты, включение которых существенно не влияет на реактивность Т-клетки и не устраняет связывание с соответствующим МНС. Таким образом, помимо данного условия, пептид согласно описанию может быть любым пептидом (в этот термин авторы изобретения включают олигопептиды или полипептиды), который включает аминокислотные последова-

тельности или их участок или их вариант, как дано.

Таблица 9
Варианты и мотив пептидов

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NOs:1-24	K	V	L	E	H	V	V	R	V
Варианты									L
									A
									I
		L							
		L							L
		L							A
		L							I
		A							
		A							L
		A							A
		A							I
	Y	L							
	Y	L							L
	Y	L							A
	Y	L							I
	Y	A							
	Y	A							L
	Y	A							A
	Y	A							I
	Y								
	Y								L
	Y								A
	Y								I

Более длинные пептиды также могут быть пригодными в одном аспекте. Возможно, что, хотя обычно истинные эпитопы являются остатками, существенно не влияющими на протеолитическое расщепление, эпитопы МНС I класса необходимы для презентации истинного эпитопа во время процессинга.

В одном аспекте пептиды согласно описанию могут быть удлинены с помощью вплоть до 1, 2, 3 или 4 аминокислот, это значит, что 1, 2, 3 или 4 аминокислоты могут быть добавлены к одному из концов в любой комбинации от 8 до 11 аминокислот в длину. Предпочтительно, чтобы примыкающие остатки были в соотношении между 4:0 и 0:4. Комбинации элонгаций в соответствии с описанием могут быть взяты из табл. 10.

Таблица 10
Комбинации элонгаций пептидов согласно описанию

С-конец	N-конец
4	0
3	0 или 1
2	0 или 1 или 2
1	0 или 1 или 2 или 3
0	0 или 1 или 2 или 3 или 4
N-конец	С-конец
4	0
3	0 или 1
2	0 или 1 или 2
1	0 или 1 или 2 или 3
0	0 или 1 или 2 или 3 или 4

Аминокислотами для элонгации/удлинения могут быть пептиды исходной последовательности белка или любая(ые) другая(ие) аминокислота(ы). Элонгация может быть использована для повышения стабильности или растворимости пептидов.

Таким образом, эпитопы настоящего описания могут быть идентичны встречающимся в природе опухолеассоциированным или опухолеспецифическим эпитопам или могут включать эпитопы, отличающиеся не более чем четырьмя остатками от контрольного пептида, при условии, что они имеют, по существу, идентичную антигенную активность.

В альтернативном варианте осуществления пептид удлинен с одной или другой стороны или с двух

сторон одновременно добавлением более 4 аминокислот, предпочтительно, до общей длины вплоть до 30 аминокислот. В одном аспекте это удлинение приводит к образованию пептидов, связывающихся с МНС II класса. Связывание с МНС II класса может быть проверено известными из уровня техники способами.

Соответственно, в настоящем описании предлагаются пептидные эпитопы и эпитопы пептидных вариантов, связывающихся с молекулами МНС I класса, в которых указанный пептид или вариант имеет общую длину между 8 и 100, предпочтительно между 8 и 30, и, наиболее предпочтительно, между 8 и 14, а именно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 аминокислот, в случае более длинных пептидов, связывающихся с молекулами МНС II класса, длина может также быть 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 аминокислоты.

В одном аспекте пептид или вариант в соответствии с настоящим описанием будет обладать способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса. Связывание пептида или варианта с комплексом МНС может быть проверено способами, известными из уровня техники.

Предпочтительно, чтобы Т-клетки, специфичные для пептида в соответствии с настоящим описанием были испытаны относительно замещенных пептидов; концентрация пептида, при которой замещенные пептиды достигают половины максимального роста лизиса относительно фона, составляет не более чем около 1 мМ, предпочтительно, не более чем около 1 мкМ, более предпочтительно, не более чем около 1 нМ, и еще более предпочтительно не более чем около 100 пМ и, наиболее предпочтительно, не более чем около 10 пМ. Также предпочтительно, чтобы замещенный пептид распознавался Т-клетками более чем одного индивида, по меньшей мере двух и, более предпочтительно, трех индивидов.

В контексте настоящего описания понятие "комплекс" относится к молекуле, которая специфически связывается с (например, антигенной) детерминантой. В одном варианте осуществления комплекс способен направлять единицу, к которой он прикреплен (например, (второй) антигенсвязывающий элемент) к сайту-мишени, например, к конкретному виду опухолевых клеток или стромы опухоли, несущих антигенную детерминанту (например, комплекс пептида с МНС в соответствии с настоящей патентной заявкой). В другом варианте осуществления комплекс способен активировать пути передачи сигналов за счет его антигена-мишени, например, антигена комплекса Т-клеточного рецептора. Комплексы включают, но без ограничения, антитела и их фрагменты, антигенсвязывающие домены антитела, включающие вариабельный участок тяжелой цепи антитела и вариабельный участок легкой цепи антитела, связывающие белки, включающие по меньшей мере один мотив анкиринового повтора и однодоменные антигенсвязывающие (SDAB) молекулы, аптамеры, (растворимые) ТКР и (модифицированные) клетки, такие как аллогенные или аутологичные Т-клетки. Чтобы оценить, является ли молекула комплексом, связывающимся с мишенью, может быть проведен анализ связывания.

"Специфическое" связывание обозначает, что комплекс (например, ТКР) связывается с представляющим интерес комплексом пептида с МНС лучше, чем с другими встречающимися в природе комплексами пептида с МНС, в такой степени, что комплекс, снабженный активной молекулой, способной уничтожать клетку, несущую специфическую мишень, не способен уничтожить другую клетку без специфической мишени, но пре-зентирующую другой(ие) комплекс(ы) пептида с МНС. Связывание с другими комплексами пептида с МНС не играет роли, если пептид перекрестно реагирующего комплекса пептида с МНС не является встречающимся в природе, т.е. не образован из человеческого НЛА-пептидома. Испытания для оценки потенциала уничтожения клетки-мишени хорошо известны из уровня техники. Они должны проводиться с использованием клеток-мишеней (первичные клетки или клеточные линии) с неизменной презентацией комплексов пептида с МНС или клеток, нагруженных пептидами, таким образом, что будет достигаться уровень встречающихся в природе комплексов пептида с МНС.

Каждый комплекс может включать метку, которая обеспечивает возможность обнаружения связанного комплекса за счет определения наличия или отсутствия сигнала, подаваемого меткой. Например, комплекс может быть помечен флуоресцентным красителем или любой другой применимой маркерной молекулы клетки. Такие маркерные молекулы хорошо известны из области техники. Например, флуоресцентное мечение, например, с помощью флуоресцентного красителя, может обеспечивать визуализацию связанного аптамера посредством флуоресцентной или лазерной сканирующей микроскопии или проточной цитометрии.

Каждый комплекс может быть конъюгирован со второй активной молекулой, такой как, например, ИЛ-21, антитело к CD3 и антитело к CD28.

Дополнительную информацию о пептидных комплексах можно получить, например, в разделе описания уровня техники патентной заявки WO 2014/071978A1, которая включена во всей полноте путем ссылки.

"Фармацевтическая композиция" является композицией, подходящей для введения человеку в медицинском учреждении. Предпочтительно, если фармацевтическая композиция является стерильной и произведена в соответствии с правилами GMP (надлежащей производственной практики).

Фармацевтические композиции настоящего описания также включают по меньшей мере один ТКР, растворимый ТКР, нуклеиновую кислоту и/или клетку-хозяина, экспрессирующую ТКР настоящего описания, в фармацевтически приемлемом носителе.

Фармацевтические композиции настоящего описания могут также включать фармацевтически при-

емлемые вспомогательные вещества и/или стабилизаторы.

Эта композиция используется для парентерального введения, такого как подкожное, внутривенное, внутримышечное или для перорального введения. Для этого пептиды и, факультативно, другие молекулы растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом, предпочтительно водном, носителе. Помимо того, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы, смазочные вещества и т.д. Обширный список вспомогательных веществ, которые могут быть использованы в такой композиции, может быть взят, например, из работы A. Kibbe, "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (Kibbe, 2000). Композиция может использоваться для предупреждения, профилактики и/или лечения аденоматозных или раковых заболеваний. Примеры составов могут быть взяты, например, из EP2112253, который включен во всей полноте путем ссылки.

В еще одном аспекте описания предлагаются нуклеиновые кислоты (например, поли-нуклеотиды), кодирующие пептид или варианты пептида, ТКР и варианты ТКР согласно описанию. Полинуклеотид может быть, например, ДНК, кДНК, РНК, РНК или их комбинациями, как одно-, так и/или двухнитевыми; природными или стабилизированными формами полинуклеотидов, такими как, например, полинуклеотиды с фосфоротиоат-ным остовом, и может содержать или не содержать интроны при условии, что полинуклеотид кодирует пептид. Разумеется, только пептиды, которые содержат встречающиеся в природе аминокислотные остатки, присоединенные встречающимися в природе пептидными связями, могут кодироваться полинуклеотидом. В другом аспекте описания предложен вектор экспрессии, способный экспрессировать полипептид в соответствии с описанием.

Был разработан ряд способов связывания полинуклеотидов, в особенности ДНК, с векторами, например, с помощью комплементарных липких концов. К примеру, к сегменту ДНК могут быть добавлены комплементарные гомополимерные хвосты для встраивания в векторную ДНК. Этот вектор и сегмент ДНК в таком случае соединены водородной связью между комплементарными гомополимерными хвостами, образуя молекулы рекомбинантной ДНК.

Синтетические линкеры, содержащие один или несколько сайтов рестрикции, обеспечивают альтернативный способ присоединения сегмента ДНК к векторам. Синтетические линкеры, содержащие ряд сайтов распознавания рестрикционной эндонуклеазы, имеются в продаже в различных источниках, включая International Biotechnologies Inc, Нью-Хейвен, Коннектикут, США.

В желаемом способе модификации ДНК, кодирующей полипептид согласно описанию, используется полимеразная цепная реакция, как раскрыто в работе Saiki RK, et al. (Saiki et al., 1988). Этот способ может быть использован для введения ДНК в подходящий вектор, например, при конструировании в подходящих сайтах рестрикции, или же он может быть использован для модификации ДНК другими пригодными путями, известными из уровня техники. Если используются вирусные векторы, то предпочтительными являются поксвирусные или аденовирусные векторы.

В одном аспекте для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему описанию, нуклеиновые кислоты, кодирующие цепи ТКР-альфа и/или ТКР-бета согласно настоящему описанию, клонируют в векторы экспрессии, такие как гамма-ретровирус или лентивирус. Рекомбинантные вирусы получают и проводят испытание их функциональности, такой как антигенная специфичность и функциональная авидность. Аликвота конечного продукта затем используется для трансдукции целевой популяции Т-клеток (как правило, очищенных от МПКК пациента), которую культивируют перед инфузией пациенту.

В другом аспекте для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему описанию, РНК ТКР синтезируют с помощью методик, известных из уровня техники, например, транскрипционные системы *in vitro*. Синтезированные *in vitro* РНК ТКР затем вводят с помощью электропорации в первичные CD8⁺ Т-клетки, полученные у здоровых доноров, в целях повторной экспрессии альфа- и/или бета-цепей опухолеспецифических ТКР.

Цепи ТКР, введенные в периферическую Т-клетку, могут конкурировать с цепями эндогенных ТКР за ассоциацию с комплексом CD3, который необходим для поверхностной экспрессии ТКР. Поскольку высокий уровень поверхностной экспрессии ТКР необходим, чтобы придать соответствующую чувствительность для инициации, вызываемой клетками, экспрессирующими опухолевый антиген-мишень (Cooper et al., 2000; Labrecque et al., 2001), важным аспектом генной терапии на основе ТКР являются стратегии, которые увеличивают уровни генной экспрессии ТКР-альфа и ТКР-бета.

В целях увеличения уровня экспрессии нуклеиновые кислоты, кодирующие ТКР согласно настоящему описанию, могут быть функционально связаны с сильными промоторами, такими как длинные терминальные повторы ретровируса (LTR), цитомегаловируса (CMV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV) U3, фосфоглицераткиназой (PGK), β -актином, убиквитином и комбинированным промотором вируса обезьян 40 (SV40)/CD43 (Cooper et al., 2004; Jones et al., 2009), фактором элонгации (EF)-1a (Tsujii et al., 2005) и промотором вируса некроза селезенки (SFFV) (Joseph et al., 2008). В предпочтительном варианте осуществления промотор является гетерологичным по отношению к экспрессируемой нуклеиновой кислоте.

В дополнение к сильным промоторам экспрессионные кассеты ТКР согласно настоящему описанию

могут содержать дополнительные элементы, которые могут усиливать экспрессию трансгена, включая центральный полипуриновый тракт (сРРТ), который способствует ядерной транслокации лентивирусных конструкций (Follenzi et al., 2000), и пост-транскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (wPRE), который повышает уровень экспрессии трансгена за счет увеличения стабильности РНК (Zufferey et al., 1999).

Альфа- и бета-цепи ТКР по настоящему изобретению могут кодироваться нуклеиновыми кислотами, локализованными в отдельных векторах, или могут кодироваться поли-нуклеотидами, локализованными в одном и том же векторе.

Для достижения высоких уровней экспрессии ТКР на поверхности требуется транскрипция высоких уровней как цепей ТКР-альфа, так и ТКР-бета, введенного ТКР. Для этого цепи ТКР-альфа и ТКР-бета согласно настоящему описанию могут быть клонированы в бицистронные конструкции в одном векторе, который, как было показано, способен преодолеть данное препятствие. Использование участка внутренней посадки рибосомы вируса (IRES) между цепями ТКР-альфа и ТКР-бета приводит к скоординированной экспрессии обеих цепей, поскольку цепи ТКР-альфа и ТКР-бета образуются из одного транскрипта, который разделяется на два белка во время трансляции, обеспечивая получение равного молярного соотношения цепей ТКР-альфа и ТКР-бета (Schmitt et al. 2009).

Нуклеиновые кислоты, кодирующие ТКР согласно настоящему описанию, могут быть кодон-оптимизированы для увеличения экспрессии клеткой-хозяином. Избыточность генетического кода позволяет кодирование некоторых аминокислот более чем одним кодоном, однако некоторые конкретные кодоны менее "оптимальны", чем другие, по причине относительной доступности подходящих тРНК, а также других факторов (Gustafsson и соавт., 2004). Как было показано, модификации последовательностей генов ТКР-альфа и ТКР-бета, так чтобы каждая аминокислота кодировалась оптимальным кодоном для экспрессии генов млекопитающих, а также удаление нестабильных мотивов мРНК или криптических сайтов сплайсинга, существенно усиливали экспрессию генов ТКР-альфа и ТКР-бета (Scholten и соавт., 2006).

Кроме того, нарушение комплементарности между введенными и эндогенными цепями ТКР может привести к приобретению специфичности, которая будет представлять значительный риск для аутоиммунитета. Например, формирование смешанных димеров ТКР может снизить число молекул CD3, имеющих в наличии для формирования правильно спаренных комплексов ТКР, и, таким образом, может существенно снизить функциональную avidность клеток, экспрессирующих введенный ТКР (Kuball и соавт., 2007).

Для снижения ошибочного спаривания С-концевой домен введенных цепей ТКР согласно настоящему описанию может быть модифицирован в целях стимуляции межцепочечной аффинности, при этом снижая способность введенных цепей спариваться с эндогенным ТКР. Данные стратегии могут включать замещение С-концевых доменов ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей человека их мышинными эквивалентами (С-концевой "муринизированный" домен); получение второй межцепочечной дисульфидной связи в С-концевом домене за счет введения второго остатка цистеина в обе цепи: ТКР-альфа и ТКР-бета введенного ТКР (модификация цистеином); обмен взаимодействующими остатками в С-концевом домене ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей ("выступ-во-впадину"); и слияние вариабельных доменов цепей ТКР-альфа и ТКР-бета непосредственно в CD3 ζ (слияние CD3 ζ). (Schmitt et al. 2009).

Затем ДНК (или в случае ретровирусных векторов РНК) может экспрессироваться в подходящем хозяине для получения полипептида, включающего пептид или вариант согласно описанию. Таким образом, ДНК, кодирующая пептид или вариант согласно описанию, может быть использована в соответствии с известными методиками, модифицированными соответствующим образом с учетом раскрытых в данном описании идей, для конструирования вектора экспрессии, который затем используется для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии и получения полипептида согласно описанию. Такие методики включают те, что раскрыты, например, в патентах США №№ 4440859, 4530901, 4582800, 4677063, 4678751, 4704362, 4710463, 4757006, 4766075 и 4810648, которые включены в описание в своей полноте путем ссылки.

ДНК (или в случае ретровирусных векторов - РНК), кодирующая полипептид, представляющий собой соединение согласно описанию, может быть присоединена к обширному ряду других последовательностей ДНК для введения в соответствующего хозяина. ДНК-спутник будет зависеть от природы хозяина, способа введения ДНК хозяину и от того, желательно ли поддержание в эпизомальной или интегративной форме.

Как правило, ДНК вводится в вектор экспрессии, такой как плаزمид, с соответствующей ориентацией и правильной рамкой считывания для экспрессии. Если необходимо, то ДНК может быть соединена с соответствующими нуклеотидными последовательностями, обеспечивающими координацию транскрипции и трансляции, распознаваемыми желательным хозяином, хотя такие контрольные элементы обычно имеются в векторе экспрессии. Вектор вводится затем хозяину стандартными способами. Как правило, не все хозяева трансформируются вектором. Поэтому будет необходимо выделить трансформированные клетки-хозяева. Одна из методик отбора включает введение в вектор экспрессии последовательности ДНК с любыми необходимыми элементами контроля, которая кодирует выбранный признак в

трансформированной клетке, такой как устойчивость к антибиотикам.

В качестве альтернативы ген для такого выбираемого признака может быть на другом векторе, который используется для совместной трансформации желаемой клетки-хозяина.

Клетки-хозяева, которые были трансформированы рекомбинантной ДНК согласно описанию, культивируют затем в течение достаточного времени и при соответствующих условиях, известных специалистам данной области, с учетом раскрытых в данном описании идей, что ведет к экспрессии полипептида, который после этого может быть выделен.

Известно множество систем экспрессии, включающих бактерии (например, *E. coli* и *Bacillus subtilis*), дрожжи (например, *Saccharomyces cerevisiae*), мицелиальные грибы (например, *Aspergillus* spec.), растительные клетки, клетки животных и насекомых. Предпочтительно, чтобы система была клетками млекопитающих, такими как клетки СНО, имеющимися в наличии в Американской коллекции типовых культур АТСС.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин генетически модифицирована, чтобы экспрессировать ТКР согласно настоящему описанию. В предпочтительных вариантах осуществления клетка-хозяин является человеческой Т-клеткой или предшественником Т-клетки. В одних вариантах осуществления Т-клетка или предшественник Т-клетки получены у пациента, больного раком. В других вариантах осуществления Т-клетка или предшественник Т-клетки получены у здорового донора. Клетки-хозяева согласно настоящему описанию могут быть аллогенными или аутологичными в отношении пациента, подлежащего лечению. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является гамма/дельта Т-клеткой, трансформированной для экспрессии альфа-/бета-ТКР.

Типичная клеточная векторная плаزمид млекопитающих для конститутивной экспрессии включает промотор CMV или SV40 с подходящим концевым участком поли-А и маркером устойчивости, таким как неомицин. Одним примером является pSVL, имеющимся в наличии в компании Pharmacia, Пискатеуэй, Нью-Джерси, США. Примером индуцируемого вектора экспрессии млекопитающих является pMSG, также имеющийся в наличии в Pharmacia. Пригодными плазмидными векторами дрожжей являются pRS403-406 и pRS413-416, и они, как правило, имеются в наличии у компании Stratagene Cloning Systems, Ла Джолла, Калифорния 92037, США. Плазмиды pRS403, pRS404, pRS405 и pRS406 являются дрожжевыми интегрирующими плазмидами (YIps) и включают дрожжевые селективируемые маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 являются дрожжевыми плазмидами с центромерами (Ycp). Основанные на промоторе CMV векторы (например, компании Sigma-Aldrich) обеспечивают кратковременную или устойчивую экспрессию, цитоплазматическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, c-мус или MAT. Данные слитые белки позволяют проводить выявление, очистку и анализ рекомбинантного белка. Слияния с двойной меткой обеспечивают гибкость при выявлении.

Сильный регуляторный участок промотора цитомегаловируса человека (CMV) повышает уровни конститутивной экспрессии белка, достигающие 1 мг/л в клетках COS. Для менее активных клеточных линий белковые уровни обычно составляют ~0,1 мг/л. Присутствие точки начала репликации SV40 будет приводить к высоким уровням репликации ДНК в пермиссивных клетках COS. Векторы CMV, например, могут содержать точку начала репликации pMB1 (производное pBR322) в бактериальных клетках, ген бета-лактамазы для отбора устойчивости к ампициллину у бактерий, polyA гормона роста человека, и точку начала репликации f1. Векторы, содержащие лидерную последовательность препротрипсина (PPT), могут направлять секрецию слитых белков FLAG в культуральной среде для очистки с использованием антител к FLAG, смол и планшетов. Другие векторы и системы экспрессии для применения с различными клетками-хозяевами хорошо известны из уровня техники.

В другом предпочтительном варианте осуществления кодируются два или более пептида или варианта пептидов согласно описанию и, таким образом, они экспрессируются последовательно (как в случае структуры типа "бусины на нити"). В этих целях пептиды или варианты пептидов могут быть соединены или слиты воедино с помощью фрагментов линкерных аминокислот, таких как, например, LLLLLL, или же могут быть соединены без какого(их)-либо дополнительного(ых) пептида(ов) между ними. Эти структуры могут быть также использованы в противораковой терапии и, возможно, индуцировать иммунные ответы с участием как молекул МНС I, так и МНС II класса.

Настоящее описание относится также к клетке-хозяину, трансформированной с помощью полинуклеотидной векторной конструкции настоящего описания. Клетка-хозяин может быть как прокариотической, так и эукариотической. Бактериальные клетки могут быть, предпочтительно, прокариотическими клетками-хозяевами при некоторых условиях и обычно являются штаммом *E. coli*, таким как, например, *E. coli* штамма DH5, имеющимся в наличии в Bethesda Research Laboratories Inc., Бетесда, Мэриленд, США, и RR1, имеющимся в наличии в Американской коллекции типовых культур ("American Type Culture Collection") (ATCC), Роквил, Мэриленд, США (№ ATCC 31343). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают дрожжи, клетки насекомых и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как линии фибробластных клеток и клеток толстой кишки таких видов как мышь, крыса, обезьяна или человек. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и YPH501, которые, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, Ла Джолла, Калифорния 92037, США. Предпоч-

тительные клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), имеющиеся в наличии в ATCC как CCL61, эмбриональные клетки швейцарской мыши линии NIH/3T3, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1658, клетки COS-1 из почек обезьяны, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1650, и клетки 293, являющиеся эмбриональными клетками почек эмбрионов человека. Предпочтительными клетками насекомых являются клетки Sf9, которые могут трансфицироваться с помощью бакуловирусных векторов экспрессии. Обзор в отношении выбора подходящих клеток-хозяев для экспрессии представлен, например, в учебном пособии авторов Paulina Balbas и Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols", часть первая, второе издание, ISBN 978-1-58829-262-9, и другой литературе, известной специалисту данной области.

Трансформация соответствующих клеток-хозяев с помощью ДНК-конструкции согласно настоящему описанию производится при помощи хорошо известных способов, которые обычно зависят от типа используемого вектора. Относительно трансформации прокариотических клеток-хозяев см., например, работу Cohen и соавт. (Cohen et al., 1972) и (Green and Sambrook, 2012). Трансформация дрожжевых клеток описывается в работе Sherman и соавт. (Sherman et al., 1986). Также подходит метод Бигса (Beggs) (Beggs, 1978). Что касается клеток позвоночных, то подходящие для трансфекции таких клеток реагенты, например, фосфат кальция и DEAE-декстран или липосомальные составы, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems или Life Technologies Inc., Гейтерсберг, Мэриленд 20877, США. Электропорация также подходит для трансформации и/или трансфекции клеток и хорошо известна из уровня техники для трансформации дрожжевых клеток, бактериальных клеток, клеток насекомых и клеток позвоночных.

Успешно трансформированные клетки, т.е. клетки, которые содержат конструкцию ДНК согласно настоящему описанию, могут быть идентифицированы хорошо известными способами, такими как ПЦР. Альтернативно наличие белка в супернатанте может быть выявлено с применением антител.

Следует понимать, что некоторые клетки-хозяева согласно описанию подходят для получения пептидов согласно описанию, например, бактериальные, дрожжевые клетки и клетки насекомых. Тем не менее, в конкретных терапевтических методах могут использоваться другие клетки-хозяева. Например, антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки, могут с пользой быть использованы для экспрессии пептидов согласно описанию так, что их можно будет нагружать на подходящие молекулы МНС. Таким образом, в настоящем описании предложена клетка-хозяин, включающая нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с описанием.

В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, в частности дендритной клеткой или антигенпрезентирующей клеткой. АПК, нагруженные рекомбинантным слитым белком, содержащим простатическую кислую фосфатазу (PAP), были одобрены Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) 29 апреля 2010 г. для применения при лечении метастатического HRPС (гормон-рефрактерного рака предстательной железы), протекающего бессимптомно или с минимально выраженными симптомами (си-пулейцел-Т) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

В другом аспекте описания предложен способ получения пептида или его варианта, причем способ включает культивацию клетки-хозяина и выделение пептида из клетки-хозяина или его культуральной среды.

В другом варианте осуществления ТКР, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии согласно описанию применяются в медицине. Например, пептид или его вариант может приготавливаться для внутривенного (в/в) введения, подкожного (п/к) введения, внутрикожного (в/к) введения, внутрибрюшинного (в/б) введения, внутримышечного (в/м) введения. Предпочтительные способы введения пептидов включают п/к, в/к, в/б, в/м и в/в. Предпочтительные способы введения ДНК включают в/к, в/м, п/к, в/б и в/в. Вводятся могут, к примеру, дозы от 50 мкг до 1,5 мг, предпочтительно от 125 до 500 мкг пептида или ДНК, в зависимости от соответствующего пептида или ДНК. Дозировка в данном диапазоне успешно использовалась в предыдущих клинических исследованиях (Walter et al., 2012).

Полинуклеотид, применяемый в активной вакцинации, может быть, по существу, чистым или сохраняться в подходящем векторе или системе доставки. Нуклеиновая кислота может быть ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинацией. Методы конструирования и введения такой нуклеиновой кислоты хорошо известны из уровня техники. Обзор представлен, например, в работе Teufel и соавт. (Teufel et al., 2005). Полинуклеотидные вакцины просто получить, однако механизм действия этих векторов по индуцированию иммунного ответа понятен не полностью. Подходящие векторы и системы доставки включают вирусные ДНК и/или РНК, такие как системы, которые основаны на аденовирусе, вирусе осповакцины, ретровирусах, вирусе герпеса, аденоассоциированном вирусе или гибридах, содержащих элементы более чем одного вируса. Невирусные системы доставки включают катионные липиды и катионные полимеры и хорошо известны из уровня техники в области доставки ДНК. Также может быть использована физическая доставка, такая как посредством "генного пистолета". Пептид или пептиды, кодируемые нуклеиновой кислотой, могут быть слитым белком, например, с эпитопом, который стимулирует Т-клетки против соответствующего противоположного определяющего комплементарность участка CDR, как описывается выше.

Настоящее описание далее относится к аптамерам. Аптамеры (см., например, заявку WO

2014/191359 и цитируемую в ней литературу, которые включены в описание в своей полноте путем ссылки) - это короткие одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот, которые могут сворачиваться в определенные трехмерные структуры и распознавать специфические структуры-мишени. Оказалось, что они представляют собой подходящую альтернативу для разработки таргетной терапии. Как было продемонстрировано, аптамеры селективно связываются с различными сложными мишенями с высокой аффинностью и специфичностью.

Аптамеры, распознающие молекулы, которые находятся на поверхности клеток, были идентифицированы в последнее десятилетие и предоставляют возможность для разработки диагностических и терапевтических подходов. Так как было продемонстрировано, что аптамеры практически не обладают токсичностью и иммуногенностью, они являются многообещающими кандидатами для биомедицинского применения. Действительно, аптамеры, например аптамеры, распознающие простатический специфический мембранный антиген, были успешно задействованы в таргетной терапии и продемонстрировали функциональность в моделях с ксенотрансплантатами *in vivo*. Кроме того, были идентифицированы аптамеры, распознающие конкретные опухолевые линии.

Могут быть отобраны ДНК-аптамеры, проявляющие широкий спектр свойств по распознаванию различных раковых клеток, и, в частности, клеток, образованных из солидных опухолей, тогда как неопухолегенные и первичные здоровые клетки не распознаются. Если идентифицированные аптамеры распознают не только конкретный опухолевый подтип, но и взаимодействуют с различными опухолями, это делает возможным применение аптамеров в качестве так называемых диагностических и терапевтических средств широкого спектра действия.

Более того, исследование поведения по связыванию с клетками с помощью проточной цитометрии показало, что аптамеры проявляли очень хорошую кажущуюся аффинность, которая выражалась на наномолярном уровне.

Аптамеры пригодны для диагностических и терапевтических целей. В одном аспекте по меньшей мере один или несколько аптамеров захватываются опухолевыми клетками и, таким образом, могут действовать в качестве молекулярных носителей для направленной доставки противораковых средств, таких как мРНК, в опухолевые клетки.

Могут быть отобраны аптамеры к сложным мишеням, таким как клетки и ткани и комплексы пептидов или ТКР, включающих, предпочтительно состоящих из последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO 25 по SEQ ID NO 26 в соответствии с представленным описанием с молекулой МНС, используя метод cell-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment - систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении).

В одном варианте осуществления согласно описанию предложен способ получения ТКР, согласно настоящему описанию, причем способ включает культивацию клетки-хозяина, способной экспрессировать ТКР в условиях, подходящих для стимуляции экспрессии ТКР.

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает инкубацию МКПК HLA-A*02-отрицательных здоровых доноров с А2/мономерами MAG-003, инкубацию МКПК с тетрамер-фикоэритрином (PE) и выделение Т-клеток с высокой avidностью с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)-Calibur.

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает инкубацию МКПК HLA-A*02-отрицательных здоровых доноров с А2/мономерами p286-1Y2L, инкубацию МКПК с тетрамер-фикоэритрином (PE) и выделение Т-клеток с высокой avidностью с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)-Calibur.

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает инкубацию МКПК HLA-A*02-отрицательных здоровых доноров с А2/мономерами p286-1Y2L9L, инкубацию МКПК с тетрамер-фикоэритрином (PE) и выделение Т-клеток с высокой avidностью с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)-Calibur.

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает получение трансгенной мыши с целыми локусами человеческого гена $TCR\alpha\beta$ (1,1 и 0,7 млн. п.н.), Т-клетки которой экспрессируют широкий спектр ТКР человека, компенсируя недостаток ТКР у мыши, иммунизацию мыши MAG-003, инкубацию МКПК, полученных у трансгенной мыши, с тетрамер-фикоэритрином (PE) и выделение Т-клеток с высокой avidностью с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)-Calibur.

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает получение трансгенной мыши с целыми локусами человеческого гена $TCR\alpha\beta$ (1,1 и 0,7 млн. п.н.), Т-клетки которой экспрессируют широкий спектр ТКР человека, компенсируя недостаток ТКР у мыши, иммунизацию мыши p286-1Y2L, инкубацию МКПК, полученных у трансгенной мыши, с тетрамер-фикоэритрином (PE) и выделение Т-клеток с высо-

кой avidностью с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)-Calibur.

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает получение трансгенной мыши с целыми локусами человеческого гена $TCR\alpha\beta$ (1,1 и 0,7 млн. п.н.), Т-клетки которой экспрессируют широкий спектр ТКР человека, компенсируя недостаток ТКР у мыши, иммунизацию мыши р286-1Y2L9L, инкубацию МКПК, полученных у трансгенной мыши, с тетрамер-фикоэритрином (PE) и выделение Т-клеток с высокой avidностью с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)-Calibur.

Настоящее описание далее относится к способу в соответствии с описанием, где Т-клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать ТКР А в соответствии с настоящим описанием.

Настоящее описание далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени аберрантно экспрессируют MAG-003, причем способ включает введение пациенту эффективного числа ТКК, растворимых ТКР и/или Т-клеток, полученных в соответствии с настоящим описанием.

Настоящее описание далее относится к применению любого описанного ТКР, нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим описанием, вектора экспрессии в соответствии с настоящим описанием, клетки в соответствии с настоящим описанием или активированного цитотоксического Т-лимфоцита в соответствии с настоящим описанием в качестве медикамента или в производстве медикамента. Настоящее описание далее относится к способу применения в соответствии с настоящим описанием, где медикамент проявляет противораковую активность.

Настоящее описание относится далее к применению в соответствии с описанием, где указанные раковые клетки являются клетками немелкоклеточного рака легких или клетками другой солидной или гематологической опухоли, такой как немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, почечноклеточный рак, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, гепатоклеточный рак, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоз, рак молочной железы, карцинома клеток Меркеля, меланома, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря и желчных протоков и рак пищевода.

Настоящее описание далее относится к способу уничтожения раковых клеток, включающему контактирование раковых клеток с клеткой-хозяином согласно настоящему описанию. В одном варианте осуществления клетка-хозяин экспрессирует ТКР согласно настоящему описанию. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является Т-клеткой или предшественником Т-клетки. В одном варианте осуществления в предпочтительном варианте осуществления раковые клетки выбраны из клеток немелкоклеточного рака легких или клеток другой солидной или гематологической опухоли, таких как немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, почечноклеточный рак, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, гепатоклеточный рак, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоз, рак молочной железы, карцинома клеток Меркеля, меланома, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря и желчных протоков и рак пищевода. В некоторых вариантах осуществления ТКР конъюгирован с терапевтически активным ингредиентом. В конкретных вариантах осуществления терапевтически активный ингредиент выбран из группы, состоящей из радионуклида, химиотерапевтического средства и токсина.

Настоящее изобретение далее относится к способу лечения рака, включающему введение нуждающемуся в лечении субъекту клетки-хозяина по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления клетка-хозяин экспрессирует ТКР согласно настоящему описанию. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является Т-клеткой или предшественником Т-клетки. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является аутологичной для субъекта, подлежащего лечению. В другом варианте осуществления клетка-хозяин является аллогенной для субъекта, подлежащего лечению. В предпочтительном варианте осуществления раковые клетки выбраны из клеток немелкоклеточного рака легких или клеток другой солидной или гематологической опухоли, таких как немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, почечноклеточный рак, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, гепатоклеточный рак, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоз, рак молочной железы, карцинома клеток Меркеля, меланома, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря и желчных протоков и рак пищевода.

В некоторых вариантах осуществления ТКР конъюгирован с терапевтически активным ингредиентом. В контексте настоящего описания понятие "терапевтически активный ингредиент" обозначает соединение, применяемое для лечения или предупреждения заболевания или нежелательного клинического состояния. В одном варианте осуществления терапевтически активный ингредиент применяется для лечения или предотвращения рака. В конкретных вариантах осуществления терапевтически активный ингредиент выбран из группы, состоящей из радионуклида, химиотерапевтического средства и токсина.

ТКР, нуклеиновые кислоты и клетки-хозяева согласно настоящему описанию и их фармацевтические композиции могут вводиться нуждающемуся в лечении субъекту способами, известными из уровня техники, и могут варьироваться в зависимости от вида рака, подлежащего лечению. Способы введения включают, например, локальное введение (такое как внутритуморальный способ) и парентеральное введение, такое как подкожное, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, интрапортальное и

внутрипеченочное. В предпочтительном варианте осуществления ТКР, нуклеиновые кислоты или клетки-хозяева согласно настоящему описанию или их фармацевтические композиции вводят субъекту с помощью локальной инфузии, например, при использовании инфузионного насоса и/или системы катетеров, в участок, подлежащий лечению, такой как солидная опухоль. В одном варианте осуществления композицию согласно настоящему описанию вводят с помощью инфузии в солидную опухоль, кровеносный сосуд, который питает солидную опухоль, и/или участок, окружающий солидную опухоль.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции согласно настоящему описанию вводят субъекту, используя схему дозировки с введением по меньшей мере двух доз с промежутком по меньшей мере в 24 ч. Схемы дозировки, подходящие для введения композиций согласно настоящему описанию, включают, например, один раз в сутки, один раз в двое суток и один раз в трое суток. Более предпочтительные схемы дозировки включают введение один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз в месяц и два раза в месяц. В конкретных вариантах осуществления применяется схема повышения дозы, когда субъекту вводят серии увеличивающихся доз в течение дней, недель или месяцев.

Эффективные дозы клеток-хозяев, экспрессирующих ТКР по настоящему изобретению включают, например, по меньшей мере около 10^4 , по меньшей мере около 10^5 , по меньшей мере около 10^6 , по меньшей мере около 10^7 , по меньшей мере около 10^8 , по меньшей мере около 10^9 и по меньшей мере около 10^{10} клеток-хозяев в одной дозе. В одном варианте осуществления клетки-хозяева согласно настоящему описанию вводят с дозировкой около 10^4 до около 10^{10} клеток на дозу, предпочтительно, с дозировкой около 10^5 до около 10^9 клеток на дозу. В предпочтительных вариантах осуществления дозы вводят по схеме дозирования в течение курса, продолжающегося по меньшей мере два или более циклов введения доз.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака, включающему введение ТКР, нуклеиновой кислоты или клетки-хозяина согласно настоящему описанию в комбинации с по меньшей мере одним химиотерапевтическим препаратом и/или лучевой терапией.

Также предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в нем, включающий:

- а) выделение клетки-хозяина из организма указанного субъекта;
- б) трансформацию клетки по меньшей мере одним вектором, кодирующим ТКР согласно настоящему описанию, для получения трансформированной клетки;
- в) культивацию трансформированной клетки для получения множества трансформированных клеток и

г) введение множества трансформированных клеток указанному субъекту.

Также предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в нем, включающий:

- а) выделение клетки из организма здорового донора;
- б) трансформацию клетки вектором, кодирующим ТКР согласно настоящему описанию, для получения трансформированной клетки;
- в) культивацию трансформированной клетки для получения множества трансформированных клеток; и

г) введение множества трансформированных клеток указанному субъекту.

Также предложен способ выявления рака в биологическом образце, включающий:

- а) контактирование биологического образца с ТКР согласно настоящему описанию;
- б) выявление связывания ТКР с биологическим образцом.

В некоторых вариантах осуществления способ выявления рака осуществляется *in vitro*, *in vivo* или *in situ*.

Настоящее описание далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам, основанным на пептидах в соответствии с настоящим описанием, в контексте изобретения называемые "мишенями", которые могут быть использованы при постановке диагноза и/или составлении прогноза течения немелкоклеточного рака легких. Настоящее описание относится также к применению этих новых мишеней для лечения рака.

В другом аспекте описания предложен способ получения растворимого Т-клеточного рецептора (рТКР), распознающего конкретный комплекс пептида и МНС. Такие растворимые Т-клеточные рецепторы могут быть получены из специфических Т-клеточных клонов, и их аффинность может быть повышена за счет мутагенеза, направленного на определяющие комплементарность участки. Для выбора Т-клеточного рецептора может использоваться фаговое отображение (заявка США 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). В целях стабилизации Т-клеточных рецепторов в процессе фагового отображения и в случае практического применения в качестве лекарственного средства альфа- и бета-цепи могут быть связаны, например, посредством не встречающихся в природе дисульфидных связей, других ковалентных связей (одноцепочечный Т-клеточный рецептор) или с помощью доменов димеризации (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). В целях выполнения определенных функций на клетках-мишенях Т-клеточный рецептор может быть связан с токсинами, лекарственными средствами, цитокинами (см., например, заявку США 2013/0115191), доменами, рекрутирующими эффекторными клетками, такими как анти-CD3 домен и т.д. В другом аспекте он экспрессирован в Т-клетках, используемых для адоптивного

переноса. См., например, заявки WO 2004/033685A1, WO 2004/074322A1 и WO 2013/057586A1, содержание которых в полном объеме включено по ссылке.

Помимо того пептиды и/или ТКР или антитела или другие связывающиеся молекулы настоящего описания могут быть использованы для подтверждения диагноза рака, поставленного патоморфологом на основании исследования биоптата.

Эти антитела или ТКР могут также применяться для диагностики *in vivo*. Как правило, антитело или ТКР помечают радионуклеотидом (таким как ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P или ^{35}S), так что опухоль может быть локализована с помощью иммуносцинтиграфии. В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты связываются с внеклеточными доменами двух или более мишеней белка, выбранного из группы, состоящей из указанных выше белков, при показателе аффинности (K_d) ниже чем 1×10 мкМ.

Антитела или ТКР для диагностических целей могут помечаться зондами, подходящими для обнаружения различными способами визуализации. Способы обнаружения зондов включают, но без ограничения, флуоресценцию, световую, конфокальную и электронную микроскопию; магнитно-резонансную томографию и спектроскопию; флюороскопию, компьютерную томографию и позитронно-эмиссионную томографию. Подходящие зонды включают, но без ограничения, флуоресцеин, родамин, эозин и другие флюорофоры, радиоизотопы, золото, гадолиний и другие лантаноиды, парамагнитное железо, фтор-18 и другие позитронно-активные радионуклиды. Более того, зонды могут быть би- или мультифункциональными и обнаруживаться более чем одним из приведенных способов. Данные антитела и/или ТКР могут быть помечены напрямую или опосредованно указанными зондами. Присоединение зондов к антителам и/или ТКР включает ковалентное присоединение зонда, внедрение зонда в антитело или ТКР и ковалентное присоединение хелатирующего соединения для связывания зонда, среди других широко признанных методов в данной области. Для иммуногистохимических исследований образец пораженной ткани может быть свежим или замороженным или может быть залит парафином и зафиксирован таким консервантом как формалин. Зафиксированный или залитый срез приводят в контакт с помеченным первичным антителом и вторичным антителом, где антитело используется для обнаружения экспрессии белков *in situ*.

Изобретение далее представлено в изложенных ниже пунктах:

Пункт 1. ТКР, включающий альфа-цепь и бета-цепь, где альфа-цепь включает альфа-вариабельный домен ТКР, который по меньшей мере на 90% идентичен любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 71; и бета-цепь включает бета-вариабельный домен ТКР, который по меньшей мере на 90% идентичен любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 79, и где ТКР специфически связывается с комплексом пептида MAG-003 и молекулы MHC.

Пункт 2. ТКР по п.1, далее включающий альфа-константный домен ТКР и бета-константный домен ТКР, где альфа-константный домен ТКР по меньшей мере на 70% идентичен альфа-константному домену ТКР с любой из SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 71, и бета-константный домен ТКР по меньшей мере на 70% идентичен бета-константному домену ТКР с любой из SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 79.

Пункт 3. ТКР по любому из п.1 или 2, где альфа-константный домен включает трансмембранный домен альфа VIGFRILLKLVAGFNLLMTL (SEQ ID NO: 97) и бета-константный домен включает трансмембранный домен бета TILYEILLGKATLYAVLVLSALVL (SEQ ID NO: 88).

Пункт 4. ТКР по любому из пп.1-3, где альфа-вариабельный домен ТКР состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39 и бета-вариабельный домен ТКР состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47.

Пункт 5. ТКР по любому из пп.1-3, где альфа-вариабельный домен ТКР состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55 и бета-вариабельный домен ТКР состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63.

Пункт 6. ТКР по любому из пп.1-3, где альфа-вариабельный домен ТКР состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71 и бета-вариабельный домен ТКР состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79.

Пункт 7. ТКР по любому из пп.1-6, где альфа-константный домен ТКР состоит из альфа-константного домена ТКР с SEQ ID NO: 39 и бета-константный домен ТКР состоит из бета-константного домена ТКР с SEQ ID NO: 47.

Пункт 8. ТКР по любому из пп.1-6, где альфа-константный домен ТКР состоит из альфа-константного домена ТКР с SEQ ID NO: 55 и бета-константный домен ТКР состоит из бета-константного домена ТКР с SEQ ID NO: 63.

Пункт 9. ТКР по любому из пп.1-6, где альфа-константный домен ТКР состоит из альфа-константного домена ТКР с SEQ ID NO: 71 и бета-константный домен ТКР состоит из бета-константного домена ТКР с SEQ ID NO: 79.

Пункт 10. ТКР по любому из пп.1-9, включающий альфа-цепь, состоящую из последовательности с SEQ ID NO: 39, и бета-цепь, состоящую из последовательности с SEQ ID NO: 47.

Пункт 11. ТКР по любому из пп.1-9, включающий альфа-цепь, состоящую из последовательности с SEQ ID NO: 55, и бета-цепь, состоящую из последовательности с SEQ ID NO: 63.

Пункт 12. ТКР по любому из пп.1-9, включающий альфа-цепь, состоящую из последовательности с SEQ ID NO: 71 и бета-цепь, состоящую из последовательности с SEQ ID NO: 79.

Пункт 13. ТКР по любому из пп.1-12, где альфа-цепь ТКР включает по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), альфа-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 71; и/или бета-цепь ТКР включает по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR) бета-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 79.

Пункт 14. ТКР по любому из пп.1-13, где альфа-цепь ТКР включает все три участка CDR с SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 71.

Пункт 15. ТКР по любому из пп.1-13, где бета-цепь ТКР включает все три участка CDR с SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 79.

Пункт 16. ТКР по любому из пп.1-15, где альфа-цепь ТКР и бета-цепь ТКР слиты с получением одноцепочечного ТКР.

Пункт 17. ТКР по любому из пп.1-16, где альфа- и/или бета-цепь включает поддающуюся обнаружению метку.

Пункт 18. ТКР по п.17, где поддающаяся обнаружению метка выбрана из группы, состоящей из радионуклида, флуорофора и биотина.

Пункт 19. ТКР по любому из пп.1-18, где альфа- и/или бета-цепь конъюгирована с терапевтически активным ингредиентом.

Пункт 20. ТКР по п.19, где терапевтически активный ингредиент выбран из группы, состоящей из радионуклида, химиотерапевтического средства и токсина.

Пункт 21. ТКР, включающий гамма-цепь и дельта-цепь, где гамма-цепь включает по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 71; и/или дельта-цепь ТКР включает по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 79, и где ТКР специфически связывается с комплексом пептида MAG-003 и молекулы МНС.

Пункт 22. ТКР по любому из пп.1-21, где ТКР специфически связывается с комплексом пептида MAG-003 и молекулы МНС, где пептид MAG-003 выбран из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NOs: 1-24, и молекула МНС является молекулой HLA I класса или HLA II класса.

Пункт 23. Нуклеиновая кислота, кодирующая альфа-цепь и/или бета-цепь ТКР по любому из пп.1-20 или гамма-цепь и/или дельта-цепь ТКР по п.21.

Пункт 24. Вектор экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту по п.23, функционально связанную по меньшей мере с одной промоторной последовательностью.

Пункт 25. Клетка-хозяин, трансформированная с помощью вектора экспрессии по п.24.

Пункт 26. Клетка-хозяин по п.25, которая является Т-клеткой или предшественником Т-клетки.

Пункт 27. Клетка-хозяин по п.26, где Т-клетка или предшественник Т-клетки получены у пациента, больного раком.

Пункт 28. Клетка-хозяин по п.26, где Т-клетка или предшественник Т-клетки получены у здорового донора.

Пункт 29. Фармацевтическая композиция, включающая ТКР по любому из пп.1-22, нуклеиновую кислоту по п.3, вектор экспрессии по п.24 и/или клетку-хозяина по любому из пп.25-28; и фармацевтически приемлемый носитель и, факультативно, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества и/или стабилизаторы.

Пункт 30. Способ получения ТКР, который специфически связывается с пептидом с последовательностью с SEQ ID NO: 1, если они презентуются молекулой МНС, причем указанный способ включает культивацию клетки-хозяина по любому из пп.25-28 в условиях, подходящих для стимуляции экспрессии ТКР.

Пункт 31. Способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в лечении субъекту ТКР по любому из пп.1-22, нуклеиновой кислоты по п.23, вектора экспрессии по п.24, клетки-хозяина по любому из пп.25-28, и/или фармацевтической композиции по п.29.

Пункт 32. Способ по п.31, где ТКР экспрессируется на поверхности клетки-хозяина.

Пункт 33. Способ по п.31, где клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из Т-клетки или предшественника Т-клетки.

Пункт 34. Способ по п.33, где Т-клетка или предшественник Т-клетки являются аутологичными.

Пункт 35. Способ по п.33, где Т-клетка или предшественник Т-клетки являются аллогенными.

Пункт 36. Способ по п.31, где ТКР конъюгирован с терапевтически активным ингредиентом.

Пункт 37. Способ по п.36, где терапевтически активный ингредиент выбран из группы, состоящей из радионуклида, химиотерапевтического средства и токсина.

Пункт 38. Способ по любому из пп.31-37, где рак является немелкоклеточным раком легких, мелко-клеточным раком легких, почечноклеточным раком, раком головного мозга, раком желудка, колоректальным раком, гепатоклеточным раком, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы,

лейкозом, раком молочной железы, карциномой клеток Меркеля, меланомой, раком яичника, раком мочевого пузыря, раком матки, раком желчного пузыря и желчных протоков, раком пищевода или их комбинацией.

Пункт 39. Способ по любому из пп.31-38, дополнительно включающий введение субъекту по меньшей мере одного химиотерапевтического средства.

Пункт 40. Способ по любому из пп.31-39, дополнительно включающий применение по отношению к субъекту лучевой терапии.

Пункт 41. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в нем, включающий:

- а) выделение клетки-хозяина из организма указанного субъекта;
- б) трансформацию клетки вектором, кодирующим ТКР по любому из пп.1-22, для получения трансформированной клетки;
- в) культивацию трансформированной клетки для получения множества трансформированных клеток и
- г) введение множества трансформированных клеток указанному субъекту.

Пункт 42. Способ по п.41, где клетка выбрана из Т-клетки или предшественника Т-клетки.

Пункт 43. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в нем, включающий:

- а) выделение клетки из организма здорового донора;
- б) трансформацию клетки вектором, кодирующим ТКР по любому из пп.1-22, для получения трансформированной клетки;
- в) культивацию трансформированной клетки для получения множества трансформированных клеток; и
- г) введение множества трансформированных клеток указанному субъекту.

Пункт 44. Способ по п.43, где клетка выбрана из Т-клетки или предшественника Т-клетки.

Пункт 45. Способ выявления рака в биологическом образце, включающий:

- а) контактирование биологического образца с ТКР по любому из пп.1-22 и
- б) выявление связывания ТКР с биологическим образцом.

Пункт 46. Способ по п.45, где ТКР включает поддающуюся обнаружению метку.

Пункт 47. Способ по п.46, где поддающаяся обнаружению метка выбрана из группы, состоящей из радионуклида, флуорофора и биотина.

Пункт 48. Способ по любому из пп.45-47, где указанное обнаружение осуществляется *in vitro*, *in vivo* или *in situ*.

Пункт 49. Способ по любому из пп.45-48, где указанный рак является немелкоклеточным раком легких, мелкоклеточным раком легких, почечноклеточным раком, раком головного мозга, раком желудка, колоректальным раком, гепатоклеточным раком, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, лейкозом, раком молочной железы, карциномой клеток Меркеля, меланомой, раком яичника, раком мочевого пузыря, раком матки, раком желчного пузыря и желчных протоков, раком пищевода или их комбинацией.

Пункт 50. Клетка-хозяин по любому из пп.25-28, где Т-клетка является гамма-дельта Т-клеткой.

Пункт 51. Способ уничтожения клеток-мишеней у пациента, клетки-мишени которого аберрантно экспрессируют MAG-003, причем способ включает введение пациенту эффективного количества Т-клеток, экспрессирующих ТКР по любому из пп.1-22, нуклеиновой кислоты по п.23, вектора экспрессии по п.24, клетки-хозяина по любому из пп.25-28 и/или фармацевтической композиции по п.29.

Пункт 52. ТКР по любому из пп.1-22, который является растворимым ТКР.

Пункт 53. ТКР по любому из пп.1-22, где альфа-цепь и бета-цепь, где альфа-цепь включает альфа-вариабельный домен ТКР, который по меньшей мере на 95% идентичен любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 71; и бета-цепь включает бета-вариабельный домен ТКР, который по меньшей мере на 95% идентичен любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 79, и где ТКР специфически связывается с комплексом пептида MAG-003 и молекулы МНС.

Пункт 54. ТКР по любому из пп.1-22, имеющий по меньшей мере одну мутацию в альфа-цепи относительно последовательностей с SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 71 и/или имеющий по меньшей мере одну мутацию в бета-цепи относительно последовательностей с SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 79, и где ТКР имеет аффинность связывания по отношению к и/или полупериод связывания с комплексом пептида MAG-003 и молекулы HLA, которая по меньшей мере вдвое выше, чем у ТКР без мутаций по отношению к тому же пептида.

Пункт 55. ТКР по любому из пп.1-22, имеющий по меньшей мере одну мутацию в альфа-цепи относительно последовательностей с SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 71 и/или имеющий по меньшей мере одну мутацию в бета-цепи относительно последовательностей с SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 79 и где ТКР обладает модифицированным гликозилированием в сравнении с ТКР без мутаций.

Пункт 56. Способ по любому из пп.31-44 или 51, где ТКР по любому из пп.1-22, нуклеиновую кислоту по п.23, вектор экспрессии по п.24, клетку-хозяина по любому из пп.25-28 или фармацевтическую

композицию по п.29 вводят в виде по меньшей мере двух введений с интервалом не менее чем 24 ч.

Пункт 57. Способ по п.56, где ТКР по любому из пп.1-22, нуклеиновую кислоту по п.23, вектор экспрессии по п.24, клетку-хозяина по любому из пп.25-28 или фармацевтическую композицию по п.29 вводят субъекту в течение периода времени в несколько дней, недель или месяцев.

Пункт 58. Способ по п.56 или 57, где ТКР по любому из пп.1-22, нуклеиновую кислоту по п.23, вектор экспрессии по п.24, клетку-хозяина по любому из пп.25-28 или фармацевтическую композицию по п.29 вводят посредством местной инфузии.

Пункт 59. Способ по п.58, где местную инфузию проводят с помощью инфузионного насоса и/или системы катетеров.

Пункт 60. Способ по п.58 или 59, где указанная местная инфузия проводится в солидную опухоль, кровеносный сосуд, который питает солидную опухоль, и/или участок, окружающий солидную опухоль.

Пункт 61. Способ по любому из пп.31-44, 51 или 56-60, где ТКР по любому из пп.1-22, нуклеиновую кислоту по п.23, вектор экспрессии по п.24, клетку-хозяина по любому из пп.25-28 или фармацевтическую композицию по п.29 вводят с дозировкой от около 10^4 до около 10^{10} клеток на дозу.

Пункт 62. ТКР, включающий по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), альфа-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи с SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 71; и/или по меньшей мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), бета-цепи, выбранный из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи с SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 79, и где ТКР специфически связывается с комплексом пептида MAG-003 и молекулы МНС.

Примеры

Аллореактивный ответ может использоваться, чтобы обойти аутоотолерантность получить Т-клетки с более высокой авидностью по сравнению с Т-клетками, полученными в аутологических условиях, т.е., у пациентов. Примеры таких условий включают получение *in vitro* алло-HLA-реактивных, пептид-специфических Т-клеток (Sadovnikova et al. 1998; Savage et al. 2004; Wilde et al. 2012) и иммунизацию мышей, трансгенных для человеческого МНС или человеческого ТКР (Stanislowski et al. 2001; Li et al. 2010).

Пример 1. Получение *in vitro* алло-HLA-реактивных, пептид-специфических Т-клеток (Savage et al. 2004).

МКПК HLA-A*02-положительных и HLA-A*02-отрицательных здоровых доноров использовали после получения информированного согласия пациентов. Рекомбинантные биотинилированные мономеры HLA-A2 I класса и флуоресцентные тетрамеры A2, содержащие MAG-003, были получены из MBLI (Вобурн, Массачусетс, США). МКПК инкубировали с антителами к CD20SA, растворенными в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS) в течение 1 ч при комнатной температуре, промывали и инкубировали с биотинилированными мономерами A2/MAG-003 в течение 30 мин при комнатной температуре, промывали и высевали по 3×10^6 клеток/лунка в 24-луночные планшеты в среду RPMI с 10% человеческой сыворотки АВ. Интерлейкин 7 (ИЛ-7; R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США) добавляли в день 1 в концентрации 10 нг/мл и ИЛ-2 (Chiron, Хейрфилд, Великобритания) добавляли в количестве 10 ед./мл в день 4. В течение 5 недель проводили еженедельную рестимуляцию клеток свежими МКПК, смешивали с клетками, дающими ответы, в соотношении 1:1 и высевали на 24-луночные планшеты по 3×10^6 клеток/лунка.

Для получения высокоавидных Т-клеток приблизительно 10^6 МКПК инкубировали с HLA-A2/MAG-003-тетрамер-фикоэритрином (PE) (полученным из компании MBLI) в течение 30 мин при 37°C, затем - с антителами к CD8-флуоресцеин изотиоцианату (FITC)/аллофикоцианину (APC) в течение 20 мин при 4°C, за чем следовал анализ с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)-Calibur. Сортировку проводили на оборудовании FACS-Vantage (Becton Dickinson, Коули, Оксфорд, Великобритания). Отсортированные тетрамер-положительные клетки культивировали в 24-луночных планшетах при использовании, на лунку, 2×10^5 отсортированных клеток, 2×10^6 облученных A2-негативных МКПК в качестве питающих клеток, 2×10^4 CD3/CD28 гранул/мл (Dyna, Осло, Норвегия) и ИЛ-2 (1000 ед./мл). Полученные таким образом высокоавидные Т-клетки использовали затем для идентификации и выделения ТКР с помощью методик, известных из уровня техники, таких как 5' RACE на основе отдельных клеток (быстрая амплификация концов кДНК). Не являющиеся избыточными ДНК ТКР затем анализировали в целях определения аминокислотных/ДНК-последовательностей и клонирования в векторы экспрессии с помощью способов, хорошо известных из уровня техники.

Пример 2. Иммунизация мышей, трансгенных для МНС человека или ТКР человека.

MAG-003 применяли для иммунизации трансгенных мышей целыми локусами человеческого гена TCR $\alpha\beta$ (1,1 и 0,7 млн. п.н.), Т-клетки которых экспрессируют различные ТКР человека, компенсируя недостаток ТКР у мыши. (Li et al. 2010). Для получения высоко-авидных Т-клеток МКПК, полученные из трансгенных мышей, инкубируют с тетрамер-фикоэритрином (PE) и затем производят сортировку клеток, как описывалось ранее. Полученные таким образом высокоавидные Т-клетки используют затем для идентификации и выделения ТКР для определения последовательностей аминокислот/ДНК и клонирования.

ния в векторы экспрессии с помощью способов, описанных в уровне техники.

В одном аспекте MAG-003 и его варианты, т.е. p286-1Y2L (с 2 заменами аминокислот, SEQ ID NO: 13) и p286-1Y2L9L (с 3 заменами аминокислот, SEQ ID NO: 14) демонстрируют сильную аффинность связывания и стабильность относительно молекулы HLA-A*0201. В частности, p286-1Y2L9L демонстрирует способность индуцировать специфические ЦТЛ, которые - в одном аспекте - лизируют раковые клетки-мишени как из МКПК здоровых доноров, так и HLA-A2.1 /Kb-трансгенных мышей. См., например, (Wu et al. 2011), содержание которого в полном объеме включено путем ссылки.

Для получения высокоавидных ТКР для комплексов МНС I или II/p286-1Y2L или p286-1Y2L9L эти пептиды могут использоваться в способах, описанных в примерах 1 и 2. Полученные таким образом высокоавидные Т-клетки используют затем для идентификации и выделения ТКР для определения последовательностей аминокислот/ДНК и клонирования в векторы экспрессии с помощью способов, описанных в уровне техники.

Пример 3. Клонирование ТКР.

Способы клонирования ТКР известны из уровня техники, например, они описаны в патенте США 8519100, в отношении данных способов включенном в настоящее описание в своей полноте путем ссылки. Олигонуклеотид A1 (ggaattccatagagtcacaagaagaagatcc SEQ ID NO: 26), специфический для последовательности вариательной области альфа-цепи, который кодирует сайт рестрикции NdeI, введенный метионин для эффективной инициации экспрессии в бактериях, и олигонуклеотид A2 (ttgtcagtcgacttagagtctctcagctggtagacg SEQ ID NO: 27), специфический для последовательности константной области альфа-цепи, который кодирует сайт рестрикции SalI, использованы для амплификации вариательной области альфа-цепи. В случае бета-цепи: специфический для последовательности вариательной области бета-цепи олигонуклеотид B1 (tctctcatatggatgggaattactcaatcccaaa SEQ ID NO: 28), который кодирует сайт рестрикции, например, NdeI, введенный метионин для эффективной инициации экспрессии в бактериях и специфический для последовательности константной области бета-цепи олигонуклеотид B2 (tagaaaccgggtggccaggcacaccagtgtggc SEQ ID NO: 29), который кодирует сайт рестрикции AgeI, использованы для амплификации вариательной области бета-цепи.

Последовательности ДНК, кодирующие продукт расщепления альфа-цепи ТКР с помощью NdeI и SalI, лигированы в вектор pGMT7+Cα, который был расщеплен с помощью NdeI и XhoI. Последовательности ДНК, кодирующие продукт расщепления бета-цепи ТКР с помощью NdeI и AgeI, были лигированы в отдельный вектор pGMT7+Cβ, который также был обрезан с помощью NdeI и AgeI. Лигированные плазмиды трансформировали в компетентные клетки XL1-blue штамма Escherichia coli и высевали на чашки с агаром LB, содержащие 100 мкг/мл ампициллина. После инкубации в течение ночи при 37°C собирали отдельные колонии и выращивали их в 10 мл питательной среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина при 37°C, в течение ночи, встряхивая. Клонированные плазмиды очищали с использованием комплекта Miniprep kit (Qiagen), и вставки секвенировали с помощью автоматического секвенсора ДНК (Lark Technologies).

Три ТКР (R20P1H7, R7P1D5 и R10P2G12, см. табл. 2), каждый из которых кодирует опухолеспецифические альфа- и бета-цепи ТКР, были выделены и амплифицированы из Т-клеток здоровых доноров. Клетки, полученные от здоровых доноров, стимулировали *in vitro* в соответствии со способом, описанным в работе Walter et. al. 2003. Мишень-специфические клетки были отсортированы поклеточно с помощью мишень-специфических мультимеров для последующего выделения ТКР. Последовательности ТКР были выделены с помощью метода 5' RACE при использовании стандартных методик, как это описано, например, в лабораторном руководстве Molecular Cloning, изд. 4-е, Green and Sambrook. Все три ТКР были получены у HLA-A2-положительных доноров. Определяли последовательности вариательных областей альфа- и бета цепей ТКР R20P1H7, R7P1D5 и R10P2G12.

Альфа-вариательный домен ТКР R20P1H7, как было установлено, имеет аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 22-133 последовательности SEQ ID NO: 39. Бета-вариательный домен ТКР R20P1H7, как было установлено, имеет аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 20-135 последовательности SEQ ID NO: 47.

Альфа-вариательный домен ТКР R7P1D5 имеет аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 22-131 последовательности SEQ ID NO: 55. Бета-вариательный домен ТКР R7P1D5 имеет аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 20-131 последовательности SEQ ID NO: 63.

Альфа-вариательный домен ТКР R10P2G12 имеет аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 21-136 последовательности SEQ ID NO: 71. Бета-вариательный домен бета-цепи ТКР R10P2G12 имеет аминокислотную последовательность, соответствующую остаткам 20-134 последовательности SEQ ID NO: 79.

Фаговое отображение может быть применено для создания библиотек вариантов ТКР в целях идентификации мутантов с высокой аффинностью. Фаговое отображение ТКР и методы скрининга, описанные в работе (Li et al, (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354), могут быть применены к контрольному ТКР, выбранному из ТКР, описанных в табл. 2.

Например, все три области CDR последовательности альфа-цепи с SEQ ID NO: 39, 55 и 71; и все три области CDR последовательности альфа-цепи с SEQ ID NO: 47, 55 и 79 могут быть мишенями мутагенезов, и каждая библиотека CDR может быть подвергнута панорамированию и исследована в отдельности.

Соответственно, были идентифицированы ТКР с аффинностями и/или полупериодами связывания, которые не менее чем в два раза больше, чем у контрольного ТКР (и, следовательно, как подразумевается, не менее чем в два раза больше, чем у природных ТКР).

Гетеродимеры ТКР подвергаются рефолдингу с помощью способа, включающего введение остатков цистеина в константные области для получения искусственной дисульфидной связи между цепями. Таким способом получают ТКР, состоящие из (а) контрольной бета-цепи ТКР вместе с альфа-цепями, имеющими мутацию; (б) контрольной альфа-цепи ТКР вместе с бета-цепями, имеющими мутацию; и (с) различных комбинаций бета- и альфа-цепей, включая вариабельные домены с мутациями.

Взаимодействие между высокоаффинными растворимыми ТКР с дисульфидной связью, вариантами ТКР и комплексом природного пептида KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1) и молекулы HLA-A*02 может быть проанализировано при использовании методики BIAcore.

Высокоавидные варианты ТКР могут быть также выбраны из библиотеки мутантов CDR с помощью дрожжевого или Т-клеточного отображения (holler et al. 2003; Chervin et al. 2008). Кандидаты в варианты ТКР, таким образом, могут быть руководством для конструирования мутаций CDR ТКР для получения вариантов ТКР с высокой авидностью (Robbins et al. 2008; Zoete et al. 2007).

Пример 4. Генная инженерия аутологичных Т-клеток.

Т-клетки могут быть сконструированы так, чтобы экспрессировать высокоавидные ТКР (так называемые лекарственные препараты на основе ТКР) или образованные слиянием белков химерные антигенные рецепторы (CAR), которые имеют повышенную специфичность к антигену комплекса МНС I/MAG-003 или комплекса МНС II/MAG-003. В одном аспекте с помощью данного подхода преодолеваются некоторые ограничения, ассоциированные с центральной и периферической толерантностью, и получают Т-клетки, которые будут более эффективными при нацеливании на опухоль без необходимости активации Т-клеток *de novo* в организме пациента.

В одном аспекте для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему описанию, нуклеиновые кислоты, кодирующие цепи опухоеспецифических ТКР-альфа и/или ТКР-бета, идентифицированные и выделенные согласно описанию примеров 1-3, клонируют в векторы экспрессии, такие как гамма-ретровирус или лентивирус. Рекомбинантные вирусы получают и проводят испытание их функциональности, такой как антигенная специфичность и функциональная авидность. Аликвота конечного продукта затем используется для трансдукции целевой популяции Т-клеток (как правило, очищенных от МКПК пациента), которую культивируют перед инфузией пациенту.

В другом аспекте для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему описанию, РНК ТКР синтезировали с помощью методик, описанных в уровне техники, например, транскрипционные системы *in vitro*. Синтезированные *in vitro* РНК ТКР затем вводили с помощью электропорации в первичные CD8⁺ Т-клетки, полученные у здоровых доноров, в целях повторной экспрессии альфа- и/или бета-цепей опухоеспецифических ТКР.

Для определения специфичности и аффинности ТКР трансформированные CD8⁺ Т-клетки инкубировали совместно с клетками-мишенями, нагруженными пептидом MAG-003, или с клетками-мишенями, нагруженными гомологичным, но не родственным пептидом RABGAP1L-001 (SEQ ID NO: 91), AXIN1-001 (SEQ ID NO: 92), ANO5-001 (SEQ ID NO: 93), TPX2-001 (SEQ ID NO: 94), SYNE3-001 (SEQ ID NO: 95), MIA3-001 (SEQ ID NO: 96), HERC4-001 (SEQ ID NO: 97), PSME2-001 (SEQ ID NO: 98), HEATR5A-001 (SEQ ID NO: 99) или CNOT1-003 (SEQ ID NO: 100) или контрольным пептидом NYESO1-001 (SEQ ID NO: 101), затем проводили анализ высвобождения IFN- γ . Ненагруженные клетки-мишени и CD8⁺ Т-клетки в отдельности служили контролями. Выработка IFN- γ CD8⁺ Т-клетками является индикатором активации у Т-клеток цитотоксической активности.

Таблица 11

№ ТКР	Код ТКР	Донор/HLA-A2 (+ или -)	IFN- γ (пг/мл)	EC50	% положительного окрашивания тетрамером MAG-003 первичных CD8 ⁺ Т-клеток	% положительного окрашивания тетрамером NYESO1-001 первичных CD8 ⁺ Т-клеток
1	R7P1D5	HBC-583/(+)	400 - 1050	~3 нМ	7,99	0,87
2	R20P1H7	HBC-689/(+)	200 - 900	~10 нМ	5,73	0,87
3	R10P2G12	HBC-673/(+)	200 - 1500	~10 нМ	5,38	0,87

Как показано на фиг. 5-7 во всех первичных CD8⁺ Т-клетках, трансформированных ТКР в соответ-

ствии с настоящим раскрытием сущности после совместной инкубации с нагруженными MAG-003 клетками-мишенями наблюдалось высвобождение более высоких уровней IFN- γ , чем в клетках-мишенях, стимулированных несоответствующим пептидом и контролях. Анализ титрованием пептида-мишени выявил диапазоны EC50 от около 3 до около 10 нм (табл. 11). Данные результаты позволяют предположить, что ТКР по настоящему изобретению могут активировать цитотоксическую активность Т-клеток, например, высвобождение IFN- γ , за счет специфического взаимодействия с комплексом МНС/MAG-003.

Активация Т-клеток была, кроме того, подтверждена с помощью методики окрашивания тетрамером для выявления цитотоксических Т-клеток, активированных связыванием с МНС/MAG-003. Как показано на фиг. 8 и в табл. 11, более высокая процентная доля ТКР-экспрессирующих CD8+ Т-клеток была окрашена положительно тетрамерами МНС/MAG-003 с флуоресцентными метками, чем контрольным тетрамером МНС/NYESO1-001 или имитатором, служившим контролем. В качестве контроля первичные CD8+ Т-клетки, трансформированные ТКР, таким как ТКР 1G4, о котором известно, что он специфически связывается с комплексом МНС/NYESO1-001, легко активировались клетками-мишенями, обработанными NYESO1-001. Альфа- и бета-цепи ТКР 1G4 представлены последовательностью с SEQ ID NO: 89 и 90 соответственно:

Альфа-цепь 1G4 (SEQ ID NO: 89):

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTTQIPAALSVPEGENVLNCSTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQ
SSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCVRPTSGGSYIPTFGRGTSLVHPYIQNPDP
AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVQSQSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFAFA
NAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

Бета-цепь 1G4 (SEQ ID NO: 90):

MSIGLLCCAALLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHY
SVGAGITDQGEVPGNGYNVSRSTTDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKN
VFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY
CLSSRLRVSAFTWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG
VLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

Для определения связывающего мотива ТКР для комплекса MAG-003/МНС проводили аланиновое сканирование для идентификации положений на каждой из 9 аминокислот пептида MAG-003. Пептиды MAG-003 с замещенными аланином аминокислотами показаны в табл. 12.

Таблица 12

Позиция:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MAG-003 (SEQ ID NO:1)	K	V	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A1 (SEQ ID NO:30)	A	V	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A2 (SEQ ID NO:31)	K	A	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A3 (SEQ ID NO:32)	K	V	A	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A4 (SEQ ID NO:33)	K	V	L	A	H	V	V	R	V
MAG-003 A5 (SEQ ID NO:34)	K	V	L	E	A	V	V	R	V
MAG-003 A6 (SEQ ID NO:35)	K	V	L	E	H	A	V	R	V
MAG-003 A7 (SEQ ID NO:36)	K	V	L	E	H	V	A	R	V
MAG-003 A8 (SEQ ID NO:37)	K	V	L	E	H	V	V	A	V
MAG-003 A9 (SEQ ID NO:38)	K	V	L	E	H	V	V	R	A

CD8+ Т-клетки, электропорированные РНК, кодирующей представляющий интерес ТКР, совместно инкубировали с клетками-мишенями, нагруженными пептидами MAG-003, от MAG-003-A1 по MAG-003-A9, или несоответствующим пептидом NYESO1-001, после чего проводили анализ высвобождения IFN γ , как описано выше.

Результаты идентификации позиций при помощи аланинового сканирования представлены в фиг. 9-11 и сведены в табл. 13.

Таблица 13

ТКР	Позиции MAG-003, позволяющие связывание с ТКР
R7P1D5	1, 3, 5, 7, 8
R20P1H7	1, 3, 4, 5, 7, 8
R10P2G12	1, 2, 3, 4, 5, 8

Скрининг всего генома на наличие A*02-связывающих пептидов с идентичным мотивом не выявил пептидов, потенциально перекрестно реагирующих с ТКР R20P1H7, R7P1D5 и R10P2G12 соответственно. Эти результаты позволяют предположить, что ТКР, описанные в настоящем документе, имеют чрезвычайно специфический паттерн распознавания с низким риском проявления внемишеневых эффектов.

Для определения эффективности Т-клеток, экспрессирующих ТКР, описанные в настоящем документе, первичные CD8+ Т-клетки электропорированные РНК, кодирующие ТКР R7P1D5, R20P1H7 и R10P2G12, инкубировали совместно с различными линиями раковых клеток человека, например A-375

(линия клеток меланомы человека, положительная по экспрессии HLA-A2 и MAG-003), T98G (линия клеток глиобластомы человека, HLA-A2-положительная и MAG-003-отрицательная) и SK-BR-3 (линия клеток рака молочной железы человека, HLA-A2-отрицательная и MAG-003-отрицательная), за чем следовал анализ высвобождения IFN γ .

Как показано на фиг. 12А-С, высвобождение IFN γ наблюдалось в клетках А-375, которые являются HLA-A2-положительными и MAG-003-положительными, но не в клетках T98G и SK-BR-3, имеющих фоновые уровни высвобождения IFN γ , сравнимые с контрольными образцами - только эффекторными клетками. Кроме того, CD8 $^{+}$ Т-клетки, трансформированные ТКР R7P1D5, но не контроли, также демонстрировали повышенные уровни IFN γ , когда их инкубировали совместно с линией клеток немелкоклеточно-го рака человека, H1755 (данные не показаны). Эти результаты указывают на то, что Т-клетки, экспрессирующие ТКР R7P1D5, R20P1H7 и R10P2G12 могут специфически индуцировать цитотоксическую активность, направленную на раковые клетки специфическим по отношению к комплексу HLA-A2/MAG-003 образом.

В настоящем описании предложены ТКР, которые пригодны для лечения раковых заболеваний/опухолей, предпочтительно, меланомы и немелкоклеточного рака легких, клетки которых презентуют в избытке или исключительно пептид MAG-003.

Пример 5. Генетическая инженерия аллогенных Т-клеток.

Гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетки, являющиеся нетрадиционными эффекторами Т-лимфоцитов, задействованными в первой линии защиты от патогенов, могут взаимодействовать с опухолевыми клетками и уничтожать их вне зависимости от МНС за счет активации рецепторов, среди прочих, ТКР-гамма и ТКР-дельта-цепей. Данные $\gamma\delta$ Т-клетки обнаруживают преактивированный фенотип, при активации которого становится возможной быстрая выработка цитокинов (IFN- γ , TNF- α) и сильный цитотоксический ответ. Эти Т-клетки обладают противоопухолевой активностью по отношению ко многим видам рака и позволяют предположить, что опосредованная $\gamma\delta$ Т-клетками иммунотерапия оправдана и может вызывать объективные ответы опухоли (Braza et al. 2013).

Последние достижения по применению иммобилизованных антигенов, агонистических моноклональных антител (мАт), искусственных антигенпрезентирующих клеток, полученных из опухоли (иАПК), или комбинаций из активирующих мАТ и иАПК применялись с успехом в культивации гамма-дельта Т-клеток со спектром олигоклональных или по-ликлональных ТКР. Например, иммобилизованный белок А, связанный с цепью главного комплекса гистосовместимости I класса был стимулятором для $\gamma\delta$ Т-клеток, экспрессирующих изотипы TCR δ 1, и связанные на чашках Петри активирующие антитела способствовали культивации клеток V δ 1 и V δ 2 ex vivo. Клинически достаточные количества TCR δ 1, TCR δ 2 и TCR δ 1^{нег}-TCR δ 2^{нег} были получены после совместной культивации на иАПК, и данные подтипы обладали различиями по фенотипу памяти и их активности по отношению к опухолям in vitro и in vivo. (Deniger et al. 2014).

Кроме того, $\gamma\delta$ Т-клетки поддаются генетической модификации, как это наглядно продемонстрировано введением ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей (Hiasa et al. 2009). В другом аспекте настоящее описание относится к получению $\gamma\delta$ Т-клеток, экспрессирующих ТКР-альфа и ТКР-бета, связывающихся с пептидом MAG-003. В этих целях $\gamma\delta$ Т-клетки культивируют методами, описанными в работе Deniger и соавт.. 2014, с последующей трансдукцией рекомбинантных вирусов, экспрессирующих ТКР, которые связываются с MAG-003 (согласно описанию примера 3), в $\gamma\delta$ Т-клетки после культивации. Трансдуцированные вирусом $\gamma\delta$ Т-клетки затем вводят посредством инфузии пациенту.

Пример 6. Безопасность MAG-003-специфических ТКР.

Три MAG-003-специфических ТКР (R7P1D5, R10P2G12, R20P1H7, см. табл. 2), каждый из которых кодирует опухолеспецифические альфа- и бета-цепи ТКР, были выделены и амплифицированы из Т-клеток здоровых доноров. Клетки здоровых доноров стимулировали in vitro в соответствии с ранее описанным способом (Walter et al., 2003 J Immunol., Nov 15;171(10):4974-8) и мишень-специфические клетки сортировали по отдельности при использовании мультимеров HLA-A*02, а затем использовали для последующего выделения ТКР. Последовательности ТКР были выделены с помощью метода 5' RACE при использовании стандартных методик, как это описано, например, в лабораторном руководстве Molecular Cloning, изд. 4-е, Green and Sambrook. Альфа- и бета-вариабельные области ТКР R7P1D5, R10P2G12 и R20P1H7 секвенировали и клонировали для дальнейшей характеристики функциональности. ТКР R7P1D5, R10P2G12 и R20P1H7 были получены у HLA-A*02-положительного донора.

Таблица 14
Виды клеток-мишеней

Вид клеток	Сокращение	источник
Нормальные фибробласты кожи человека	NHDF	Первичные клетки
Клетки гладких мышц коронарной артерии человека	HCASMC	Первичные клетки
Клетки гладких мышц бронхов человека	HBSMC	Первичные клетки
Эпителиальные клетки почек человека	HREpC	Первичные клетки
Кардиомиоциты человека	HCM	Первичные клетки
Эндотелиальные клетки микрососудов сердечной мышцы человека	HCMEC	Первичные клетки
Гепатоциты человека	HH	Первичные клетки
Астроциты человека	HA	Первичные клетки
Периневральные клетки человека	KKП	Первичные клетки
Клетки мозговой оболочки человека	HMC	Первичные клетки
Нейроны человека	HN	Клетки, образованные из iPSC

Представляющие интерес ТКР экспрессировались в Т-клетках человека за счет элек-тропорации РНК, и Т-клетки оценивали на высвобождение IFN-γ после совместной инкубации с различными клетками-мишенями, такими как Т2-клетками, нагруженными различными пептидами, а также с линиями опухолевых клеток и первичными клетками из здоровых тканей. Данные по активации Т-клеток представлены в виде абсолютных уровней высвобождения IFN-γ или в нормализованном виде как показано ниже.

Эффективность CD8+ Т-клеток, экспрессирующих ТКР R7P1D5, R10P2G12 и R20P1H7 определяли с помощью изучения активации Т-клеток (высвобождение IFN-γ) при использовании различных линий опухолевых клеток в качестве клеток-мишеней. Характеристики профиля безопасности представляющих интерес ТКР определяли, проводя исследования потенциальной активации ТКР-экспрессирующих Т-клеток после совместной культивации с выделенными видами первичных клеток из здоровых тканей и видами клеток, образованных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), полученных у HLA-A*02-положительных доноров (табл. 13). Виды клеток были выбраны таким образом, чтобы охватить большинство из важнейших органов, таких как головной мозг, сердце и печень, и различных видов клеток, таких как эпителий, эндотелий или гладкие мышцы. Линии опухолевых клеток анализировали параллельно с положительными и отрицательными контролями.

Метод нормализации для выработки IFNγ:

Средн._{норм.} (инт.ТКР; совм) = [средн._(инт.ТКР; совм) - средн._(инт.ТКР; только эффектор)] - [средн._(имитатор; совм) - средн._(имитатор; только эффектор)]

Соответствующий KB_{норм.} рассчитывали так:

$KB_{норм.(инт.ТКР; совм)} = [KB_{(инт.ТКР; совм)}^2 + KB_{(инт.ТКР; только эффектор)}^2 + KB_{(имитатор; совм)}^2 + KB_{(имитатор; только эффектор)}^2]^{1/2}$

инт.ТКР = эффекторные клетки, экспрессирующие ТКР, представляющий интерес

Имитатор = эффекторные клетки без экспрессии экзогенного ТКР

Совм. = эффекторные клетки после совместной инкубации с клетками-мишенями

Только эффектор = эффекторные клетки без совместной культивации

Средн._(норм.) = среднее значение уровня высвобождения IFNγ (нормализованное)

KB_(норм.) = коэффициент вариации (нормализованный)

Результаты:

Для CD8+ Т-клеток, экспрессирующих ТКР R7P1D5, R10P2G12 или R20P1H7, активации после совместной культивации с HLA-A*02-положительными видами клеток из здоровых тканей не наблюдалось (см. фиг. 13), тогда как имела активация в отношении линий опухолевых клеток A-375 и NCI-H1755, экспрессирующих HLA-A*02 и MAGEA4, в качестве исходного гена для пептида MAG-003. Сходная картина активности наблюдалась с CD8+ Т-клетками, экспрессирующими NYESO1-специфический ТКР 1G4, которые, как было обнаружено, реагируют в отношении HLA-A*02-положительных линий опухолевых клеток, экспрессирующих NYESO1, но не в отношении указанной панели клеток здоровых тканей.

Активация Т-клеток после совместной культивации с линиями клеток, экспрессирующими HLA-A*02 и MAGEA4, отражает распознавание ТКР R7P1D5, R10P2G12 и R20P1H7 pHLA-мишени, экспрессируемого и процессируемого эндогенно.

Анализ безопасности указывает на отсутствие неожиданного перекрестного взаимодействия или потенциальной аллореактивности ТКР R7P1D5, R10P2G12 и R20P1H7 в отношении первичных клеток здоровой ткани. Этот факт заслуживает внимания, поскольку испытанные виды первичных клеток представляют тысячи нормальных HLA-лигандов в контексте HLA-A*02 и, скорее всего, также представляют дополнительные аллогенные HLA-аллели, которые варьируются между видами нормальных клеток.

Пример 7. Экспрессия ТКР по изобретению векторами на основе лентивирусов.

Т-клеточные продукты были получены из общей массы мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), выделенных из крови здоровых доноров при помощи мелкомасштабного производственного процесса по технологии ACTengine. Скелет лентивирусного вектора, экспрессирующего ТКР R7P1D5 по изобретению для производства Т-клеток с помощью ACTengine, был сконструирован на основе предварительных исследований и многочисленных клинических исследований (Porter et al., 2011; Kalos et al., 2011; and others). Вкратце, МКПК после размораживания и периода покоя активировали антителами к CD3/CD28 и трансдуцировали с концентрированными лентивирусными супернатантами, полученными при использовании различных лентивирусных векторов с трансгеном ТКР R7P1D5 с различной ориентацией α - и β -цепей и различными комбинациями промоторов и энхансеров последовательностей (конструкции были названы R71-R78). Две из 8 конструкций (R74, R75) были удалены в связи с низким титром и/или низкой продуктивностью. Клетки, трансдуцированные оставшимися 6 вирусными супернатантами, культивировали, и для оценки экспрессии трансгена применяли проточный цитометрический анализ.

Ориентации были следующими: Альфа-бета: R71, R72, 75, 76; бета-альфа: R73, R74, R77, 78, IG4.

Все Т-клеточные продукты демонстрировали сопоставимую жизнеспособность, процентное содержание лимфоцитов, а также CD3+ Т-клеток. Процентная доля CD4+ и CD8+ Т-клеток варьировалось среди доноров. Различий в отношении токсичности среди всех 6 вирусных супернатантов не наблюдалось. Лентивирусная конструкция ТКР R73 для R7P1D5 устойчиво индуцировала более высокую экспрессию ТКР, которая была обнаружена на поверхности с помощью связывания тетрамера. Исходя из экспрессии трансгена лентивирусные конструкции имеют следующий порядок: R73>R78>R77>R71>R76>R72 (фиг. 14).

Для подтверждения возможности трансдукции ТКР R7P1D5 вирусной конструкцией R73 были проведены дополнительные эксперименты с 2 новыми донорами. Трансдуцированные клетки из всех экспериментов испытывали для оценки их функциональности с помощью анализа высвобождения цитокинов и уничтожения. У всех обследованных доноров трансдуцированные R73 Т-клетки, полученные из цельных МКПК четырех доноров демонстрировали существенно более высокие уровни продукции IFN γ после совместной культивации с клетками A375, экспрессирующими антиген MAGE-A4 по сравнению с нетрансдуцированными Т-клетками (фиг. 15A). Ответ в виде IFN γ был строго антиген-специфическим, поскольку индукция в присутствии клеток вида MCF-7 с дефицитом экспрессии MAGE-A4 находилась ниже фоновых уровней. Кроме того, показатель EC₅₀, полученный из кривых титрования T2, соответствующих количествам IFN γ , обнаруженным в ответ на снижение концентрации пептида MAG-003, у обоих доноров составлял 10,0 нМ (фиг. 15B).

Кроме выработки цитокинов Т-клеточные продукты, трансдуцированные ТКР R7P1D5 (вирус R73), исследовали в рамках 4-часового анализа цитотоксичности с высвобождением Cr51. Производили оценку распознавания и лизиса MAGE-A4+ опухолевых клеток A375, представляющих эндогенно процессированный пептид MAG-003. Трансдуцированные R73 Т-клетки демонстрировали повышенную цитотоксичность в сравнении с нетрансдуцированными клетками при всех соотношениях Э/М (фиг. 16A, B). Цитотоксические эффекты, отмеченные для трансдуцированных R73 клеток, были опосредованы антиген-специфическим образом, поскольку процентная доля лизиса, наблюдавшегося для MAGE-A4+ мишеней, была существенно выше, чем в случае MAGEA-A4-отрицательных клеток-мишеней (фиг. 16C).

Список цитируемой литературы

- Adair SJ, Hogan KT (2009). Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 589-601.
- Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givel JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 839-847.
- Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* **8**, 2.
- Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De ME, Spagnoli GC, Chomez P, De BO, Jegou B, Samson M (2001). MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* **92**, 2778-2785.
- Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* **12**, 764-771.
- Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Rugghetti A, Panici PB, Nuti M (2007). Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur. J Cancer* **43**, 2621-2627.
- Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009). High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *Int. J Cancer* **125**, 1365-1371.
- Bhan S, Chuang A, Negi SS, Glazer CA, Califano JA (2012). MAGEA4 induces growth in normal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis. *Oncol Rep.* **28**, 1498-1502.
- Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* **27**, 899-905.
- Cabezon T, Gromova I, Gromov P, Serizawa R, Timmermans W, V, Kroman N, Celis JE, Moreira JM (2013). Proteomic profiling of triple-negative breast carcinomas in combination with a three-tier orthogonal technology approach identifies Mage-A4 as potential therapeutic target in estrogen receptor negative breast cancer. *Mol. Cell Proteomics.* **12**, 381-394.
- Cesson V, Rivals JP, Escher A, Piotet E, Thielemans K, Posevitz V, Dojcinovic D, Monnier P, Speiser D, Bron L, Romero P (2011). MAGE-A3 and MAGE-A4 specific CD4(+) T-cells in head and neck cancer patients: detection of naturally acquired responses and identification of new epitopes. *Cancer Immunol. Immunother.* **60**, 23-35.
- Chambost H, Van BN, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi SJ, Theate I, Plumas J, Spagnoli GC, Michel G, Coulie PG, Olive D (2000). Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood* **95**, 3530-3533.

- Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA (2005). Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod. Pathol.* **18**, 119-126.
- Coral S, Parisi G, Nicolay HJ, Colizzi F, Danielli R, Fratta E, Covre A, Taverna P, Sigalotti L, Maio M (2013). Immunomodulatory activity of SGI-110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 605-614.
- Cruz CR, Gerdemann U, Leen AM, Shafer JA, Ku S, Tzou B, Horton TM, Sheehan A, Copeland A, Younes A, Rooney CM, Heslop HE, Bollard CM (2011). Improving T-cell therapy for relapsed EBV-negative Hodgkin lymphoma by targeting upregulated MAGE-A4. *Clin Cancer Res* **17**, 7058-7066.
- Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, Lienard D, Monnier P, Romero P, Bron L, Rimoldi D (2011). Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J Cancer* **128**, 2625-2634.
- Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, Matsuzaki J, Tsuji T, Groman A, Gnjjatic S, Spagnoli G, Lele S, Odunsi K (2014). Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS. ONE.* **9**, e104099.
- Duffour MT, Chaux P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P (1999). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur. J Immunol.* **29**, 3329-3337.
- Forghanifard MM, Gholamin M, Farshchian M, Moaven O, Memar B, Forghani MN, Dadkhah E, Naseh H, Moghbeli M, Raeisossadati R, Abbaszadegan MR (2011). Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* **12**, 191-197.
- Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, Gottschalk SM, Savoldo B, Vera JF, Heslop HE, Brenner MK, Bollard CM, Rooney CM, Leen AM (2011). Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol. Ther.* **19**, 2258-2268.
- Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S (2013). Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery* **154**, 1456-1462.
- Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 8055-8062.
- Hartmann S, Meyer TJ, Brands RC, Haubitz IR, Linz C, Seher A, Kubler AC, Muller-Richter UD (2015). MAGE-A expression clusters and antineoplastic treatment in head and neck cancer. *Int. J Mol. Med.* **35**, 1675-1682.
- Hussein YM, Morad FE, Gameel MA, Emam WA, El Sawy WH, El Tarhouny SA, Bayomy ES, Raafat N (2012). MAGE-4 gene m-RNA and TGF in blood as potential biochemical markers for HCC in HCV-infected patients. *Med. Oncol* **29**, 3055-3062.
- Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de Rakt MW, Figdor CG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol.* **88**, 273-280.

- Jia ZC, Ni B, Huang ZM, Tian Y, Tang J, Wang JX, Fu XL, Wu YZ (2010). Identification of two novel HLA-A*0201-restricted CTL epitopes derived from MAGE-A4. *Clin Dev. Immunol.* **2010**, 567594.
- Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraishi T, Inoue N, Tanabe M, Kidokoro T, Yoshioka H, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H (2015). Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer. *Clin. Cancer Res.*
- Kang J, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. *PLoS. ONE.* **10**, e0118927.
- Kawagoe H, Yamada A, Matsumoto H, Ito M, Ushijima K, Nishida T, Yakushiji M, Itoh K (2000). Serum MAGE-4 protein in ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol* **76**, 336-339.
- Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethraly resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* **8**, 743-750.
- Kobayashi T, Lonchay C, Colau D, Demotte N, Boon T, van der Bruggen P (2003). New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens* **62**, 426-432.
- Kocher T, Zheng M, Bolli M, Simon R, Forster T, Schultz-Thater E, Rimmel E, Noppen C, Schmid U, Ackermann D, Mihatsch MJ, Gasser T, Heberer M, Sauter G, Spagnoli GC (2002). Prognostic relevance of MAGE-A4 tumor antigen expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a tissue microarray study. *Int. J Cancer* **100**, 702-705.
- Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* **109**, 568-575.
- Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T (1997). Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* **17**, 3559-3563.
- Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* **11**, 1809-1814.
- Lifantseva N, Koltsova A, Krylova T, Yakovleva T, Poljanskaya G, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int.* **2011**, 795239.
- Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br. J Dermatol.* **151**, 1213-1218.
- Melo DH, Mamede RC, Neder L, Saggioro FP, Figueiredo DL, da Silva WAJ, Jungbluth AA, Zago MA (2011). Expression of MAGE-A4 and MAGE-C1 tumor-associated antigen in benign and malignant thyroid diseases. *Head Neck* **33**, 1426-1432.
- Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadde A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* **118**, 696-703.

Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol.* **27**, 1255-1266.

Miyahara Y, Naota H, Wang L, Hiasa A, Goto M, Watanabe M, Kitano S, Okumura S, Take-mitsu T, Yuta A, Majima Y, Lemonnier FA, Boon T, Shiku H (2005). Determination of cellular-ly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res* **11**, 5581-5589.

Montoro JR, Mamede RC, Neder SL, Saggiaro FP, Figueiredo DL, Silva WA, Jr., Jungbluth AA, Spagnoli GC, Zago MA (2012). Expression of cancer-testis antigens MAGE-A4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* **34**, 1123-1128.

Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, Sakurai T, Dawson S, Mayer RJ, Itoh K, Fujita J (2003). MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* **278**, 10668-10674.

Naota H, Miyahara Y, Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka Y, Hiasa A, Kitano S, Takahashi T, Yuta A, Majima Y, Shiku H (2006). Generation of peptide-specific CD8+ T-cells by phytohe-magglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4+ T-cells. *J Immunol. Methods* **314**, 54-66.

Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* **119**, 3097-3104.

Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosemberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* **8**, 7.

Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K, Togashi Y, Kitamura H, Nishimura T (2009). Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumour antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br. J Cancer* **100**, 1135-1143.

Ottaviani S, Colau D, van der Bruggen P, van der Bruggen P (2006). A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 867-872.

Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, Pichlmeier U, Loning T, Janicke F, Pantel K (2001). MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res* **61**, 6682-6687.

Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* **66**, 4693-4700.

Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Chen WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* **219**, 223-232.

Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J Cancer* **123**, 1551-1555.

Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* **26**, 1053-1057.

- Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F (1997). Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res.* **17**, 387-391.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213-219.
- Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs*. (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).
- Resnick MB, Sabo E, Kondratev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J Cancer* **101**, 190-195.
- Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J (2005). Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int. J Oncol.* **26**, 817-824.
- Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y (2014). High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine* **32**, 5901-5907.
- Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Chiba T, Fujita J (2004). A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J Biol Chem* **279**, 15505-15514.
- Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* **64**, 443-449.
- Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevogt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* **13**, 156.
- Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **51**, 870-880.
- Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**, 5442-5447.
- Shichijo S, Hoshino T, Koufuji K, Hayashi A, Kawamoto M, Kikuchi M, Higuchi T, Ichiki M, Oizumi K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in sera of lung cancer patients. *Jpn. J Cancer Res* **88**, 414-419.
- Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **68**, 105-110.
- Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gammanull mice. *Cancer Sci.* **103**, 17-25.

Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* 1, 326-330.

Su C, Xu Y, Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer-testis antigens in stage Ib-IIIa non-small cell lung cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.

Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y, Kitamura H, Todo S, Nishimura T (2012). First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/ killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci.* 103, 150-153.

Tanaka F, Mori M, Li J, Fujie T, Mimori K, Haraguchi M, Tanaka Y, Mafune K, Akiyoshi T (1997). High frequency of the expression of the MAGE gene family in human esophageal carcinoma. *Int. J Oncol* 10, 1113-1117.

Tsuzurahara S, Sata M, Iwamoto O, Shichijo S, Kojiro M, Tanikawa K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in the sera of patients with hepatitis-C virus-associated hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Jpn. J Cancer Res* 88, 915-918.

Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Bühring HJ, Rammensee HG, Stevanović S. (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol.* 171(10), 4974-8

Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping Y, Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Combined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.

Wu ZY, Gao YF, Wu YH, Liu W, Sun M, Zhai MX, Qi YM, Ye Y (2011). Identification of a novel CD8+ T-cell epitope derived from cancer-testis antigen MAGE-4 in oesophageal carcinoma. *Scand. J Immunol.* 74, 561-567.

Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB (2003). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res* 9, 6453-6460.

Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N (2013). Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434.

Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Ikeda H, Nishimura T (2006). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T-cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *Int. J Oncol* 28, 1089-1098.

Zhang Y, Stroobant V, Russo V, Boon T, van der Bruggen P (2002). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 60, 365-371.

Zimmermann AK, Imig J, Klar A, Renner C, Korol D, Fink D, Stadlmann S, Singer G, Knuth A, Moch H, Caduff R (2013). Expression of MAGE-C1/CT7 and selected cancer/testis antigens in ovarian borderline tumours and primary and recurrent ovarian carcinomas. *Virchows Arch.* 462, 565-574.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная антигенраспознающая структура, специфически связывающаяся с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 в комплексе с молекулой человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) I класса, где X_1 выбран из аминокислот К и Y, X_2 выбран из аминокислот V, L и A и X_3 выбран из V, L, A и I и где указанная антигенраспознающая структура включает альфа-вариабельный домен ТКР и бета-вариабельный домен ТКР, или гамма-вариабельный домен ТКР и дельта-вариабельный домен ТКР, и где

(i) альфа-вариабельный домен ТКР или гамма-вариабельный домен ТКР включают участки, определяющие комплементарность (CDR), имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 60, и бета-вариабельный домен ТКР или дельта-вариабельный домен ТКР включают CDR, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 68; и

(ii) указанная антигенраспознающая структура включает соответствующие аминокислотные последовательности CDR с не более чем одной, двумя или тремя модификациями аминокислот, выбранными из вставки, делеции или замены аминокислоты.

2. Рекомбинантная антигенраспознающая структура, специфически связывающаяся с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 в комплексе с молекулой человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) I класса, где X_1 выбран из аминокислот К и Y, X_2 выбран из аминокислот V, L и A и X_3 выбран из V, L, A, и I и где указанная антигенраспознающая структура включает аль-

фа-вариабельный домен ТКР и бета-вариабельный домен ТКР или гамма-вариабельный домен ТКР и дельта-вариабельный домен ТКР, и где

(i) альфа-вариабельный домен ТКР или гамма-вариабельный домен ТКР включают CDR, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 44, и бета-вариабельный домен ТКР или дельта-вариабельный домен ТКР включают CDR, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 52; и

(ii) указанная антигенраспознающая структура включает соответствующие аминокислотные последовательности CDR с не более чем одной, двумя или тремя модификациями аминокислот, выбранными из вставки, делеции или замены аминокислоты.

3. Рекомбинантная антигенраспознающая структура, специфически связывающаяся с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 в комплексе с молекулой человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) I класса, где X_1 выбран из аминокислот К и Y, X_2 выбран из аминокислот V, L и А и X_3 выбран из V, L, А и I и где указанная антигенраспознающая структура включает альфа-вариабельный домен ТКР и бета-вариабельный домен ТКР или гамма-вариабельный домен ТКР и дельта-вариабельный домен ТКР, и где

(i) альфа-вариабельный домен ТКР или гамма-вариабельный домен ТКР включают участки, определяющие комплементарность (CDR), имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, и SEQ ID NO: 76, и бета-вариабельный домен ТКР или дельта-вариабельный домен ТКР включают CDR, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 84; и

(ii) указанная антигенраспознающая структура включает соответствующие аминокислотные последовательности CDR с не более чем одной, двумя или тремя модификациями аминокислот, выбранными из вставки, делеции или замены аминокислоты.

4. Рекомбинантная антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп.1-3, дополнительно включающая последовательность CDR2 в соответствии с SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 83.

5. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп.1-4, где указанная рекомбинантная антигенраспознающая структура является антителом, α/β -ТКР или указанная структура является γ/δ -ТКР.

6. Антигенраспознающая структура в соответствии с п.5, где указанное антитело является биспецифическим антителом.

7. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп.1-6, где указанная антигенраспознающая структура способна индуцировать иммунный ответ у субъекта факультативно, где иммунный ответ характеризуется повышением уровней интерферона (IFN)- γ .

8. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп.1-7, где эта структура гуманизирована, химерна и/или муринизирована.

9. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп.1-8, включающая α или γ -цепь ТКР; и/или β или δ -цепь ТКР; где α или γ -цепь ТКР включает последовательности CDR1-CDR3, имеющие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 42-44, и где указанная последовательность β или δ -цепи ТКР включает последовательности CDR1-CDR3, имеющие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 50-52; или где указанная последовательность α или γ -цепи ТКР включает последовательности CDR1-CDR3, имеющие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 58-60, и где указанная последовательность β или δ -цепи ТКР включает последовательности CDR1-CDR3, имеющие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 66-68; или где указанная последовательность α или γ -цепи ТКР включает последовательности CDR1-CDR3, имеющие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 74-76, и где указанная последовательность β или δ -цепи ТКР включает последовательности CDR1-CDR3, имеющие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 82-84.

10. Антигенраспознающая структура в соответствии с любым из пп.1-9, где эта структура является ТКР или его фрагментом, включающим по меньшей мере одну из последовательности α -цепи ТКР и одну последовательность β -цепи ТКР, где указанная последовательность α -цепи ТКР включает последовательность вариабельной области, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 41 или α -цепь ТКР по меньшей мере на 90% идентична α -цепи ТКР с SEQ ID NO: 41, и где указанная последовательность β -цепи ТКР включает последовательность вариабельной области, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 49 или β -цепь ТКР по меньшей мере на 90% идентична β -цепи ТКР с SEQ ID NO: 49; или где указанная последовательность α -цепи ТКР включает последовательность вариабельной области, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 57 или α -цепь ТКР по меньшей мере на 90% идентична α -цепи ТКР с SEQ ID NO: 57, и где указанная последовательность β -цепи ТКР включает последовательность вариабельной области, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 65 или β -цепь ТКР по меньшей мере на 90% идентична β -цепи ТКР с SEQ ID NO: 65; или где указанная последовательность α -цепи ТКР включает последовательность вариабельной области, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 73 или α -цепь ТКР по меньшей

мере на 90% идентична цепи ТКР с SEQ ID NO: 73, и где указанная последовательность β -цепи ТКР включает последовательность вариабельной области, имеющую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 81 или β -цепь ТКР по меньшей мере на 90% идентична β -цепи ТКР с SEQ ID NO: 81.

11. Антиген распознающая структура в соответствии с любым из пп.1-10, где указанная рекомбинантная антигенраспознающая структура является ТКР, где указанный ТКР

(i) дополнительно включает константную область ТКР, последовательность которой по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей с SEQ ID NO: 46, 54, 62, 70, 78 и 86;

предпочтительно, где ТКР состоит по меньшей мере из одной последовательности α -цепи ТКР и одной последовательности β -цепи ТКР, где эта последовательность α -цепи ТКР включает константную область, последовательность которой по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей с SEQ ID NO: 46, 62 и 78; и где эта последовательность β -цепи ТКР включает константную область, последовательность которой по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей с SEQ ID NO: 54, 70 и 86;

(ii) является одноцепочечным ТКР;

(iii) представляет собой $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ гетеродимерный ТКР, где между остатками константных доменов присутствует введенная дисульфидная связь.

12. Нуклеиновая кислота, кодирующая антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп.1-11.

13. Две отдельные нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп.1-11.

14. Вектор, включающий нуклеиновую кислоту в соответствии с п.12 или две отдельные нуклеиновые кислоты в соответствии с п.13.

15. Клетка-хозяин, включающая антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп.1-11, или нуклеиновую кислоту в соответствии с п.12, или две отдельные нуклеиновые кислоты в соответствии с п.13, или вектор в соответствии с п.14.

16. Клетка-хозяин в соответствии с п.15, где эта клетка является лимфоцитом, предпочтительно, Т-лимфоцитом или предшественником Т-лимфоцита, более предпочтительно CD4 или CD8-положительной Т-клеткой.

17. Фармацевтическая композиция, включающая антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп.1-11, или нуклеиновую кислоту или две отдельные нуклеиновые кислоты в соответствии с п.12 или 13, или вектор в соответствии с п.14, или клетку-хозяина в соответствии с п.15 или 16 и фармацевтически приемлемый носитель, стабилизатор и/или вспомогательное вещество.

18. Применение антигенраспознающей структуры в соответствии с любым из пп.1-11, или нуклеиновой кислоты или двух отдельных нуклеиновых кислот в соответствии с п.12 или 13, или вектора в соответствии с п.14, или клетки-хозяина в соответствии с п.15 или 16, или фармацевтической композиции в соответствии с п.17 в медицине.

19. Применение антигенраспознающей структуры в соответствии с любым из пп.1-11, или нуклеиновой кислоты или двух отдельных нуклеиновых кислот в соответствии с п.12 или 13, или вектора в соответствии с п.14, или клетки-хозяина в соответствии с п.15 или 16, или фармацевтической композиции по п.17 в диагностике, предупреждении и/или в лечении пролиферативного заболевания, где заболевание включает злокачественное или доброкачественное опухолевое заболевание.

20. Способ производства линии клеток, экспрессирующей ТАА-специфическую рекомбинантную антигенраспознающую структуру, включающий:

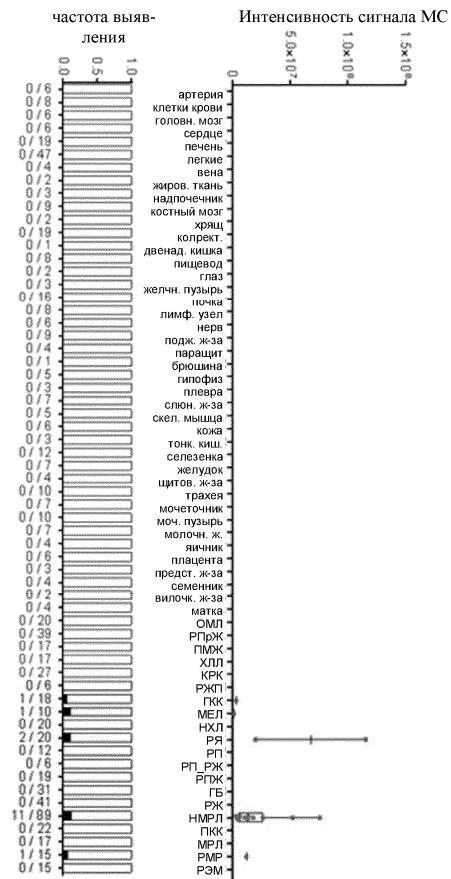
а) обеспечение подходящей клетки-хозяина,

б) обеспечение генетической конструкции, включающей кодирующую последовательность, кодирующую рекомбинантную антигенраспознающую структуру в соответствии с любым из пп.1-11,

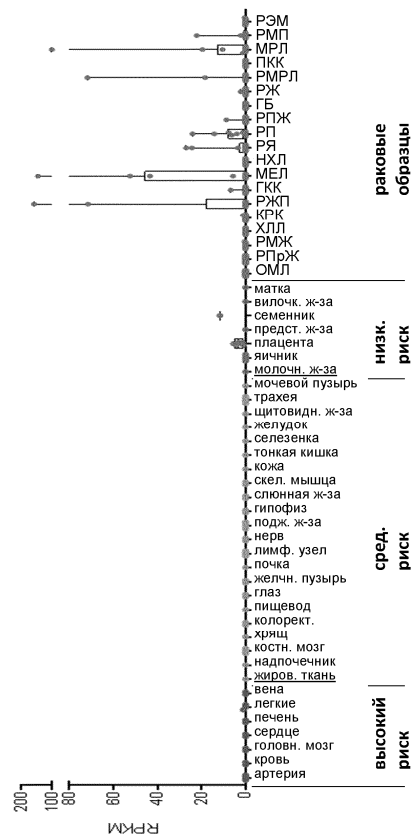
в) введение в указанную подходящую клетку-хозяина указанной генетической конструкции,

г) экспрессию указанной генетической конструкции указанной подходящей клеткой-хозяином.

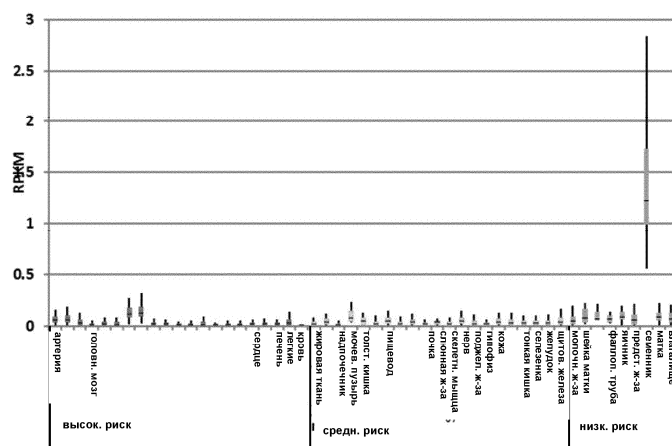
21. Способ в соответствии с п.20, где указанная рекомбинантная антигенраспознающая структура является модифицированным ТКР, где указанная модификация включает добавление функционального домена, включающего метку, или альтернативного домена, включающего мембранный якорный домен.



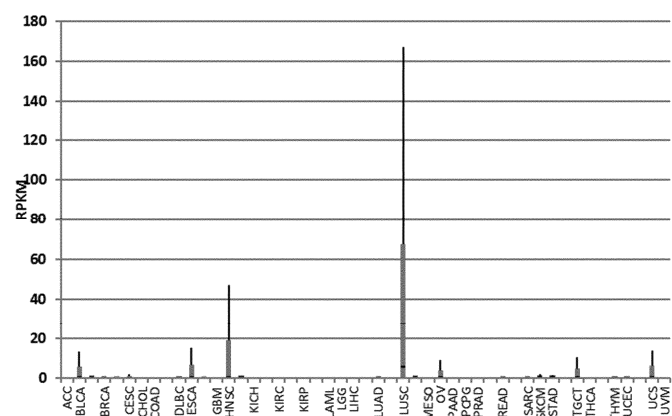
Фиг. 1



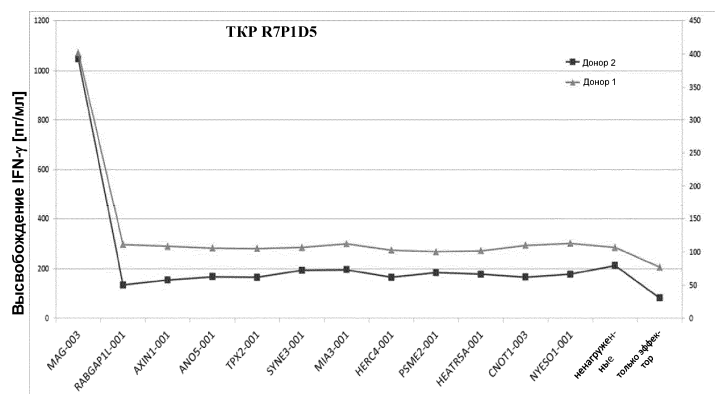
Фиг. 2



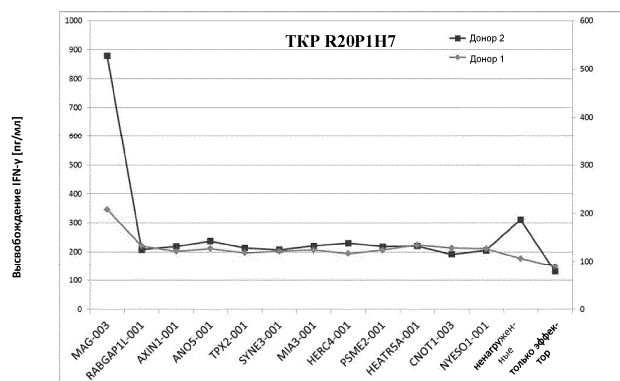
Фиг. 3



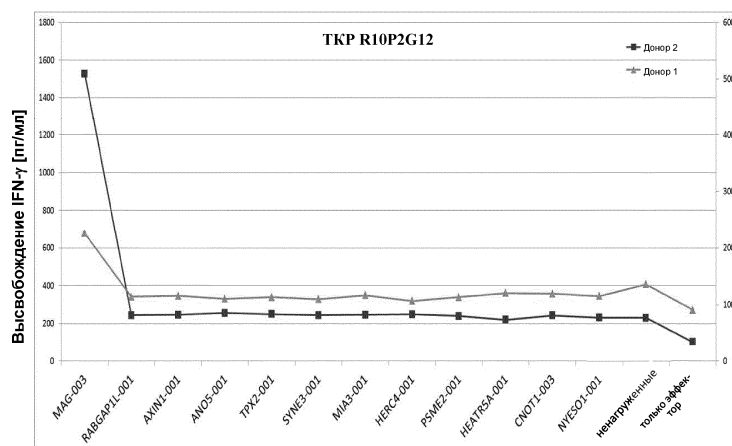
Фиг. 4



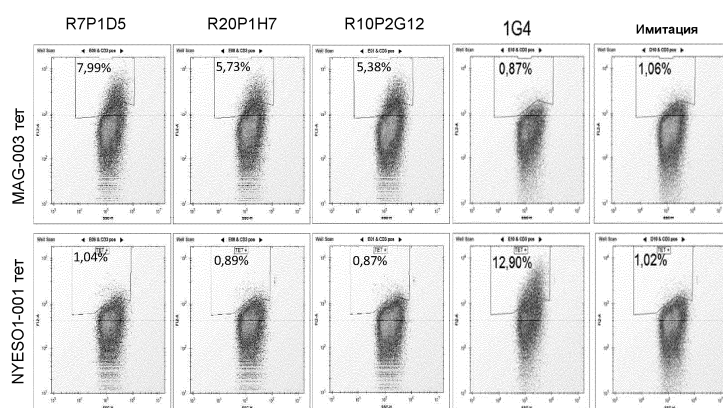
Фиг. 5



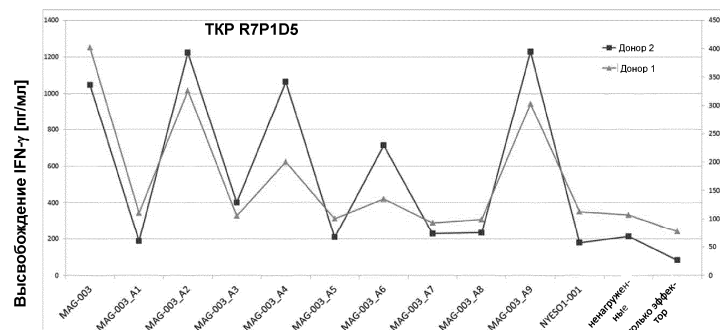
Фиг. 6



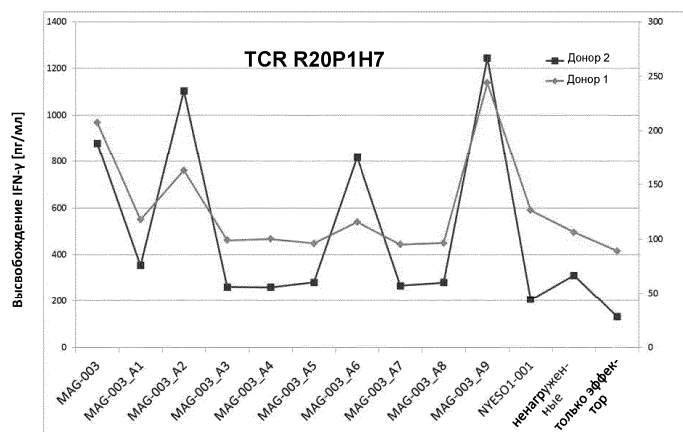
Фиг. 7



Фиг. 8

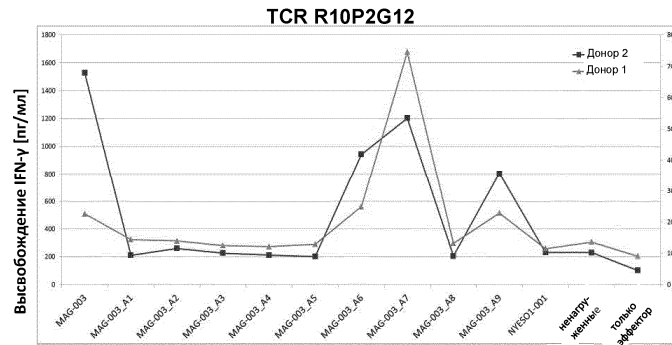


Фиг. 9

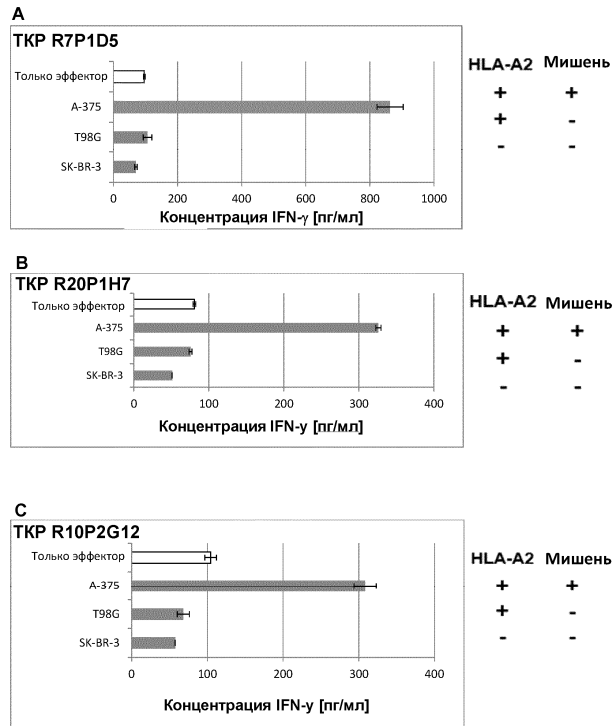


Фиг. 10

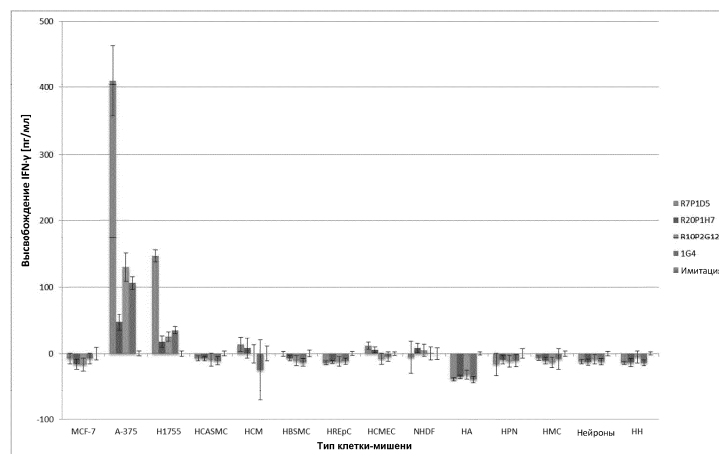
043021



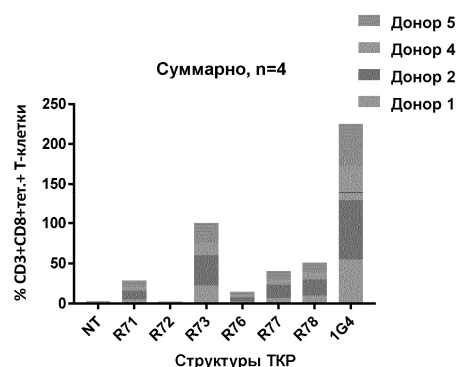
ФИГ. 11



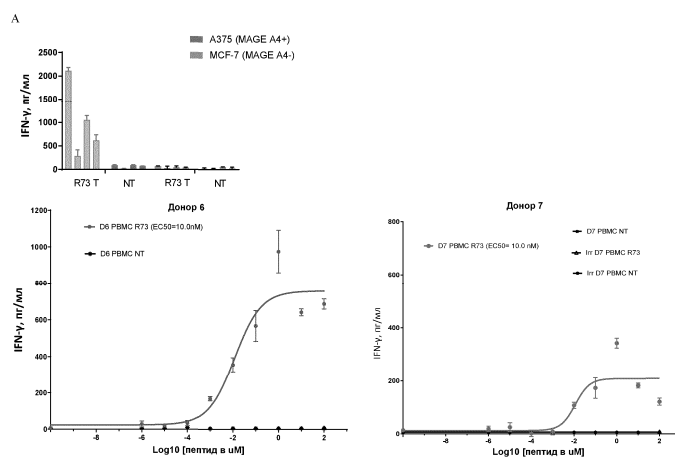
Фиг. 12



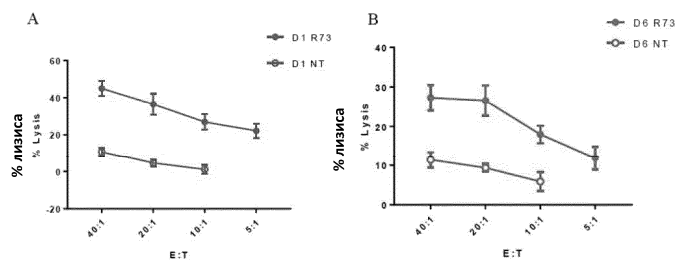
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2