



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2022.11.15

(21) Номер заявки  
201892452

(22) Дата подачи заявки  
2017.06.16

(51) Int. Cl. *C07K 16/30* (2006.01)  
*A61K 35/17* (2015.01)  
*C07K 14/725* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

---

(54) ПРАМЕ-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР И ВАРИАНТЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

---

(31) 93112; 17160260.0

(32) 2016.06.17; 2017.03.10

(33) LU; EP

(43) 2019.04.30

(86) PCT/EP2017/064729

(87) WO 2017/216324 2017.12.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
МЕДИДЖИН ИММУНОТЕРАПИС  
ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:  
Эллингер Кристиан, Венер Карина,  
Вайс Манон, Вильде Сусанне,  
Шендель Долорес (DE)

(74) Представитель:  
Носырева Е.Л. (RU)

(56) WO-A1-2013002086  
EP-A1-2746393  
WO-A2-2009026116  
WO-A2-0152614

VAN LOENEN M.M. ET AL.: "Multi-cistronic vector encoding optimized safety switch for adoptive therapy with T-cell receptor-modified T cells", GENE THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 20, no. 8, 1 August 2013 (2013-08-01), pages 861-867, XP002760144, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/GT.2013.4 [retrieved on 2013-01-31] the whole document

AMIR A.L. ET AL.: "PRAME-specific Allo-HLA-restricted T cells with potent antitumor

reactivity useful for therapeutic T-cell receptor gene transfer", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 17, no. 17, 1 September 2011 (2011-09-01), pages 5615-5625, XP002760143, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1066 [retrieved on 2011-07-19] the whole document

KESSLER J.H. ET AL.: "Efficient identification of novel HLA-A(\*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 193, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 73-88, XP002339970, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.193.1.73, the whole document

MOSQUERA LUIS A. ET AL.: "In vitro and in vivo characterization of a novel antibody-like single-chain TCR human IgG1 fusion protein", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 174, no. 7, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 4381-4388, XP002504087, ISSN: 0022-1767, the whole document

EMMET MCCORMACK ET AL.: "Bi-specific TCR-anti CD3 redirected T-cell targeting of NY-ESO-1- and LAGE-1-positive tumors", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, vol. 62, no. 4, 22 December 2012 (2012-12-22), pages 773-785, XP055187200, ISSN: 0340-7004, DOI: 10.1007/S00262-012-1384-4, the whole document

(57) Изобретение относится к области биотехнологии. В частности, в изобретении предусматривается ПРАМЕ-специфический Т-клеточный рецептор (TCR). Кроме того, в изобретении охватываются кодирующие его полинуклеотиды и вектор, содержащий указанные полинуклеотиды. Также предусматривается клетка-хозяин, содержащая молекулы по изобретению. Кроме того, в изобретении предусматриваются средства и способы диагностики и терапии, в частности, ПРАМЕ-экспрессирующего рака.

### Уровень техники

Т-лимфоциты (или Т-клетки), которые образуют часть клеточно-опосредованной иммунной системы, играют основную роль в уничтожении патогенов. Т-клетки развиваются в тимусе и экспрессируют молекулы Т-клеточных рецепторов на своей поверхности, которые способствуют распознаванию пептидов, презентруемых на молекулах главного комплекса гистосовместимости (МНС), которые экспрессируются на ядросодержащих клетках (презентация антигена). Антигены патогенов, т.е. чужеродные антигены, презентруемые молекулами МНС, будут вызывать выраженный Т-клеточный ответ, в то время как аутоантигены обычно не вызывают Т-клеточный ответ благодаря негативному отбору Т-клеток, специфичных к аутоантигенам, в тимусе во время развития таких Т-клеток. Таким образом, иммунная система может различать ядросодержащие клетки, презентрующие чужеродные антигены и аутоантигены, и специфично нацеливаться на инфицированные клетки и уничтожать их за счет активного высвобождения цитокинов и за счет механизмов клеточной цитотоксичности Т-клеток.

Потенциал иммунной системы был признан в качестве перспективного средства для терапии рака в будущем. В последнее десятилетие были начаты исследования относительно использования уникальных свойств Т-клеток с помощью адаптивного переноса клеток (АСТ), который включает введение полученных от доноров лимфоцитов, экспансированных *ex vivo*. АСТ представляет собой перспективную концепцию лечения рака, поскольку для нее не требуется иммунокомпетентность у пациентов, а специфичность переносимых лимфоцитов может быть направлена против немутировавших и таким образом недостаточно иммуногенных опухолевых антигенов, которые обычно неспособны эффективно запускать аутологичные Т-клеточные ответы. Несмотря на то что АСТ зарекомендовала себя в качестве перспективного лечения различных типов рака, ее широкое применение в качестве клинического лечения было приостановлено необходимостью индивидуального выделения и определения характеристик опухолевых Т-клеток у каждого пациента - процесс, который может быть не только сложным и требующим много времени, но который также зачастую не приводит к получению высокоавидных Т-клеток (Xue et al. *Clin Exp Immunol.* 2005 Feb; 139(2): 167-172; Schmitt et al., *Hum Gene Ther.* 2009 Nov; 20(11): 1240-1248).

Генетический перенос опухолевых антигенспецифических Т-клеточных рецепторов (TCR) в первичные Т-клетки может преодолевать имеющиеся в настоящее время ограничения в АСТ, поскольку он обеспечивает возможность быстрого получения опухолереактивных Т-клеток с определенной специфичностью к антигену даже у пациентов с ослабленным иммунитетом. Однако идентификация подходящих клонов Т-клеток, несущих TCR, которые специфично распознают опухолевые антигены и проявляют необходимые противоопухолевые эффекты *in vivo*, по-прежнему является задачей текущих исследований. Учитывая, что в 2012 г. в мире возникло приблизительно 14,1 млн новых случаев рака и что рак в настоящее время является причиной приблизительно 14,6% всех смертей людей в мире, незамедлительно требуются новые и эффективные варианты лечения. Целью настоящего изобретения является удовлетворение требований, изложенных выше.

### Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены антигенспецифические Т-клеточные рецепторы, а также нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева, содержащие их; и различные варианты их использования и применения.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к PRAME-специфическому Т-клеточному рецептору (TCR), содержащему: (i) вариабельный участок альфа-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, или состоящий из нее, и (ii) вариабельный участок бета-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или состоящий из нее, при этом указанный TCR способен связываться с PRAME-специфическим эпитопом, содержащимся в аминокислотной последовательности VLDGLDVLL (SEQ ID NO: 32) или ее МНС-связанной форме.

В частности, PRAME-специфический TCR, предусмотренный в данном документе, может содержать: (i) альфа-цепь TCR, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 7, 9, 11 или 13, или состоящую из нее, и (ii) бета-цепь TCR, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 8, 10, 12 или 14, или состоящую из нее.

PRAME-специфический TCR по настоящему изобретению может представлять собой TCR-конструкцию. В данном документе предусмотрены гетеродимеры и мультимеры, содержащие альфа- и бета-цепи TCR, ковалентно связанные друг с другом, а также TCR-конструкции, содержащие один или более слитых компонентов. Применимая TCR-конструкция содержит, например, альфа-цепь TCR, бета-цепь TCR (обе ковалентно связанные друг с другом) и антитело или фрагмент антитела, такой как svFv, которые направлены против антигена или эпитопа на поверхности лимфоцитов (например, CD3, CD28, CD5, CD16 или CD56) и слит с цепями TCR посредством линкера.

Другие применимые фрагменты, которые могут быть ковалентно связаны с TCR по настоящему изобретению, содержат различные метки. PRAME-специфический TCR по настоящему изобретению также может быть представлен в растворимой форме.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая PRAME-специфический TCR, представленный в данном документе, при этом указанная нуклеиновая кислота, например, содержит последовательность нуклеиновой кислоты из любой из SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 или состоит из нее.

Кроме того, в данном документе предусмотрен вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением. Иллюстративные векторы включают вирусные векторы, например, лентивирусные или гамма-ретровирусные векторы.

В данном документе также предусмотрена клетка-хозяин, содержащая PRAME-специфический TCR, нуклеиновую кислоту или вектор по настоящему изобретению. Применяемая клетка-хозяин включает лимфоциты, такие как цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), CD8<sup>+</sup> Т-клетки, CD4<sup>+</sup> Т-клетки, естественные киллерные (NK) клетки, естественные киллерные (NKT) Т-клетки, гамма/дельта-Т-клетки.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен способ получения PRAME-специфического TCR по настоящему изобретению.

Также в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая PRAME-специфический TCR и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество(вещества) по настоящему изобретению. Также в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновую кислоту и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество(вещества) по настоящему изобретению. Также в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая клетку-хозяина и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество(вещества) по настоящему изобретению. Также в данном документе предусмотрена диагностическая композиция, содержащая PRAME-специфический TCR и одно или более диагностических средств. Также предусмотрено применение разработанных PRAME-специфического TCR, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции в качестве лекарственного препарата или диагностического средства, и, в частности, для выявления, диагностики, прогнозирования, предупреждения и/или лечения PRAME-экспрессирующего рака. Применимый способ предупреждения или лечения PRAME-экспрессирующего рака предусматривает следующие стадии: (a) обеспечения одного или более из PRAME-специфического TCR, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции, раскрываемых в данном документе, и (b) введения одного или более из вышеупомянутого нуждающемуся в этом субъекту. Настоящее изобретение также охватывает следующее: (a) обеспечение образца от субъекта, при этом указанный образец содержит лимфоциты, (b) обеспечение одного или более из PRAME-специфического TCR, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции, раскрываемых в данном документе, и (c) их введение в лимфоциты, полученные на стадии (a), за счет чего получают модифицированные лимфоциты, (d) введение модифицированных на стадии (c) лимфоцитов нуждающимся в этом субъекту или пациенту.

Настоящее изобретение также относится к способу выявления *in vitro* наличия PRAME-экспрессирующего рака у субъекта *in vitro*, предусматривающему: (a) обеспечение образца от субъекта, при этом указанный образец содержит одну или более клеток, (b) приведение указанного образца в контакт с PRAME-специфическим TCR, нуклеиновой кислотой, вектором или клеткой-хозяином, за счет образуются комплекс, и (c) выявление комплекса, где выявление комплекса свидетельствует о наличии PRAME-экспрессирующего рака у субъекта.

#### Описание графических материалов

На фиг. 1 изображен схематический обзор подхода на основе примирования с использованием зрелых дендритных клеток. PRAME-трансфицированные зрелые дендритные клетки использовали для *de novo* индукции PRAME-специфических CD8 Т-клеток в репертуаре аутологичного здорового донора.

На фиг. 2 изображен мультиплексный анализ секреции нитокинов (IFN-гамма, IL-2, TNF-альфа, IL-5, IL-10, IL-6, IL12p70, IL-4, IL-1-бета) клона PRAME<sub>100-108</sub>-специфических Т-клеток Т4.8-1-29, совместно культивируемых с нагруженными пептидом Т2-клетками (PRAME<sub>100-108</sub> "VLD-пептидом" или PRAME<sub>300-309</sub> "ALY-пептидом" в качестве отрицательного контроля, н.о. = не выявлено). Клон Т4.8-1-29 характеризуется наличием CDR3 в своем варибельном участке альфа-цепи TCR, как показано в SEQ ID NO: 1, и/или наличием CDR3 в своем варибельном участке бета-цепи TCR, как показано в SEQ ID NO: 2.

На фиг. 3 изображено высвобождение IFN-гамма из клона PRAME<sub>100-108</sub>-специфических Т-клеток Т4.8-1-29, совместно культивируемых с различными линиями опухолевых клеток человека, экспрессирующими HLA-A\*02:01, где, как указано в подписи к фиг. 3, некоторые из линий опухолевых клеток экспрессируют PRAME (столбцы зеленого цвета). Линии опухолевых клеток, не экспрессирующих PRAME, служат в качестве отрицательного контроля (столбцы красного цвета). Положительный контроль: Т2-клетки, нагруженные "VLD-пептидом" (столбец черного цвета), фоновый уровень Т-клеток без стимуляции указан с помощью столбцов белого цвета ("н.в. = не выявлено").

На фиг. 4 изображено высвобождение IFN-гамма клоном PRAME<sub>100-108</sub>-специфических Т-клеток Т4.8-1-29, совместно культивируемых с клетками Т2-клетками, нагруженными титруемыми количествами PRAME<sub>100-108</sub>-пептида. Пунктирная линия указывает концентрацию пептида, которая приводит к полумаксимальной секреции IFN-гамма, составляющей 10<sup>-9</sup>-10<sup>-10</sup> моль/л [M] в качестве показателя функциональной avidности исследуемого клона Т-клеток.

Фиг. 5. Для доказательства образования пар и функциональности трансгенного TCR специфическое высвобождение IFN-гамма PRAME<sub>100-108</sub>-специфическими TCR T4.8-1-29-трансфицированными реципиентными CD8<sup>+</sup> Т-клетками (клон реципиентных Т-клеток + T4.8-1-29 ivtPHK) при совместном культивировании с PRAME<sub>100-108</sub> (VLD)-пептид-нагруженными Т2-клетками или Т2-клетками, нагруженными нерелевантным пептидом, измеряли с помощью стандартного ELISA.

На фиг. 6 изображено специфическое высвобождение IFN-гамма из PRAME<sub>100-108</sub>-специфических CD8<sup>+</sup> обогащенных PBMC, сконструированных в целях экспрессии PRAME<sub>100-108</sub>-специфического TCR T4.8-1-29 при совместном культивировании с аутопептид-нагруженными (в общей сложности 131 универсальный аутопептид, связывающийся с кодируемыми HLA-A\*02:01 молекулами) Т2-клетками, измеренное с помощью стандартного ELISA.

На фиг. 7 изображен лизис Т2-клеток, нагруженных PRAME<sub>100-108</sub>-пептидом ("VLD-пептидом") или нерелевантным пептидом SLLQHLIGL ("SLL-пептидом") с помощью CD8<sup>+</sup> обогащенных PBMC, сконструированных для экспрессии PRAME<sub>100-108</sub>-специфического TCR T4.8-1-29.

На фиг. 8 изображен лизис PRAME<sub>100-108</sub>-экспрессирующих целевых клеток с помощью человеческих PBMC, экспрессирующих PRAME<sub>100-108</sub>-специфической TCR T4.8-1-29. (А) Лизис HLA-A\*02:01-трансфицированных эндогенно PRAME-положительных человеческих K562 опухолевых клеток, дополнительно нагруженных PRAME<sub>100-108</sub>-пептидом ("VLD-пептидом"). (В) HLA-A\*02 отрицательные эндогенно PRAME-положительные человеческие K562-клетки, дополнительно трансфицированные ivtPHK, кодирующей PRAME, в качестве отрицательного контроля не лизируются. (С) Изображен лизис HLA-A\*02-трансфицированных эндогенно PRAME-положительных человеческих K562-клеток, дополнительно трансфицированных ivtPHK, кодирующей PRAME. (D) Изображен лизис HEA-A\*02-трансфицированных эндогенно PRAME-положительных человеческих K562-клеток.

На фиг. 9 изображены аминокислотные последовательности из применяемого примера альфа- и бета-цепи Т-клеточного рецептора (SEQ ID NO: 11 и 12) и аминокислотная последовательность человеческого PRAME (SEQ ID NO. 33). В альфа- и бета-цепи последовательности CDR1 и CDR2 подчеркнуты, а последовательности CDR3 выделены серым цветом и жирным шрифтом, вариабельные участки - обычным шрифтом, константные участки - курсивом.

На фиг. 10 изображено распознавание различных HLA-A\*02- и PRAME-положительных линий опухолевых клеток CD8<sup>+</sup> обогащенными PBMC, экспрессирующими TCR T4.8-1-29HLA-A\*02, о чем свидетельствует индуцированное активацией высвобождение IFN-гамма и которое измерено с помощью стандартного ELISA.

На фиг. 11 изображены нетрансдуцированные PBMC здорового донора и те же PBMC здорового донора, трансдуцированные плазмидой, содержащей конструкцию TCT T4.8-1-29, описанную в данном документе.

На фиг. 12 изображена функциональная avidность Т-клеток по отношению к PRAME<sub>100-108</sub> (VLD)-пептиду, измеряемая с помощью выявления секреции IFN-гамма после совместного культивирования либо с клоном Т-клеток T4.8-1-29 (пунктирная кривая), либо с эффекторными PBMC, трансдуцированными T4.8-1-29 (сплошная кривая) с помощью пептид-нагруженных Т2-клеток.

На фиг. 13 изображен анализ специфичности к антигену T4.8-1-29-трансдуцированных эффекторных PBMC и нетрансдуцированных контрольных PBMC. Линии опухолевых клеток OPM-2 и U937 (HLA-A2-отрицательные и PRAME-отрицательные) исследовали либо немодифицированными, либо трансфицированными ivtPHK, кодирующей HLA-A2.

На фиг. 14 изображен анализ специфичности к антигену, T4.8-1-29-трансдуцированные эффекторные PBMC и нетрансдуцированные контрольные PBMC совместно культивировали с различными линиями целевых клеток. Тестировали линии опухолевых клеток K562 (HLA-A2- отрицательные и PRAME-положительные), а также K562\_A2 и Mel 624.38 (HLA-A-положительные и PRAME-положительные) и 647-V (HLA-A2-положительные и PRAME-отрицательные).

На фиг. 15 изображен анализ цитотоксической активности T4.8-1-29-трансдуцированных эффекторов в отношении опухолевых клеток с помощью системы для анализа живых клеток IncuCyte ZOOM® (Essenbiosciences), системы на основе микроскопа, которая позволяет визуализацию живых клеток.

На фиг. 16 изображен анализ профиля безопасности T4.8-1-29-экспрессирующих PBMC.

#### **Подробное описание изобретения**

Авторы настоящего изобретения идентифицировали клоны Т-клеток, которые способны специфически распознавать клетки, экспрессирующие опухолеассоциированный антиген (ТАА) PRAME; и которые характеризуются преимущественными эффекторными функциями, такими как продуцирование цитокинов и цитолиз целевых клеток. Таким образом, указанные клоны Т-клеток и их Т-клеточные рецепторы являются перспективными средствами для высокоспецифичного и эффективного лечения рака. Таким образом, идентифицированные PRAME-специфические TCR являются подходящими для адаптивной Т-клеточной терапии рака. Таким образом, идентификация TCR, который способен связываться с PRAME высокоспецифичным образом, обеспечивает возможность "вооружения" Т-клеток ex vivo и вторное их введение донору, где они могут эффективно распознавать и специфически элиминировать PRAME-экспрессирующие раковые клетки. Кроме того, антигенсвязывающие участки нового TCR, пре-

дусмотренные в данном документе, могут быть использованы для разработки растворимых конструкций, содержащих дополнительные функциональные фрагменты (такие как, лекарственные средства, метки или дополнительные связывающие домены, притягивающие другие иммунные клетки), которые легко доступны для прямого введения.

Вариабельный участок CDR3-домены.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к Т-клеточному рецептору (TCR), содержащему: (i) CDR3 альфа-цепи Т-клеточного рецептора, содержащий последовательность CAVHSTAQAGTALIF (SEQ ID NO: 1) или состоящий из нее, и/или (ii) CDR3 бета-цепи Т-клеточного рецептора, содержащий аминокислотную последовательность CASSTHRGQTNYGYTF (SEQ ID NO. 2), или состоящий из нее.

В данном документе дополнительно предусмотрены варианты последовательности TCR, содержащие альфа-цепь CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 1, или состоящую из нее, и/или бета-цепь CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 2, или состоящую из нее, при условии, что TCR сохраняет предпочтительные способности TCR, оцениваемые в прилагаемых примерах, т.е. способен связываться с антигенной мишенью, определенной в данном документе.

Термин "Т-клеточный рецептор" или "TCR", используемый в данном документе, включает нативные TCR, а также варианты, фрагменты и конструкции TCR. Таким образом, данный термин включает гетеродимеры, содержащие альфа- и бета-цепи TCR, а также мультимеры и одноцепочечные конструкции, необязательно содержащие дополнительные домены и/или фрагменты.

В своей нативной форме TCR существует в виде комплекса из нескольких белков на поверхности Т-клеток. Т-клеточный рецептор состоит из двух (отдельных) белковых цепей, которые продуцируются в результате функционирования генов альфа- и бета-цепей Т-клеточного рецептора (TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ ) и называются альфа-( $\alpha$ -) и бета-( $\beta$ -)цепями. Каждая цепь TCR имеет один N-концевой иммуноглобулин-подобный (Ig)-вариабельный (V) домен/участок, один подобный Ig-подобный-константный (C) домен/участок, трансмембранный/клеточномембранный-перекрывающий участок, закорячивающий цепь в плазматической мембране, и короткий цитоплазматический хвост на С-конце.

Специфичность к антигену придается вариабельными участками альфа- и бета-цепи. Оба вариабельных домена альфа-цепи и бета-цепи TCR содержат три гипервариабельных или определяющих комплементарность участка (CDR1-альфа/бета, CD2-альфа/бета и CDR3-альфа/бета), окруженные каркасными (FR) участками. CDR3 представляет собой примированную детерминанту распознавания антигена и специфичности к нему (т.е. способность распознавать и взаимодействовать со специфическим антигеном), в то время как CDR1 и CDR2 главным образом взаимодействуют с молекулой МНС, презентующей антигенный пептид.

Нативные TCR распознают антигенные пептиды, связанные ("презентированные/отображающиеся на") с молекулами (молекулами/молекулах) главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности антигенпрезентирующей клетки. Антигенный пептид, презентированный на молекуле МНС, также обозначается в данном документе как "пептид:комплекс МНС". Существует два различных класса молекул МНС: МНС I и МНС II, которые презентуют пептиды из различных клеточных компартментов. Молекулы МНС I класса экспрессируются на поверхности всех ядросодержащих клеток во всем организме человека и отображают пептидные или белковые фрагменты из внутриклеточных компартментов цитотоксическим Т-клеткам. У человека МНС также называется человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA). Существует три основных типа МНС I класса: HLA-A, HLA-B и HLA-C. При связывании TCR со своим специфическим пептидом комплексом МНС Т-клетка активируется и проявляет биологические эффекторные функции.

TCR, предусмотренные в данном документе, предпочтительно способны (специфично) распознавать PRAME, в частности PRAME<sub>100-108</sub>, в своей МНС-связанной форме, как будет подробно рассмотрено ниже. Считается, что антигенный пептид присутствует в своей "МНС-связанной форме", если он образует комплекс с молекулой МНС (которая может присутствовать на поверхности антигенпрезентирующей клетки, такой как дендритная клетка или опухолевая клетка, или он может быть иммобилизован, например, путем нанесения с осаждением на гранулу или планшет).

CDR1- и CDR2-домены.

Как изложено ранее, TCR по настоящему изобретению особенно предусмотрены для распознавания их антигенной мишени PRAME<sub>100-108</sub> при презентации на молекуле МНС, в частности молекуле МНС-I, и, в частности, HLA-A, предпочтительно HLA-A\*02, и, в частности, молекулах HLA-A2, кодируемых аллелем HLA-A\*02:01 (считается, что Т-клетка или TCR "ограничены" определенной молекулой МНС). Не исключена вероятность того, что TCR по настоящему изобретению распознают свою антигенную мишень, презентированную другими аллелями HLA-A\*02. Как отмечено ранее, считается, что CDR1 и

CDR2 альфа- и бета-цепей TCR главным образом вовлечены в распознавание МНС. Существует ограниченный "пул" последовательностей CDR1 и CDR2, которые, как известно, вовлечены в распознавание HLA-A\*02-ограниченного антигена, и предполагается, что CDR3-домены по настоящему изобретению могут в принципе сочетаться с любым из CDR1- и CDR2-доменов, представленных в SEQ ID NO: 34-224, при условии, что TCR сохраняет свою способность распознавать свою антигенную мишень, предпочтительно в его HLA-A\*02-связанной форме, в аналогичной, такой же самой или даже более высокой степени, что и TCR, оцениваемую в прилагаемых примерах. Применимые примеры CDR1- и CDR2-доменов включают CDR1-альфа, содержащий последовательность VSGLRG, представленную в SEQ ID NO: 5, или состоящий из нее, CDR2-альфа, содержащий последовательность LYSAGEE, представленную в SEQ ID NO: 3, или состоящий из нее, CDR1-бета, содержащий последовательность SGDLS, представленную в SEQ ID NO: 6, или состоящий из нее, и CDR2-бета, содержащий последовательность YYNGEE, представленную в SEQ ID NO: 4, или состоящий из нее. Указанные последовательности CDR также показаны на фиг. 9.

В соответствии с вышеизложенным в настоящем изобретении, в частности, предусмотрены TCR, содержащие две полипептидные цепи, каждая из которых содержит человеческий вариабельный участок, содержащий по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (т.е., в частности, CDR3, и предпочтительно CDR1, и/или CDR2) TCR. TCR с определенными предпочтительными свойствами (показанными в прилагаемых примерах) содержит первую полипептидную цепь, содержащую CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (CDR 1-альфа), или состоящий из нее, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (CDR2-альфа), или состоящий из нее, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (CDR3-альфа), или состоящий из нее, и вторую полипептидную цепь, содержащую CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (CDR1-бета), или состоящий из нее, CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (CDR2-бета), или состоящий из нее, и CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (CDR3-бета), или состоящий из нее.

Полные вариабельные участки.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен TCR, содержащий вариабельный участок альфа-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, или состоящий из нее, и/или вариабельный участок бета-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или состоящий из нее. Указанные последовательности альфа- и бета-цепи также показаны на фиг. 9 (обычный шрифт).

Варианты последовательности TCR, содержащие вариабельные участки альфа-цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 15, и/или вариабельный участок бета-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 16, или состоящий из нее, также предусмотрены в данной документе, при условии, что TCR сохраняет предпочтительные способности TCR, оцениваемые в прилагаемых примерах, т.е. способен связываться с антигенной мишенью, определенной в данном документе.

Константный участок.

TCR может дополнительно содержать константный (C) участок в своей альфа- и/или бета-цепи. Константный участок может представлять собой человеческий константный участок или происходить от других видов, образуя "химерный" TCR. Например, человеческие альфа- и/или бета-цепи могут быть замещены своими мышинными аналогами ("муринизация"), что, как было выявлено, усиливает поверхностную экспрессию человеческих TCR путем поддерживающего предпочтительного образования пар альфа- и бета-цепей TCR и более стабильной ассоциации с CD3 корецептором. Подходящие константные участки альфа-цепи, например, могут быть выбраны из SEQ ID NO: 17 (человеческой), 19 (минимально муринизированной) и 21 (мышинной). Подходящие константные участки бета-цепи могут быть выбраны из SEQ ID NO: 18 (человеческой), 20 (минимально муринизированной) и 22 (мышинной). Вместо замены полных человеческих участков их мышинными аналогами, также можно заменять лишь некоторые аминокислоты в человеческих константных участках на соответствующие аминокислоты мышинного константного участка ("минимальная муринизация"), как дополнительно поясняется в разделе "Варианты последовательности TCR" в данном документе.

Альфа- и бета-цепи.

Применимые примеры TCR по настоящему изобретению включают такие, которые содержат альфа-цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, 9, 11 или 13, или состоящую из нее, и бета-цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, 10, 12 или 14, или состоящую из нее. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрен, в частности, TCR, содержащий альфа-цепь, или состоящий из нее, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или состоящую из нее, и бета-цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или состоящую из нее,

TCR, содержащий альфа-цепь, или состоящий из нее, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или состоящую из нее, и бета-цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, или состоящую из нее, TCR, содержащий альфа-цепь, или состоящий из нее, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, или состоящую из нее, и бета-цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или состоящую из нее (обе также показаны на фиг. 9); и TCR, содержащий альфа-цепь, или состоящий из нее, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, или состоящую из нее, и бета-цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или состоящую из нее.

Варианты последовательности TCR, содержащие альфа-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 7, 9, 11 или 13, или состоящую из нее, и/или бета-цепь TCR, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 8, 10, 12 или 14, или состоящую из нее, также предусмотрены в данной документе, при условии, что TCR сохраняет предпочтительные способности TCR, оцениваемые в прилагаемых примерах, т.е. способен связываться с антигенной мишенью, определенной в данном документе.

Антигенная мишень.

TCR, предусмотренные в данном документе, предпочтительно способны связываться с (человеческим) PRAME. PRAME (антиген меланомы, предпочтительно экспрессируемый в опухолях, номер доступа в Uniprot P78395), также обозначаемый как MAPE (антиген меланомы, предпочтительно экспрессируемый в опухолях) и OIP4 (OPA-взаимодействующий белок 4), был описан в качестве раково-тестискулярного антигена (СТА) с неизвестной функцией.

В частности, в настоящем изобретении предусмотрены TCR, которые способны (специфично) связываться с эпитопом, содержащимся в аминокислотной последовательности, соответствующей положению аминокислот 100-108 аминокислотной последовательности PRAME, представленной в SEQ ID NO: 33 (фиг. 9) жирным шрифтом. Пептид PRAME, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 32, также обозначается в данном документе как PRAME<sub>100-108</sub> или "антигенная мишень" или "VLD-пептид". Как изложено в других разделах данного документа, TCR по настоящему изобретению будет предпочтительно распознавать PRAME<sub>100-108</sub> при связывании MHC, в частности HLA-A\*02.

Термин "положение" при использовании в соответствии с настоящим изобретением означает либо положение аминокислоты в аминокислотной последовательности, описанной в данном документе, либо положение нуклеотида в последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Термин "соответствующий", используемый в данном документе, также включает то, что положение не только определяется количеством предшествующих нуклеотидов/аминокислот, а скорее рассматривается в контексте прилегающей части последовательности. Соответственно положение определенной аминокислоты или нуклеотида в соответствии с настоящим раскрытием, может варьироваться за счет делеции или добавления аминокислот или нуклеотидов в других участках в последовательности. Таким образом, когда положение обозначается как "соответствующее положение" в соответствии с настоящим раскрытием, следует понимать, что нуклеотиды/аминокислоты могут отличаться с точки зрения обозначенного номера, но могут все еще иметь аналогичные соседние нуклеотиды/аминокислоты. Чтобы определить, соответствует ли аминокислотный остаток (или нуклеотид) в определенной последовательности определенному положению в аминокислотной последовательности "родительской" аминокислотной/нуклеотидной последовательности, специалист в данной области может использовать средства и способы, хорошо известные в данной области, например, выравнивание последовательности, либо вручную, либо с помощью компьютерных программ, таких как приведенных в качестве примера в данном документе.

Термин "эпитоп" в целом относится к сайту в антигене, как правило, к (поли)пептиду, который распознает связывающий домен. Термин "связывающий домен" в своем наиболее широком смысле относится к "антигенсвязывающему участку", т.е. характеризует домен молекулы, которая связывает специфичный эпитоп/взаимодействует с ним в антигенной мишени. Антигенная мишень может содержать один эпитоп, однако, как правило, содержит по меньшей мере два эпитопа и может включать любое количество эпитопов в зависимости от размера, конформации и типа антигена. Термин "эпитоп" в целом охватывает линейные эпитопы и конформационные эпитопы. Линейные эпитопы представляют собой смежные эпитопы, содержащиеся в аминокислотной первичной последовательности и, как правило, включают по меньшей мере 2 аминокислоты или больше. Конформационные эпитопы образуются несмежными аминокислотами, соединенными за счет фолдинга целевого антигена, и, в частности, определенного целевого (поли)пептида.

В контексте настоящего изобретения термин "связывающий домен", в частности, относится к варибельному участку альфа- и/или бета-цепи TCR и, в частности, CDR3-альфа и CDR3-бета TCR.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что минимальная аминокислотная последовательность, распознаваемая TCR по настоящему изобретению, соответствует аминокислотной последовательности X1LX2GLDX3LL (SEQ ID NO: 31), при этом X выбрано из любой аминокислоты. В частности, было показано, что TCR по настоящему изобретению (специфично) распознают аминокислотную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность VLDGLDVLL (SEQ ID NO: 32), или состоящую из нее, показанную в прилагаемых примерах. Таким образом, TCR по настоящему изобретению способны связываться с аминокислотной последовательностью, содержащей аминокислотную последовательность X1LX2GLDX3LL (SEQ ID NO: 31), или состоящую из нее, предпочтительно содержащую аминокислотную последовательность VLDGLDVLL (SEQ ID NO: 32) или ее MHC-связанную форму, или состоящую из нее. Например, предусмотрено, что распознаваемый пептид может содержать дополнительные С-аминокислоты, расположенные на С- и/или N-конце мотива распознавания, представленного в SEQ ID NO: 31, и, в частности, SEQ ID NO: 32. В частности, TCR, описанный в данном документе, предусмотрен для распознавания по меньшей мере одного эпитопа в вышеупомянутых аминокислотных последовательностях. Термины "связывающийся с" и "распознающий" во всех грамматических формах используются в данном документе взаимозаменяемо. Предусмотрено, что антигенная мишень, в частности, подлечит распознаванию TCR по настоящему изобретению при связывании молекулой MHC I класса, в частности молекулой HLA-A, и предпочтительно молекулой HLA-A\*02, в частности молекулой HLA-A\*02:01. Указанная молекула MHC, в частности молекулы HLA-A и HLA-A\*02, может присутствовать на поверхности клетки, например опухолевой клетки, или на (твердом) носителе.

Предпочтительно TCR по настоящему изобретению специфично связываются со своей антигенной мишенью. Термин "специфическое(специфично) связывание(связывающийся)", как правило, указывает на то, что TCR связывается с помощью своего антигенсвязывающего участка более легко со своей предполагаемой антигенной мишенью, чем со случайным неродственным нецелевым антигеном. В частности, термин "специфически связывается" указывает на то, что специфичность связывания TCR будет по меньшей мере приблизительно в 5 раз, предпочтительно в 10 раз, более предпочтительно в 25 раз, еще более предпочтительно в 50 раз и наиболее предпочтительно в 100 раз больше со своей антигенной мишенью, чем его связывание с нецелевым антигеном.

Эффекторные клетки-хозяева, экспрессирующие нативный TCR, описанный в данном документе, предусмотрены для связывания своей антигенной мишени (т.е. предпочтительно PRAME<sub>100-108</sub>, презентируемого HLA-A\*02 с помощью антигенпрезентирующих клеток) с высокой функциональной авидностью. Термин "функциональная авидность" относится к способности TCR-экспрессирующих клеток (в частности, Т-клеток, экспрессирующих нативные TCR, описанные в данном документе) отвечать *in vitro* на определенную концентрацию лиганда и, как считается, коррелировать с эффекторной способностью TCR-экспрессирующих клеток *in vivo*. По определению TCR-экспрессирующие клетки с высокой функциональной авидностью отвечают в исследованиях *in vitro* на очень низкие дозы антигена, в то время как такие клетки с более низкой функциональной авидностью требуют более высоких количеств антигена перед тем, как они вызывают иммунный ответ, аналогичный такому TCR-экспрессирующих клеток с высокой авидностью. Таким образом, функциональная авидность может рассматриваться в качестве количественной детерминанты порога активации TCR-экспрессирующей клетки. Это определено в результате воздействия на такие клетки *in vitro* различных количеств когнатного антигена. TCR-экспрессирующие клетки с высокой функциональной авидностью отвечают на низкие дозы антигена. Например, будет считаться, что в типичных случаях TCR-экспрессирующая клетка связывается с "высокой" функциональной авидностью со своей антигенной мишенью, если она секретирует по меньшей мере приблизительно 200 пг/мл или больше (например, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 5000, 7000, 10000 или 20000 пг/мл или больше) интерферона гамма (IFN-гамма) при совместном культивировании с антиген-отрицательными HLA-A\*02-экспрессирующими целевыми клетками, нагруженными PRAME<sub>100-108</sub> пептидом в низкой концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно  $10^{-5}$  до приблизительно  $10^{-11}$  М (т.е. от приблизительно 0,05 до приблизительно 5 нг/мл, 0,05, 0,1, 0,5, 1 или 5 нг/мл), при этом молекулярная масса PRAME<sub>100-108</sub> пептида составляет 956 г/моль.

Другие способы определения специфического связывания TCR по настоящему изобретению включают в себя анализа высвобождения <sup>51</sup>Cr, описанный Gertner-Dardenne et al. J Immunol 188(9): 4701-4708, мобилизацию CD107a/b, описанную Leisegang et al., Clin. Cancer Res 2010. 16. 2333-2343 и анализы связывания пептида:мультимера MHC, описанные Wilde et al., J Immunol 2012; 189:598-605.

#### Варианты.

Как отмечено ранее, термин "TCR" охватывает варианты TCR, которые включают варианты последовательности, фрагменты TCR и TCR-конструкции. Предусмотрено, что все варианты TCR являются функциональными вариантами TCR по настоящему изобретению. Термин "функциональный вариант", используемый в данном документе, относится к TCR, полипептиду или белку, имеющему существенную или значительную идентичность или сходство последовательности с родительским TCR, его вариативными участками или его антигенсвязывающими участками, и сохраняющему его биологическую активность, т.е. его способность специфично связываться с антигенной мишенью, к которому родительский TCR по настоящему изобретению имеет антигенную специфичность, в аналогичной, той же самой или



даже большей степени, как и TCR, раскрываемый в данном документе, и оцениваемую в прилагаемых примерах.

Варианты последовательности.

Термин "варианты TCR" включает "варианты последовательности" TCR, раскрываемых в данном документе, т.е. варианты, которые фактически содержат аминокислотную последовательность TCR по настоящему изобретению, описанного выше (также обозначаемую как "родительский" TCR), но содержащие по меньшей мере одну аминокислотную модификацию (т.е. замену, делению или вставку) по сравнению с аминокислотной последовательностью "родительского" TCR, при условии, что вариант предпочтительно сохраняет антигенную специфичность "родительского" TCR по настоящему изобретению. Варианты последовательности TCR по настоящему изобретению, как правило, получают с помощью осуществления соответствующих нуклеотидных изменений в нуклеиновых кислотах, кодирующих "родительский" TCR, или с помощью пептидного синтеза. Как правило, вышеупомянутые аминокислотные модификации могут быть введены в варибельный участок или константный участок TCR или могут присутствовать в таких, и могут служить для модуляции свойств, например, силы и специфичности связывания, посттрансляционного процессинга (например, гликозилирования), термодинамической стабильности, растворимости, поверхностной экспрессии или сборки TCR.

Как изложено ранее, аминокислотные модификации включают, например, делеции остатков, и/или вставки в остатки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях родительского TCR. Иллюстративные варианты TCR со вставками по настоящему изобретению включают слитые продукты указанного TCR, а также фермент или другой функциональный полипептид. Иллюстративные TCR с заменами по настоящему изобретению представляют собой такие, которые включают аминокислотные замены в варибельных участках или CDR альфа- и/или бета-цепи, каркасном участке или константном участке. В частности, в данном документе предусмотрены консервативные аминокислотные замены. Консервативные аминокислотные замены известны в данной области и включают аминокислотные замены, в которых одна аминокислота, имеющая определенные физические и/или химические свойства, заменена на другую аминокислоту, которая имеет те же самые химические или физические свойства. Например, консервативная аминокислотная замена может быть в аминокислоте, замещенной на другую аминокислоту (например, Asp или Glu), аминокислоте с неполярной боковой цепью, замещенной на другую аминокислоту с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val и пр.), основной аминокислоте, замещенной на другую основную аминокислоту (Lys, Arg и пр.), аминокислоте с полярной боковой цепью, замещенной на другую аминокислоту с полярной боковой цепью (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr и пр.) и др., что может быть выполнено, например, на основании сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы включенных остатков.

Модификация цистеина.

Было описано, что добавление дисульфидной связи в константном участке способствует надлежащему образованию пар альфа- и бета-цепей TCR (Kuball J. et al. Blood. 2007 Mar 15; 109(6):2331-8.). Таким образом, добавление одной или более цистеиновых связей в константном участке также предусмотрено в данном документе.

Муринизация.

Как отмечено ранее, муринизация TCR (т.е. замена человеческих константных участков в альфа- и бета-цепях их мышинными аналогами) представляет собой методику, которая широко используется в целях повышения экспрессии TCR клеточной поверхностью в клетках-хозяевах. Не ограничиваясь определенной теорией, считается, что муринизированные TCR ассоциируются более эффективно с CD3-корцепторами; и/или, что предпочтительно, образуют пары друг с другом и менее подвержены образованию смешанных TCR на человеческих Т-клетках, сконструированных *ex vivo*, для экспрессии TCR с необходимой антигенной специфичностью, однако все еще сохраняющих и экспрессирующих свои "оригинальные" TCR.

Недавно были идентифицированы девять аминокислот, ответственных за повышенную экспрессию муринизированных TCR (Sommermeier and Uckert, J Immunol. 2010 Jan 1; 184(11):6223-31), и предусмотрена замена одного или всех аминокислотных остатков в константном участке альфа- и/или бета-цепи TCR на их мышинные остатки-аналоги. Эта методика также называется как "минимальная муринизация" и обеспечивает преимущество, связанное с усилением экспрессии на клеточной поверхности, при этом одновременно снижается количество "чужеродных" аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности и тем самым риск проявления иммуногенности.

Как правило, предусмотрены варианты последовательности TCR, которые содержат по меньшей мере одно из CDR1, CDR2, CDR3, варибельных участков альфа-цепи, варибельных участков бета-цепи, альфа-цепи и/или бета-цепи, раскрываемых в данном документе, или содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80, приблизительно на 85, приблизительно на 90, приблизительно на 95, приблизительно на 96, приблизительно на 97, приблизительно на 98, приблизительно на 99% идентична аминокислотным последовательностям, раскрываемым в данном документе, при условии, что указанные варианты характеризуются сопоставимыми, такими же самыми или

улучшенными характеристиками связывания по сравнению с TCR, оцениваемыми в прилагаемых примерах.

Используемый в данном документе термин "идентичность последовательности" указывает на степень, в которой две (нуклеотидные или аминокислотные) последовательности имеют идентичные остатки в тех же самых положениях при выравнивании, и часто выражается в виде процента. Предпочтительно идентичность определяют по всей длине последовательностей, подлежащих сравнению. Таким образом, две копии точно такой же последовательности характеризуются 100% идентичностью, но последовательности, которые в меньшей степени высоко консервативны и имеют делеции, добавления или замещения, могут характеризоваться меньшей степенью идентичности. Специалистам в данной области будет понятно, что для определения идентичности последовательностей с использованием стандартных параметров доступны несколько алгоритмов, например, Blast (Altschul, et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402), Blast2 (Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410), Смита-Уотермана (Smith, et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 147:195-197) и ClustalW.

Соответственно, например, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 или 2 могут служить в качестве "последовательности для сравнения" или "эталонной последовательности", в то время как аминокислотная последовательность CDR3, отличная от них, может служить в качестве "искомой последовательности".

Конструкции и фрагменты.

Термин "TCR", используемый в данном документе, дополнительно подразумевает TCR-конструкции. Термин "конструкция" включает белки или полипептиды, содержащие по меньшей мере один антигенсвязывающий домен TCR по настоящему изобретению, однако они не обязательно имеют общую структуру с нативным TCR (т.е. вариабельными доменами, включенными в альфа-цепь TCR и бета-цепь TCR, образующими гетеродимер). Конструкции и фрагменты TCR получают, как правило, с помощью стандартных способов генной инженерии, и их часто конструируют искусственно для того, чтобы они содержали дополнительные функциональные белковые или полипептидные домены. В соответствии с вышеизложенным предусмотрены конструкции и фрагменты TCR по настоящему изобретению, содержащие по меньшей мере один CDR3-альфа и/или по меньшей мере один CDR3-бета, описанные в других разделах данного документа. В данном документе предусмотрены дополнительные конструкции и фрагменты, содержащие по меньшей мере один CDR1-альфа, CDR2-альфа, CDR1-бета, CDR2-бета, вариабельный участок альфа-цепи, вариабельный участок бета-цепи, альфа-цепь и/или бета-цепь или их комбинации, необязательно в сочетании с дополнительными белковыми доменами или фрагментами, приведенными в качестве примеров в данном документе. Предусмотрено, что конструкции и фрагменты TCR, предусмотренные в данном документе, способны специфично связываться с той же самой антигенной мишенью, что и TCR по настоящему изобретению, описанные выше и оцениваемые в прилагаемых примерах.

Мультимеры.

Термин "TCR-конструкция" охватывает гетеродимеры и мультимеры, в которых по меньшей мере один вариабельный участок альфа-цепи TCR или альфа-цепь TCR и по меньшей мере один вариабельный участок бета-цепи TCR ковалентно связаны друг с другом. В наиболее простой форме мультивалентная конструкция TCR в соответствии с настоящим изобретением содержит мультимер из двух, или трех, или четырех или больше TCR, ассоциированных (например, ковалентно или иным образом связанных) друг с другом, предпочтительно с помощью линкерной молекулы.

Подходящие линкерные молекулы включают без ограничения мультивалентные соединяющие молекулы, такие как авидин, стрептавидин, нейтравидин и экстравидин, каждая из которых имеет четыре связывающих сайта для биотина. Таким образом, биотинилированные TCR могут быть превращены в мультимеры, имеющие множество TCR-связывающих участков. Количество TCR в мультимере будет зависеть от количества TCR по отношению к количеству линкерных молекул, используемых для получения мультимеров, и также от присутствия или отсутствия любых других биотинилированных молекул. Иллюстративные мультимеры представляют собой димерные, тримерные, тетрамерные или пентамерные TCR-конструкции или такие конструкции более высокого порядка. Мультимеры по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные функциональные фрагменты, такие как метки, или лекарственные средства, или (твердые) носители.

Термин "конструкция на основе TCR" также охватывает молекулы TCR, которые связаны с помощью подходящего линкера со сферическим объектом, предпочтительно однородной гранулой, более предпочтительно полистирольной гранулой, наиболее предпочтительно биосовместимой полистирольной гранулой. Такие конструкции на основе TCR также могут содержать TCR по настоящему изобретению и гранулу, имеющую предварительно определенный флуоресцентный краситель, включенный в гранулу.

Слитые белки.

Термин "TCR-конструкция" также относится к слитым белкам или полипептидам, содержащим по меньшей мере одну альфа-цепь TCR, вариабельный участок альфа-цепи TCR или CDR3-альфа и/или по меньшей мере одну бета-цепь TCR, вариабельный участок бета-цепи TCR или CDR3-бета; и дополни-

тельно один или более слитых компонентов. Применимые компоненты включают Fc-рецепторы; Fc-домены (происходящие из IgA, IgD, IgG, IgE и IgM); цитокины (такие как IL-2 или IL-15); токсины; антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (такие как антитела к CD3, антитела к CD28, антитела к CD5, антитела к CD16 или антитела к CD56 или их антигенсвязывающие фрагменты); CD247 (CD3-дзета), CD28-, CD137-, CD134-домены; или любые их комбинации.

Иллюстративные фрагменты антител, которые можно использовать в качестве слитых компонентов, включают фрагменты или полноразмерные антитела, такие как (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или "r IgG" ("полуантитело"); модифицированные фрагменты антител, такие как scFv, di-scFv или bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-молния, scFab, Fab2, Fab3, диатела, одноцепочечные диатела, тандемные диатела (Tandab), тандемные di-scFv, тандемные tri-scFv, минитела, мультитела, такие как триатела или тетратела, и одно доменные антитела, такие как нанотела или антитела с одним варибельным доменом, содержащие только один варибельный домен, который может представлять собой V<sub>H</sub>H, V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>.

TCR-конструкции по настоящему изобретению могут быть слиты с одним или более антителами или фрагментами антитела, что приводит к образованию моновалентных, бивалентных и поливалентных/мультивалентных конструкций и таким образом моноспецифических конструкций, специфично связывающихся только с одним целевым антигеном, а также биспецифических и полиспецифических/мультиспецифических конструкций, которые специфически связываются более чем с одним целевым антигеном, например, двумя, тремя или больше, с помощью различающихся антигенсвязывающих участков.

Необязательно линкер может быть введен между одним или более из доменов или участков TCR-конструкции по настоящему изобретению, т.е. между CDR3 альфа-цепи TCR, варибельным участком альфа-цепи TCR и/или альфа-цепью TCR, CDR3 бета-цепи TCR, варибельным участком бета-цепи TCR и/или бета-цепью TCR, и/или одним или более слитыми компонентами, описанными в данном документе. Линкеры известны в данной области и были описаны в обзоре, в частности, в Chen et al. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Oct 15; 65(10): 1357-1369. Как правило, линкеры включают подвижные, расщепляемые и жесткие линкеры и могут быть выбраны в зависимости от типа конструкции и предполагаемого использования/применения. Например, для терапевтического применения неиммуногенные подвижные линкеры часто являются предпочтительными с тем, чтобы обеспечить определенную степень гибкости или взаимодействия между доменами, при этом снижается риск побочных иммуногенных реакций. Такие линкеры, как правило, состоят из небольших неполярных (например, Gly) или полярных (например, Ser или Thr) аминокислот и включают в себя "GS"-линкеры, состоящие из участков Gly- и Ser-остатков. В примере наиболее широко используемого гибкого линкера, который, как предусмотрено, также используется для применения в TCR-конструкции по настоящему изобретению, имеется последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 225). Другие подходящие линкеры включают в себя, например, KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 226) и EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 227) и GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 228).

Особенно применимыми TCR-конструкциями, предусмотренными в соответствии с настоящим изобретением, являются такие, которые содержат по меньшей мере одну альфа-цепь TCR, варибельный участок альфа-цепи TCR или CDR3-альфа, определенные в данном документе, по меньшей мере одну бета-цепь TCR, варибельный участок бета-цепи TCR или CDR3-бета, определенные в данном документе, необязательно связанные друг с другом или слитые необязательно с помощью линкера по меньшей мере с одним антителом или фрагментом антитела (таким как, фрагмент одноцепочечного антитела (scFv)), направленными против антигена или эпитопа на поверхности лимфоцитов. Применимые антигенные мишени, распознаваемые антителом или фрагментом антитела (например, scFv), включают CD3, CD28, CD5, CD16 и CD56. Указанная конструкция в целом может иметь любую структуру в тех условиях, когда "участок TCR" (т.е. альфа- и бета-цепь TCR или их CDR3) сохраняет свою способность распознавать антигенную мишень, определенную в данном документе, а "участок антитела" связывается с необходимым поверхностным антигеном или эпитопом, за счет чего осуществляется рекрутинг соответствующего лимфоцита и его нацеливание на клетку-мишень. Такие конструкции могут предпочтительно выступать в качестве "адаптеров", соединяющих вместе антигенпрезентирующую клетку, демонстрирующую антигенную мишень (такую как опухолевая клетка), и лимфоцит (такой как цитотоксическая Т-клетка или NK-клетка). Примером такого слитого белка является конструкция, разработанная в соответствии с принципом привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE®), состоящего из двух одноцепочечных варибельных фрагментов (scFv) различных антител, на одной пептидной цепи, размером приблизительно 55 килодальтон (кД). Соответственно TCR-конструкция по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере один антигенсвязывающий домен TCR, описанный в данном документе (к примеру, варибельный домен альфа-цепи и варибельный домен бета-цепи TCR, слитые друг с другом), связанный с scFv (или другим связывающим доменом) с необходимой специфичностью связывания, например, CD3 или CD56. scFv (или другой связывающий домен) связывается с Т-клетками, например, посредством CD3-рецептора, или с CD56 в случае NK-клеточной активации, а другой с опухолевой клеткой с помощью антигенной мишени, специфично экспрессируемой на опухолевой клетке. Также в данном документе предусмотрены триатела, содержащие по меньшей мере один антигенсвязыва-

вающий домен TCR, описанный в данном документе, scFv (или другой связывающий домен) и дополнительный домен, например, для целенаправленного воздействия конструкции на сайт воздействия в организме (например, Fc-домен).

**Выделенная форма.**

TCR по настоящему изобретению могут быть предусмотрены в "выделенной" или "фактически чистой" форме. Термины "выделенный" или "фактически чистый" при использовании в данном документе означает, что TCR были идентифицированы отделенными от и/или извлеченными из компонента своей среды продуцирования, так что "выделенный" TCR не содержит или фактически не содержит других контаминирующих компонентов из своей среды продуцирования, которые могут нарушить его терапевтическое или диагностическое применение. Контаминирующие компоненты могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Таким образом, "выделенные" TCR будут получены с помощью по меньшей мере одной стадии очистки, удаляющей или фактически удаляющей эти контаминирующие компоненты. Вышеупомянутое определение в равной степени применимо к "выделенным" полинуклеотидам/нуклеиновым кислотам с соответствующими поправками.

**Растворимые формы.**

TCR по настоящему изобретению могут быть предусмотрены в растворимой форме. Растворимые TCR применимы в качестве диагностических средств и носителей или "адаптеров", которые специфически нацеливают терапевтические средства или эффекторные клетки, например, на раковую клетку, экспрессирующую антигенную мишень, распознаваемую растворимым TCR. Растворимые TCR (sTCR), как правило, будут представлять собой фрагменты или конструкции, содержащие альфа- и/или бета-цепи TCR или их переменные участки или CDR, и необязательно стабилизированы с помощью дисульфидных связей или ковалентно связаны с помощью линкерной молекулы, например, описанной выше в контексте TCR-конструкций по настоящему изобретению. Например, в типичном случае они не будут содержать трансмембранный участок. При некоторых обстоятельствах аминокислотные модификации в полипептидной последовательности могут быть введены с целью усиления растворимости молекул, и/или коррекции фолдинга и образования пар альфа- и бета-цепей (при необходимости), в частности, при продуцировании в рекомбинантном хозяине, который не обеспечивает вышеупомянутые характеристики. Например, при использовании *E. coli* в качестве клеток-хозяев для продуцирования, фолдинг и образование пар альфа- и бета-цепей TCR, как правило, осуществляется *in vitro*. Таким образом, TCR в соответствии с настоящим изобретением могут содержать, например, дополнительные цистеиновые остатки, описанные в других разделах в данном документе.

Помимо дополнительных цистеиновых мостиков, другие применимые модификации включают, например, добавление лейциновых змеек и/или последовательностей ухода с рибосомы, например, последовательности 2A из пикорнавируса, описанной в Walseng et al. (2015), PLoS ONE 10(4): e0119559, в целях повышения фолдинга, экспрессии и/или спаривания альфа- и/или бета-цепей TCR.

**Модификации.**

TCR по настоящему изобретению могут дополнительно содержать одну или более модификаций, описанных ниже. Модификации, описанные ниже, как правило, будут представлять собой ковалентные модификации и могут быть выполнены с помощью стандартных методик, известных в данной области. При некоторых обстоятельствах аминокислотные модификации в TCR могут потребоваться с целью облегчения введения указанных модификаций.

**Метки.**

TCR, в частности (растворимые) TCR по настоящему изобретению, могут быть мечеными. Применимые метки известны в данной области и могут быть связаны с TCR или вариантом TCR с помощью стандартных способов, необязательно с помощью линкеров различной длины. Термин "метка" или "группа для мечения" относится к любой детектируемой метке. Как правило, метки разделяются на несколько классов, в зависимости от анализа, в котором они подлежат выявлению; следующие примеры включают без ограничения изотопные метки, которые могут представлять собой радиоактивные или тяжелые изотопы, такие как радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ); магнитные метки (например, магнитные частицы); редокс-активные фрагменты; оптические красители (в том числе без ограничения хромофоры, фосфоры и флуорофоры), такие как флуоресцентные группы (например, FITC, родамин, соединения лантаноидов с фосфором), хемилюминесцентные группы и флуорофоры, которые могут представлять собой как "низкомолекулярные" флуорофоры, так и белковые флуорофоры; ферментативные группы (например, пероксидазу хрена,  $\beta$ -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу; биотинилированные группы; или предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парными последовательностями с лейциновыми застежками, связывающими сайтами для вторичных антител, металл-связывающими доменами, эпитопными метками и т.д.). В частности, мечение предусмотрено в том случае, когда TCR, варианты TCR или особенно растворимые TCR-конструкции (такие как конструкции, содержащие по меньшей мере одну альфа-цепь TCR и/или бета-цепь TCR, описанные в данном документе), предназначены для диагностического применения.

Функциональные фрагменты.

TCR, в частности растворимые TCR по настоящему изобретению, могут быть модифицированы с помощью присоединения дополнительных функциональных фрагментов, например, для снижения иммуногенности, повышения гидродинамического размера (размера в растворе), растворимости и/или стабильности (например, в результате повышенной защиты к протеолитическому разрушению) и/или увеличения периода полужизни в сыворотке.

Иллюстративные функциональные фрагменты для применения в соответствии с настоящим изобретением включают пептидные или белковые домены, связывающиеся с другими белками в организме человека (такими как сывороточный альбумин, Fc-участок иммуноглобулина или неонатальный Fc-рецептор (FcRn), полипептидные цепи различной длины (например, технология XTEN или ПАСилирование®), небелковые полимеры, в том числе без ограничения различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль (ПЕГиление), полипропиленгликоль, полиоксиалкилены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, или углеводов, таких как гидроксипропиловый крахмал (например, ГЭСилирование®), или полисиаловая кислота (например, технология PolyXen®).

Другие применимые функциональные фрагменты включают "суицидальные" или "предохранительные выключатели", которые могут быть использованы для отключения эффекторных клеток-хозяев, несущих TCR по настоящему изобретению в организме пациента. Примером является "предохранительный выключатель" индуцибельной каспазы 9 (iCasp9), описанный Gargett and Brown *Front Pharmacol.* 2014; 5: 235. Вкратце эффекторные клетки-хозяева модифицируют с помощью хорошо известных способов с целью экспрессии домена каспазы 9, димеризация которого зависит от низкомолекулярного димеризирующего препарата, такого как AP1903/CIP, и приводит к быстрой индукции апоптоза в модифицированных эффекторных клетках. Такая система, например, описана в EP2173869 (A2). Примеры других "суицидальных" и "предохранительных выключателей" известны в данной области, например, тиамидинкиназа простого вируса герпеса (HSV-TK), экспрессия CD20 и последующее истощение с помощью антитела к CD20 или тус-метки (Kieback et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Jan 15; 105(2):623-8).

Гликозилирование.

В данном документе также предусмотрены TCR с измененным паттерном гликозилирования. Как известно в данной области, паттерны гликозилирования могут зависеть от аминокислотной последовательности (например, присутствия или отсутствия определенных аминокислотных остатков, рассматриваемых ниже) и/или клетки-хозяина или организма, в котором белок продуцируется. Гликозилирование полипептидов, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к связыванию углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Добавление N-связанных сайтов гликозилирования к связывающей молекуле легко осуществляется путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более трипептидных последовательностей, выбранных из аспарагин-X-серина и аспарагин-X-треонина (где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина). Сайты O-связанного гликозилирования могут быть введены путем добавления или замены одного или более треониновых остатков в исходной последовательности.

Другим средством гликозилирования TCR является химическое или ферментативное связывание гликозидов к белку. В зависимости от используемого способа связывания, сахар(сахара) может(могут) быть присоединен(присоединены) к: (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как, группы серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина.

Аналогично дегликозилирование (т.е. удаление углеводных фрагментов, присутствующих на связывающей молекуле) можно осуществлять химически, например, в результате воздействия на TCR трифторметансульфоновой кислоты, или ферментативно в результате использования эндо- или экзогликозидаз.

Лекарственные конъюгаты.

К TCR, в частности к растворимым TCR по настоящему изобретению, также можно добавить лекарственное средство, такое как низкомолекулярное соединение. Связывание можно осуществить с помощью ковалентных связей или нековалентных взаимодействий, например, с помощью электростатических сил. Различные линкеры, известные в данной области, могут быть использованы в целях образования лекарственных конъюгатов.

Метки.

TCR, в частности растворимые TCR по настоящему изобретению, могут быть модифицированы с введением дополнительных доменов, которые способствуют идентификации, трекингу, очистке и/или выделению соответствующей молекулы (меток). Неограничивающие примеры таких меток включают пептидные мотивы известные как Мус-метка, НАТ-метка, НА-метка, ТАР-метка, GST-метка, хитин-связывающий домен (CBD-tag), мальтоза-связывающий домен (MBP-tag), Flag-метка, Strep-метка и их варианты (например, Strep II-метка), His-метка, CD20, Her2/neu метки, мус-метка, FLAG-метка, T7-метка, НА(геммаглоитинин)-метка или GFP-метка.

Эпитопные метки являются применимыми примерами меток, которые могут быть включены в TCR по настоящему изобретению. Эпитопные метки представляют собой короткие последовательности аминокислот, которые способствуют связыванию специфического антитела и тем самым обеспечивают идентификацию и трекинг связывания и движения растворимых TCR или клеток-хозяев в организме пациента или культивируемых клетках (хозяевах). Выявление эпитопной метки и, следовательно, меченого TCR может быть достигнуто с помощью ряда различных методик. Примеры таких методик включают иммуногистохимический анализ, иммунопреципитацию, проточную цитометрию, иммунофлуоресцентную микроскопию, ELISA, иммуноблоттинг ("вестерн") и аффинную хроматографию. Эпитопные метки, например, могут иметь длину от 6 до 15 аминокислот, в частности от 9 до 11 аминокислот. Также можно включать более одной эпитопной метки в TCR по настоящему изобретению.

Метки могут быть дополнительно использованы для стимуляции и экспансии клеток-хозяев, несущих TCR по настоящему изобретению, с помощью культивирования клеток в присутствии связывающих молекул (антител), специфических для указанной метки. Нуклеиновая кислота

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, описанные в данном документе. В частности, в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие альфа- или бета-цепи TCR, вариабельные участки альфа- или бета-цепей TCR и CDR3-альфа и CDR3-бета TCR, а также варианты, конструкции и фрагменты TCR по настоящему изобретению.

Термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", используемые в данном документе, включает последовательность полирибонуклеотидов и полидезоксирибонуклеотидов, например, модифицированные или немодифицированные РНК или ДНК, каждую в одонитевой и/или двунитевой форме, линейную или кольцевую, или их смеси, в том числе гибридные молекулы. Таким образом, нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением содержат ДНК (такую как днРНК, онДНК, кДНК), РНК (такую как днРНК, онРНК, мРНК, ivtРНК), их комбинации и их производные (такие как ПНК).

Полинуклеотид может содержать стандартную фосфодиэфирную связь или нестандартную связь (например, амидную связь, такую как встречается в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут также содержать одно или более модифицированных оснований, таких как, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. Другие модификации, в том числе химические, ферментативные или метаболические модификации, также допустимы в том случае, если только связывающая молекула по настоящему изобретению может быть экспрессирована из полинуклеотида. Полинуклеотид может быть обеспечен в выделенной форме, описанной в других разделах данного документа. Полинуклеотид может включать регуляторные последовательности, такие как элементы контроля транскрипции (в том числе промоторы, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции), участок связывания рибосомы, интроны и т.п.

В частности, в настоящем изобретении предусмотрен полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, которая по меньшей мере на приблизительно 80, на приблизительно 85, на приблизительно 90, на приблизительно 91, на приблизительно 92, на приблизительно 93, на приблизительно 94, на приблизительно 95, на приблизительно 96, на приблизительно 97, на приблизительно 98, на приблизительно 99 или на 100% идентична эталонной полинуклеотидной последовательности, или состоящий из нее, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30.

Полинуклеотиды, описанные выше, могут содержать или могут не содержать дополнительные или измененные нуклеотидные последовательности, кодирующие, например, измененные аминокислотные остатки, сигнальный пептид для управления секрецией кодируемого TCR, константных участков или других гетерологичных полипептидов, описанных в данном документе. Таким образом, такие полинуклеотиды могут кодировать слитые полипептиды, фрагменты, варианты и другие производные связывающих молекул, описанных в данном документе.

Кроме того, настоящее изобретение включает композиции, содержащие один или более из полинуклеотидов, описанных выше. В данном документе также предусмотрены композиции, содержащие первый полинуклеотид и второй полинуклеотид, где указанный первый полинуклеотид кодирует вариабельный участок альфа-цепи TCR, описанный в данном документе, и где второй полинуклеотид кодирует вариабельный участок бета-цепи TCR, описанный в данном документе.

Последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут быть кодон-оптимизированными для оптимальной экспрессии в требуемой клетке-хозяине, например, лимфоците человека; или для экспрессии в клетках бактерий, дрожжей или насекомых, которые особенно предпочтительны для экспрессии растворимых TCR по настоящему изобретению. Кодон-оптимизация относится к замене в представляющей интерес последовательности кодонов, которые, как правило, редко встречаются в высокоэкспрессируемых генах определенного вида, на кодоны, которые, как правило, часто встречаются в высокоэкспрессируемых генах таких видов, при этом такие кодоны кодируют те же аминокислоты, что и кодоны, которые заменяются. Таким образом, выбор оптимальных кодонов зависит от использования кодонов генома хозяина и присутствия нескольких желательных и нежелательных мотивов последовательности.

Вектор.

В данном документе дополнительно предусмотрен вектор, содержащий один или более из полинук-

леотидов, описанных в данном документе. "Вектор" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, используемую для переноса (чужеродного) генетического материала в клетку-хозяина, где он может, например, быть реплицирован и/или экспрессирован.

Термин "вектор" охватывает без ограничения плазмиды, вирусные векторы (в том числе ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, векторы на основе вируса осповакцины, векторы на основе вируса полиомиелита и аденовирус-ассоциированные векторы (AAV)), фаги, фagemиды, космиды и искусственные хромосомы (в том числе ВАС и YAC). Собственно вектор, как правило, представляет собой нуклеотидную последовательность, обычно последовательность ДНК, которая содержит вставку (трансген) и более длинную последовательность, которая выступает в качестве "остова" вектора. Сконструированные векторы, как правило, содержат точку начала репликации для автономной репликации в клетках-хозяевах (если требуется стабильная экспрессия полинуклеотида), селективные маркеры и сайты для расщепления рестриктазами (например, сайт множественного клонирования, MCS). Вектор может дополнительно содержать промоторы, генетические маркеры, репортерные гены, нацеливающие последовательности и/или метки для очистки белка. Как известно специалистам в данной области, большое количество подходящих векторов известно специалистам в данной области и многие являются коммерчески доступными. Примеры подходящих векторов предусмотрены в J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2012) и включают в себя следующие.

#### Направленные векторы.

Направленные векторы можно использовать для интеграции полинуклеотида в хромосому клетки-хозяина с помощью способов, известных в данной области, таких как описаны J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2012). Вкратце, подходящие средства включают в себя гомологическую рекомбинацию или использование гибридной рекомбиназы, которая специфически целенаправленно воздействует на последовательности в участках интеграции. Направленные векторы, как правило, являются кольцевыми или линейными перед использованием для гомологической рекомбинации. В качестве альтернативы чужеродные полинуклеотиды могут представлять собой фрагменты ДНК, соединенные с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами, или синтетически сконструированные фрагменты ДНК, которые затем рекомбинируют в клетку-хозяина. Также можно использовать гетерологическую рекомбинацию, которая приводит к случайной или нецелевой интеграции.

В настоящем изобретении также предусмотрен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе.

#### Векторы экспрессии.

Вектор по настоящему изобретению может также представлять собой вектор экспрессии. "Векторы экспрессии" или "конструкции для экспрессии" можно применять для транскрипции гетерологических нуклеотидных последовательностей, например, таких последовательностей, которые кодируют TCR по настоящему изобретению, и трансляции своей мРНК в подходящей клетке-хозяине. Этот процесс также называется как "экспрессия" TCR по настоящему изобретению.

Помимо точки начала репликации, селективных маркеров и участков расщепления рестриктазами, векторы экспрессии, как правило, включают в себя одну или более регуляторных последовательностей, функционально связанных с гетерологичным полинуклеотидом, подлежащим экспрессии.

Термин "регуляторная последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, необходимой для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности (гетерологичного) полинуклеотида в определенных организме-хозяине или клетке-хозяине, и таким образом включает регуляторные последовательности транскрипции и трансляции. Как правило, регуляторные последовательности, требующиеся для экспрессии гетерологичных полинуклеотидных последовательностей в прокариотах, включают в себя промотор(промоторы), необязательно последовательность(последовательности) оператора(операторов) и участок(участки) связывания рибосом. У эукариот, как правило, требуются промоторы, сигналы полиаденилирования, энхансеры и необязательно сигналы сплайсинга. Кроме того, специфические сигналы инициации и секреторные сигналы могут быть введены в вектор для обеспечения секреции полипептида, представляющего интерес, в среду для культивирования.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она размещена в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты, в частности на одной и той же полинуклеотидной молекуле. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью гетерологичного гена, если он способен воздействовать на экспрессию этой кодирующей последовательности. Промотор, как правило, расположен выше гена, кодирующего полинуклеотид, представляющий интерес, и регулирует экспрессию указанного гена.

Иллюстративные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего включают вирусные элементы, которые управляют высокими уровнями экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, происходящие из цитомегаловируса (CMV) (такие как промотор/энхансер CMV), вируса обезьян 40 (SV40) (такие как промотор/энхансер SV40), аденовируса (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и вируса полиомиелита. Как изло-

жено ранее, векторы экспрессии также могут включать точки начала репликации и селективные маркеры.

Как упомянуто ранее, векторы по настоящему изобретению могут дополнительно содержать один или более селективных маркеров. Подходящие селективные маркеры для применения с эукариотическими клетками-хозяевами включают без ограничения гены тимидинкиназы (tk) простого вируса герпеса, гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (hgrpt) и аденинфосфорибозилтрансферазы (aprt). Другие гены включают в себя dhfr (ген устойчивости к метотрексату), gpt (ген устойчивости к микофеноловой кислоте), neo (ген устойчивости к G-418) и hygro (ген устойчивости к гидромицину). Для повышения уровней экспрессии можно использовать амплификацию вектора. Как правило, ген селективного маркера можно быть либо непосредственно связан с полинуклеотидными последовательностями, подлежащими экспрессии, либо введен в ту же клетку-хозяину в результате совместной трансформации.

В связи с вышеизложенным, в настоящем изобретении также дополнительно предусмотрены одна или более нуклеотидных последовательностей, описанных в данном документе, вставленных в вектор (т.е. содержащихся в векторе). В частности, в настоящем изобретении предусмотрены (реплицируемые) векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую TCR по настоящему изобретению, или его альфа- или бета-цепь, или варибельный домен альфа- или бета-цепи, или CDR3-альфа или CDR3-бета, функционально связанные с промотором.

Специалист в данной области сможет легко выбрать подходящий вектор экспрессии на основе, например, клетки-хозяина, предусмотренной для экспрессии TCR. Примеры подходящих векторов экспрессии представляют собой вирусные векторы, такие как ретровирусные векторы, например, векторы на основе MP71 или SIN-векторы на основе ретровирусов; и лентивирусные векторы или SIN-векторы на основе лентивирусов. Вирусные векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие TCR по настоящему изобретению, например, способны инфицировать лимфоциты, которые, как предусмотрено, затем экспрессируют гетерологичный TCR. Другим примером подходящего вектора экспрессии является плазмидная система ДНК транспозазы транспозона Sleeping Beauty (SB), плаزمиды ДНК SB. Нуклеиновые кислоты и/или, в частности, конструкции экспрессии по настоящему изобретению также могут быть перенесены в клетки в результате транзиторной трансфекции РНК.

В настоящее время вирусные векторы для нативной экспрессии TCR в типичном случае связывают гены альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR в одном векторе либо с помощью последовательности внутреннего участка связывания рибосомы (IRES), либо последовательности 2А-пептида, происходящего из тесковируса свиней, приводя к экспрессии в одной молекуле матричной РНК (мРНК) под контролем промотора вируса в трансдуцированной клетке.

Клетка-хозяин.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрена клетка-хозяин, содержащая TCR, нуклеиновую кислоту или вектор, описанный в данном документе.

Множество клеток-хозяев может быть использовано в соответствии с настоящим изобретением. Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" охватывает клетки, которые могут представлять собой реципиентов полинуклеотидов или векторов, описанных в данном документе, или были таковыми, и/или экспрессируют (и необязательно секретируют) TCR по настоящему изобретению. Термины "клетка" и "клеточная культура" используются взаимозаменяемо для определения источника TCR, если четко не указано иное. Термин "клетка-хозяин" также включает "линии клеток-хозяев".

Как правило, термин "клетка-хозяин" включает прокариотические или эукариотические клетки, а также включает без ограничения бактериальные клетки, клетки дрожжей, растительные клетки и клетки животных, такие как клетки насекомых и клетки млекопитающих, например, клетки мыши, крысы, макаки или человека.

В связи с вышеизложенным, таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены, в частности, клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид или вектор, например, вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую TCR или TCR-конструкцию, описанную в данном документе.

Полинуклеотиды и/или векторы по настоящему изобретению можно вводить в клетки-хозяева с помощью стандартных способов, известных в данной области, например, трансфекции, трансформации и т.п.

"Трансфекция" представляет собой процесс намеренного введения молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (в том числе векторов) в целевые клетки. Пример представляет собой трансфекцию РНК, т.е. процесс введения РНК (такой как транскрибированной *in vitro* РНК, *ivt*РНК) в клетку-хозяина. Термин главным образом используется для невирусных способов в эукариотических клетках. Термин "трансдукция" часто используется для описания опосредованного вирусом переноса молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов. Трансфекция клеток животных, как правило, включает открытие транзитных пор или "отверстий" в клеточной мембране для обеспечения захвата материала. Трансфекцию можно проводить с использованием фосфата кальция, путем электропорации, путем сжатия клетки или с использованием катионного липида с материалом для получения липосом, которые сливаются с клеточной мембраной и депонируют свой груз внутри. Иллюстративные методики переноса в эукариотические клетки-хозяева включают опосредованный липидными пузырьками захват, опосредованный теп-



ловым шоком захват, опосредованная фосфатом кальция трансфекция (фосфат кальция/копреципитация ДНК), микроинъекцию и электропорацию.

Термин "трансформация" используется для описания невирусного переноса молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (в том числе векторов) в бактерии, а также в эукариотические клетки помимо животных, в том числе растительные клетки. Таким образом, трансформация представляет собой генетическое изменение бактериальной или эукариотической клетки, происходящей не от животного, полученное в результате прямого переноса через клеточную(клеточные) мембрану(мембраны) из ее окружения и последующего включения экзогенного генетического материала (молекул нуклеиновой кислоты). На трансформацию можно воздействовать различными искусственными средствами. Чтобы трансформация произошла, клетки или бактерии должны пребывать в состоянии компетентности, которое может происходить в виде ограниченного во времени ответа на условия окружающей среды, такие как голодание или плотность клеток. В случае прокариотической трансформации методики могут включать опосредованный тепловым шоком захват, слияние бактериального протопласта с интактными клетками, микроинъекцию и электропорацию. Методики в случае растительной трансформации включают опосредованный *Agrobacterium* перенос, например, *A. tumefaciens*, быстродвигающиеся микрочастицы вольфрама или золота, электропорацию, микроинъекцию и опосредованный полиэтиленгликолем захват.

Таким образом, ввиду вышеизложенного в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены клетки-хозяева, содержащие, по меньшей мере, полинуклеотидную последовательность и/или вектор, описываемые в данном документе.

В случае экспрессии TCR по настоящему изобретению клетку-хозяина можно выбрать таким образом, что она модулирует экспрессию встроенных полинуклеотидных последовательностей, и/или модифицирует и осуществляет процессинг генного продукта (т.е. РНК и/или белка), если это необходимо. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) генных продуктов могут быть важными для функции TCR. Различные клетки-хозяева имеют характеристики и определенные механизмы для посттрансляционного процессинга и модификации генных продуктов. Подходящие клеточные линии или системы-хозяева могут быть выбраны с целью обеспечения надлежащих модификации и процессинга продукта. В связи с этим можно применять эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным аппаратом для надлежащих процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта.

В данном документе предусмотрено обеспечение: (а) клеток-хозяев для экспрессии и получения TCR по настоящему изобретению, в частности, в растворимой форме ("клетки-хозяева для продуцирования") и (б) клеток-хозяев, экспрессирующих TCR по настоящему изобретению и имеющих эффекторную функцию ("эффекторные клетки-хозяева"). Такие "эффекторные клетки-хозяева" являются особенно пригодными для применений в терапии и предусмотрены для введения нуждающемуся в этом субъекту. Предпочтительные "эффекторные клетки-хозяева" включают лимфоциты, такие как цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), CD8<sup>+</sup> Т-клетки, CD4<sup>+</sup> Т-клетки, естественные киллерные (NK) клетки, естественные киллерные (NKT) Т-клетки, гамма/дельта-Т-клетки.

"Клетка-хозяин для продуцирования".

Клетки.

"Клетки-хозяева для продуцирования", используемые для экспрессии растворимых TCR по настоящему изобретению, предпочтительно способны экспрессировать высокие количества рекомбинантного белка.

Иллюстративные клетки-хозяева млекопитающих, которые могут быть использованы в качестве "клеток-хозяев для продуцирования" включают клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO), в том числе дефектные по DHFR клетки CHO, такие как клетки DG44 и DUXB1 1, NSO, COS (производное CV1 с Т-антигеном SV40), HEK293 (почка человека) и SP2 (миелома мыши). Другие иллюстративные линии клеток-хозяев включают без ограничения HELA (карцинома шейки матки человека), CV1 (линия клеток почки обезьян), VERY, ВНК (почка новорожденного хомячка), MDCK, 293, WI38, R1610 (фибробласт китайского хомячка), BALBC/3T3 (фибробласт мыши), HAK (линия клеток почки хомячка), P3x63-Ag3.653 (миелома мыши), VFA-IcIBPT (эндотелиальные клетки крупного рогатого скота) и RAJI (лимфоциты человека). Линии клеток-хозяев, как правило, доступны из коммерческих служб, Американской коллекции тканевых культур (ATCC) или из опубликованной литературы.

Клетки, отличные от клеток млекопитающих, такие как клетки бактерий, дрожжей, насекомых или растений также легко доступны и могут быть использованы в качестве "клеток-хозяев для продуцирования", описанных в данном документе. Иллюстративные бактериальные клетки-хозяева включают Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia coli*, *Salmonella*; Bacillaceae, такие как *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* и *Haemophilus influenzae*. Другие клетки-хозяева включают клетки дрожжевых грибов, такие как *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*. Клетки насекомых включают без ограничения клетки *Spo-doptera frugiperda*.

В соответствии с вышеизложенным приемлемые системы экспрессии (т.е. клетки-хозяева, содержащие вышеописанный вектор экспрессии) включают микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*, *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантной ДНК бактериофага, векторами экспрессии на

основе плазмидной ДНК плазмиды или космидной ДНК; дрожжевые клетки (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии дрожжевых клеток; системы на основе клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловируса); системы на основе растительных клеток, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вируса мозаики цветной капусты, CaMV; вируса табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Ti-плазмиды). Часто предпочтительными являются системы экспрессии млекопитающих, несущие рекомбинантные конструкции для экспрессии, содержащие промоторы, происходящие из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотронеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; 7.5K-промотор вируса оспавакцины, главный промотор немедленно раннего ответа (CMV) цитомегаловируса (MEP)). Подходящие клетки-хозяева млекопитающих могут быть выбраны из известных клеточных линий (например, клеток COS, CHO, BLK, 293, 3T3), однако также приемлемо использовать лимфоциты, такие как цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), CD8<sup>+</sup> Т-клетки, CD4<sup>+</sup> Т-клетки, естественные киллерные (NK) клетки, естественные киллерные (NKT) Т-клетки, гамма/дельта-Т-клетки.

В соответствии с вышеизложенными в настоящем изобретении также предусмотрен способ продуцирования и получения TCR, описанного в данном документе, предусматривающий стадии (i) инкубации клетки-хозяина (т.е. клетки-хозяина для продуцирования) в условиях, вызывающих экспрессию указанного TCR, и (ii) очистки указанного TCR.

Культивирование.

Клетки-хозяева, несущие вектор экспрессии, выращивают в условиях, подходящих для продуцирования TCR, предусмотренных в данном документе, в частности альфа-цепей и/или бета-цепей, описанных в других разделах данного документа, и проводят анализ на предмет синтеза белков альфа- и/или бета-цепи. В случае экспрессии двуцепочечных TCR векторы, кодирующие как альфа-, так и бета-цепи, могут быть совместно экспрессированы в клетке-хозяине для экспрессии целой молекулы.

Очистка.

После экспрессии TCR по настоящему изобретению он может быть очищен с помощью любого способа очистки, известного в данной области, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной хроматографии (например, хроматографии с гидроксипатитом), аффинной хроматографии, в частности аффинной хроматографии на основе связывания с белком А, белком G или лектином, эксклюзионной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости, хроматографии с гидрофобным взаимодействием или с помощью любой другой стандартной методики для очистки белков. Специалисты в данной области смогут легко выбрать подходящий способ очистки на основе индивидуальных характеристик TCR, подлежащего извлечению.

"Эффекторная клетка-хозяин".

Как упоминалось ранее, в настоящем изобретении также предусмотрены "эффекторные клетки-хозяева", содержащие нуклеотидную последовательность, вектор или TCR по настоящему изобретению. Указанные эффекторные клетки-хозяева модифицируют с помощью стандартных способов для того, чтобы они содержали последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей TCR по настоящему изобретению, и они предусмотрены для экспрессии TCR, описанного в данном документе, в частности, на поверхности клеток. Для целей настоящего изобретения термин "модифицированные клетки-хозяева, экспрессирующие TCR по настоящему изобретению", как правило, относится к клеткам-хозяева (эффекторным или для продуцирования), обработанным или измененным с целью экспрессии TCR в соответствии с настоящим изобретением, например, с помощью РНК-трансфекции, описанной в прилагаемых примерах. Также предусмотрены другие способы модификации, или трансфекции, или трансдукции, такие как описанные в других разделах данного документа. Таким образом, термин "модифицированная клетка-хозяин" включает "трансфицированные", "трансдуцированные" и "генетически сконструированные" клетки-хозяева, предпочтительно экспрессирующие TCR по настоящему изобретению.

Предпочтительно такие "(модифицированные) эффекторные клетки-хозяева" (в частности, "(модифицированные) эффекторные лимфоциты") способны опосредовать эффекторные функции за счет внутриклеточной передачи сигнала при связывании TCR со своей специфической антигенной мишенью. Такие эффекторные функции включают, например, высвобождение перфорина (которые создает отверстия в мембране клетки-мишени), гранзимов (которые представляют собой протеазы, действующие внутри клетки с активацией апоптоза), экспрессию Fas-лиганда (который активирует апоптоз в Fas-несущей клетке-мишени) и высвобождение цитокинов, предпочтительно цитокинов Th1/Tc1, таких как IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$ . Таким образом, эффекторная клетка-хозяин, сконструированная для экспрессии TCR по настоящему изобретению, которая способна распознавать и связываться со своей антигенной мишенью у субъекта, подлежащего лечению, предусмотрена для осуществления вышеупомянутых эффекторных функций, за счет чего уничтожаются клетки-мишени (например, раковые). Цитолиз целевых клеток можно оценить, например, с помощью флуоресцентного киллинг-анализа CTL (CTL, США), выявляюще-

го исчезновение флуоресцентно меченых целевых клеток в ходе совместного культивирования с TCR-трансфицированными реципиентными Т-клетками.

В связи с вышеизложенным эффекторные клетки-хозяева предпочтительно экспрессируют функциональный TCR, т.е. который, как правило, содержит альфа- и бета-цепь TCR, описанные в данном документе; а также субъединицы для трансдуцирования сигнала CD3-гамма, дельта, эпсилон и зета (CD3-комплекс). Кроме того, также может потребоваться экспрессия корецепторов CD4 или CD8. Как правило, лимфоциты, несущие требуемые гены, вовлеченные в связывание антигена, активацию рецептора и нисходящую передачу сигнала (например, Lck, FYN, CD45 и/или Zap70) Т-клетки, являются особенно подходящими в качестве эффекторных клеток-хозяев. Однако в данном документе также предусмотрены эффекторные клетки-хозяева, экспрессирующие TCR по настоящему изобретению в качестве "связывающего домена" без субъединицы трансдуцирования сигнала CD3 и/или вышеупомянутых нисходящих сигнальных молекул (т.е. способных распознавать антигенную мишень, описанную в данном документе, но, не влияя на функции, опосредуемые CD3 и/или вышеупомянутыми нисходящими сигнальными молекулами). Такие эффекторные клетки предусмотрены для возможности распознавания антигенной мишени, описанной в данном документе, и необязательного воздействия на другие функции, не ассоциированные с передачей сигнала с помощью CD3 и/или передачей сигнала вышеупомянутыми нисходящими сигнальными молекулами. Примеры включают NK- или NKT-клетки, экспрессирующие TCR по настоящему изобретению, способные, например, высвобождать цитотоксические гранулы при распознавании своей антигенной мишени.

Таким образом, цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), CD8<sup>+</sup> Т-клетки, CD4<sup>+</sup> Т-клетки, естественные киллерные (NK) клетки, естественные киллерные (NKT) Т-клетки, гамма/дельта-Т-клетки считаются применимыми лимфоцитарными эффекторными клетками-хозяевами. Такие лимфоциты, экспрессирующие рекомбинантный TCR по настоящему изобретению, также обозначены в данном документе как "модифицированные эффекторные лимфоциты". Однако специалист в данной области легко признает, что, как правило, любой компонент пути сигнального пути TCR, приводящий к необходимой эффекторной функции, может быть введен в подходящую клетку-хозяина с помощью способов рекомбинантной генной инженерии, известных в данной области.

Эффекторные клетки-хозяева, в частности лимфоциты, такие как Т-клетки, могут быть аутологичными клетками-хозяевами, которые получены от подлежащего лечению субъекта, и трансформированы или трансдуцированы для экспрессии TCR по настоящему изобретению. Как правило, рекомбинантная экспрессия TCR будет осуществляться с помощью вирусного вектора, описанного в прилагаемых примерах. Методики получения и выделения клеток от пациента, хорошо известны в данной области.

Как упоминалось ранее, эффекторные клетки-хозяева, предусмотренные в данном документе, особенно предпочтительны для применений в терапии. Дополнительные генетические модификации клетки-хозяина могут быть необходимыми для повышения терапевтической эффективности. Например, при использовании аутологичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в качестве "эффекторных клеток-хозяев" подходящие дополнительные модификации включают снижение эндогенной экспрессии TCR, CTLA-4 и/или PD-1; и/или амплификации стимулирующих молекул, таких как CD28, CD134, CD137. В данной области были описаны средства и способы достижения вышеупомянутых генетических модификаций.

Способы целевого геномного конструирования клеток-хозяев известны в данной области и включают в себя, помимо нокдауна гена с помощью миРНК, применение так называемых "программируемых нуклеаз", таких как нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатором транскрипции (TALEN), и направляемые РНК сконструированные нуклеазы (RGEN), происходящие из систем бактериальных коротких палиндромных повторов, регулярно расположенными группами (CRISPR)-Cas (CRISPR-ассоциированных), как, в частности, описано в Kim & Kim Nature Reviews Genetics 15, 321-334 (2014). Например, программируемые нуклеазы, такие как TALEN, могут быть использованы для разрезания участков ДНК, которые кодируют "нежелательные" белки, такие как PD-1, CTLA-4 или эндогенный TCR, за счет чего снижается их экспрессия. Если Т-клетки используются в качестве (эффекторных) клеток-хозяев, снижение экспрессии эндогенного TCR имеет преимущество, проявляющееся в снижении нежелательного "ошибочного спаривания" эндогенных и экзогенных альфа/бета-цепей TCR.

Фармацевтическая композиция/диагностика.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрена фармацевтическая композиция в виде одного или нескольких активных средств, TCR, нуклеиновой кислоты, вектора и/или клетки-хозяина, описанных в данном документе, и необязательно одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Соответственно применение указанных TCR, нуклеиновой кислоты, вектора и клетки-хозяина для изготовления фармацевтической композиции или лекарственного препарата также предусмотрено в данном документе.

Термин "фармацевтическая композиция", в частности, относится к композиции, подходящей для введения человеку. Однако композиция, подходящие для введения животным, отличным от человека, как правило, также охвачены данным термином.

Фармацевтическая композиция и ее компоненты (т.е. активные средства и необязательно вспомога-

тельные вещества) являются предпочтительно фармацевтически приемлемыми, т.е. способными вызывать необходимый терапевтический эффект, не вызывая нежелательные местные или системные эффекты у реципиента. Фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению, например, могут быть стерильными. В частности, термин "фармацевтически приемлемый" может обозначать одобренный регуляторным органом или другой общепризнанной фармакопеей для применения у животных и более конкретно у человека.

Активное средство, описанное в вышеизложенном (например, клетка-хозяин или TCR), предпочтительно присутствует в фармацевтической композиции в терапевтически эффективном количестве. Под "терапевтически эффективным количеством" понимается количество активного средства, которое вызывает необходимый терапевтический эффект. Терапевтическая эффективность и токсичность могут быть определены с помощью стандартных процедур, например, в клеточной культуре или у исследуемых животных, например, ED<sub>50</sub> (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции) и LD<sub>50</sub> (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение дозы терапевтических и токсических эффектов представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено в виде соотношения ED<sub>50</sub>/LD<sub>50</sub>. Фармацевтические композиции, которые характеризуются высокими терапевтическими индексами, являются предпочтительными.

#### Дозировка.

Точная дозировка полинуклеотида, вектора или клетки-хозяина для TCR будет установлено специалистом в данной области с помощью известных методик. В подходящих дозировках предусмотрены достаточные количества активного средства по настоящему изобретению, и они предпочтительно являются терапевтически эффективными, т.е. вызывают необходимый терапевтический эффект.

Как известно в данной области, может потребоваться корректировка с целью лечения (например, для поддержания ремиссии или лечения острого приступа заболевания), пути, времени и частоты введения, времени и частоты введения состава, возраста, веса тела, общего состояния здоровья, пола, питания, тяжести патологического состояния, лекарственной(лекарственных) комбинации(комбинаций), реакций чувствительности и переносимости/устойчивости к терапии. Подходящие диапазоны дозирования, например, в случае растворимых TCR, могут быть определены с помощью данных, полученных на основе анализа клеточных культур и исследований на животных, и могут включать ED<sub>50</sub>. Как правило, дозы могут варьироваться от 0,1 до 100000 микрограмм, до общей дозы, составляющей приблизительно 2 г, в зависимости от способа введения. Иллюстративные дозировки активного средства по настоящему изобретению находятся в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг или от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг. Руководство касательно конкретных дозирования и способов доставки приведено в литературе. Следует признать, что для лечения может потребоваться одно введение терапевтически эффективной дозы или несколько введений терапевтически эффективной дозы активного средства по настоящему изобретению. Например, некоторые фармацевтические композиции можно вводить каждые 3-4 дня, каждую неделю или один раз в две недели, или один раз в месяц в зависимости от состава, периода полужизни и скорости выведения определенной композиции.

Как изложено ранее, фармацевтическая композиция может необязательно содержать одно или несколько вспомогательных веществ и/или одно или несколько дополнительных активных средств.

#### Вспомогательные вещества.

Термин "вспомогательное вещество" включает наполнители, связывающие вещества, разрыхлители, покрывающие вещества, сорбенты, вещества, препятствующие склеиванию, скользящие вещества, консерванты, антиоксиданты, ароматизаторы, красители, подсластители, растворители, соразтворители, буферные средства, хелатирующие средства, средства, придающие вязкость, поверхностно-активные вещества, разбавители, смачивающие средства, носители, консерванты, эмульгаторы, стабилизаторы и регуляторы тоничности. Выбор подходящих вспомогательных веществ для получения необходимой фармацевтической композиции по настоящему изобретению находится в пределах компетенции специалиста в данной области. Иллюстративные носители для применения в фармацевтической композиции по настоящему изобретению включают солевой раствор, буферный солевой раствор, декстрозу и воду. Как правило, выбор подходящих вспомогательных веществ, в частности, зависит от используемого активного средства, заболевания, подлежащего лечению, и необходимого состава лекарственной композиции.

#### Дополнительные активные средства.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько активных средств по настоящему изобретению, описанные выше (например, клетку-хозяина или TCR-конструкцию), и одно или несколько дополнительных активных средств, которые подходят для лечения и/или профилактики заболевания, подлежащего лечению. Предпочтительные примеры активных ингредиентов, подходящих для комбинаций, включают противоопухолевые препараты, такие как цисплатин, производные майтансина, рахелмицин, калихеамедин, доцетаксел, этопозид, гемцитабин, ифосфамид, иринотекан, мельфалан, митоксантрон, сорфимер натрия фотофрин II, темозоломид, топотекан, триметреат глюкуроонат, ауристин Е, винкрестин и доксорубин; и пептидные ци-

токсины, такие как риксин, дифтерийный токсин, бактериальный экзотоксин синегнойной палочки А, ДНКазу и РНКазу; радионуклиды, такие как йод 131, рений 186, индий 111, иттрий 90, висмут 210 и 213, актиний 225 и астат 213; про лекарства, такие как антитело-направленные ферментативные пролекарства; иммуностимуляторы, такие как IL-2, хемокины, такие как IL-8, тромбоцитарный фактор 4, белок, стимулирующий рост меланомы, и т.д., антитела или их фрагменты, такие как антитела к CD3 или их фрагменты, активаторы комплемента, домены ксеногенных белков, домены аллогенных белков, вирусные/бактериальные белковые домены и вирусные/бактериальные пептиды.

#### Введение.

Множество путей применимы для введения фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. Как правило, введение будет выполняться парентерально. Способы парентеральной доставки включают местное, интраартериальное, внутримышечное, подкожное, интрамедуллярное, интратекальное, интравентрикулярное, внутривенное, интраперитонеальное, внутриматочное, интравагинальное, подъязычное или интраназальное введение.

#### Получение препарата.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть получены в различных формах в зависимости, в частности, от используемого активного средства (например, растворимого TCR), например, в твердой, жидкой, газообразной или лиофилизированной форме, и могут быть представлены, в частности, в форме мази, крема, трансдермальных пластырей, геля, порошка, таблетки, раствора, аэрозоля, гранул, пилюль, суспензий, эмульсий, капсул, сиропов, жидкостей, эликсиров, экстрактов, настойки или жидких экстрактов или в форме, которая является особенно подходящей для необходимого способа введения. Сами способы, известные для получения лекарственных препаратов, представлены в 22-м изд. Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa., 2012) и могут включать, например, способы стандартного смешивания, растворения, гранулирования, дражирования, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, захвата или лиофилизации. Фармацевтические композиции, содержащие, например, клетки-хозяева или растворимый TCR, описанные в данном документе, как правило, будут представлены в жидкой форме, и предпочтительно содержать фармацевтически приемлемый буфер.

После получения фармацевтических композиций по настоящему изобретению они могут быть помещены в соответствующий контейнер и маркированы этикеткой, как предназначенные для лечения указанного состояния. Такая этикетка, будет включать, например, указание количества, частоты и способа введения.

#### Лечение.

Таким образом, в свете вышеизложенного в настоящем изобретении предусмотрены TCR, нуклеиновая кислота, вектор и/или клетка-хозяина, описанные в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата.

TCR, нуклеиновая кислота, вектор и/или клетка-хозяин, как правило, могут быть использованы для выявления, диагностики, прогнозирования, предупреждения и/или лечения заболеваний или нарушений. Термин "лечение" во всех своих грамматических формах включает терапевтическое или профилактическое лечение нуждающегося в этом субъекта. Термин "терапевтическое или профилактическое лечение" подразумевает профилактическое лечение, направленное на полное предупреждение клинических и/или патологических проявлений, или терапевтическое лечение, направленное на нормализацию или ремиссию клинических и/или патологических проявлений. Таким образом, термин "лечение" также включает нормализацию или предупреждение заболеваний.

Термины "субъект", или "индивидуум", или "животное", или "пациент" используются взаимозаменяемо в данном документе для обозначения любого субъекта, особенно субъекта-млекопитающего, которому необходима терапия. Субъекты-млекопитающие, как правило, включают человека, приматов, отличных от человека, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, коров и т.п. Однако легко будет понять, что TCR, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и фармацевтические композиции, представленные в данном документе, особенно предусмотрены для лечения субъектов-людей, в частности таких, которые являются HLA-A2-положительными.

#### Прямое введение.

В случае терапии с использованием TCR, в частности растворимыми TCR по настоящему изобретению, нуклеиновые кислоты, векторы (такие как вирусные векторы) или клетки-хозяева по настоящему изобретению можно вводить непосредственно нуждающемуся в этом субъекту. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены TCR, нуклеиновая кислота, вектор или клетки-хозяева для применения в способе выявления, диагностики, прогнозирования, предупреждения и/или лечения субъекта. Такой способ может предусматривать стадии (а) обеспечения одного или более из: (i) TCR, (ii) нуклеиновой кислоты, (iii) вектора, (iv) клетки-хозяина и/или (v) фармацевтической композиции по настоящему изобретению, и (b) введения одного или более из (i)-(v) нуждающемуся в этом субъекту. Необязательно способ предусматривает дополнительную стадию терапии рака, например лучевую терапию или введение одного или более противоопухолевых средств.

Лечение *ex vivo*.

Лечение в соответствии с настоящим изобретением может также предусматривать стадии: (a) обеспечения образца субъекта, при этом указанный образец содержит лимфоциты; (b) обеспечения одного или более TCR, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению; (c) введения одного или более (i)-(v) из стадии (b) в лимфоциты из стадии (a), за счет чего получают модифицированные лимфоциты; (d) введения модифицированных лимфоцитов из стадии (c) нуждающимся в этом субъекту или пациенту.

Лимфоциты, полученные на стадии (a), в частности, предусмотрены в качестве "эффекторных клеток-хозяев", описанных в вышеизложенных разделах, и предпочтительно выбраны из T-клеток, НК-клеток и/или NKT-клеток, особенно CD8<sup>+</sup> T-клеток; и могут быть получены на предыдущей стадии (a') из образца, в частности образца крови, субъекта с помощью стандартных способов, известных в данной области. Однако также приемлемо применение лимфоцитов, которые предпочтительно способны экспрессировать TCR по настоящему изобретению и проявлять необходимые биологические эффекторные функции, описанные в данном документе. Кроме того, указанные лимфоциты, как правило, будут выбраны для совместимости с иммунной системой субъекта, т.е. они не будут предпочтительно вызывать иммуногенный ответ. Например, приемлемо использовать "универсальные реципиентные клетки", т.е. универсально совместимые лимфоциты, проявляющие необходимые биологические эффекторные функции, которые могут быть выращены и размножены *in vitro*. Таким образом, применение таких клеток будет устранять необходимость в получении и предоставлении собственных клеток субъекта на стадии (a).

Введение *ex vivo* на стадии (c) может быть проведено путем введения нуклеиновой кислоты или вектора, описанных в данном документе, с помощью электропорации в лимфоциты, или путем инфицирования лимфоцитов вирусным вектором, таким как лентивирусный или ретровирусный вектор, описанные ранее в контексте эффекторной клетки-хозяина. Другие приемлемые способы включают применение реагентов для трансфекции, таких как липосомы, или транзientной РНК-трансфекции. Перенос генов антигенспецифических TCR в (первичные) T-клетки с помощью (ретро)вирусных векторов или транзientной трансфекции РНК представляет собой перспективное средство для генерации опухолеассоциированных антигенспецифических T-клеток, которые затем могут быть повторно введены в донора, где они специфически нацеливаются на опухолевые клетки, экспрессирующие указанный антиген, и разрушают их. В настоящем изобретении указанный опухолеассоциированный антиген представляет собой PRAME<sub>100-108</sub>, в частности в своей HLA-A\*02 связанной форме.

В связи с вышеизложенным в дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение TCR, последовательности нуклеиновой кислоты, вектора и/или клетки-хозяина, описанных в других разделах данного документа, для получения модифицированных лимфоцитов. Средства и способы введения, например, нуклеиновой кислоты и вектора в лимфоциты, были описаны в других разделах данного документа.

Диагностическая композиция.

В настоящем изобретении предусмотрена диагностическая композиция, содержащая одно или более диагностических средств, TCR, нуклеиновую кислоту, вектор и/или клетку-хозяина, описанные в данном документе. Как правило, указанное диагностическое средство будет предусматривать средства для выявления своего связывания со своей антигенной мишенью, например меткой, описанной в контексте TCR-конструкций по настоящему изобретению. Что касается клетки-хозяина, например, считается приемлемым использование модифицированных клеток-хозяев, содержащих краситель или контрастное средство, которое высвобождается (вместо цитотоксических гранул) при распознавании антигена.

Применение.

В настоящем изобретении предусмотрено применение диагностических средств, описанных выше, для выявления, диагностики и/или прогнозирования рака у субъекта, которое может быть осуществлено *in vivo* или *in vitro*.

Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрена диагностическая композиция для применения в выявлении, диагностике и/или прогнозировании рака у субъекта *in vivo*, при этом указанная композиция содержит в качестве диагностического средства TCR, нуклеиновую кислоту, вектор и/или клетку-хозяина по настоящему изобретению. Способ, как правило, предусматривает (a) введение указанного диагностического средства субъекту и (b) выявление связывания указанного диагностического средства с его антигенной мишенью.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрен способ выявления, диагностики и/или прогнозирования рака у субъекта *in vitro*. В соответствии с настоящим изобретением также предусмотрен способ выявления наличия рака у субъекта, предусматривающий стадии: (a) обеспечения образца от субъекта, при этом указанный образец содержит одну или более клеток; (b) приведения указанного образца в контакт с TCR, нуклеиновой кислотой, вектором и/или клеткой-хозяином по настоящему изобретению, за счет чего образуется комплекс; и (c) выявления комплекса. Предусмотрено, что указанный комплекс является показателем связывания диагностического средства с его антигенной мишенью и наличия (раковой) клетки, экспрессирующей указанную антигенную мишень.

В обоих способах связывания диагностического средства со своей антигенной мишенью может

быть определен с помощью стандартных способов, известных в данной области, и будет, в частности, зависеть от конкретного используемого диагностического средства. Подходящие метки, которые могут быть связаны с диагностическим средством по настоящему изобретению, приведены в качестве примера в разделе, относящемся к меченым TCR-конструкциям. Применение для получения модифицированных лимфоцитов

Следует отметить, что используемые в данном документе формы единственного числа включают ссылки во множественном числе, если контекст явно не указывает иное. Таким образом, например, упоминание "реагента" включает один или более таких различных реагентов, и упоминание "способа" включает упоминание эквивалентных стадий и способов, известных специалистам в данной области, которые могут быть модифицированы или заменены способами, описанными в данном документе.

Если не указано иное, выражение "по меньшей мере", предшествующее ряду элементов, следует понимать как относящееся к каждому элементу в данном ряду. Специалистам в данной области будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанного в данном документе, или с помощью проведения только лишь обычных экспериментов они будут способны определить такие эквиваленты. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются настоящим изобретением.

Выражение "и/или", где бы оно не использовалось, включает значение "и", "или" и "все или любая комбинация из элементов, связанных указанным термином".

Выражение "приблизительно" или "примерно", используемое в данном документе, означает в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% от конкретного значения или диапазона. Однако он также включает конкретное число, например, "приблизительно 20" включает 20.

Выражение "менее" или "более" включает конкретное число. Например, менее 20 означает менее чем 20 или равно 20. Аналогично более чем или выше чем означает более чем или равно или выше чем или равно соответственно.

По всему настоящему описанию и в нижеследующей формуле изобретения, если контекст не подразумевает иное, слово "содержать" и варианты, такие как "содержит" и "содержащий", будут подразумевать включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, а не исключение какого-либо другого целого числа или стадии или группы целых чисел или шагов. При использовании в данном документе термин "содержащий" можно заменить термином "включающий" или "включающий в себя" или иногда при использовании в данном документе термином "имеющий".

При использовании в данном документе "состоящий из" исключает любые элемент, стадию или ингредиент, не указанные в элементе пункта формулы изобретения. При использовании в данном документе "состоящий фактически из" не исключает материалы или стадии, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики пункта формулы изобретения.

В каждом случае в данном документе любые из выражений "содержащий", "состоящий фактически из" и "состоящий из" можно заменить любым из других двух выражений.

Необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничено определенной методологией, протоколами, материалом, реагентами и веществами и т.д., описанными в данном документе, и таким образом может варьироваться. Терминология, используемая в данном документе, предназначена лишь для описательных целей конкретных вариантов осуществления, но не предполагает ограничение объема настоящего изобретения, который определен исключительно формулой изобретения.

Все публикации и патенты, цитируемые в тексте данного описания (в том числе все патенты, заявки на патент, научные публикации, технические паспорта, инструкции и т.д.), будь то выше или ниже, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Ничего в данном документе не должно толковаться как признание того, что настоящее изобретение не имеет права преподносить такое изобретение в силу предшествующего изобретения. В той степени, в которой материал, включенный посредством ссылки, противоречит настоящему описанию или несовместим с ним, настоящее описание будет превалировать над любым таким материалом.

Лучшее понимание настоящего изобретения и его преимуществ будет получено, исходя из следующего примера, представленного только с иллюстративными целями. Данный пример никоим образом не предусматривает ограничение объема настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также характеризуется следующими пунктами.

1. Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий:

(i) CDR3 варибельного участка альфа-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность SAVHSTAQAGTALIF (SEQ ID NO: 1) или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 1, или состоящий из нее, и/или

(ii) CDR3 варибельного участка бета-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность CASSTHRGQTNVGYTF (SEQ ID NO: 2) или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 2, или состоящий из нее.

2. TCR по п.1, где указанный TCR способен связываться с эпитопом, содержащимся в аминокислотной последовательности X1LX2GLDX3LL (SEQ ID NO: 31) или ее МНС-связанной форме, предпочтительно эпитопом, содержащимся в аминокислотной последовательности VLDGLDVLL (SEQ ID NO: 32) или ее МНС-связанной форме.

3. TCR по любому из пп.1 или 2, содержащий:

(i) вариабельный участок альфа-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, или состоящий из нее, и/или

(ii) вариабельный участок бета-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или состоящий из нее.

4. TCR по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащий: (i) константный участок альфа-цепи TCR и/или

(ii) константный участок бета-цепи TCR.

5. TCR по любому из предыдущих пунктов, содержащий:

(i) альфа-цепь TCR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13,

или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 7, 11,9 или 13, или состоящую из нее, и/или

(ii) бета-цепь TCR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14,

или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 8, 10, 12 или 14, или состоящую из нее.

6. TCR по любому из предыдущих пунктов, при этом указанный TCR выбран из нативного TCR, варианта TCR, фрагмента TCR или TCR-конструкции.

7. TCR-конструкция по п.6, содержащая по меньшей мере одну альфа-цепь(цепи)TCR и по меньшей мере одну бета-цепь(цепи)TCR, ковалентно связанные друг с другом с образованием гетеродимеров или мультимеров TCR.

8. TCR по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащий один или более слитых компонентов, необязательно выбранных из Fc-рецепторов; Fc-доменов, в том числе IgA, IgD, IgG, IgE и IgM; цитокинов, в том числе IL-2 или IL-15; токсинов; антител или их антигенсвязывающих фрагментов, в том числе антител к CD3, к CD28, к CD5, к CD16 или к CD56 или их антигенсвязывающих фрагментов; CD247- (CD3-дзета), CD28-, CD137-, CD134-домена или их комбинаций, необязательно дополнительно содержащих по меньшей мере один линкер.

9. TCR по любому из предыдущих пунктов, содержащий:

(i) по меньшей мере одну альфа-цепь TCR, определенную в любом из пп.1-4, и

(ii) по меньшей мере одну бета-цепь TCR, определенную в любом из пп.1-4,

(iii) антитело или фрагмент одноцепочечного антитела (scFv), которые направлены против антигена или эпитопа на поверхности лимфоцитов,

где альфа-цепь(цепи) TCR и бета-цепь(цепи) TCR связаны друг с другом и слиты с указанным антителом или scFv необязательно посредством линкера.

10. TCR по п.9, где указанный антиген выбран из CD3, CD28, CD5, CD16 или CD56.

11. TCR по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащий по меньшей мере одну метку.

12. TCR по любому из предыдущих пунктов, который является растворимым.

13. Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR по любому из предыдущих пунктов.

14. Нуклеиновая кислота по п.13, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30.

15. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.13 или 14.

16. Клетка-хозяин, содержащая TCR по любому из пп.1-12, последовательность нуклеиновой кислоты по п.12 или 13 или вектор по п.14.

17. Клетка-хозяин по п.16, которая выбрана из лимфоцитов, в том числе без ограничения цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), CD8<sup>+</sup> Т-клеток, CD4<sup>+</sup> Т-клеток, естественных киллерных (NK) клеток, естественных киллерных (NKT) Т-клеток, гамма/дельта-Т-клеток.

18. Способ получения TCR по любому из пп.1-12, предусматривающий:

(i) инкубацию клетки-хозяина по п.17 в условиях, вызывающих экспрессию указанного TCR,

(ii) очистку указанного TCR.

19. Фармацевтическая или диагностическая композиция, содержащая одно или более из:

(i) TCR по любому из пп.1-12,

(ii) нуклеиновой кислоты по любому из пп.13-14;

(iii) вектора по п.15 и/или

(iv) клетки-хозяина по любому из пп.16 или 17,



и необязательно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество(вещества).

20. TCR по любому из пп.1-12, нуклеиновая кислота по любому из пп.13 или 14, вектор по п.15 и/или клетка-хозяин по п.16 или 17 для применения в качестве лекарственного препарата.

21. TCR по любому из пп.1-12, нуклеиновая кислота по любому из пп.13 или 14, вектор по п.15 и/или клетка-хозяин по п.16 или 17 для применения в выявлении, диагностике, прогнозировании, предупреждении и/или лечении рака.

22. TCR, нуклеиновая кислота, вектор и/или клетка-хозяин для применения по п.21, где предупреждение и/или лечение рака предусматривает:

(a) обеспечение одного или более из (i) TCR по любому из пп.1-12,

(ii) нуклеиновой кислоты по любому из пп.13 или 14,

(iii) вектора по п.15 и/или

(iv) клетки-хозяина по любому из пп.16 или 17,

(v) фармацевтической композиции по п.19, и

(b) введение по меньшей мере одного из (i)-(v) нуждающемуся в этом субъекту.

23. TCR, нуклеиновая кислота, вектор и/или клетка-хозяин для применения по п.21, где предупреждение и/или лечение рака предусматривает:

(a) обеспечение образца от субъекта, при этом указанный образец содержит лимфоциты,

(b) обеспечение одного или более из (i) TCR по любому из пп.1-12,

(ii) нуклеиновой кислоты по любому из пп.13 или 14,

(iii) вектора по п.15 и/или

(iv) клетки-хозяина по любому из пп.16 или 17,

(v) фармацевтической композиции по п.19,

(c) применение одного или более из (i)-(v) из стадии (b) по отношению к лимфоцитам из стадии (a), за счет чего обеспечивается получение модифицированных лимфоцитов,

(d) введение модифицированных лимфоцитов из стадии (c) нуждающимся в этом субъекту или пациенту.

24. Способ выявления наличия рака у субъекта *in vitro*, предусматривающий:

(a) обеспечение образца от субъекта, при этом указанный образец содержит одну или более клеток,

(b) приведение указанного образца в контакт с:

(i) TCR по любому из пп.1-12,

(ii) нуклеиновой кислотой по любому из пп.13 или 14,

(iii) вектором по п.15 и/или

(iv) клеткой-хозяином по любому из пп.16 или 17,

(v) фармацевтической композицией по п.19,

за счет чего образуется комплекс, и

(c) выявление комплекса,

где выявление комплекса свидетельствует о наличии рака у субъекта.

25. Применение TCR по любому из пп.1-12, нуклеиновой кислоты по любому из пп.13 или 14 и/или вектора по п.15 для получения модифицированных лимфоцитов.

## Примеры

## Аббревиатуры и синонимы:

(m)DC	(зрелая) дендритная клетка
ivtRNA	<i>In vitro</i> транскрибируемая РНК
APC	антигенпрезентирующая клетка
(X) <sup>pos</sup> или (X) <sup>+</sup>	экспрессирующий X
VLD- или VLD-пептид	PRAME <sub>100-108</sub>
Соотношение E:T	Соотношение эффекторных клеток и целевых клеток
Пептид SLL или SLL	Пептид, нерелевантный, SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 229).
Пептид ALY или ALY	Пептид, нерелевантный, ALYVDSLFFL (SEQ ID NO: 230).
[M]	Пептид, нерелевантный, ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 231).  Концентрация молярная [моль/л]
PBMC	Мононуклеарная клетка периферической крови, т. е. ядросодержащие клетки в периферической крови; представляют собой PBL (лимфоциты периферической крови), такие как Т-клетки.

## Пример 1. Выделение PRAME-специфического клона Т-клеток.

Авторы настоящего изобретения использовали подход примирования *in vitro* для выделения клонов Т-клеток с любым требуемым ограничением по МНС и специфичностью к антигену. В системе примирования используются зрелые дендритные клетки (mDC) в качестве антигенпрезентирующих клеток и аутологические CD8<sup>+</sup>-обогащенные Т-клетки в качестве клеток-респондеров. *In vitro* транскрибированная РНК (ivtРНК), кодирующая полноразмерную аминокислотную последовательность PRAME человека в качестве эталонной в SEQ ID NO: 33, служит в качестве источника специфического антигена. После электропорации в mDC ivtРНК транслируется в полноразмерный белок, который затем процессируется и презентуется в виде пептидов молекулами МНС mDC.

Совместное культивирование *in vitro* Т-клеток с ivtРНК-трансфицированными mDC от одного и того же донора приводит к индукции *de novo* антигенспецифических Т-клеток, которые служат в качестве источника соответствующих ТCR. Антигенспецифические Т-клетки могут быть обогащены с помощью ряда способов и клонированы путем предельного разведения или выращивания отдельных клеток на основе FACS.

## Пример 1.1. Подход примирования с использованием зрелых дендритных клеток.

Примирование Т-клеток с помощью DC высокоаффинным ТCR осуществляли с использованием пептидной презентации аутологичными молекулами МНС в соответствии со следующими протоколом (фиг. 1): примирование HLA-A\*02:01/PRAME, через 8 дней получали mDC с использованием подходящих смесей для DC, загрузка APC: ivtРНК, обогащение с помощью мультимера HLA-A\*02:01 PRAME<sub>100-108</sub>, сортировка одиночных клеток с использованием технологии FACS.

## Пример 2. Анализ функций/специфичности.

После идентификации кандидатного клона Т-клеток (клон Т-клеток Т4.8-1-29), который распознает необходимый эпитоп PRAME (PRAME<sub>100-108</sub>), выполняли полное определение характеристик относительно функции и специфичности. Анализы включали определение паттерна секреции цитокинов выделенного клона Т-клеток (клона Т-клеток Т4.8-1-29) при совместном культивировании с разными линиями опухолевых клеток человека, способности клона специфически распознавать разные клетки-мишени, функциональной avidности клона и цитотоксичности в отношении Т2 и опухолевых клеток.

## Пример 2.1. Анализ исходного клона Т-клеток Т4.8-1-29.

## Пример 2.1.1. Анализ полицитоклинов.

Схема эксперимента: стимуляция нагруженными пептидом Т2-клетками.

Высвобождение цитокинов измеряли в соответствии со следующим протоколом:

анализ цитокинов Multiplex® выполняли с выявлением IFN-гамма, IL-2, TNF-альфа, IL-5, IL-10, IL-6, IL12p70, IL-4 и IL-1-бета,

стимулирующие клетки: Т2-клетки (HLA-A\*02<sup>полож</sup>), нагруженные насыщающими количествами (10<sup>-5</sup> М) PRAME<sub>100-108</sub> пептида ("VLD-пептида") или нерелевантного PRAME300-309, т.е. пептида ALYVDSLFFL ("ALY-пептида", SEQ ID NO: 230),

супернатанты Т-клеточных совместных культур с Т2-клетками, нагруженными релевантным и нерелевантным пептидом, собирали через 24 ч и затем измеряли с помощью анализа цитокинов Multiplex®. Результаты.

Кандидатный клон секретировал IFN-гамма, IL-2 и TNF-альфа (цитокины Th1/Tc1) выше фоновых уровней. Паттерн экспрессии цитокинов отражает фенотип Th1, который связан с высокой противоопухолевой эффекторной функцией (фиг. 2).

Секрецию IL-5 и IL-13 (цитокины Th2/Tc2) не определяли (н.о.).

Пример 2.2. Распознавание опухолевых клеток.

Схема эксперимента: стимуляция линиями опухолевых клеток.

ELISA IFN-гамма использовали для оценки секреции цитокинов после стимуляции группой линий опухолевых клеток человека (статус экспрессии PRAME выявляли с помощью анализа NanoString nCounter®).

Супернатанты собирали через 24 ч после совместного культивирования клона Т-клеток Т4.8-1-29 с K562-A2, Mel-624.38, Colo-678, 647-V и SuDHL-6 (все HLA-A\*02<sup>полож</sup>). Специфическую секрецию IFN-гамма оценивали с помощью стандартного ELISA.

Клетки-мишени

K562-A2 (HLA-A\*02<sup>полож</sup>, PRAME<sup>полож</sup>),

Mel-624.38 (HLA-A\*02<sup>полож</sup>, PRAME<sup>полож</sup>),

Colo-678 (HLA-A\*02<sup>полож</sup>, PRAME<sup>отриц</sup>),

647-V (HLA-A\*02<sup>полож</sup>, PRAME<sup>отриц</sup>),

SuDHL-6 (HLA-A\*02<sup>полож</sup>, PRAME<sup>отриц</sup>).

Результаты.

Клон Т-клеток Т4.8-1-29 характеризовался высокой секрецией IFN-гамма при совместном культивировании с PRAME<sup>полож</sup>, линиями HLA-A\*02<sup>полож</sup> опухолевых клеток K562-A2 и Mel-624.38 (положительный контроль: активированные пептидами Т2-клетки),

линии PRAME<sup>отриц</sup>, HLA-A\*02<sup>полож</sup> опухолевых клеток не распознавались клоном Т-клеток Т4.8 (отрицательные контроли; н.о., не определено), только линии опухолевых клеток, экспрессирующие HLA-A\*02 и PRAME, распознавались самоограниченным клоном Т-клеток Т4.8-1-29, свидетельствуя о специфичности к антигену (фиг. 3).

Пример 2.3. Функциональная avidность.

Схема эксперимента: стимуляция активированных пептидом Т2-клеток.

Функциональная avidность Т-клеток в отношении распознавания PRAME<sub>100-108</sub> (VLD)-пептида измеряли путем выявления секреции IFN-гамма после совместного культивирования клона Т4.8-1-29 с нагруженными пептидом Т2-клетками.

Клетки-мишени: Т2-клетки (HLA-A\*02<sup>полож</sup>, PRAME<sup>отриц</sup>), нагруженные титруемыми количествами экзогенного PRAME<sub>100-108</sub> (VLD)-пептида (от 10<sup>-5</sup> М до 10<sup>-12</sup> М).

Соотношение эффектор-мишень (Е:Т) составляет 1:1.

Относительное высвобождение IFN-гамма выражено в процентах от максимального высвобождения. ПолуМаксимальная секреция IFN-гамма, определяющая функциональную avidность, указана штрихпунктирными линиями.

Супернатанты культур собирали через ~24 ч после совместного культивирования и оценивали с помощью стандартного ELISA.

Результаты.

Клон Т4.8-1-29 характеризовался полуМаксимальной секрецией IFN-гамма при концентрации от приблизительно 1×10<sup>-9</sup> до 1×10<sup>-9</sup> моль/л [М] PRAME<sub>100-108</sub> пептида (среднее значение из двух независимых экспериментов), что лежит в пределах физиологического диапазона для вирус-специфических Т-клеток и, как сообщается, представляет собой необходимую функциональную avidность для высокой противоопухолевой эффективности (Aleksic, M. et al. Eur. J. Immunol.; 42 (12):3174-3179).

→ TCR Т4.8-1-29: ~1×10<sup>-9</sup> моль/л [М] (фиг. 4).

Пример 2.3. Анализ трансгенного Т-клеточного рецептора: TCR Т4.8-1-29.

После идентификации PRAME<sub>100-108</sub>-специфического клона Т-клеток Т4.8-1-29 следующая стадия включала выделение последовательности ДНК, кодирующей информацию о соответствующих цепях TCR, перенос клонированного TCR в соответствующие реципиентные Т-клетки и последующий функциональный анализ TCR-сконструированных Т-клеток.

Пример 2.3.1. Анализ последовательности Т-клеточного рецептора.

Последовательности ДНК альфа- и бета-цепей TCR исходного клона Т4.8-1-29 анализировали в собственной лаборатории с помощью секвенирования нового поколения (NGS-TCRseq). Соответствующие последовательности ДНК альфа- и бета-цепей TCR реконструировали с помощью синтеза генов на основе ДНК (GeneAgt, Регенсбург) и клонировали в каркасы вектора pGEM для продуцирования *in vitro* рНК, а также ретровирусные векторы для стабильной трансдукции.

Пример 2.3.2. Функциональная проверка трансгенного TCR.

Перенос последовательности TCR клона Т-клеток Т4.8-1-29 в реципиентные клетки.

Последовательности ДНК TCR исходного клона Т-клеток Т4.8-1-29 либо транскрибировали *in vitro* в РНК, кодирующую полноразмерные последовательности Т4.8-1-29 TCR для транзientной трансфекции реципиентных эффекторных клеток путем электропорации, либо использовали для стабильной трансдукции эффекторных клеток с помощью конструкций на основе ретровирусных векторов, также кодирующих последовательность полного TCR Т4.8-1-29.

Схема эксперимента: стимуляция активированных пептидом Т2-клеток.

Специфическую секрецию IFN-гамма TCR Т4.8-1-29-трансфицированными реципиентными Т-клетками (клон CD8<sup>полож</sup> реципиентных Т-клеток + Т4.8-1-29 *ivt*РНК) при совместном культивировании с активированными PRAME<sub>100-108</sub> (VLD)-пептидом Т2-клетками, измеряли с помощью стандартного ELISA.

Клетки-мишени: Т2-клетки (HLA-A\*02<sup>полож</sup>, PRAME<sup>отриц</sup>), активированные 10<sup>-5</sup> М VLD (релевантным) или "ELA-пептидом" (нерелевантным) (ELAGIGILTV, MelanA, SEQ IDNO: 231).

Результаты.

TCR Т4.8-1-29-трансфицированные реципиентные Т-клетки характеризовались высоким распознаванием Т2-клеток, нагруженных релевантным пептидом, однако распознавание в том случае, когда Т2-клетки нагружали нерелевантным пептидом, отсутствовало.

Последовательности ДНК альфа- и бета-цепей TCR Т4.8-1-29 реконструировали корректным образом и они характеризовались высокой эффективностью в качестве трансгенов (фиг. 5).

Пример 2.4. Анализ распознавания аутопептидов.

Схема эксперимента: секреция INF-гамма CD8<sup>+</sup> обогащенными PBMC, экспрессирующими TCR Т4.8-1-29 при совместном культивировании с нагруженными пептидом Т2-клетками

Секрецию INF-гамма CD8<sup>+</sup> обогащенными PBMC, экспрессирующими Т-клеточный рецептор клона Т4.8-1-29, совместно культивированных с клетками-мишенями Т2 (HLA-A\*02<sup>полож</sup>, PRAME<sup>отриц</sup>), нагруженными 10<sup>-5</sup> М PRAME<sub>100-108</sub> VLD-пептида или универсальными аутопептидами, элюированными из HLA-A\*02 (131 аутопептид), определяли с помощью анализа ELISA.

Результаты.

CD8 обогащенные PBMC, экспрессирующие Т-клеточный рецептор клона Т4.8-1-29, характеризовались отсутствием секреции INF-гамма в случае совместного культивирования с Т2-клетками (HLA-A\*02<sup>полож</sup>, PRAME<sup>отриц</sup>), нагруженными универсальными аутопептидами (положительный контроль: нагруженные PRAME<sub>100-108</sub> Т2-клетки), отражающей высокую специфичность TCR 4.8-1-29 (фиг. 6).

Пример 2.5. Анализ цитотоксичности.

Схема эксперимента: лизис активированных пептидом Т2-клеток.

Лизис активированных PRAME<sub>100-108</sub> (VLD) пептидом Т2-клеток измеряли с помощью флуоресцентного киллинг-анализа TVA<sup>TM</sup> (CTL, Cellular Technology Limited, США), определяющего исчезновение флуоресцентно меченых клеток-мишеней в ходе совместного культивирования с CD8 обогащенными PBMC, экспрессирующими Т4.8-1-29 TCR.

Клетки-мишени: Т2-клетки (HLA-A\*02<sup>полож</sup>, PRAME<sup>отриц</sup>), активированные 10<sup>-5</sup> М PRAME<sub>100-108</sub> VLD (релевантным) или SLL (SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 229), PRAME, нерелевантным) пептидом, совместно культивируемым с TCR Т4.8-1-29, экспрессирующими PBMC при оцененных соотношениях Е:Т.

Результаты.

Т4.8-1-29, экспрессирующие PBMC, характеризовались эффективным лизисом Т2-клеток, нагруженных релевантным (VLD) пептидом даже при низких соотношениях Е:Т.

Т2-клетки, нагруженные нерелевантным SLL-пептидом (PRAME), не лизировались (отрицательный контроль) при любом соотношении Е:Т (фиг. 7).

Схема эксперимента: лизис опухолевых клеток.

Цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток анализировали с помощью флуоресцентного киллинг-анализа TVA<sup>TM</sup> (CTL, Cellular Technology Limited, США), выявляющего исчезновение флуоресцентно меченых клеток-мишеней в ходе совместного культивирования с PBMC, экспрессирующими трансгенный TCR клона Т-клеток Т4.8-1-29.

Клетки-мишени: для экспериментов использовали линию опухолевых клеток человека K562. Клетки K562 трансфицировали с использованием *ivt*РНК, кодирующей HLA-A\*02:01 человека, и/или РНК, кодирующей PRAME человека. Клетки K562 человека характеризуются эндогенной экспрессией PRAME (определенной с помощью Nanonstring и описанной в литературе). Кроме того, экспрессия PRAME повышалась в результате трансфекции клеток K562 *ivt*РНК, кодирующей PRAME человека, или в результате загрузки PRAME<sub>100-108</sub> VLD- пептида.

K562, трансфицированные *ivt*РНК, кодирующей HLA-A\*02:01, или нагруженные PRAME<sub>100-108</sub> (VLD)-пептидом: K562- (PRAME<sup>+/A2<sup>-</sup>) + A2-*ivt*РНК + VLD пептид (фиг. 8А).</sup>

K562, трансдуцированные *ivt*РНК, кодирующие PRAME: K562-(PRAME<sup>+/A2<sup>-</sup>) + PRAME-*ivt*РНК</sup>

(фиг. 8B).

K562, трансфицированные *ivtPHK*, кодирующей PRAME, и *ivtPHK*, кодирующей HLA-A\*02: K562-(PRAME<sup>+</sup>/A2)+A2-*ivtPHK* (фиг. 8C).

K562, трансфицированные *ivtPHK*, кодирующей HLA-A\*02 *ivtPHK*: K562-(PRAME<sup>+</sup>/A2)+A2-*ivtPHK* + PRAME *ivtPHK* (фиг. 8D).

Опухолевые клетки, кокультивируемые с TCR T4.8-1-29-экспрессирующими PBMC в оцененных соотношениях E:T.

Результаты.

Трансфекция PRAME *ivtPHK*, а также VLD-пептидом, нагруженным HLA-A\*02:01-экспрессирующими K562-клетками, повышала специфический лизис PBMC, экспрессирующих трансгенный TCR T4.8-1-29 (фиг. 8A-D).

Пример 2.5. Распознавание опухолевых клеток CD8<sup>+</sup> обогащенными PBMC-экспрессирующими TCR T4.8-1-29.

Схема эксперимента: стимуляция линиями опухолевых клеток

ELISA IFN-гамма использовали для оценки секреции цитокинов после стимуляции группой линий опухолевых клеток человека (статус экспрессии PRAME выявляли с помощью анализа NanoString nCounter®).

Супернатанты собирали через 24 ч совместного культивирования CD8 обогащенных PBMC, экспрессирующих T-клеточный рецептор T4.8-1-29 с K562-B35, K562-A2, Mel-624.38, Colo-678 и SKMEL23. Специфическую секрецию IFN-гамма оценивали с помощью стандартного ELISA.

Клетки-мишени

K562-B35	(HLA-A*02 <sup>отриц</sup> , PRAME <sup>полож</sup> ),
K562-A2	(HLA-A*02 <sup>полож</sup> , PRAME <sup>полож</sup> ),
K562-A2	(HLA-A*02 <sup>полож</sup> , PRAME <sup>полож</sup> ), нагруженные VLD-пептидом,
Mel-624.38	(HLA-A*02 <sup>полож</sup> , PRAME <sup>полож</sup> ),
SKMEL23	(HLA-A*02 <sup>полож</sup> , PRAME <sup>полож</sup> ).

Результаты.

CD8<sup>+</sup> обогащенные PBMC, экспрессирующие T-клеточный рецептор T4.8-1-29, характеризовались высокой секрецией IFN-гамма при совместном культивировании с PRAME<sup>pos</sup>, линиями HLA-A\*02<sup>pos</sup> опухолевых клеток K562-A2, K562-A2, дополнительно нагруженными VLD-пептидом, промежуточной секрецией INF-гамма при совместном культивировании с PRAME<sup>полож</sup>, HLA-A\*02<sup>полож</sup> Mel-624.38 и SKMEL23.

Экспрессия PRAME<sup>полож</sup> K562 с HLA-B\*35 не индуцировала секрецию INF-гамма, что подтверждало ограничение HLA-A\*02 TCR T4.8-1-29 (фиг. 10).

Пример 2.6. Трансдукция PBMC TCR T4.8-1-29.

CD8-обогащенные PBMC здорового донора трансдуцировали плазмидой, содержащей конструкцию TCR T4.8-1-29. Для анализа эффективности трансдукции TCR осуществляли FACS-анализ после окрашивания нетрансдуцированных и TCR T4.8-1-29-трансдуцированных PBMC. Клетки окрашивали антителами, специфическими к CD8 и к вариабельному участку TCR β-цепи TCR (TRBV9). В популяции контрольных эффекторных клеток присутствовало 8% эндогенно TRBV9-экспрессирующих T-клеток, в то время как после трансдукции 60% T-клеток экспрессировали TRBV9. Это указывает на эффективность трансдукции, которая составляла более 50% (фиг. 11).

Пример 2.7. Функциональная avidность T-клеток по отношению к PRAME<sub>100-108</sub> (VLD) пептиду с использованием клона T-клеток T4.8-1-29 и PBMC, трансдуцированных TCR T4.8-1-29.

Функциональную avidность T-клеток по отношению к распознаванию PRAME<sub>100-108</sub> (VLD)-пептида измеряли путем выявления секреции IFN-гамма после совместного культивирования либо с клоном T-клеток T4.8-1-29 (сплошная кривая), либо с эффекторными PBMC, трансдуцированными T4.8-1-29 (пунктирная кривая) с помощью нагруженных пептидом T2-клеток. T2-клетки нагружали титруемыми количествами пептида, концентрация которого варьировала от 10<sup>-5</sup> М до 10<sup>-12</sup> М. Супернатанты совместной культуры собирали через ~24 ч после совместного культивирования и оценивали с помощью стандартного ELISA, при этом относительное высвобождение IFN-гамма выражено в процентах от максимального высвобождения. Полумаксимальная секреция IFN-гамма (EC50), определяющая функциональную avidность, указана штрих-пунктирной линией. Функциональная avidность клона исходных T-клеток и трансгенных TCR является весьма схожей (фиг. 12). Пример 2.8. Анализ специфичности к антигену PBMC, трансдуцированных TCR T4.8-1-29, и нетрансдуцированных контрольных PBMC с различными целевыми клетками (OPM-2 и U937)

Для анализа специфичности к антигену, T4.8-1-29-трансдуцированные эффекторные PBMC и нетрансдуцированные контрольные PBMC совместно культивировали с различными целевыми клетками. Линии опухолевых клеток OPM-2 и U937 (HLA-A2-отрицательные и PRAME-отрицательные) тестировали либо немодифицированными, либо трансфицированными *ivtPHK*, кодирующей HLA-A2. Кроме того, клетки также тестировали после трансфекции комбинацией *ivtPHK*, кодирующей HLA-A2 и PRAME, или

HLA-A2 и нерелевантного антигена. В качестве контроля эффекторные клетки также совместно культивировали с T2-клетками, нагруженными PRAME<sub>VLD</sub> пептидом ( $10^{-5}$ М) или нерелевантным PRAME<sub>SLL</sub> пептидом ( $10^{-5}$ М). Через 24 ч совместного культивирования супернатанты собирали и секретированные количества IFN-гамма измеряли с помощью стандартного ELISA. Высокие количества IFN-гамма измеряли в случае TCR-трансдуцированных PBMC в совместной культуре с VLD-нагруженными T2-клетками. Кроме того, обе из линий опухолевых клеток, трансфицированные HLA-A2 и антигеном PRAME, индуцировали секрецию IFN-гамма TCR-трансдуцированными PBMC. Таким образом, лишь опухолевые клетки, экспрессирующие HLA-A2 в качестве необходимого элемента ограничения МНС, в комбинации с антигеном PRAME, распознавались и приводили к активации T4.8-1-29-экспрессирующих PBMC (фиг. 13).

Пример 2.9. Анализ специфичности к антигену PBMC, трансдуцированных TCR T4.8-1-29, и нетрансдуцированных контрольных PBMC с различными клетками-мишенями (K562, K562\_A2 и Mel 624.38).

Для анализа специфичности к антигену, T4.8-1-29-трансдуцированные эффекторные PBMC и нетрансдуцированные контрольные PBMC совместно культивировали с различными линиями клеток-мишеней. Тестировали линии опухолевых клеток K562 (HLA-A2- отрицательные и PRAME-положительные), а также K562\_A2 и Mel 624.38 (HLA-A-положительные и PRAME-положительные) и 647-V (HLA-A2-положительные и PRAME-отрицательные). В качестве контроля эффекторные клетки также совместно культивировали с T2-клетками, нагруженными PRAME<sub>VLD</sub> пептидом ( $10^{-5}$  М) или нерелевантным PRAME<sub>SLL</sub> пептидом ( $10^{-5}$ М). Через 24 ч совместного культивирования супернатанты собирали и секретированные количества IFN-гамма измеряли с помощью стандартного ELISA. Высокие количества IFN-гамма измеряли в случае TCR-трансдуцированных PBMC в совместной культуре с VLD-нагруженными T2-клетками.

Измеренные значения IFN-гамма указывали на активацию TCR T4.8-1-29-трансдуцированных PBMC T2-клетками, нагруженными VLD-пептидом, и линиями опухолевых клеток K562\_A2 и Mel624.38. Таким образом, только HLA-A2-положительные эндогенно PRAME-экспрессирующие линии опухолевых клеток распознавались трансдуцированными PBMC, в то время как отсутствие либо HLA-A2, либо антигена предупреждало активацию (фиг. 14).

Пример 2.10. Анализ цитотоксической активности T4.8-1-29-трансдуцированных эффекторов в отношении опухолевых клеток.

Цитотоксическую активность T4.8-1-29-трансдуцированных эффекторов в отношении опухолевых клеток анализировали с помощью системы для анализа живых клеток IncuCyte ZOOM® (Essenbiosciences), системы на основе микроскопа, которая позволяет визуализацию живых клеток. TCR T4.8-1-29-трансдуцированные и нетрансдуцированные эффекторные PBMC совместно культивировали с HLA-A2-положительной, PRAME-положительной клеточной линией меланомы Mel624.38. Клетки меланомы высевали в 96-луночный планшет и при достижении конfluence, составляющей ~60%, добавляли эффекторные клетки. Для визуализации гибели клеток также добавляли красный V-краситель аннексин и изображение снимали ежедневно в течение 4 дней. Линию клеток меланомы Mel624.38 в совместной культуре с нетрансдуцированными эффекторами (верхний ряд) выращивали в динамике, и при этом могли отмечаться только редкие случаи гибели клеток, в то время как TCR-трансдуцированные эффекторы предупреждали разрастание опухолевых клеток и приводили к образованию скоплений клеток с высоким количеством погибающих клеток. Это указывает на то, что T4.8-1-29-экспрессирующие эффекторные клетки могут эффективно лизировать PRAME-экспрессирующие опухолевые клетки и предупреждать рост опухолевых клеток в течение нескольких дней.

Пример 2.11. Анализ профиля безопасности T4.8-1-29-экспрессирующих PBMC.

Для анализа профиля безопасности T4.8-1-29-экспрессирующих PBMC, необходимо было исключить распознавание нормальных тканей человека. Таким образом, T4.8-1-29-трансдуцированные PBMC, происходящие от двух различных доноров, совместно культивировали с клетками, происходящими из нормальных тканей HLA-A2-положительных доноров. В качестве примера трансдуцированные, а также нетрансдуцированные PBMC совместно культивировали с эпителиальными клетками капилляров почек человека (HRCер). В качестве контроля клетки HRCер дополнительно нагружали VLD-пептидом ( $10^{-5}$  М). Через 24 ч совместного культивирования супернатанты собирали и секретированные количества IFN-гамма измеряли с помощью стандартного ELISA. TCR-трансдуцированные PBMC активировались только при совместном культивировании с нагруженными пептидом целевыми клетками, в то время как распознавание немодифицированных клеток HRCер отсутствовало.

Основные признаки настоящего изобретения перечислены в следующих пунктах.

1. Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий:

- (i) CDR3 варибельного участка альфа-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность SAVHSTAQAGTALIF (SEQ ID NO: 1) или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 1, или состоящий из нее, и/или
- (ii) CDR3 варибельного участка бета-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность

CASSTHRGQTNVGYTF (SEQ ID NO: 2) или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 2, или состоящий из нее, при этом указанный TCR способен связываться с эпитопом, содержащимся в аминокислотной последовательности X1LX2GLDX3LL (SEQ ID NO: 31) или ее MHC-связанной форме, предпочтительно эпитопом, содержащимся в аминокислотной последовательности VLDGLDVLL (SEQ ID NO: 32) или ее MHC-связанной форме.

2. TCR по п.1, содержащий:

(i) вариабельный участок альфа-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, или состоящий из нее, и/или

(ii) вариабельный участок бета-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или состоящий из нее.

3. TCR по любому из пп.1 или 2, дополнительно содержащий:

(i) константный участок альфа-цепи TCR и/или

(ii) константный участок бета-цепи TCR.

4. TCR по любому из предыдущих пунктов, содержащий:

(i) альфа-цепь TCR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13, или

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 7, 11, 9 или 13, или состоящую из нее, и/или

(ii) бета-цепь TCR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична, более предпочтительно на 90 или 95% идентична SEQ ID NO: 8, 10, 12 или 14, или состоящую из нее.

5. TCR по любому из предыдущих пунктов, при этом указанный TCR выбран из нативного TCR, варианта TCR, фрагмента TCR или TCR-конструкции.

6. TCR-конструкция по п.5, содержащая по меньшей мере одну альфа-цепь(цепи) TCR и по меньшей мере одну бета-цепь(цепи) TCR, ковалентно связанные друг с другом с образованием гетеродимеров или мультимеров TCR.

7. TCR по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащий один или более слитых компонентов, необязательно выбранных из Fc-рецепторов; Fc-доменов, в том числе IgA, IgD, IgG, IgE и IgM; цитокинов, в том числе IL-2 или IL-15; токсинов; антител или их антигенсвязывающих фрагментов, в том числе антител к CD3, к CD28, к CD5, к CD16 или к CD56 или их антигенсвязывающих фрагментов; CD247- (CD3-дзета), CD28-, CD137-, CD134-домена или их комбинаций, необязательно дополнительно содержащих по меньшей мере один линкер.

8. TCR по любому из предыдущих пунктов, содержащий:

(i) по меньшей мере одну альфа-цепь TCR, определенную в любом из пп.1-3, и

(ii) по меньшей мере одну бета-цепь TCR, определенную в любом из пп.1-3,

(iii) антитело или фрагмент одноцепочечного антитела (scFv), которые направлены против антигена или эпитопа на поверхности лимфоцитов, где альфа-цепь(цепи) TCR и бета-цепь(цепи) TCR связаны друг с другом и слиты с указанным антителом или scFv необязательно посредством линкера.

9. TCR по п.8, где указанный антиген выбран из CD3, CD28, CD5, CD16 или CD56.

10. TCR по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащий по меньшей мере одну метку.

11. TCR по любому из предыдущих пунктов, который является растворимым.

12. Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR по любому из предыдущих пунктов.

13. Нуклеиновая кислота по п.12, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30.

14. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.12 или 13.

15. Клетка-хозяин, содержащая TCR по любому из пп.1-11, последовательность нуклеиновой кислоты по п.12 или 13 или вектор по п.14.

16. Клетка-хозяин по п.15, которая выбрана из лимфоцитов, в том числе без ограничения цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), CD8<sup>+</sup> Т-клеток, CD4<sup>+</sup> Т-клеток, естественных киллерных (NK) клеток, естественных киллерных (NKT) Т-клеток, гамма/дельта-Т-клеток.

17. Способ получения TCR по любому из пп.1-11, предусматривающий:

(i) инкубацию клетки-хозяина по п.15 или 16 в условиях, вызывающих экспрессию указанного TCR, (ii) очистку указанного TCR.

18. Фармацевтическая или диагностическая композиция, содержащая одно или более из:

(i) TCR по любому из пп.1-11,

(ii) нуклеиновой кислоты по любому из пп.12 или 13,

(iii) вектора по п.14 и/или

(iv) клетки-хозяина по любому из пп.15 или 16,

и необязательно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество(вещества).

19. TCR по любому из пп.1-11, нуклеиновая кислота по п.12 или 13, вектор по п.14 и/или клетка-хозяин по п.15 или 16 для применения в качестве лекарственного препарата.

20. TCR по любому из пп.1-11, нуклеиновая кислота по п.12 или 13, вектор по п.14 и/или клетка-хозяин по п.15 или 16 для применения в выявлении, диагностике, прогнозировании, предупреждении и/или лечении рака.

21. TCR, нуклеиновая кислота, вектор и/или клетка-хозяин для применения по п.20, где предупреждение и/или лечение рака предусматривает:

(a) обеспечение одного или более из:

- (i) TCR по любому из пп.1-11,
- (ii) нуклеиновой кислоты по любому из пп.12 или 13,
- (iii) вектора по п.14 и/или
- (iv) клетки-хозяина по любому из пп.15 или 16,
- (v) фармацевтической композиции по п.18, и

(b) введение по меньшей мере одного из (i)-(v) нуждающемуся в этом субъекту.

22. TCR, нуклеиновая кислота, вектор и/или клетка-хозяин для применения по п.20, где предупреждение и/или лечение рака предусматривает:

(a) обеспечение образца от субъекта, при этом указанный образец содержит лимфоциты,

(b) обеспечение одного или более из:

- (i) TCR по любому из пп.1-11,
- (ii) нуклеиновой кислоты по любому из пп.12 или 13,
- (iii) вектора по п.14 и/или
- (iv) клетки-хозяина по любому из пп.15 или 16,
- (v) фармацевтической композиции по п.18,

(c) применение одного или более из (i)-(v) из стадии (b) по отношению к лимфоцитам из стадии (a), за счет чего обеспечивается получение модифицированных лимфоцитов,

(d) введение модифицированных лимфоцитов из стадии (c) нуждающимся в этом субъекту или пациенту.

23. Способ выявления наличия рака у субъекта *in vitro*, предусматривающий:

(a) обеспечение образца от субъекта, при этом указанный образец содержит одну или более клеток,

(b) приведение указанного образца в контакт с:

- (i) TCR по любому из пп.1-11,
- (ii) клеткой-хозяином по любому из пп.15 или 16 и/или
- (iii) фармацевтической композицией по п.18,

за счет чего образуется комплекс, и

(c) выявление комплекса, где выявление комплекса свидетельствует о наличии рака у субъекта.

24. Применение TCR по любому из пп.1-11, нуклеиновой кислоты по любому из пп.12 или 13 и/или вектора по п.14 для получения модифицированных лимфоцитов.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. PRAME-специфический Т-клеточный рецептор (TCR), содержащий альфа-цепь TCR и бета-цепь TCR, для диагностики, прогнозирования, предупреждения или лечения PRAME-экспрессирующего рака, содержащий:

(i) вариабельный участок альфа-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, или состоящий из нее, и

(ii) вариабельный участок бета-цепи TCR, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или состоящий из нее,

при этом указанный TCR способен связываться с PRAME-специфическим эпитопом, содержащимся в аминокислотной последовательности VLDGLDVLL (SEQ ID NO: 32) или ее МНС-связанной форме.

2. PRAME-специфический TCR по п.1, содержащий:

(i) альфа-цепь TCR, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13 или состоящую из нее, и

(ii) бета-цепь TCR, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14 или состоящую из нее.

3. PRAME-специфический TCR по п.1 или 2, содержащий:

(i) альфа-цепь TCR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 13, или состоящую из нее, и

(ii) бета-цепь TCR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14, или состоящую из нее.

4. PRAME-специфический TCR по любому из предыдущих пунктов, где указанный TCR представ-



ляет собой TCR-конструкцию.

5. PRAME-специфический TCR по п.4, где TCR-конструкция содержит по меньшей мере одну альфа-цепь(цепи) TCR и по меньшей мере одну бета-цепь(цепи) TCR, ковалентно связанные друг с другом с образованием гетеродимеров или мультимеров TCR.

6. PRAME-специфический TCR по п.4 или 5, дополнительно содержащий один или более слитых компонентов, необязательно выбранных из Fc-рецепторов; Fc-доменов, в том числе IgA, IgD, IgG, IgE и IgM; цитокинов, в том числе IL-2 или IL-15; токсинов; антител или их антигенсвязывающих фрагментов, в том числе антител к CD3, к CD28, к CD5, к CD16 или к CD56 или их антигенсвязывающих фрагментов; CD247- (CD3-дзета), CD28-, CD137-, CD134-домена или их комбинаций, необязательно дополнительно содержащих по меньшей мере один линкер.

7. PRAME-специфический TCR по п.6, содержащий:

(i) по меньшей мере одну альфа-цепь TCR, определенную в п.2, и

(ii) по меньшей мере одну бета-цепь TCR, определенную в п.2,

(iii) антитело или фрагмент одноцепочечного антитела (scFv), которые направлены против антигена на поверхности лимфоцитов, где указанный антиген выбран из CD3, CD28, CD5, CD16 или CD56,

где альфа-цепь(цепи) TCR и бета-цепь(цепи) TCR связаны друг с другом и слиты с указанным антителом или scFv необязательно посредством линкера.

8. Нуклеиновая кислота, кодирующая PRAME-специфический TCR по любому из предыдущих пунктов.

9. Нуклеиновая кислота по п.8, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30.

10. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.8 или 9.

11. Клетка-хозяин, содержащая PRAME-специфический TCR по любому из пп.1-7, последовательность нуклеиновой кислоты по п.8 или 9 или вектор по п.10, где указанная клетка-хозяин выбрана из лимфоцитов, в том числе без ограничения цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), CD8<sup>+</sup> Т-клеток, CD4<sup>+</sup> Т-клеток, естественных киллерных (NK) клеток, естественных киллерных (NKT) Т-клеток, гамма/дельта-Т-клеток.

12. Способ получения PRAME-специфического TCR по любому из пп.1-7, предусматривающий:

(i) инкубацию клетки-хозяина, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты по п.8 или 9 или вектор по п.10 в условиях, вызывающих экспрессию указанного TCR, где указанная клетка-хозяин выбрана из лимфоцитов, в том числе без ограничения цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), CD8<sup>+</sup> Т-клеток, CD4<sup>+</sup> Т-клеток, естественных киллерных (NK) клеток, естественных киллерных (NKT) Т-клеток, гамма/дельта-Т-клеток,

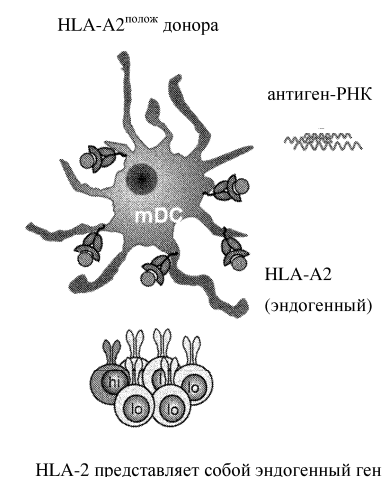
(ii) очистку указанного TCR.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая PRAME-специфический TCR по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество(вещества).

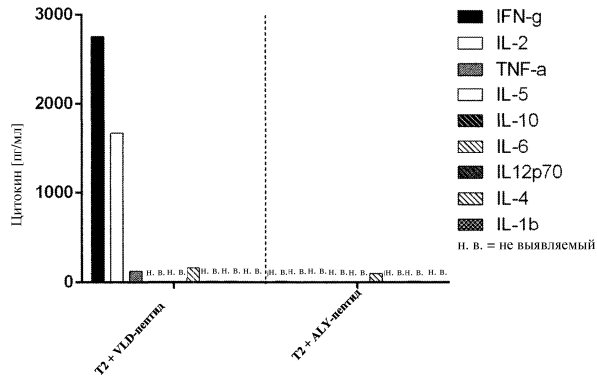
14. Фармацевтическая композиция, содержащая нуклеиновую кислоту по п.8 или 9 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество(вещества).

15. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку-хозяина по п.11 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество(вещества).

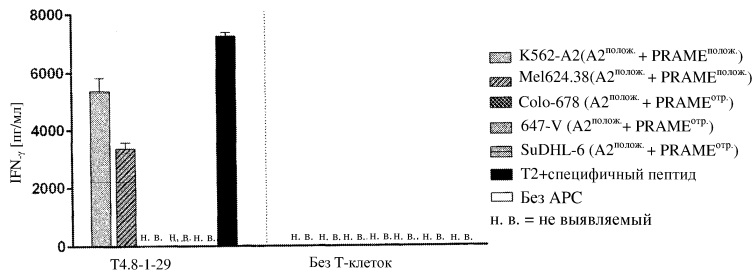
16. Диагностическая композиция для диагностики PRAME-экспрессирующего рака, содержащая PRAME-специфический TCR по любому из пп.1-7 и одно или более диагностических средств.



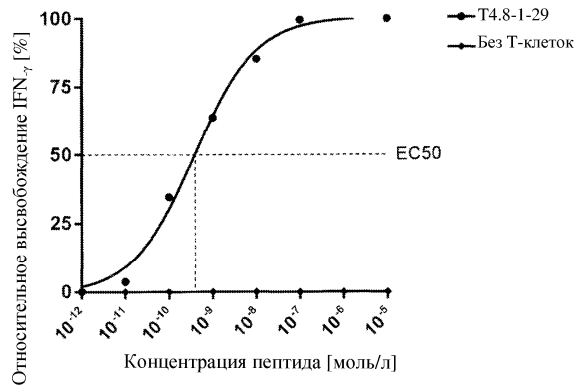
Фиг. 1



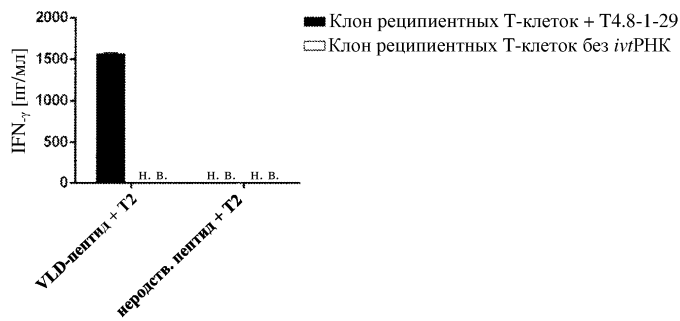
Фиг. 2



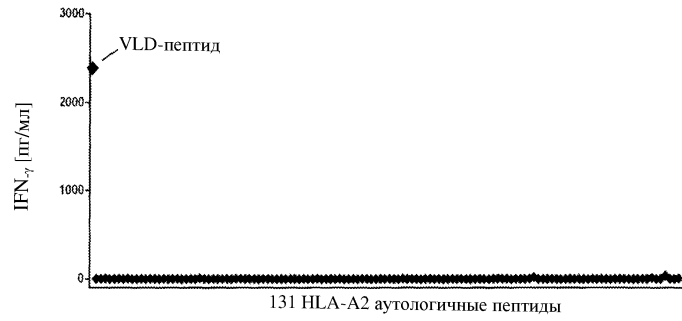
Фиг. 3



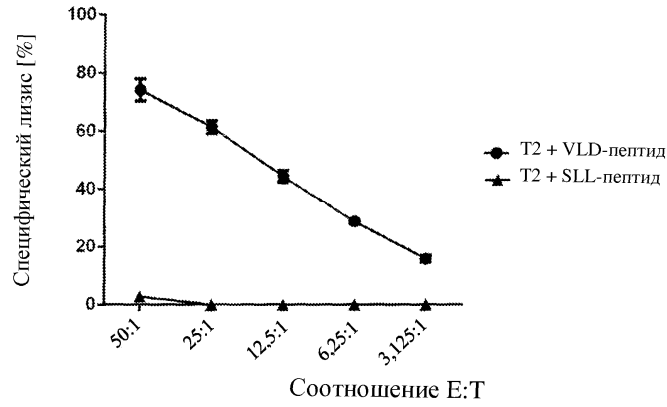
Фиг. 4



Фиг. 5

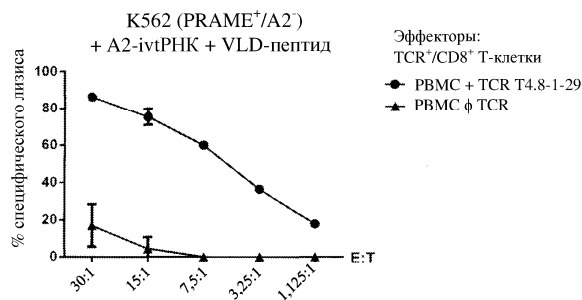


Фиг. 6

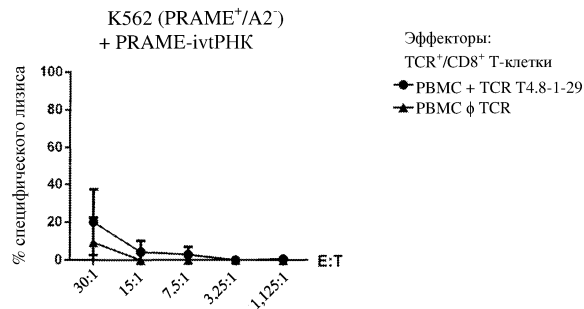


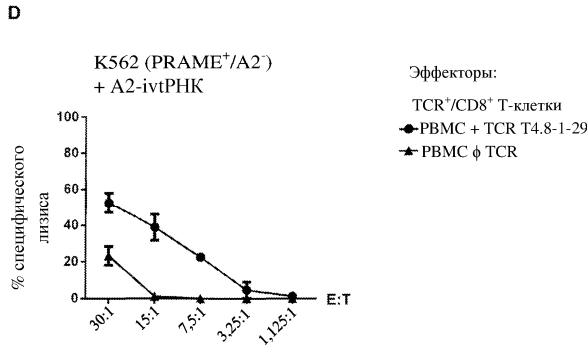
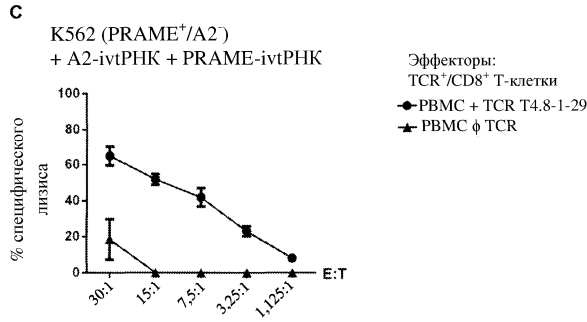
Фиг. 7

**A** Положительный контроль



**B** Отрицательный контроль





Фиг. 8

**SEQ ID NO: 11 TCR альфа**

```

MEKMLECAPI VLWLQGLWLS GEDQVTSPE ALRLQEGESS SLNCSYTVSG LRGLFWYRQD 60
PGKGFPELFT LYSAGEEKEK ERLKATLTKK ESFLHITAPK PEDSATVLCVHSSTAGNGTA 120
LPLGKGTLS VSSNIQNDP AVYQLRDSKS SDKSVCLFTD FDSQTNVSGS KSDVYITDK 180
CVLDMRSHDF KNSAVAWSN KSDFACANAF NNSLIPEDTF FSSDVPDGV KLVEKSFETD 240
TNLNEQNLV IGRILLKLV AGFLLMLTLR LWSS 274
    
```

**SEQ ID NO: 12 TCR бета**

```

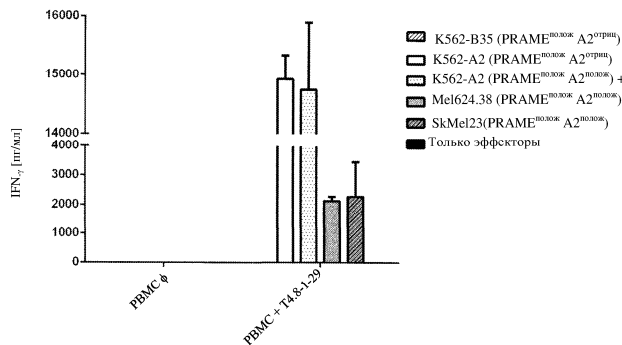
MGFELLCQVA FCLLGGAPVD SGVTQTPKHL ITATGORVTL RQSPRSGDLS VVWYQOSLDO 60
GLQELIQYYN GEERAKGNIL FRFSAQFPD LHSLENLSSL ELGDSALYFCASSSTHCQNTM 120
VYVTEGSGTR LTVVEDLNKV FPPEVAVFEP SKAEIANTQK ATLVCLATGF FPDHVELSWW 180
VNGKVVHSGV CTDPQPLKEQ PALNDSRYCL SRRLVVSATF WQNFNRHFRG QVQFYGLSEN 240
DEWTDQRAKF VTQIVSAEAM GRADCGITSA SYHQCVLSAT ILYEILLGKA TLYAVLVLSAL 300
VLMAMVRRKD F 311
    
```

**SEQ ID NO: 33 (PRAME)**

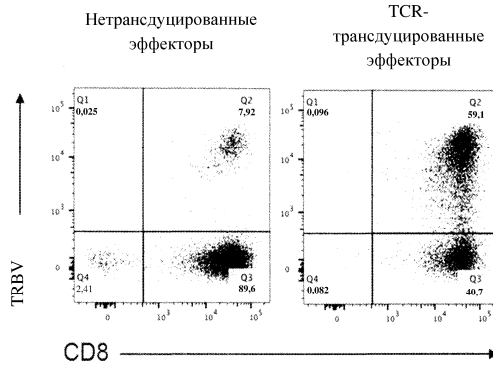
```

10 20 30 40 50
MERRRIRWGS I QSRVTSMSVW TSPRRLVELA GQSLKDEAL AIAALELLPR
60 70 80 90 100
ELFFPLEMAA FQGRHSQELK AMVQMPFTC LPLGVLMKQV HNHLETKAV
110 120 130 140 150
LDCIIVLLAQ EVRPRRWKIQ VLDRKNSHQ DEWTVWSGNR ASLYSPPEPE
160 170 180 190 200
AAQPMTRKKR VDGLSTAEAQ FFIPVEVLVD LFLKEGACDE LFSYLIKVKV
210 220 230 240 250
RKKVRLRCC KKLKIFAMFH QDIKMLIKVY QLDSTEDLEV TCTWKLPTIA
260 270 280 290 300
KFSFYLQMI NLRRLLSHI HASSYISPEK EEQYTAQFTS QFI STLQCIQA
310 320 330 340 350
LVVDSLFLR GRLDQLLRHV MNPLETSLIT NCRLSEGDMV HLSQSPSVSQ
360 370 380 390 400
LSVLSLQGMV LTVSPPELQ ALLERASATL QDLVFEQGI TDDQLLALLP
410 420 430 440 450
SLSHCSQIIT LSFYGNISIT SAIQSLQHL IGLSNLTHV YPVPLESYED
460 470 480 490 500
THGTLHLERL AYLHARLREL LCELGRPMV WLSANPQHC GDRTFYDPEP
ILPCPFMPN
    
```

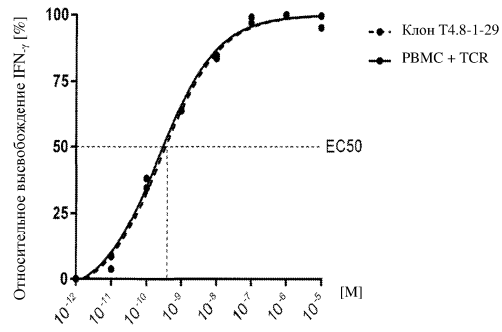
Фиг. 9



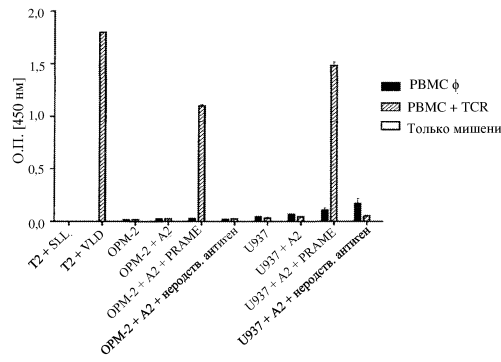
Фиг. 10



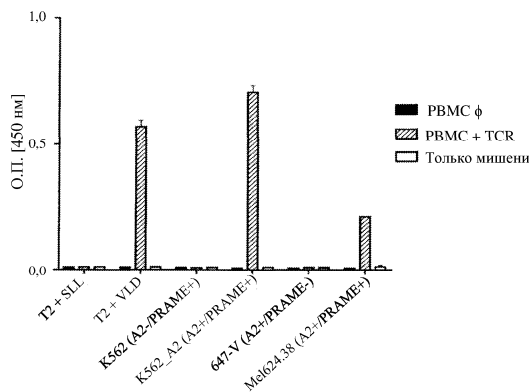
Фиг. 11



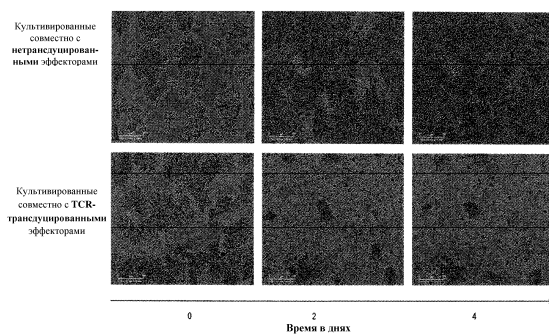
Фиг. 12



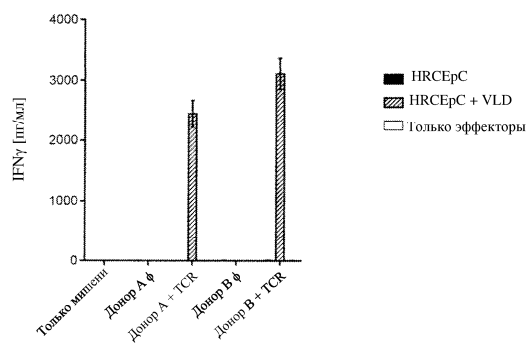
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16