

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392787** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.11

(22) Дата подачи заявки
2022.05.04

(51) Int. Cl. *C07K 16/30* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕ PRAME

(31) **21172351.5; 63/184,689**

(32) **2021.05.05**

(33) **EP; US**

(86) **PCT/EP2022/062017**

(87) **WO 2022/233956 2022.11.10**

(71) Заявитель:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Пезолла Габриэль, Хофманн Мартин,
Хутт Майке, Бунк Себастьян,
Унвердорбен Феликс, Швებель
Франк, Маурер Доминик, Яворски
Майке, Вагнер Клаудиа, Швёер
Флориан, Шустер Хейко (DE)**

(74) Представитель:
**Костюшенкова М.Ю., Строкова
О.В., Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатулина Е.М.
(RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, направленным против антигенов, происходящих из белка PRAME. Настоящее изобретение, в частности, относится к антигенсвязывающим белкам, которые являются специфическими в отношении экспрессируемого опухолью антигена PRAME, причем опухольный антиген включает или состоит из SEQ ID NO: 50 и находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС). Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению содержат, в частности, определяющие комплементарность области (CDR) новых сконструированных Т-клеточных рецепторов (TCR), которые специфически связываются с указанным пептидом PRAME. Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению предназначены для применения для диагностики, лечения и профилактики раковых заболеваний, для которых характерна экспрессия PRAME. Кроме того, настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению, векторам, содержащим указанные нуклеиновые кислоты, рекомбинантным клеткам, экспрессирующим антигенсвязывающие белки, и фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению.

A1

202392787

202392787

A1

АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕ

PRAME

ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, направленным против антигенов, происходящих из белка PRAME. Настоящее изобретение, в частности, относится к антигенсвязывающим белкам, которые являются специфическими в отношении экспрессируемого опухолью антигена PRAME, причем опухолевый антиген включает или состоит из SEQ ID NO: 50 и находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС). Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению содержат, в частности, определяющие комплементарность области (CDR) новых сконструированных Т-клеточных рецепторов (TCR), которые специфически связываются с указанным пептидом PRAME. Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению предназначены для применения для диагностики, лечения и профилактики раковых заболеваний, для которых характерна экспрессия PRAME. Кроме того, настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению, векторам, содержащим указанные нуклеиновые кислоты, рекомбинантным клеткам, экспрессирующим антигенсвязывающие белки, и фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению.

PRAME относится к «преимущественно экспрессируемому антигену при меланоме» и принадлежит к семейству антигенов, кодируемых зародышевой линией, известных как антигены рака яичка. Антигены рака яичек являются мишенью иммунотерапевтического вмешательства. PRAME экспрессируется в ряде солидных опухолей, а также при лейкозах и лимфомах. Пептид SLLQHLLIGL (SEQ ID NO : 50), также называемый PRAME-004, соответствует аминокислотам 425-433 полноразмерного белка PRAME (SEQ ID NO : 328), и указанный пептид презентирован на поверхности клетки в виде комплекса с молекулой МНС, в частности HLA-A*02 (Kessler *et al.*, J Exp Med. 2001 Jan 1, 193(1):73-88). Пептидные эпитопы, презентруемые молекулами МНС, могут связываться ТCR.

Хотя были достигнуты успехи в разработке лекарственных средств молекулярного действия для терапии рака, в данной области сохраняется потребность в разработке новых противораковых агентов, которые специфически нацелены на молекулы, высокоспецифические для раковых клеток, но не для клеток нормальных тканей. Поскольку

пептид PRAME-004 специфически экспрессируется на опухолях, он является мишенью для иммунотерапии на основе Т-клеток.

В WO 2018/172533 раскрыты TCR, включая TCR R11P3D3, которые связываются с пептидом PRAME-004 в комплексе с белковым комплексом МНС, и применение указанных TCR для диагностики, лечения и профилактики раковых заболеваний, которые (чрезмерно) экспрессируют PRAME. Однако эти TCR не были сконструированы в областях CDR для связывания с целевым антигеном с повышенной аффинностью.

Нативные TCR связываются с антигенами, презентированными МНС, обычно с низкой аффинностью (K_D = от 300 мкМ до 1 мкМ), при этом связывание с аутоантигенами рака, презентированными МНС, редко наблюдается с аффинностью выше 10 мкМ, в отличие от вирусных чужеродных антигенов, для которых хорошо установлены аффинности связывания TCR в диапазоне 1-10 мкМ (Aleksic *et al.* 2012, Eur J Immunol. 2012 Dec,42(12):3174-9). Частично это явление объясняется тем, что Т-клетки, которые развиваются в тимусе, подвергаются негативному отбору по лигандам собственных пептидов МНС, так что Т-клетки со слишком высокой аффинностью в отношении таких собственных пептидов МНС удаляются (индукция толерантности). Эта низкая аффинность TCR в отношении аутоантигенов рака может быть одним из возможных объяснений ускользания опухоли от иммунитета (Aleksic *et al.* 2012, Eur J Immunol. 2012 Dec,42(12):3174-9). Таким образом, представляется желательной стратегией разработать варианты TCR, которые связываются с более высокой аффинностью с аутоантигенами рака, для применения в качестве антигенраспознающих конструкций в адоптивной клеточной терапии (АСТ). Кроме того, желательно сконструировать варианты TCR с высокой аффинностью, которые могут экспрессироваться в виде растворимого белка, для нацеливания на аутоантигены рака с помощью растворимых терапевтических средств, то есть с использованием биспецифических молекул (Hickman *et al.* 2016, J Biomol Screen. 2016 Sep,21(8):769-85).

Однако повышение аффинности TCR может также увеличить риск побочных эффектов. Как упоминалось выше, в природе TCR с высокой аффинностью, направленные против опухолеассоциированных антигенов, которые являются собственными белками, исключаются посредством тимусного отбора, чтобы избежать распознавания собственных пептидов, присутствующих в нормальной ткани, посредством перекрестной реактивности. Соответственно, простое увеличение аффинности TCR к его целевой последовательности, вероятно, также увеличит аффинность к аналогичным неспецифическим для рака пептидам и, следовательно, увеличит риск перекрестной реактивности и нежелательного цитотоксического воздействия на здоровые ткани. То, что это не просто теоретический

риск, было обнаружено для сконструированных TCR, нацеленных на MAGE-A3. В частности, ранее опубликованные результаты показали летальную токсичность у двух пациентов, которым вводили Т-клетки, сконструированные для экспрессии TCR, нацеленного на MAGE-A3, перекрестно реагирующие с пептидом мышечного белка титина, хотя перекрестная реактивность не была предсказана в доклинических исследованиях (Linette GP *et al.* Blood 2013, 122:863–71, Cameron BJ, *et al.* Sci. Transl. Med. 2013, 5: 197-103). Эти пациенты продемонстрировали, что Т-клетки, сконструированные с TCR, могут иметь серьезную и непредсказуемую нецелевую и органоспецифическую токсичность.

Соответственно, существует неудовлетворенная медицинская потребность в разработке и предоставлении антигенсвязывающих белков, специфически связывающихся со своей мишенью с более высокой аффинностью, что позволяет воздействовать даже на опухолевые клетки или клеточные линии со сниженной экспрессией целевого антигенного пептида, в то время как высокий профиль безопасности поддерживается посредством низкой или сниженной перекрестной реактивности с потенциально нецелевыми пептидами (также называемыми «подобными пептидами» или «SimPeps»). Такие антигенсвязывающие белки в идеале также должны иметь хорошие метаболические и/или фармакокинетические профили и должны быть пригодны для крупномасштабного производства, совместимого с промышленной практикой.

Соответственно, авторы настоящего изобретения разработали антигенсвязывающие белки, специфичные для пептида PRAME-004, содержащего варианты CDR, происходящие из родительского TCR R11P3D3. Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению обладают повышенной аффинностью связывания с комплексом пептид-МНС и повышенной стабильностью, такой как пониженная агрегация во время экспрессии и/или очистки, и/или повышенной растворимостью, что делает их более подходящими для медицинского применения.

Кроме того, антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению, в частности, биспецифические рецепторы, взаимодействующие с Т-клетками (TCER[®]), проявляют высокую цитотоксичность против PRAME-004-положительных опухолевых клеток, например, клеточных линий Hs695T и клеток U2OS, где половина максимальной эффективной концентрации (EC₅₀) составляет от 1 до 1000 пМ. EC₅₀ в 100 раз, предпочтительно более чем в 1000 раз выше, чем для PRAME-004-отрицательных опухолевых клеток, например, клеточной линии T98G, что демонстрирует повышенную безопасность антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению.

Кроме того, авторы настоящего изобретения продемонстрировали значительное ингибирование роста опухоли на терапевтической мышинной модели *in vivo* антигенсвязывающими белками согласно настоящему изобретению в низких дозах.

Таким образом, неожиданные открытия авторов настоящего изобретения обеспечивают, *среди прочего*, следующие преимущества по сравнению с уровнем техники: предоставление антигенсвязывающей молекулы с (i) повышенной аффинностью в отношении его пептида-мишени при сохранении высокой селективности к опухоли, (ii) повышенной специфичностью/снижением перекрестной реактивности, что приводит к снижению нецелевой и внеопухолевой цитотоксичности и общему улучшению профиля безопасности, (iii) повышенной стабильностью, (iv) улучшенным выходом экспрессии и растворимостью, подходящими для крупномасштабного производства, и (v) сниженной иммуногенностью.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом PRAME, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL согласно SEQ ID NO: 50 и находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), причем антигенсвязывающий белок содержит

(a) первый полипептид, содержащий переменный домен V_A , содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где

CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности VKEFQD (SEQ ID NO: 16) или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 16 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ALYNNLDMR (SEQ ID NO: 33), или ALYNNYDMR (SEQ ID NO: 34), или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34 одной, двумя или тремя, предпочтительно одной или двумя, аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

(b) второй полипептид, содержащий переменный домен V_B , содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где

CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SGHNS (SEQ ID NO: 10) или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 10

одной или двумя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ASSX₁GX₂X₃DX₄QY (SEQ ID NO: 327), где X₁ представляет собой P, A или T, X₂ представляет собой A или S, X₃ представляет собой T или I, и X₄ представляет собой K или A, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 327 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту настоящего изобретения.

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей антигенсвязывающий белок согласно первому аспекту, нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту или вектор согласно третьему аспекту настоящего изобретения.

Согласно пятому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий белок согласно первому аспекту, нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту, вектор согласно третьему аспекту или клетку-хозяин согласно четвертому аспекту, и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно шестому аспекту настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего белка согласно первому аспекту настоящего изобретения, предусматривающему

- (a) предоставление клетки-хозяина,
- (b) предоставление генетической конструкции, содержащей кодирующую последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок согласно первому аспекту настоящего изобретения,
- (c) введение указанной генетической конструкции в указанную клетку-хозяин, и
- (d) экспрессию указанной генетической конструкции указанной клеткой-хозяином.

Согласно седьмому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку согласно первому аспекту, нуклеиновой кислоте согласно второму аспекту, вектору согласно третьему аспекту, клетке-хозяину согласно четвертому аспекту или фармацевтической композиции согласно пятому аспекту для применения в

медицине, в частности, для применения для диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания.

Определения

«PRAME» или «преимущественно экспрессируемый антиген при меланоме» был впервые идентифицирован как антиген, который чрезмерно экспрессируется при меланоме (Ikeda et al *Immunity*. 1997 Feb,6(2): 199-208), также известный как CT130, MAPE, OIP-4, и имеет номер доступа согласно Uniprot P78395 (как доступно на 11 января 2019). Белок действует как репрессор передачи сигналов рецептора ретиноевой кислоты (Epping *et al.*, *Cell*. 2005 Sep 23, 122(6):835-47). PRAME принадлежит к семейству антигенов, кодируемых зародышевой линией, известных как антигены рака яичка. Антигены рака яичка являются привлекательными мишенями для иммунотерапевтического вмешательства, поскольку они обычно имеют ограниченную экспрессию или вообще не экспрессируются в нормальных тканях взрослого человека. PRAME экспрессируется в ряде солидных опухолей, а также при лейкозах и лимфомах (Doolan *et al.*, *Breast Cancer Res Treat*. 2008 May, 109(2):359-65, Epping *et al.*, *Cancer Res*. 2006 Nov 15,66(22): 10639-42, Ercolak *et al.*, *Breast Cancer Res Treat*. 2008 May, 109(2):359-65, Matsushita *et al.*, *Leuk Lymphoma*. 2003 Mar,44(3):439-44, Mitsuhashi *et al.*, *Int. J Hematol*. 2014, 100(1):88-95, Proto-Sequeire *et al.*, *Leuk Res*. 2006 Nov,30(11): 1333-9, Szczepanski *et al.*, *Oral Oncol*. 2013 Feb,49(2): 144-51, Van Baren *et al.*, *Br J Haematol*. 1998 Sep, 102(5): 1376-9). Терапия, нацеленная на PRAME, согласно настоящему изобретению может быть особенно подходящей для лечения раковых заболеваний, включая без ограничения острый миелолейкоз, рак молочной железы, холангиоцеллюлярную карциному, рак желчного пузыря, глиобластому, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную карциному головы и шеи, меланому, амеланотическую меланому, неходжкинскую лимфому, аденокарциному немелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак пищевода, почечно-клеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, карциному мочевого пузыря, рак матки и эндометрия, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальную карциному, остеосаркому и синовиальную саркому, предпочтительно рак молочной железы, холангиоцеллюлярную карциному, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную карциному головы и шеи, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак пищевода, почечно-клеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, карциному мочевого пузыря, рак матки и эндометрия и синовиальную саркому.

«Антигенный пептид PRAME» содержит или состоит из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50), которая соответствует аминокислотам 425-433 полноразмерного белка PRAME с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 328, доступной по номеру доступа Uniprot P78395 (как доступно на 11 января 2019 г.). Пептид, происходящий из PRAME, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50), также упоминается в настоящем документе как PRAME-004. Пептид PRAME-004 представляет собой пептидный эпитоп, происходящий из опухолеассоциированного или опухолеспецифического белка и презентируется на поверхности клетки молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Более конкретно, пептид, происходящий из PRAME-004, презентируется на поверхности клеток в комплексе с HLA-A*02. Med. 2001 Jan 1, 193(1):73-88). В контексте настоящего изобретения термины «антигенный пептид PRAME», «пептид PRAME» или «PRAME-004» используются взаимозаменяемо и относятся к пептиду, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50). Предпочтительно пептид PRAME состоит из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL. В тех случаях, когда пептид PRAME содержит дополнительные аминокислоты в дополнение к аминокислотной последовательности SLLQHLIGL, предпочтительно, чтобы общая длина пептида PRAME не превышала 12 аминокислот.

В контексте настоящего изобретения термин «антиген» или «антиген-мишень» относится к молекуле или части молекулы или комплекса, которые способны связываться антигенсвязывающим сайтом, причем указанный антигенсвязывающий сайт присутствует, например, в антителе, TCR и /или другом антигенсвязывающем белке согласно настоящему изобретению. Антиген в контексте настоящего изобретения представляет собой пептид PRAME, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL SEQ ID NO: 50, более конкретно, пептид PRAME, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL SEQ ID NO: 50 в комплексе с белком МНС, таким как белок HLA, например, HLA-A*02.

«Домен» может представлять собой любую область белка, обычно определяемую на основе гомологии последовательностей и часто связанную с конкретной структурной или функциональным фрагментом.

Термин «домен иммуноглобулина (Ig)» в контексте настоящего изобретения относится к белковому домену, который состоит из двухслойного сэндвича из 7-9 антипараллельных β -нитей, организованных в два β -листа с топологией греческого ключа. Домен Ig, вероятно, является наиболее часто используемым «строительным блоком» в

природных белках. Белки, содержащие домены Ig, отнесены к суперсемейству иммуноглобулинов, включая, например, антитела, Т-клеточные рецепторы (TCR) и молекулы клеточной адгезии. Примерами доменов Ig являются переменные и константные домены антител и TCR.

V_{α} в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену α -цепи TCR.

V_{β} в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену β -цепи TCR.

V_{γ} в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену цепи γ -цепи TCR.

V_{δ} в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену цепи δ -цепи TCR.

V_A в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену, содержащему CDR, происходящие из TCR, в частности, CDR1a, CDR3a, происходящие из α -цепи, и, необязательно, CDR2a. Последовательности, окружающие CDR, т.е. каркасные последовательности, могут происходить из переменного домена TCR, т.е. переменного домена α -цепи, β -цепи, γ -цепи или δ -цепи TCR или из переменного домена антитела, предпочтительно из переменного домена α -цепи TCR.

V_B в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену, содержащему CDR, происходящие из TCR, в частности, CDR1b, CDR3b, происходящие из β -цепи, и необязательно CDR2b. Последовательности, окружающие CDR, т.е. каркасные последовательности, могут происходить из переменного домена TCR, т.е. переменного домена α -цепи, β -цепи, γ -цепи или δ -цепи TCR, или из переменного домена антитела, предпочтительно из переменного домена β -цепи TCR.

V_L в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену легкой цепи антитела.

V_H в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену тяжелой цепи антитела.

C_L в контексте настоящего изобретения относится к константному домену легкой цепи антитела.

C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} в контексте настоящего изобретения относятся к константным доменам тяжелой цепи антитела, в частности тяжелой цепи IgG.

Термин «эпитоп», также известный как антигенная детерминанта, представляет собой часть антигена, распознаваемую иммунной системой. В настоящем документе термин «эпитоп» включает термины «структурный эпитоп» и «функциональный эпитоп».

«Структурный эпитоп» представляет собой те аминокислоты антигена, например, комплекс пептид-МНС, которые покрыты антигенсвязывающим белком при связывании с антигеном. Как правило, все аминокислоты антигена считаются покрытыми, которые находятся в пределах 5 Å от любого атома аминокислоты антигенсвязывающего белка. Структурный эпитоп антигена можно определить известными в данной области методами, включая рентгеновскую кристаллографию или ЯМР-анализ. Структурный эпитоп антитела обычно содержит от 20 до 30 аминокислот. Структурный эпитоп ТСР обычно содержит от 20 до 30 аминокислот. «Функциональный эпитоп» представляет собой подмножество тех аминокислот, которые образуют структурный эпитоп, и включает аминокислоты антигена, которые имеют решающее значение для формирования интерфейса с антигенсвязывающим белком согласно настоящему изобретению или его функциональным фрагментом, либо путем непосредственного образования нековалентных взаимодействий, таких как Н-связи, солевые мостики, ароматическое штабелирование или гидрофобные взаимодействия, или путем косвенной стабилизации конформации связывания антигена, и это определяется, например, мутационным сканированием. В контексте настоящего изобретения функциональный эпитоп также называют «связывающим мотивом». Как правило, функциональный эпитоп антигена, связываемого антителом, содержит от 4 до 6 аминокислот. Обычно функциональный эпитоп комплекса пептид-МНС содержит от 2 до 6 или 7 аминокислот пептида и от 2 до 7 аминокислот молекулы МНС. Поскольку пептиды, представленные МНС I, обычно имеют длину от 8 до 10 аминокислот, только часть аминокислот каждого данного пептида является частью функционального эпитопа комплекса пептид-МНС. Эпитоп, в частности функциональный эпитоп, связываемый антигенсвязывающими белками согласно настоящему изобретению, содержит или состоит из аминокислот антигена, которые необходимы для образования интерфейса связывания. В контексте настоящего изобретения функциональный эпитоп (т.е. мотив связывания) содержит по меньшей мере аминокислоты 3, 5 и 7, предпочтительно не аминокислоты 1 и 4 антигенного пептида PRAME-004 согласно SEQ ID NO: 50.

«Главный комплекс гистосовместимости» (МНС) представляет собой набор белков клеточной поверхности, необходимых приобретенной иммунной системе для распознавания чужеродных молекул у позвоночных, что, в свою очередь, определяет гистосовместимость. Основная функция молекул МНС состоит в связывании с антигенами, происходящими из патогенов, и презентации их на поверхности клетки для распознавания соответствующими Т-клетками. МНС человека также называют комплексом HLA (человеческий лейкоцитарный антиген) (или просто HLA). Семейство генов МНС разделено на три подгруппы: класс I, класс II и класс III. Комплексы пептида и МНС класса

I распознаются CD8-позитивными Т-клетками, несущими соответствующий Т-клеточный рецептор (TCR), тогда как комплексы пептида и молекул МНС класса II распознаются CD4-позитивными Т-хелперами, несущими соответствующий TCR. Поскольку как CD8-, так и CD4-зависимые ответы совместно и синергически способствуют противоопухолевому эффекту, идентификация и характеристика опухолеассоциированных антигенов и соответствующих Т-клеточных рецепторов важны при разработке методов иммунотерапии рака, таких как вакцины и клеточная терапия. Ген HLA-A расположен на коротком плече хромосомы 6 и кодирует более крупный компонент α -цепи HLA-A. Вариация α -цепи HLA-A является ключом к функции HLA. Эта вариация способствует генетическому разнообразию популяции. Поскольку каждый HLA имеет различную аффинность в отношении пептидов определенных структур, большее разнообразие HLA означает большее разнообразие антигенов, которые будут «презентированы» на поверхности клетки. Белок HLA МНС класса I в контексте настоящего изобретения может представлять собой белок HLA-A, HLA-B или HLA-C, предпочтительно белок HLA-A, например, HLA-A*02. При иммунной реакции, зависимой от МНС класса I, пептиды не только должны быть способны связываться с определенными молекулами МНС класса I, экспрессируемыми опухолевыми клетками, но впоследствии также должны распознаваться Т-клетками, несущими специфические рецепторы Т-клеток (TCR).

«Антигенный пептид в комплексе с белком МНС» в настоящем документе относится к антигенному пептиду, который нековалентно связан с молекулой МНС. В частности, антигенный пептид располагается в «связывающей пептид бороздке», образованной молекулой МНС. Комплекс молекулы МНС и антигенного пептида в настоящем документе также называется «комплексом пептид-МНС» или «комплексом рМНС». В случае антигенного пептида PRAME комплекс также называют «комплексом антигенный пептид PRAME-МНС» или «комплексом PRAME-004:МНС».

«HLA-A*02» означает конкретный аллель HLA, где буква А означает аллель, а префикс «префикс *02» указывает на серотип А2.

Термин «антигенсвязывающий белок» в настоящем документе относится к полипептиду, содержащему антигенсвязывающий сайт, который способен специфически связываться с антигеном. Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению содержит CDR, происходящие из TCR, в частности, переменный домен V_A, содержащий происходящие из TCR CDRa1, CDRa3 и необязательно CDRa2, и переменный домен V_B, содержащий происходящие из TCR CDRb1, CDRb3 и необязательно CDRb2. В конкретном варианте осуществления весь домен V_A и/или весь домен V_B происходят от TCR и, таким образом, представляют собой домены V _{α} и V _{β} или V _{γ} и V _{δ} . В контексте настоящего описания

термин «антигенсвязывающий белок» включает множество форматов TCR и антител, как определено ниже. В одном примере антигенсвязывающий белок содержит CDR, происходящие из TCR, в частности, CDRa1, CDRa3, CDRb1, CDRb3, происходящие из TCR, и необязательно CDRa2 и CDRb2, как определено в формуле изобретения, которые были привиты к тяжелым и легким цепям антитела. В другом примере весь домен V α , происходящий из TCR, и /или весь домен V β , происходящий из TCR, прививают к тяжелым и легким цепям антитела. Специалисту в данной области известно, что такие конструкции представляют собой гибридные антигенсвязывающие белки, которые будут обладать антигенной специфичностью TCR, из которого получены CDR или переменные домены, но будут иметь общую структуру антитела и, таким образом, могут называться «антитело». Термин «антигенсвязывающий белок» дополнительно включает биспецифические или мультиспецифические антигенсвязывающие белки. В дополнение к V A , и V B , содержащим CDRa1, CDRa3, CDRb1, CDRb3 и необязательно CDRa2 и CDRb2, происходящие из TCR, как определено в формуле изобретения, такие биспецифические или мультиспецифические антигенсвязывающие белки дополнительно содержат по меньшей мере еще один переменный домен и необязательно константный домен, причем переменный и/или константные домены могут происходить из антитела или TCR. В данном случае специалисту также известно, что такие конструкции, содержащие элементы как антител, так и TCR, представляют собой гибридные форматы и могут называться «биспецифическими TCR», «биспецифическими антителами» или «молекулами биспецифических TCR-антител», в зависимости от состава антигенсвязывающего белка, но также и с точки зрения и/или фокуса специалиста. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению содержит V A , и V B , содержащие CDRa1, CDRa3, CDRb1, CDRb3 и необязательно CDRa2 и CDRb2, происходящие из TCR, как определено в формуле изобретения, а также дополнительный домен, слитый непосредственно или косвенно с V A или V B . Такие антигенсвязывающие белки можно назвать «слитым белком TCR». Примеры дополнительных доменов, входящих в состав «слитого белка TCR», перечислены ниже. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающие белки представляют собой биспецифические молекулы TCR-антитело, как определено ниже, более предпочтительно биспецифические рецепторы, взаимодействующие с Т-клетками (TCER®), как определено ниже. Согласно таким вариантам осуществления антигенсвязывающий белок содержит два разных антигенсвязывающих сайта и способен специфически связываться с двумя разными антигенами одновременно, как известно, например, для биспецифических антител.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению специфически связывается с антигенным пептидом PRAME, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL согласно SEQ ID NO: 50 и находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), причем антигенсвязывающий белок содержит

(а) первый полипептид, содержащий переменный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где

CDRa1 содержит аминокислотную последовательность VKEFQD (SEQ ID NO: 16) или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 16 самое большее одной, самое большее двумя или самое большее тремя аминокислотными заменами, и

CDRa3 содержит аминокислотную последовательность ALYNNLDMR (SEQ ID NO: 33), или ALYNNYDMR (SEQ ID NO: 34), или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34 самое большее одной, самое большее двумя или самое большее тремя аминокислотными заменами, и

CDRa2 содержит аминокислотную последовательность FGPYGKE (SEQ ID NO: 32) или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 32 самое большее одной, самое большее двумя или по меньшей мере тремя аминокислотными заменами, и

(b) второй полипептид, содержащий переменный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где

CDRb1 содержит аминокислотную последовательность SGHNS (SEQ ID NO: 10) или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 10 самое большее одной или самое большее двумя аминокислотными заменами, и

CDRb3 содержит аминокислотную последовательность ASSX₁GX₂X₃DX₄QY (SEQ ID NO: 327), где X₁ представляет собой P, A или T, X₂ представляет собой A или S, X₃ представляет собой T или I, и X₄ представляет собой K или A, или аминокислотную последовательность, отличающуюся от SEQ ID NO: 327 самое большее одной, самое большее двумя или самое большее тремя аминокислотными заменами, и

CDRb2 содержит аминокислотную последовательность FQNTAV (SEQ ID NO: 36) или аминокислотную последовательность CDRb2, отличающуюся от SEQ ID NO: 36 самое большее одной, самое большее двумя, самое большее тремя, самое большее четырьмя, самое большее пятью или самое большее шестью аминокислотными заменами.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению содержит

CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 16,

CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 32,

CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 33,
CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 10,
CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 36, и
CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 327.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению содержит

CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 16,
CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 32,
CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 34,
CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 10,
CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 36, и
CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 327.

Согласно варианту осуществления аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

«По меньшей мере один» в настоящем документе относится к одному или нескольким указанным объектам, как например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или более указанным объектам. Например, по меньшей мере один сайт связывания в настоящем документе относится к 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или более сайтам связывания.

Термин «биспецифический» в контексте настоящего изобретения относится к антигенсвязывающим белкам, имеющим по меньшей мере две валентности и специфичности связывания для двух разных антигенов и, таким образом, содержащим по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта. Термин «валентность» относится к числу сайтов связывания антигенсвязывающего белка, например, двухвалентный антигенсвязывающий белок относится к антигенсвязывающему белку, который имеет два сайта связывания. Сайты связывания могут связываться с одной и той же или с разными мишенями, т.е. двухвалентный антигенсвязывающий белок может быть моноспецифичным, т.е. связывающим одну мишень, или биспецифичным, т.е. связывающим две разные мишени. Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, содержащий CDR, происходящие из TCR. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, происходящий из TCR.

В контексте настоящего изобретения термин «TCR» включает обычные/нативные TCR и сконструированные TCR, в частности функциональные фрагменты TCR, одноцепочечные TCR и биспецифические или мультиспецифические TCR.

«Нативный TCR» относится к TCR дикого типа, который можно выделить из на основе существования в природе. TCR, который имеет тот же тип доменов и расположение доменов, что и нативный TCR, и содержит CDR, происходящие из TCR, и каркасные области, также можно называть «обычным TCR». Нативные/обычные TCR представляют собой гетеродимерные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, которые связаны с инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в опосредовании передачи сигнала. Нативные гетеродимерные TCR существуют в формах $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$, которые структурно сходны, но имеют разные местоположения и, вероятно, функции. Внеклеточная часть нативных гетеродимерных TCR $\alpha\beta$ и TCR $\gamma\delta$ содержит два полипептида, каждый из которых имеет проксимальный к мембране константный домен (также называемый константной областью) и дистальный к мембране переменный домен (также называемый переменной областью). В контексте настоящего изобретения такие TCR также называют полноразмерными TCR. Нативные гетеродимерные TCR $\alpha\beta$ имеют α -цепь и β -цепь. α -цепь содержит переменную (V), соединительную (J) и константную (C) области, а β -цепь содержит V, J и C области и обычно дополнительно короткую область разнообразия (D) между переменной и соединительной областями, хотя эта область разнообразия часто рассматривается как часть соединительной области. Константные области α - и β -цепей TCR обозначаются как TRAC и TRBC, соответственно (Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 10). В контексте настоящего изобретения константные области α - и β -цепей TCR (TRAC и TRBC) включают трансмембранные (TM) области. Каждая из константных и переменных областей (или доменов) включает внутрицепочечную дисульфидную связь. Переменные домены содержат высокополиморфные петли, аналогичные определяющим комплементарность областям (CDR) антител.

Каждый переменный домен TCR содержит три «определяющие комплементарность области TCR» (CDR), встроенные в каркасную последовательность, одна из которых представляет собой гиперпеременную область, называемую CDR3. В контексте настоящего изобретения CDRa1, CDRa2 и CDRa3 обозначают CDR α -цепи, а CDRb1, CDRb2 и CDRb3 обозначают CDR β -цепи. Существует несколько типов переменных доменов α -цепи и несколько типов переменных доменов β -цепи, отличающихся своим каркасом, последовательностями CDR1 и CDR2, а также частично определенной последовательностью CDR3. Типы переменных доменов α -цепи обозначаются в номенклатуре IMGT уникальным номером TRAV, типы переменных доменов β -цепи обозначаются в номенклатуре IMGT уникальным номером TRBV (Folch and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(1): 42-54, Scaviner and Lefranc, (2000), Exp Clin

Immunogenet 17(2): 83-96, LeFranc и LeFranc, (2001), "T cell Receptor Factsbook", Academic Press). Дополнительную информацию о генах антител и TCR можно найти в международной информационной системе international ImMunoGeneTics information system[®], Lefranc M-P *et al.*, (Nucleic Acids Res. 2015 Jan,43(Database issue):D413-22, и <http://www.imgt.org/>). В TCR аминокислотные остатки CDR1 и CDR3 контактируют с антигенным пептидом, тогда как аминокислотные остатки CDR2 в основном контактируют с молекулой HLA (Stadinski *et al.*, J Immunol. 2014 June 15, 192(12): 6071–6082, Cole *et al.*, J Biol Chem. 2014 Jan 10,289(2):628-38). Таким образом, антигенная специфичность TCR определяется последовательностями CDR3 и CDR1. Последовательности CDR2 не требуются для определения специфичности антигена, но могут играть роль в общей аффинности TCR в отношении комплекса пептид:МНС.

«Каркасные области TCR» (FR) относятся к аминокислотным последовательностям, расположенным между CDR, т.е. к тем частям переменных доменов, которые в некоторой степени консервативны среди различных TCR. Каждый из переменных доменов α -, β -, γ - и δ -цепей имеет по четыре FR, обозначенных в настоящем документе FR1-a, FR2-a, FR3-a, FR4-a (для α - или γ -цепи) и FR1-b, FR2-b, FR3-b, FR4-b (для β - или δ -цепи), соответственно. Соответственно, переменный домен α -цепи или γ -цепи может быть описан как (FR1-a)-(CDRa1)-(FR2-a)-(CDRa2)-(FR3-a)-(CDRa3)-(FR4-a), а переменный домен β - или δ -цепи может быть описан как (FR1-b)-(CDRb1)-(FR2-b)-(CDRb2)-(FR3-b)-(CDRb3)-(FR4-b). В контексте настоящего изобретения последовательности CDR/FR в переменном домене α -, β -, γ - или δ -цепи определяют на основе определения IMGT (Lefranc *et al.*, Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77, www.imgt.org). Соответственно, положения аминокислот CDR/FR, когда они связаны с TCR или доменами, происходящими из TCR, указаны в соответствии с указанным определением IMGT. Предпочтительно, положение IMGT аминокислотных положений CDR/FR переменного домена V α приведено по аналогии с нумерацией IMGT TRAV24*01, и/или положение IMGT аминокислотных положений CDR/FR переменного домена V β приведено по аналогии с нумерацией IMGT TRBV12-3*01.

Термин «комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$ » относится в контексте настоящего изобретения к комплексу Т-клеточного рецептора, присутствующему на поверхности Т-клеток. Большинство Т-клеток экспрессируют TCR α/β , состоящие из α - и β -цепей, связанных дисульфидными связями, которые обычно связывают сложные поверхности антигенных пептидов, презентированных МНС. TCR не передают сигнал сами по себе, а конститутивно связаны с CD3, белковым комплексом, который обозначен как корецептор Т-клеток и содержит внутриклеточные сигнальные мотивы (Birnbaum *et al.*, PNAS vol. 11, no. 49,

17576-17581, 2014). TCR α/β нековалентно связан с этим консервативным многосубъединичным сигнальным аппаратом, который содержит димеры CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$, и CD3 $\zeta\zeta$, которые вместе образуют комплекс TCR α/β /CD3.

«CD3» представляет собой белковый комплекс, состоящий из четырех отдельных цепей. У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3 γ , цепь CD3 δ и две цепи CD3 ϵ . Эти цепи связываются с TCR и ζ -цепью, генерируя сигнал активации в Т-лимфоцитах.

Сконструированные TCR (и, следовательно, термин «TCR» в контексте настоящего изобретения) включают функциональные фрагменты TCR, TCR с созревшей стабильностью, TCR с созревшей аффинностью, одноцепочечные TCR, химерные, гуманизированные, биспецифические и мультиспецифические TCR, в частности. «Функциональный фрагмент TCR» включает (а) фрагменты нативных или обычных TCR, которые сохраняют способность TCR, из которого они получены, связываться с целевым антигеном, и (б) рекомбинантные/сконструированные антигенсвязывающие белки, содержащие последовательности CDR, происходящие из TCR, в частности, последовательности CDR1, CDR3 и необязательно CDR2. Поскольку связывание с антигеном-мишенью определяется этими последовательностями CDR, содержащие их антигенсвязывающие белки сохраняют способность TCR, из которого происходят CDR, связываться с антигеном-мишенью. Специалистам в данной области известно, что CDR должны чередоваться с каркасными областями (FR), однако, их специфические аминокислотные последовательности не имеют решающего значения для специфичности в отношении антигена-мишени. Таким образом, переменный домен, содержащий CDR, происходящие из TCR, и FR, происходящие из антител, можно рассматривать как «функциональный фрагмент TCR». Дополнительные примеры функциональных фрагментов TCR включают отдельные переменные домены, такие как V α , V β , V δ , V γ , или фрагменты цепи α , β , δ , γ , такие как «V α -C α » или «V β -C β » или их части. Такие фрагменты могут также дополнительно содержать соответствующую шарнирную область. «Одноцепочечный TCR (scTCR)» в настоящем документе означает TCR, в котором переменные домены TCR расположены на одном полипептиде. Обычно переменные домены в scTCR разделены линкером, причем указанный линкер обычно содержит от 10 до 30 аминокислот, например, 25 аминокислот.

«Химерный TCR» в контексте настоящего изобретения относится к TCR, где цепи TCR содержат последовательности нескольких видов. Предпочтительно, TCR в контексте настоящего изобретения может содержать α -цепь, содержащую переменную область α -цепи человека и, например, мышиную константную область α -цепи мышинного TCR. «Биспецифические TCR» включают биспецифические молекулы TCR-антитело, в частности,

scTCR-F_{ab}, или рецепторы, взаимодействующие с Т-клетками (TCER®), как определено ниже.

В контексте настоящего изобретения термин «антитело» включает традиционные/нативные антитела и сконструированные антитела, в частности функциональные фрагменты антител, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела, биспецифические или мультиспецифические антитела.

«Нативное антитело» относится к антителу дикого типа, которое можно выделить из природы. Антитело, которое имеет тот же тип доменов и расположение доменов, что и нативное антитело, и содержит происходящие из антитела последовательности CDR и FR, также может называться «обычным антителом». В нативном/обычном антителе две тяжелые цепи связаны друг с другом дисульфидными связями, и каждая тяжелая цепь связана с легкой цепью дисульфидной связью. Существует два типа легкой цепи: лямбда (λ) и каппа (κ). Существует пять основных классов тяжелых цепей (или изоформ), которые определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит отдельные домены (также называемые областями). Легкая цепь включает два домена: переменный домен (V_L) и константный домен (C_L). Тяжелая цепь включает четыре или пять доменов в зависимости от изоформы антитела, переменный домен (V_H) и три или четыре константных домена (C_{H1} , C_{H2} , и C_{H3} , и необязательно C_{H4} , совместно упоминаемые как C_H). Переменные домены как легкой (V_L), так и тяжелой (V_H) цепей определяют распознавание связывания и специфичность к антигену. Константные домены легкой (C_L) и тяжелой (C_H) цепей придают важные биологические свойства, такие как ассоциация цепей антител, секреция, трансплацентарная подвижность, связывание комплемента и связывание с Fc-рецепторами (F_cR).

Специфичность антитела состоит в структурной комплементарности между сайтом связывания антитела и антигенной детерминантой. Сайты связывания антител состоят из остатков, которые в основном происходят из «определяющих комплементарность областей антитела» (CDR) или гипервариабельных областей. Иногда остатки из негипервариабельных или каркасных областей (FR) влияют на общую структуру домена и, следовательно, на сайт связывания. CDR относятся к аминокислотным последовательностям, которые вместе определяют аффинность связывания и специфичность природного участка Fv сайта связывания нативного антитела. Каждая легкая и тяжелая цепи антитела имеют по три CDR, обозначенных CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L и CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, соответственно. Таким образом, антигенсвязывающий сайт антитела включает шесть CDR, включающих набор CDR из V-области тяжелой и легкой цепей. «Каркасные области антитела» (FR) относятся к аминокислотным

последовательностям, расположенным между CDR, т.е. к тем частям переменных областей легкой и тяжелой цепи антитела, которые относительно консервативны среди различных антител одного вида. Каждая легкая и тяжелая цепи антитела содержат по четыре FR, обозначенных FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H, соответственно. Соответственно, переменный домен легкой цепи может быть описан как (FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L), а переменный домен тяжелой цепи может быть описан как (FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H). В настоящем документе «каркасная область человека» представляет собой каркасную область, которая по существу идентична (приблизительно на 85% или более, в частности 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) каркасной области встречающегося в природе человеческого антитела. В контексте настоящего изобретения определение CDR/FR в переменном домене легкой или тяжелой цепи антитела определяют на основе определения IMGT (Lefranc *et al.*, Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77, www.imgt.org). Соответственно, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 данной переменной цепи и аминокислотные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 указаны в соответствии с указанным определением IMGT.

Форматы сконструированных антител включают функциональные фрагменты антител, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела и химерные, гуманизированные, биспецифические или мультиспецифические антитела. Форматы сконструированных антител дополнительно включают конструкции, в которых CDR, происходящие из TCR, возможно, включающие дополнительные 3, 2 или 1 N- и/или C-концевой каркасный остаток, или целые переменные домены, происходящие из TCR, привиты к тяжелым или легким цепям антитела. Более конкретно, CDRa1, CDRa3 и необязательно CDRa2 могут быть привиты в аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, а CDRb1, CDRb3 и необязательно CDRb2 могут быть привиты в аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи, или наоборот. В качестве другого примера, переменный домен легкой цепи антитела может быть заменен переменным доменом α -цепи TCR, а переменный домен тяжелой цепи может быть заменен переменным доменом β -цепи TCR, или наоборот. «Функциональный фрагмент антитела» относится к части полноразмерного антитела, которая сохраняет способность связываться со своим целевым антигеном, в частности, с антигенсвязывающей областью или переменной областью полноразмерного антитела. Примеры функциональных фрагментов антител включают Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂ и диатела. Функциональный фрагмент антитела также может представлять собой однодоменное антитело, такое как антитело с тяжелой цепью. Термин «Fab» означает

фрагмент антитела, имеющий молекулярную массу приблизительно 50000 Дальтон и антигенсвязывающую активность, в котором около половины N-концевой стороны H-цепи и вся L-цепь, среди фрагментов, полученных обработкой IgG протеазы, например, папаином, связаны между собой дисульфидной связью. Фрагмент Fv представляет собой N-концевую часть Fab-фрагмента антитела и состоит из переменных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи.

В контексте настоящего изобретения «формат» антигенсвязывающего белка определяет определенное пространственное расположение доменов, в частности, переменных и необязательно константных доменов. Важными характеристиками таких форматов антигенсвязывающих белков являются количество полипептидных цепей (одноцепочечные, двухцепочечные или множественные), тип и длина линкеров, соединяющих различные домены, количество переменных доменов (и, следовательно, количество валентностей), количество различных переменных доменов (и, следовательно, количество специфичностей для разных антигенов, например, биспецифические, мультиспецифические), а также порядок и ориентацию переменных доменов (например, перекрестные, параллельные).

Множество различных биспецифических и мультиспецифических форматов в контексте антител, и, как будет понятно специалистам в данной области техники, такие биспецифические и мультиспецифические форматы могут использоваться в контексте настоящего изобретения путем замены в этих форматах доменов антител с переменными доменами, описанными в контексте настоящего изобретения. К таким форматам относятся, *например*, диатела, белки перекрестного двойного переменного домена (CODV) и двойного переменного домена (DVD). Обзор различных форматов биспецифических антител и способов их получения раскрыт, например, в Brinkmann U. and Kontermann E.E. *MAbs*. 2017 Feb-Mar, 9(2): 182–212. Формат DVD, например, раскрыт в следующих научных статьях (Wu C *et al.* *Nat Biotechnol* 2007, 25:1290-7, PMID:17934452, Wu C. *et al.* *MAbs* 2009, 1:339-47, Lacy SE *et al.* *MAbs* 2015, 7:605-19, PMID:25764208, Craig RB *et al.* *PLoS One* 2012, 7:e46778, PMID:23056448, Piccione EC *et al.* *MAbs* 2015). CODV, например, раскрыт в Onuoha SC *et al.* *Arthritis Rheumatol.* 2015 Oct, 67(10):2661-72, или, например, WO2012/135345, WO2016/116626. Диатела, например, описаны в Holliger P *et al.* *Protein Eng* 1996, 9:299-305, PMID:8736497, Atwell JL *et al.* *Mol Immunol* 1996, 33:1301-12, PMID:9171890, Kontermann RE, *Nat Biotechnol* 1997, 15:629-31, PMID:9219263, Kontermann RE *et al.* *Immunotechnology* 1997, 3:137-44, PMID:9237098, Cochlovius B *et al.* *Cancer Res* 2000, 60:4336-41, PMID:10969772, и DeNardo DG *et al.* *Cancer Biother Radiopharm* 2001, 16:525-35, PMID:11789029.

«Диантитело» относится к двухвалентной молекуле, состоящей из двух цепей, каждая из которых содержит два переменных домена, либо из одного, либо из разных антител. Если антитела разные, обычно переменные домены одного антитела (антитела X, содержащего V_{LX} и V_{HX}), расположены на двух разных полипептидных цепях, и переменные домены другого антитела (антитела Y, содержащего V_{LY} и V_{HY}) также расположены на двух разных полипептидных цепях. Домены димеризуются в ориентации «голова к хвосту». Две цепи могут иметь конфигурацию $V_{HX}-L_{Db1}-V_{LY}$, и $V_{HY}-L_{Db2}-V_{LX}$ или $V_{LX}-L_{Db1}-V_{HY}$, и $V_{LY}-L_{Db2}-V_{HX}$ или $V_{HX}-L_{Db1}-V_{HY}$, и $V_{LY}-L_{Db2}-V_{LX}$ или $V_{LX}-L_{Db1}-V_{LY}$, и $V_{HY}-L_{Db2}-V_{HX}$. Для того, чтобы домены могли димеризоваться «от головы к хвосту», две цепи содержат линкер, т.е. L_{Db1} и L_{Db2} , которые разделяют переменные домены и могут быть одинаковыми или разными. Линкеры предпочтительно представляют собой короткие линкеры. Короткий линкер обычно имеет длину от 2 до 12, от 3 до 13, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 аминокислот, например, 4, 5 (Brinkmann U. and Kontermann E.E. (MAbs. 2017 Feb-Mar, 9(2): 182–212) или длиной 8 аминокислот, например, «GGGS» согласно SEQ ID NO: 290, «GGGG» согласно SEQ ID NO: 286 или «GGGSGGG» согласно SEQ ID NO: 214.

В формате «иммуноглобулина с двойным переменным доменом» (DVD-IgTM) переменные домены моноклонального антитела Y, связывающиеся с мишенью (домены V_{LY} и V_{HY}), обычно слиты с обычным антителом X (содержащим домены V_{LX} и V_{HX}), где легкая цепь обычного антитела X, таким образом, содержит дополнительный переменный домен легкой цепи (V_{LY}), а тяжелая цепь обычного антитела X содержит дополнительный переменный домен тяжелой цепи (V_{HY}). DVD-IgTM, как описано в данной области техники, обычно состоит из двух полипептидных цепей, одной тяжелой цепи, содержащей $V_{HY}-L_1-V_{HX}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$, и одной легкой цепи, содержащей $V_{LY}-L_3-V_{LX}-L_4-CL$, или одной тяжелой цепи, содержащей $V_{HX}-L_1-V_{HY}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$, и одной легкой цепи, содержащей $V_{LX}-L_3-V_{LY}-L_4-CL$. Домены V_{HY}/V_{LY} , и V_{HX}/V_{LX} таким образом, спариваются параллельно. Соединяющие линкеры L_1 и L_3 предпочтительно содержат от 5 до 20 аминокислот, например, от 5 до 15 аминокислот, и/или соединяющие линкеры L_2 и L_4 могут присутствовать или отсутствовать.

Формат «перекрестного двойного переменного домена» (CODV), описанный в данной области техники, представляет собой формат, в котором переменные домены антитела X (V_{LX} и V_{HX}) связаны с переменными доменами антитела Y (V_{LY} и V_{HY}) таким образом, чтобы обеспечить перекрестное спаривание переменных доменов.

В формате C ODV-Ig в контексте настоящего изобретения полипептидные цепи имеют, например, конфигурацию $V_{HX}-L_1-V_{HY}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$, и $V_{LY}-L_3-V_{LX}-L_4-CL$, или $V_{HY}-L_1-V_{HX}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$, и $V_{LX}-L_3-V_{LY}-L_4-CL$ или $V_{HX}-L_3-V_{HY}-L_4-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$, и $V_{LY}-L_1-V_{LX}-$

L_2-C_L , или $V_{HY}-L_3-V_{HX}-L_4-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$, и $V_{LX}-L_1-V_{LY}-L_2-C_L$. Соединяющие линкеры ($L_1 - L_4$), которые также могут быть полностью глициновыми линкерами или серин-глициновыми линкерами, обычно имеют разную длину. Для того, чтобы обеспечить перекрестное спаривание, одна цепь (тяжелая или легкая цепь) обычно содержит более длинные линкеры, чем другая цепь. Например, в перечисленных выше конфигурациях CODV L_1 составляет от 3 до 12 аминокислотных остатков в длину, L_2 составляет от 3 до 14 аминокислотных остатков в длину, L_3 составляет от 1 до 8 аминокислотных остатков в длину, и L_4 составляет от 1 до 3 аминокислотных остатков в длину, или L_1 составляет от 5 до 10 аминокислотных остатков в длину, L_2 составляет от 5 до 8 аминокислотных остатков в длину, L_3 составляет от 1 до 5 аминокислотных остатков в длину, и L_4 составляет от 1 до 2 аминокислотных остатков в длину, или L_1 составляет 7 аминокислотных остатков в длину, L_2 составляет 5 аминокислотных остатков в длину, L_3 составляет 1 аминокислотных остатков в длину, и L_4 составляет 2 аминокислотных остатков в длину.

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, которое полностью или частично имеет нечеловеческое происхождение и которое было модифицировано путем замены определенных аминокислот, в частности, в каркасных областях тяжелой и легкой цепей, чтобы избежать или свести к минимуму иммунный ответ у человека. Константные домены гуманизированного антитела представляют собой главным образом человеческие домены C_H и C_L . В данной области техники известны многочисленные способы гуманизации последовательности антитела, см., например, обзор Almagro & Fransson (2008) *Front Biosci.* 13: 1619-1633.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, структуры антител, в частности структура переменных доменов тяжелой и легкой цепи антител, аналогичны структуре переменных доменов α -, β -, γ - или δ -цепи TCR, облегчая прививку CDR, как определено в контексте настоящего изобретения, в антитела, включая обычные антитела, биспецифические антитела или мультиспецифические антитела.

Зная аминокислотную последовательность CDR антитела, TCR или антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению, специалист в данной области техники может легко определить каркасные области, такие как каркасные области TCR или каркасные области антитела. В случаях, когда CDR не указаны, специалист в данной области техники может сначала определить аминокислотные последовательности CDR на основе определения IMGT для TCR или определения IMGT для антител, а затем определить аминокислотные последовательности каркасных областей.

Биспецифические форматы TCR-антител

Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению представляют собой биспецифические молекулы, в частности, биспецифические молекулы TCR-антитела, т.е. антигенсвязывающие белки, которые содержат по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта, причем один происходит из антитела, а другой происходит из TCR или, по меньшей мере, содержит CDR, происходящие из TCR, в частности CDR1a, CDR3a, CDR1b, CDR3b и необязательно CDR2a и CDR2b. Антигенсвязывающий сайт, происходящий из антитела, включает переменные домены V_L и V_H .

В таких молекулах биспецифического TCR-антитела переменные домены могут быть расположены, например, так, как описано для различных форматов биспецифических антител, описанных выше. Способы получения таких биспецифических антител также раскрыты в процитированном выше уровне техники, и поэтому специалисты в данной области техники могут легко использовать CDR или переменные домены, определенные в настоящем документе, для генерации и продукции антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению в раскрытых в настоящем документе форматах. Кроме того, возможны дополнительные форматы, например, форматы, в которых в каждой цепи переменные домены разделены константным доменом, который обеспечивает димеризацию, так что в конечной молекуле два сайта связывания антигена расположены по две стороны димеризованных константных доменов. Специалист в данной области техники способен выбрать подходящие линкеры для обеспечения сворачивания в желаемую конформацию.

Согласно наиболее предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению представляют собой биспецифические рецепторы, взаимодействующие с Т-клетками (TCER®), которые представляют собой растворимые Fc-содержащие биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий сайт TCR и антигенсвязывающий сайт антитела. Антигенсвязывающий сайт антитела образован переменными доменами тяжелой и легкой цепей антитела и также называется «рекрутером», поскольку он связывает эффекторную клетку, например, Т-клетку, и рекрутирует ее в опухоль. TCER® содержит две полипептидные цепи, где антигенсвязывающие сайты образованы переменными доменами, расположенными на разных полипептидных цепях в перекрестной ориентации.

В контексте настоящей заявки последовательность, которая «на по меньшей мере 85% идентична эталонной последовательности», представляет собой последовательность, имеющую по всей своей длине 85% или более, в частности 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности по всей длине эталонной последовательности. Белки, состоящие из аминокислотной последовательности, «на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной» эталонной последовательности, могут содержать такие мутации, как делеции, вставки и/или замены по сравнению с эталонной последовательностью. В случае замен белок, состоящий из аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной эталонной последовательности, может соответствовать гомологичной последовательности, происходящей из другого вида, чем эталонная последовательность.

В контексте настоящего изобретения «процент идентичности» может быть вычислен с использованием глобального попарного выравнивания (*m.e.* две последовательности сравнивают по всей их длине). Способы сравнения идентичности двух или более последовательностей хорошо известны в данной области техники. Например, можно использовать программу «needle», которая использует алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) для нахождения оптимального выравнивания (включая гэпы) двух последовательностей при рассмотрении всей их длины. Программа needle доступна, например, на веб-сайте ebi.ac.uk и подробно описана в следующей публикации (*EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite* (2000) Rice, P. Longden, I. и Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp. 276—277). Процент идентичности между двумя полипептидами в соответствии с настоящим изобретением вычисляют с использованием программы EMBOSS: needle (global) с параметром «Gap Open», равным 10,0, параметром «Gap Extend», равным 0,5, и матрицей Blosum62.

«Аминокислотные замены» могут быть консервативными и неконсервативными. Предпочтительно замены представляют собой консервативные замены, при которых одна аминокислота заменяется другой аминокислотой со схожими структурными и/или химическими свойствами.

Согласно варианту осуществления консервативные замены могут включать те, которые описаны в Dayhoff “The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5”, Natl. Biomedical Research, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Например, согласно одному аспекту аминокислоты, которые принадлежат к одной из следующих групп, могут быть заменены друг на друга, образуя, таким образом, консервативную замену: группа 1: аланин (A), пролин (P), глицин (G), аспарагин (N), серин (S), треонин (T), группа 2: цистеин (C), серин (S), тирозин (Y), треонин (T), группа 3: валин (V), изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), аланин (A), фенилаланин (F), группа 4: лизин (K), аргинин (R), гистидин (H), группа 5: фенилаланин (F), тирозин (Y),

триптофан (W), гистидин (H), и группа б: аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E). Согласно одному аспекту консервативная аминокислотная замена может быть выбрана из следующих: T→A, G→A, A→I, T→V, A→M, T→I, A→V, T→G и/или T→S.

Согласно другому варианту осуществления консервативная аминокислотная замена может включать замену аминокислоты на другую аминокислоту того же класса, например, (1) неполярные: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp, (2) незаряженные полярные: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, (3) кислотные: Asp, Glu, и (4) основные: Lys, Arg, His. Другие консервативные аминокислотные замены также могут быть выполнены следующим образом: (1) ароматические: Phe, Tyr, His, (2) доноры протонов: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp, и (3) акцепторы протонов: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (см., например, патент США № 10106805, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Согласно другому варианту осуществления консервативные замены могут быть сделаны в соответствии с Таблицей 1. Способы прогнозирования толерантности к модификации белка можно найти, например, в Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210 (2004), содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Таблица 1. Консервативные аминокислотные замены

Консервативные аминокислотные замены	
Аминокислота	Замены (другие известны в данной области техники)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

В другом варианте осуществления консервативные замены могут представлять собой те, которые показаны в Таблице 2 под заголовком «консервативные замены». Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то могут быть внесены более существенные изменения, называемые «иллюстративными заменами» в Таблице 2, и при необходимости продукты подвергают скринингу.

Таблица 2. Аминокислотные замены

Аминокислотные замены		
Исходный остаток (встречающаяся в природе аминокислота)	Консервативные замены	Иллюстративные замены
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин
Leu (L)	Ile	норлейцин ; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению могут иметь любую длину, т.е. могут содержать любое количество аминокислот при условии, что они сохраняют свою биологическую активность, например, способность специфически связываться со своим антигеном-мишенью, обнаруживать больные клетки у хозяина или лечить или предотвращать заболевание у хозяина и т.д.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению могут содержать синтетические аминокислоты вместо одной или нескольких встречающихся в природе аминокислот. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области техники и могут включать, например, аминокислоты: циклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин, α -амино-н-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометил-цистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, β -фенилсерин, β -гидроксифенилаланин, фенилглицин, α -нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты, N'-бензил-N'-метиллизин, N',N'-дибензиллизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α -аминоциклопентанкарбоновую кислоту, α -аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α -аминоциклогептанкарбоновую кислоту, α -(2-амино-2-норборнан)карбоновую кислоту, α,γ -диаминомасляную кислоту, α,β -диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин и α -трет-бутилглицин.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению может быть гликозилирован, амидирован, карбоксилирован, фосфорилирован, этерифицирован, N-ацилирован, циклизован, например, через дисульфидный мостик, или превращен в кислотно-аддитивную соль и/или необязательно димеризован или полимеризованы конъюгирован.

Согласно другому варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению находится в форме соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Подходящие фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот могут включать соли, полученные из минеральных кислот, таких как соляная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и органических кислот, таких как винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например, п-толуолсульфоновая кислота.

В контексте настоящего изобретения «ковалентная связь» относится, например, к дисульфидному мостику, или пептидной связи, или ковалентной связи через линкер или последовательность линкера, такую как полипептидный линкер.

В контексте настоящего изобретения термин «линкер» относится к одному или нескольким аминокислотным остаткам, вставленным между доменами или доменом, и агенту, обеспечивающему достаточную подвижность доменов или элементов, например, переменные домены антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению для правильного сворачивания с формированием антигенсвязывающих сайтов, например, в

форме перекрестного спаривания (в формате CODV или в некоторых форматах диантител) или в конфигурации параллельного спаривания (например, в формате DVD) антигенсвязывающих белков.

Согласно некоторым вариантам осуществления линкер состоит из 0 аминокислот, что означает, что линкер отсутствует. Линкер вставляется при переходе между переменными доменами или между переменными доменами и константными доменами (или доменами димеризации), соответственно, на уровне аминокислотной последовательности. Переход между доменами можно идентифицировать, поскольку хорошо известен приблизительный размер доменов антител, а также доменов TCR. Точное местоположение доменного перехода можно определить путем обнаружения участков пептида, которые не образуют вторичные структурные элементы, такие как бета-листы или альфа-спирали, как показано экспериментальными данными или как можно предположить с помощью методов моделирования или прогнозирования вторичной структуры. В контексте настоящего изобретения термин «линкер» включает без ограничения линкеры, называемые L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆.

Линкер, если из контекста не следует иное, такой как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, может составлять от по меньшей мере 1 до 30 аминокислот в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер, такой как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, может составлять 2-25, 2-20, или 3-18 аминокислот в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер, такой как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, может представлять собой пептид с длиной не более 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, или 5 аминокислот. Согласно другим вариантам осуществления линкер, такой как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, может составлять 5-25, 5-15, 4-11, 10-20, или 20-30 аминокислот в длину. Согласно другим вариантам осуществления линкер, такой как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, может составлять приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 аминокислот в длину. Согласно конкретному варианту осуществления линкер, такой как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, может составлять менее 24, менее 20, менее 16, менее 12, менее 10, например, от 5 до 24, от 10 до 24 или 5-10 аминокислотных остатков в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный линкер имеет длину 1 или более аминокислотных остатков, например, более 1, более 2, более 5, более 10, более 20 аминокислотных остатков в длину, более 22 аминокислотных остатков в длину.

Иллюстративные линкеры, такие как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆, содержат или состоят аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из GGGS (SEQ ID NO: 290), GGGGS (SEQ ID NO: 286), GGGAS (SEQ ID NO: 287), GGGSGGGG (SEQ ID NO: 214), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 61),

GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70), GGS GG (SEQ ID NO: 226), GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 280)GGGSA AA (SEQ ID NO: 358), в частности, GGGSGGGG (SEQ ID NO: 214), GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70) и GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 61).

В контексте настоящего изобретения термин «домен F_c» охватывает нативные F_c и варианты F_c и включает как мономерные, димерные, так и мультимерные домены F_c, отщепленные из целого антитела или полученные другими способами.

В контексте настоящего изобретения термин «нативный F_c» относится к молекуле, содержащей последовательность неантигенсвязывающего фрагмента, полученного в результате расщепления антитела или полученного другими способами, в мономерной, димерной или мультимерной форме, и может содержать шарнирную область. Исходный источник антител нативного F_c имеет, в частности, человеческое происхождение и может представлять собой антитела любого класса, хотя IgG1 и IgG2 являются предпочтительными. Нативные молекулы F_c состоят из мономерных полипептидов, которые могут быть связаны в димерные или мультимерные формы посредством ковалентной (т.е. дисульфидных связей) и нековалентной ассоциации. Число межмолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами нативных молекул F_c находится в диапазоне от 1 до 4 в зависимости от класса (например, IgG, IgA и IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 и IgGA2). Одним из примеров нативного F_c является димер с дисульфидными связями, образующийся в результате расщепления IgG папаином. Одним из примеров нативной аминокислотной последовательности F_c является SEQ ID NO: 329.

В контексте настоящего изобретения термин «вариант F_c» относится к молекуле или последовательности, которые модифицированы из нативного F_c, но все еще содержат сайт связывания для рецептора реутилизации F_cRn (неонатальный рецептор F_c). Иллюстративные варианты F_c и их взаимодействие с рецептором реутилизации известны в данной области техники. Таким образом, термин «вариант F_c» может включать молекулу или последовательность, гуманизованную из нативного F_c, не являющегося человеческим. Кроме того, нативный F_c содержит области, которые можно удалить, поскольку они обеспечивают структурные особенности или биологическую активность, которые не требуются для антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению. Таким образом, термин «вариант F_c» включает молекулу или последовательность, в которой отсутствует один или несколько нативных сайтов или остатков F_c, или в которой один или несколько сайтов или остатков F_c модифицированы, что влияет или участвует в: (1) образовании дисульфидной связи, (2) несовместимости с выбранной клеткой-хозяином,

(3) N-концевой гетерогенности при экспрессии в выбранной клетке-хозяине, (4) гликозилировании, (5) взаимодействии с комплементом, (6) связывании с F_c рецептором, отличным от рецептора реутилизации, или (7) антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

Согласно одному варианту осуществления F_c -домен представляет собой F_c -домен человеческого IgG, предпочтительно происходящий из человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно IgG1 или IgG2, более предпочтительно IgG1.

Согласно некоторым вариантам осуществления, когда антигенсвязывающий белок содержит два домена F_c (F_{c1} и F_{c2}), например, в формате TCER[®], применяемом в примерах, два домена F_c относятся к одному и тому же изотипу антитела или подклассу изотипа. Соответственно, согласно таким вариантам осуществления оба F_{c1} и F_{c2} происходят из подкласса IgG1, или из подкласса IgG2, или из подкласса IgG3, или из подкласса IgG4. Согласно предпочтительному варианту осуществления оба F_{c1} и F_{c2} происходят из подкласса IgG1, или из подкласса IgG2, более предпочтительно из подкласса IgG1.

Согласно некоторым вариантам осуществления области F_c дополнительно содержат RF и/или мутацию «выступ во впадину», как определено в настоящем документе ниже.

«Мутация RF» обычно относится к мутации аминокислот НУ в RF в домене СНЗ доменов F_c , такой как мутация Н435R и Y436F в домене СНЗ, как описано Jendeborg, L. *et al.*, (1997, J. Immunological Meth., 201: 25-34) и) и описывается как выгодная для целей очистки, поскольку она устраняет связывание с белком А. В случае, если антигенсвязывающий белок содержит два F_c -домена, мутация RF может находиться в одном или обоих предпочтительно в одном F_c -домене.

Методика «выступ во впадину» относится к мутациям T366S, L368A и Y407V, в частности T366S (впадина) и T366W (выступ), обе на границе раздела C_{H3} - C_{H3} , чтобы способствовать образованию гетеромультимеров, и описана в патентах US5731168 и US8216805, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Эти мутации «выступ во впадину» можно дополнительно стабилизировать путем введения дополнительных аминокислотных замен цистеина Y349C и S354C.

Мутация «выступ», например, присутствует в аминокислотной последовательности F_c согласно SEQ ID NO: 149, а мутация «впадина», например, присутствует в аминокислотной последовательности F_c согласно SEQ ID NO: 150.

Согласно некоторым вариантам осуществления домен F_c одного из полипептидов, например F_{c1} , содержит аминокислотную замену T366W (выступ) в его домене C_{H3} , а домен F_c другого полипептида, например F_{c2} , содержит аминокислотную замену T366S, L368A и Y407V (впадина) в его домене C_{H3} , или наоборот.

Согласно некоторым вариантам осуществления домен F_c одного из полипептидов, например, F_{c1} , содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену S354C в его домене C_{H3} , а домен F_c другого полипептида, например, F_{c2} , содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену Y349C в его домене C_{H3} , или наоборот.

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления домен F_c одного из полипептидов, например F_{c1} , содержит аминокислотные замены S354C и T366W (выступ) в его домене C_{H3} , и домен F_c другого полипептида, например, F_{c2} содержит аминокислотную замену Y349C, T366S, L368A и Y407V (впадина) в своем домене C_{H3} , или наоборот.

Этот набор аминокислотных замен может быть дополнительно расширен путем включения аминокислотных замен K409A в один полипептид и F405K в другой полипептид, как описано в Wei et al. (Structural basis of a novel heterodimeric F_c for bispecific antibody production, *Oncotarget*. 2017). Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления домен F_c одного из полипептидов, например F_{c1} , содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену K409A в его домене C_{H3} , и домен F_c другого полипептида, например, F_{c2} , содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену F405K в его домене C_{H3} , или наоборот.

В некоторых случаях искусственно введенные цистеиновые мостики могут улучшить стабильность антигенсвязывающих белков, оптимально не нарушая характеристики связывания антигенсвязывающих белков. Такие цистеиновые мостики могут дополнительно улучшить гетеродимеризацию.

Дополнительные аминокислотные замены, такие как замены заряженных пар, описаны в данной области техники, например, в EP 2970484, для улучшения гетеродимеризации полученных белков.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления домен F_c одного из полипептидов, например, F_{c1} , содержит или дополнительно содержит замены заряженных пар E356K, E356R, D356R или D356K и D399K или D399R, а также домен F_c другого полипептида, например, F_{c2} , содержит или дополнительно содержит замены заряженных пар R409D, R409E, K409E или K409D и N392D, N392E, K392E или K392D, или наоборот.

Согласно другому варианту осуществления домен F_c на одной или обеих, предпочтительно обеих, полипептидных цепях может содержать одно или несколько изменений, которые ингибируют связывание гамма-рецептора F_c ($F_{c\gamma}R$). К таким изменениям можно отнести L234A, L235A.

Согласно другому варианту осуществления домен F_c на одной или обеих, предпочтительно обеих, полипептидных цепях может содержать мутацию N297Q для

удаления сайта N-гликозилирования внутри F_c-части, такая мутация отменяет взаимодействие с F_c-гамма-рецептором.

«Шарнир», «шарнирная область» или «шарнирный домен» обычно относятся к гибкой части тяжелой цепи, расположенной между доменом C_{H1} и доменом C_{H2}. Его длина составляет приблизительно 25 аминокислот, и он разделен на «верхний шарнир», «средний шарнир» или «основной шарнир» и «нижний шарнир». «Поддомен шарнира» относится к верхнему шарниру, среднему (или основному) шарниру или нижнему шарниру. Аминокислотные последовательности шарниров молекулы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 указаны ниже:

IgG1: E₂₁₆PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 330)

IgG2: E₂₁₆RKCCVECPAPPVAGP (SEQ ID NO: 331)

IgG3: ELKTP LGDTTHTCPRCPEPKSCDT PPPCPRCPE₂₁₆PKSCDT PPPCPRCPELLG (SEQ ID NO: 332)

IgG4: E₂₁₆SKYGPPCPSCPAPEFLG (SEQ ID NO: 333).

В контексте настоящего изобретения делается ссылка на аминокислотные положения в домене F_c, эти аминокислотные положения или остатки аминокислот указаны в соответствии с системой нумерации ЕС, как описано, например, в Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969).

При включении F_c-частей, состоящих из шарниров, доменов C_{H2} и C_{H3} или их частей, в антигенсвязывающие белки, более конкретно в биспецифические антигенсвязывающие белки, возникает проблема неспецифической иммобилизации этих молекул, индуцируемой возникновением взаимодействий с F_c-гамма-рецептором (F_cγR). F_cγR состоят из различных молекул клеточной поверхности (F_cγRI, F_cγRIIa, F_cγRIIb, F_cγRIII), связывающихся с разной аффинностью с эпитопами, отображаемыми F_c-частями молекул IgG. По существу, такая неспецифическая (т.е. не индуцированная ни одним из двух связывающих доменов биспецифической молекулы) иммобилизация является неблагоприятной из-за: i) влияния на фармакокинетику молекулы и ii) нецелевой активации иммунных эффекторных клеток различных F_c-вариантов, и были идентифицированы мутации, приводящие к устранению F_cγR-связывания. В этом контексте, Morgan et al. 1995, Immunology (The N-terminal end of the C_{H2} domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, F_cγRI and F_cγRIII binding) раскрывает обмен остатков 233-236 человеческого IgG1 с соответствующей последовательностью, происходящей из человеческого IgG2, т.е. остатками 233P, 234V и 235A, и в которой аминокислота не присутствует в положении 236, что приводит к отмене F_cγRI-связывания, отмене связывания C1q и уменьшению связывания F_cγRIII. В EP1075496 раскрыты антитела и другие F_c-содержащие молекулы с вариациями в области F_c, как

например, один или несколько из 233P, 234V, 235A и отсутствие остатка или G в положениях 236 и 327G, 330S и 331S), где рекомбинантное антитело способно связывать молекулы-мишени без запуска значительного комплементзависимого лизиса или клеточно-опосредованного разрушения мишени.

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления область F_c содержит или дополнительно содержит одну или несколько аминокислот или делеций, выбранных из группы, состоящей из 233P, 234V, 235A, 236 (без остатка) или G, 327G, 330S, 331S, предпочтительно, область F_c содержит или дополнительно содержит аминокислоты 233P, 234V, 235A, 236 (без остатка) или G и одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из 327G, 330S, 331S, наиболее предпочтительно, область F_c содержит или дополнительно содержит аминокислоты 233P, 234V, 235A, 236 (без остатка) и 331S.

Согласно другому варианту осуществления домен F_c содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену N297Q, N297G или N297A, предпочтительно N297Q.

Аминокислотные замены «N297Q», «N297G» или «N297A» относятся к аминокислотным заменам в положении 297, которые отменяют нативный сайт N-гликозилирования F_c-домене. Эта аминокислотная замена дополнительно предотвращает взаимодействие с F_c-гамма-рецептором и снижает вариабельность конечных белковых продуктов, т.е. антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, из-за остатков сахара, как описано, например, в Тао, MH and Morrison, SL (J Immunol. 1989 Oct 15,143(8):2595-601.).

Согласно другому варианту осуществления, в частности, при отсутствии легкой цепи, домен F_c содержит или дополнительно содержит аминокислотную замену C220S. Аминокислотная замена «C220S» удаляет цистеин, образующий дисульфидную связь C_{H1}-C_L.

Согласно некоторым вариантам осуществления домен F_c содержит или дополнительно содержит по меньшей мере два дополнительных остатка цистеина, например, S354C и Y349C или L242C и K334C, где S354C находится в F_c-домене одного полипептида, такого как F_{c1}, и Y349C находится в домене F_c другого полипептида, такого как F_{c2}, с образованием гетеродимера, и/или где L242C и K334C расположены в одном F_c-домене либо в F_{c1}, либо в F_{c2} одного или обоих полипептидов с образованием внутридоменной связи C-C.

Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению может быть синтетическим, рекомбинантным, выделенным, сконструированным и/или очищенным.

Под «очищенным» подразумевается, когда речь идет о полипептиде, например, антигенсвязывающем белке согласно настоящему изобретению, или нуклеотидной

последовательности, например, кодирующей антигенсвязывающие белки или их функциональный фрагмент, описанные в настоящем документе, что указанная молекула присутствует по существу в отсутствии других биологических макромолекул того же типа. В контексте настоящего изобретения термин «очищенный», в частности, означает, что присутствует по меньшей мере 75 мас.%, 85 мас.%, 95 мас.% или 98 мас.% биологических макромолекул одного и того же типа.

Молекула очищенной нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный полипептид, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая по существу свободна от других молекул нуклеиновой кислоты, которые не кодируют рассматриваемый полипептид, однако, молекула может включать некоторые дополнительные основания или фрагменты, которые не оказывают вредного воздействия на основные характеристики композиции.

Термин «выделенный» означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом животном, не являются «выделенными», но та же самая нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в своем естественном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин. Выделенный антигенсвязывающий белок по существу не содержит других антигенсвязывающих белков, обладающих различной антигенной специфичностью (например, антигенсвязывающий белок, который специфически связывает PRAME, по существу свободен от антигенсвязывающих белков, которые специфически связывают антигены, отличные от PRAME). Более того, выделенный антигенсвязывающий белок может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

«Рекомбинантная» молекула представляет собой молекулу, полученную, экспрессированную, созданную или выделенную рекомбинантными способами. Рекомбинантных молекул в природе не существует.

Термин «ген» означает последовательность ДНК, которая кодирует определенную аминокислотную последовательность или соответствует ей, которая включает все или часть одного или нескольких белков или ферментов и может включать или не включать регуляторные последовательности ДНК, такие как промоторные последовательности, которые определяют, например, условия, при которых экспрессируется ген. Некоторые гены, не являющиеся структурными, могут транскрибироваться с ДНК на РНК, но не транслируются в аминокислотную последовательность. Другие гены могут

функционировать как регуляторы структурных генов или регуляторы транскрипции ДНК. В частности, термин «ген» может относиться к геномной последовательности, кодирующей белок, т.е. последовательности, содержащей последовательности регулятора, промотора, интрона и экзона.

В контексте настоящего изобретения «аффинность» определяется равновесным связыванием между антигенсвязывающим белком и его антигеном, а именно пептидом PRAME-004 согласно SEQ ID NO: 50 в комплексе с белком МНС. Аффинность может быть выражена, например, в полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) или равновесной константе диссоциации (K_D). В контексте настоящего изобретения высокая аффинность относится к связыванию с $K_D \leq 100$ нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ или ≤ 5 нМ.

« K_D » равновесную константу диссоциации, соотношение k_{off}/k_{on} между антигенсвязывающим белком и его антигеном. K_D и аффинность находятся в обратной зависимости. Значение K_D относится к концентрации антигенсвязывающего белка, и чем ниже значение K_D , тем выше аффинность антигенсвязывающего белка. Аффинность, то есть значение K_D , можно экспериментально оценить с помощью множества известных методов, таких как измерение скоростей ассоциации и диссоциации с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или интерферометрии биослоя (BLI), как более подробно описано ниже в настоящем документе в разделе «Антигенсвязывающие белки». K_D предпочтительно измеряют с помощью интерферометрии биослоя (BLI). Более предпочтительно K_D антигенсвязывающего белка с антигенным пептидом PRAME определяют при температуре от 20°C до 35°C, предпочтительно от 25°C до 32°C, более предпочтительно приблизительно 30°C, и значения pH 6,5 - 8,0, предпочтительно от 7,0 до 7,6, согласно BLI. Даже более предпочтительно K_D антигенсвязывающего белка с антигенным пептидом PRAME определяют при температуре от 20°C до 35°C, предпочтительно от 25°C до 32°C, более предпочтительно при приблизительно 30°C, значении pH от 6,5 до 8,0, предпочтительно от 7,0 до 7,6, и концентрации соли от 100 до 200 мМ, предпочтительно от 120 до 175 мМ, более предпочтительно приблизительно 140 мМ, согласно BLI. Наиболее предпочтительно K_D антигенсвязывающего белка с антигенным пептидом PRAME определяют при 30°C в буфере, содержащем или состоящем из PBS, 0,05 % Tween-20 и 0,1% BSA, с помощью BLI. В таких измерениях концентрация антигенсвязывающего белка обычно находится в пределах 1,56–500 нМ, в зависимости от аффинности измеряемого взаимодействия. В тех случаях, когда сравнивают K_D антигенсвязывающего белка для двух разных пептидов (например, пептида-мишени и потенциально нецелевого пептида/подобного пептида), условия загрузки пептида-HLA одинаковы для обоих измерений, если оба измеряемых пептида имеют одинаковую силу

связывания с HLA, а диапазон концентрации антигенсвязывающего белка выбирают с учетом ожидаемой аффинности.

«Полумаксимальная эффективная концентрация», также называемая «EC₅₀», обычно относится к концентрации молекулы, которая вызывает реакцию на полпути между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия. EC₅₀ и аффинность обратно пропорциональны: чем ниже значение EC₅₀, тем выше аффинность молекулы. В одном примере «EC₅₀» относится к концентрации антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению, которая индуцирует ответ на полпути между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия, более конкретно, относится к концентрации антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению, которая вызывает реакцию на полпути между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия. Значения EC₅₀ можно экспериментально оценить с помощью множества известных методов, используя, например, анализы связывания, такие как ELISA или проточная цитометрия, или функциональные анализы, такие как анализ высвобождения IFN-гамма или анализ высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH).

Антигенсвязывающие белки

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению сконструированы из каркасной последовательности, в которую введен ряд мутаций. Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению имеют особенно подходящий профиль для терапевтического применения. В общем, идентификация таких антигенсвязывающих белков не является простой задачей и обычно имеет высокую степень исключения.

В первую очередь специалисту необходимо идентифицировать подходящую стартовую последовательность или каркасную последовательность. Для настоящего изобретения это TCR, имеющий хорошую аффинность в отношении комплекса целевой пептид-HLA, например, 200 мкМ или более, высокий уровень целевой специфичности, например, относительно слабое связывание или отсутствие связывания с альтернативными комплексами пептид-HLA, который можно повторно свернуть и очистить с высоким выходом. Учитывая вырожденный характер распознавания TCR, даже специалистам в данной области чрезвычайно сложно определить, имеет ли конкретная каркасная последовательность TCR профиль специфичности, который позволил бы ее использовать в целях конструирования для терапевтического применения (Wooldridge, et al., J Biol Chem. 2012 Jan 6,287(2): 1 168-77).

Особенно важной стадией является преобразование этого TCR в растворимый формат, который можно стабильно экспрессировать. Встречающиеся в природе TCR

связаны с мембраной и экспрессируются только в комплексе с CD3. В отличие от антител, которые обычно экспрессируются в виде молекул одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), соответствующие конструкции варибельного домена одноцепочечного Т-клеточного рецептора (scTv) склонны к агрегации и неправильному сворачиванию (Richman, et al. Mol Immunol. 2009 Feb,46(5):902-16. doi: 10.1016/j.molimm.2008.09.021. Epub 2008 Oct 29.) Эта стадия является обязательной для создания активного биологического вещества, но может также иметь решающее значение для дальнейших стадий конструирования, как описано ниже. Процесс конверсии scTv и получения стабильной и растворимой молекулы обычно предусматривает создание одной или нескольких специфических мутаций в каркасных областях и/или CDR, включая без ограничения замены, вставки и/или делеции, на исходной последовательности TCR для повышения экспрессии и стабильности scTv. В настоящем документе каждый TCR имеет различный набор мутаций, в зависимости от комбинации варибельных доменов, а также состава CDR3. Конкретные мутации и/или комбинации мутаций, которые приводят к значительному увеличению растворимости и стабильности, непредсказуемы, и существует высокая скорость исключения. Во многих случаях может оказаться невозможным добиться значительного увеличения растворимости и стабильности при заданной исходной последовательности TCR.

Следующая задача состоит в том, чтобы сконструировать TCR так, чтобы он имел более высокую аффинность в отношении антигена-мишени, сохраняя при этом желаемые характеристики, такие как специфичность и выход. TCR, существующие в природе, обладают слабой аффинностью в отношении антигена-мишени (низкий микромолярный диапазон) по сравнению с антителами, а TCR против раковых антигенов обычно обладают более слабым распознаванием антигена, чем вирусспецифические TCR (Aleksic, et al. Eur J Immunol. 2012 Dec, 42(12):3174-9). Эта слабая аффинность в сочетании с подавлением HLA на раковых клетках означает, что терапевтические TCR для иммунотерапии рака обычно требуют разработки, чтобы увеличить их аффинность в отношении антигена-мишени и, таким образом, вызвать более мощный ответ. Такое увеличение аффинности важно для растворимых реагентов на основе TCR. В таких случаях желательна аффинность связывания антигена в наномолярном или пикомолярном диапазоне с периодом полужизни связывания в несколько часов. Процесс созревания аффинности обычно предусматривает создание специфических мутаций в CDR и/или комбинаций мутаций в CDR, включая без ограничения замены, вставки и/или делеции в исходной последовательности TCR с целью повышения силы распознавания антигена. Для того, чтобы добиться значительного увеличения аффинности данного TCR к заданной мишени, специалисту в данной области

техники, возможно, придется сконструировать комбинации мутаций в CDR из большого пула возможных альтернатив. Конкретные мутации и/или комбинации мутаций, которые приводят к значительному увеличению аффинности, непредсказуемы, и существует высокая скорость исключения. Во многих случаях может оказаться невозможным добиться значительного увеличения аффинности с данной исходной последовательностью TCR.

Процесс созревания аффинности также должен учитывать необходимость поддержания специфичности антигена TCR. Увеличение аффинности TCR к его антигену-мишени сопряжено с существенным риском выявления перекрестной реактивности с другими непреднамеренными мишенями в результате присущего ухудшения распознавания антигена TCR (Wooldridge, et al., J Biol Chem. 2012 Jan 6,287(2): 1 168-77, Wilson, et al., Mol Immunol.2004 Feb,40(14-15): 1047-55, Zhao et al., J Immunol. 2007 Nov 1,179(9):5845-54). При естественном уровне аффинности распознавание перекрестно-реактивного антигена может быть слишком низким, чтобы вызвать ответ. Если перекрестно-реактивный антиген отображается на нормальных здоровых клетках, существует высокая вероятность нецелевого связывания *in vivo*, что может проявиться в клинической токсичности. Таким образом, в дополнение к увеличению силы связывания антигена специалист в данной области техники должен также сконструировать мутации в CDR и/или комбинации мутаций в CDR, которые позволяют TCR сохранять высокую специфичность к антигену-мишени и, таким образом, демонстрировать хороший профиль безопасности в доклинических испытаниях. В данном случае подходящие мутации и/или комбинации мутаций также непредсказуемы. Скорость исключения на той стадии еще выше и во многих случаях может быть вообще недостижима при данной исходной последовательности TCR. Несмотря на описанные выше трудности, авторы настоящего изобретения идентифицировали антигенсвязывающие белки, содержащие CDR, происходящие из TCR, с особенно высокой аффинностью (низкий наномолярный диапазон) и высокой степенью антигенной специфичности.

Используя TCR R11P3D3, как описано в WO2018/172533, которая включена в настоящий документ посредством ссылки, в качестве исходной точки, авторы настоящего изобретения сконструировали, получили и протестировали варианты переменного альфа- и переменного бета-домена R11P3D3 в одноцепочечном TCR (scTCR) формате, необязательно связанном с Fab-фрагментом, и в формате TCER[®]. Таким образом, авторы идентифицировали различные CDR, в частности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и CDRb3 и необязательно CDRa2 и CDRb2, которые необходимы для связывания антигенсвязывающими белками согласно настоящему изобретению своей мишени, т.е.

пептида PRAME-004 в комплексе с белком МНС, с высокой аффинностью и высокой специфичностью.

Авторы настоящего изобретения разработали биспецифические молекулы TCER®, одноцепочечные TCR (scTCR) и биспецифические молекулы scTCR-Fab. Все конструкции специфически связываются с комплексом пептид-МНС, содержащим пептид PRAME-004. Биспецифические конструкции, раскрытые в примерах, дополнительно связываются с эффекторными клетками, в частности Т-клетками, через полученный из антитела «рекрутер». Таким образом, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что CDR можно использовать в конструкциях одноцепочечных TCR, а также в биспецифических молекулах TCR-антитело, и, таким образом, продемонстрировали, что идентифицированные CDR можно использовать для продукции различных антигенсвязывающих белков, обладающих высокой аффинностью и высокой специфичностью к пептиду PRAME-004 в комплексе с белком МНС.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом PRAME, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL согласно SEQ ID NO: 50 и находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), причем антигенсвязывающий белок содержит переменный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где

- CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности VKEFQD (SEQ ID NO: 16) или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 16 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

- CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ALYNNLDMR (SEQ ID NO: 33), или ALYNNYDMR (SEQ ID NO: 34), или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34 одной, двумя или тремя, предпочтительно одной или двумя, аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

переменный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где

- CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SGHNS (SEQ ID NO: 10) или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 10 одной, двумя или тремя, предпочтительно одной или двумя, аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

- CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ASSX₁GX₂X₃DX₄QY, где X₁ представляет собой P, A или T, предпочтительно P, X₂ представляет собой A или S, предпочтительно A, X₃ представляет собой T или I, и X₄ представляет собой T, K или A, предпочтительно K или A, более предпочтительно K (SEQ ID NO: 327), или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 327 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

Специфичность антигенсвязывающего белка определяется аминокислотными последовательностями CDRa1, CDRa3, CDRb1 и CDRb3 и не зависит от аминокислотных последовательностей CDRa2 и CDRb2.

Согласно некоторым вариантам осуществления CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 32 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 32 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и/или CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 36 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 36 одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью, предпочтительно не более чем пятью, более предпочтительно не более чем четырьмя, даже предпочтительно не более чем тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок содержит CDRa1, CDRb1 и необязательно CDRa2 и CDRb2, как определено выше, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 33 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 33 одной, двумя или тремя, предпочтительно одной или двумя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ASSX₁GX₂X₃DX₄QY (SEQ ID NO: 327), где X₁ представляет собой P, A или T, предпочтительно P, X₂ представляет собой A или S, предпочтительно A, X₃ представляет собой T или I, и X₄ представляет собой T, K или A, предпочтительно K или A, более предпочтительно K, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 327 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок содержит CDRa1, CDRb1 и необязательно CDRa2 и CDRb2, как определено выше, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 34 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 34 одной, двумя или

тремя, предпочтительно одной или двумя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ASSX₁GX₂X₃DX₄QY (SEQ ID NO: 327), где X₁ представляет собой P, A или T, предпочтительно P, X₂ представляет собой A или S, предпочтительно A, X₃ представляет собой T или I, и X₄ представляет собой T, K или A, более предпочтительно K или A, предпочтительно K, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 327 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ASSPGX₂X₃DX₄QY (SEQ ID NO: 364), где X₂ представляет собой A или S, предпочтительно A, X₃ представляет собой T или I, и X₄ представляет собой T, K или A, предпочтительно K или A, более предпочтительно K, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 364 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ASSPGX₂TDX₄QY (SEQ ID NO: 363), где X₂ представляет собой A или S, предпочтительно A, и X₄ представляет собой T, K или A, предпочтительно K или A, более предпочтительно K, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 363 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ASSPGAX₃DX₄QY (SEQ ID NO: 365), где X₃ представляет собой T или I, предпочтительно I, и X₄ представляет собой K или A, предпочтительно K, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 365 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок содержит CDRa1, CDRb1 и необязательно CDRa2 и CDRb2, как определено выше, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 33 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 33 одной, двумя или тремя, предпочтительно одной или двумя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 48 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 48 одной, двумя, тремя или четырьмя, предпочтительно

одной, двумя или тремя, более предпочтительно одной или двумя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок содержит CDRa1, CDRb1 и необязательно CDRa2 и CDRb2, как определено выше, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 33 или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 33 одной, двумя или тремя, предпочтительно одной или двумя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 48, или SEQ ID NO: 283, или SEQ ID NO: 281, или SEQ ID NO: 297, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 281 или SEQ ID NO: 283 одной, двумя или тремя, предпочтительно одной или двумя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления CDRa1, CDRa3, CDRb1, CDRb3 и необязательно CDRa2 и CDRb2 отличаются от SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 33 или 34, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 36, соответственно, не более чем двумя, предпочтительно не более чем одной аминокислотной мутацией, предпочтительно аминокислотной заменой. Согласно предпочтительным вариантам осуществления аминокислотные замены в CDR являются консервативными заменами.

Вариабельный домен V_A и вариабельный домен V_B вместе образуют антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигенным пептидом PRAME-004, находящимся в комплексе с белком МНС. В дальнейшем этот антигенсвязывающий сайт иногда также называют «первым антигенсвязывающим сайтом».

CDRa1, CDRa2 и CDRa3 происходят из вариабельного домена α -цепи TCR, а CDRb1, CDRb2 и CDRb3 происходят из вариабельного домена β -цепи TCR.

Помимо CDR, V_A и V_B содержат каркасные области (FR). Последовательности FR могут происходить из TCR, т.е. происходить из вариабельного домена α -, β -, γ - или δ -цепи TCR, или могут происходить из вариабельного домена антитела. В одном примере V_A содержит последовательности FR вариабельного домена легкой цепи антитела и, таким образом, может быть описана как (FR1-L)-(CDRa1)-(FR2-L)-(CDRa2)-(FR3-L)-(CDRa3)-(FR4-L), и V_B содержит последовательности FR вариабельного домена тяжелой цепи антитела и, таким образом, может быть описана как (FR1-H)-(CDRb1)-(FR2-H)-(CDRb2)-(FR3-H)-(CDRb3)-(FR4-H). Предпочтительно V_A содержит последовательности FR вариабельного домена α - или γ -, предпочтительно α -цепи, и, таким образом, может быть описана как (FR1-a)-(CDRa1)-(FR2-a)-(CDRa2)-(FR3-a)-(CDRa3)-(FR4-a), и V_B содержат

последовательности FR переменного домена β - или δ -, предпочтительно β -цепи, и, таким образом, может быть описана как (FR1-b)-(CDRb1)-(FR2-b)-(CDRb2)-(FR3-b)-(CDRb3)-(FR4-b). В тех случаях, когда весь домен V_A происходит из α -цепи TCR, V_A также может называться V_α . В тех случаях, когда весь домен V_B происходит из β -цепи TCR, V_B также может называться V_β .

Согласно некоторым вариантам осуществления

- Положение 27 последовательности CDRa1 согласно IMGT представляет собой V или содержит замену на аминокислоту, выбранную из L, I, M, F, A, T, N, Q, H, E, D и S, в частности, выбранную из T, N, S и I,

- Положение 28 последовательности CDRa1 согласно IMGT представляет собой K или содержит замену на аминокислоту, выбранную из R, Q, H, N, A, V, S, G, L, I и T, в частности, выбранную из R, A и S,

- Положение 38 последовательности CDRa1 согласно IMGT представляет собой D или содержит замену на аминокислоту, выбранную из E, N, Q, H, K и R, в частности, N,

- Положение 64 последовательности CDRa2 согласно IMGT представляет собой K или содержит замену на аминокислоту, выбранную из R, Q, H, N, T, V, A, L, I, M и F, в частности, выбранную из R, T, и V,

- Положение 114 последовательности CDRa3 согласно IMGT представляет собой L или Y или содержит замену на аминокислоту, выбранную из M, W, H, Q, A, I, K, R, V, D, E, F и N, в частности, выбранную из H, Q, A, I, K, R, V, D, E, F и N, более конкретно выбранную из H, Q, A и I,

- Положение 56 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой F или содержит замену на аминокислоту, выбранную из Y, M, L, W, H, V, I и A, в частности, выбранную из Y, M и L,

- Положение 57 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой Q или содержит замену на аминокислоту, выбранную из N, R, D, E, Q, H, K и K, в частности, N, при условии, что аминокислота в положении 57 не представляет собой N, когда аминокислота в положении 63 представляет собой T или S,

- Положение 58 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой N или содержит замену на аминокислоту, выбранную из Q, H, D, K, R, S и T, в частности, S,

- Положение 63 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой T или содержит замену на аминокислоту, выбранную из S, V, A, D, Q и E, в частности,

выбранную из S и E, при условии, что аминокислота в положении 63 не представляет собой T или S, когда аминокислота в положении 57 представляет собой N,

- Положение 64 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой A или содержит замену на аминокислоту, выбранную из V, L, I, S, G и T, в частности, T,

- Положение 65 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой V или содержит замену на аминокислоту, выбранную из L, I, M, A, T, F и S, в частности, выбранную из I, L и T,

- Положение 108 последовательности CDRb3 согласно IMGT представляет собой P, A или T или содержит замену на аминокислоту, выбранную из V, L, I, S, G, R, K, N и Q, в частности, выбранную из R и S, при условии, что аминокислота в положении 108 не представляет собой N, когда аминокислота в положении 110 представляет собой T или S,

- Положение 110 последовательности CDRb3 согласно IMGT представляет собой A или S или содержит замену на аминокислоту, выбранную из V, L, I, G, T и C, в частности, T, при условии, что аминокислота в положении 110 не представляет собой T или S, когда аминокислота в положении 108 представляет собой N,

- Положение 113 последовательности CDRb3 согласно IMGT представляет собой T или I или содержит замену на аминокислоту, выбранную из V, L, I, G и T, и

- Положение 115 последовательности CDRb3 согласно IMGT представляет собой T, K или A или содержит замену на аминокислоту, выбранную из G, L, I, V, R, Q, N, Y, H, E и F, в частности, выбранную из L, I, V, R, Q, N, Y, H, E и F, более конкретно из L, I, V и R.

Согласно некоторым вариантам осуществления

- CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности $X_1X_2EFQX_3$ (SEQ ID NO: 334), где X_1 представляет собой V, T, N, I или S, предпочтительно V, T или N, наиболее предпочтительно V, X_2 представляет собой K, R, S или A, более предпочтительно K или R, наиболее предпочтительно K, и X_3 представляет собой D или N, предпочтительно D,

- CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности FGPYGX₁E (SEQ ID NO: 335), где X_1 представляет собой K, R, T или V, предпочтительно K или R, наиболее предпочтительно K,

- CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ALYNNX₁DMR (SEQ ID NO: 336), где X_1 представляет собой L, Y, H, Q, A, I, K, R, V, D, E,

F или N, предпочтительно L, Y, H, Q, A, I, K или R, более предпочтительно L, Y, H, Q или A, наиболее предпочтительно L или Y

- CDRb1 предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 10

- CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, где X_1 представляет собой F, Y, M или L, предпочтительно F или Y, наиболее предпочтительно F, X_2 представляет собой Q или N, предпочтительно Q (если X_2 представляет собой N, тогда X_3 также представляет собой N), X_3 представляет собой N или S, предпочтительно N, X_4 представляет собой T, S, или E, предпочтительно T или S, наиболее предпочтительно T (если X_4 представляет собой S, тогда X_2 представляет собой Q), X_5 представляет собой A или T, предпочтительно A, и X_6 представляет собой V, I, L или T, предпочтительно V или I, наиболее предпочтительно V (SEQ ID NO: 337), более предпочтительно CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности $X_1QX_3TX_5X_6$ (SEQ ID NO: 359), где X_1 представляет собой F, Y, M или L, предпочтительно F или Y, наиболее предпочтительно F, X_3 представляет собой N или S, предпочтительно N, X_5 представляет собой A или T, предпочтительно A, и X_6 представляет собой V, I, L или T, предпочтительно V или I, наиболее предпочтительно V, и

- CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности $ASSX_1GX_2X_3DX_4QY$ (SEQ ID NO: 338), где X_1 представляет собой P, R, A, T, или S, предпочтительно P, T или A, наиболее предпочтительно P, X_2 представляет собой A или S, предпочтительно A, X_3 представляет собой T или I, предпочтительно T, и X_4 представляет собой K, A, L, I, V, R, Q, N, Y, T, H, E или F, предпочтительно K, A, L, I, V, R, Q N или Y, более предпочтительно K, A, L, I, V или R, наиболее предпочтительно K или A.

Согласно некоторым вариантам осуществления

- CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28,

- CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности согласно SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 29,

- CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 225 и SEQ ID NO: 9,

- CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 10

- CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 35, и/или

- CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 302 и SEQ ID NO: 271 и SEQ ID NO: 269.

Предпочтительно, антигенсвязывающий белок содержит CDRa1 согласно SEQ ID NO: 16, CDRa3 согласно SEQ ID NO: 34, CDRb1 согласно SEQ ID NO: 10, CDRb3 согласно SEQ ID NO: 48 или 292, и необязательно CDRa2 согласно SEQ ID NO: 32, и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 36.

Согласно предпочтительному примеру антигенсвязывающий белок содержит CDRa1 согласно SEQ ID NO: 16, CDRa3 согласно SEQ ID NO: 34, CDRb1 согласно SEQ ID NO: 10, и CDRb3 согласно SEQ ID NO: 48, и необязательно CDRa2 согласно SEQ ID NO: 32, и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 36. Таким образом, антигенсвязывающий белок может содержать CDRa1 согласно SEQ ID NO: 16, CDRa3 согласно SEQ ID NO: 34, CDRb1 согласно SEQ ID NO: 10, CDRb3 согласно SEQ ID NO: 48, CDRa2 согласно SEQ ID NO: 32, и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 36.

Согласно другому предпочтительному примеру антигенсвязывающий белок содержит CDRa1 согласно SEQ ID NO: 16, CDRa3 согласно SEQ ID NO: 34, CDRb1 согласно SEQ ID NO: 10, и CDRb3 согласно SEQ ID NO: 292, и необязательно CDRa2 согласно SEQ ID NO: 32, и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 36. Таким образом, антигенсвязывающий белок может содержать CDRa1 согласно SEQ ID NO: 16, CDRa3 согласно SEQ ID NO: 34, CDRb1 согласно SEQ ID NO: 10, CDRb3 согласно SEQ ID NO: 292, CDRa2 согласно SEQ ID NO: 32, и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 36.

Предпочтительно антигенсвязывающий белок содержит CDRa1 согласно SEQ ID NO: 16, CDRa3 согласно SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, или SEQ ID NO: 9, CDRb1 согласно SEQ ID NO: 10, CDRb3 согласно SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 47, SEQ ID

NO: 281, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 301 или SEQ ID NO: 283 и необязательно CDRa2 согласно SEQ ID NO: 32 и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 36 без модификаций.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенный пептид PRAME состоит из SEQ ID NO: 50.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 50 в комплексе с белком МНС.

Согласно некоторым вариантам осуществления белок HLA МНС класса I, такой как HLA-A, HLA-B или HLA-C, предпочтительно HLA-A, более предпочтительно HLA-A*02.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается со структурным эпитопом антигенного пептида PRAME-004 согласно SEQ ID NO: 50. Согласно более предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом антигенного пептида PRAME-004 согласно SEQ ID NO: 50.

Авторы настоящего изобретения провели эксперименты с целью идентификации остатков PRAME-004, которые имеют отношение к связыванию антигенсвязывающими белками согласно настоящему изобретению (фиг. 5, таблица 4, 10, 12, 16). В результате авторы настоящего изобретения смогли идентифицировать положения аминокислот 3, 5, 6, 7 и 8 SEQ ID NO: 50, которые имеют отношение к связыванию. Аминокислота в положении 3 хорошо распознается антигенсвязывающими белками согласно настоящему изобретению. Аминокислоты в положении 5 также хорошо распознаются. Наиболее хорошо распознается аминокислота в положении 7. Аминокислоты в положениях 6 и 8 внесли незначительный вклад. Положения 3, 5 и 7 и необязательно 6 и 8 согласно SEQ ID NO: 50 также называют в настоящем документе «связывающим мотивом» PRAME-004. Специалистам в данной области техники известно, что определение точного эпитопа или функционального эпитопа может незначительно варьироваться в зависимости от используемого метода и выбранных пороговых значений.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 3, 4 или 5 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 5, 6, 7 и 8, в частности, 3, 5 и 7 согласно SEQ ID NO: 50. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим аминокислотные положения 3, 5 и 7 согласно SEQ ID NO: 50. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок специфически

связывается с функциональным эпитопом, состоящим из аминокислотных положений 3, 5 и 7, или 3, 5, 6 и 7, или 3, 5, 7 и 8 или 3, 5, 6, 7 и 8 согласно SEQ ID NO: 50, предпочтительно без аминокислотных положений 1 и 4 согласно SEQ ID NO: 50. Другими словами, антигенсвязывающий белок специфически связывается с аминокислотными положениями 3, 5 и 7, и необязательно 6 и/или 8, предпочтительно не с 1 или 4, согласно SEQ ID NO: 50, предпочтительно в комплексе с белком МНС, в частности белком HLA, более конкретно HLA-A, даже более конкретно HLA -A*02. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим по меньшей мере 3 аминокислотных положения, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 5, 6, 7 и 8 согласно SEQ ID NO: 50, при условии, что антигенсвязывающий белок не связывается с аминокислотными положениями 1 и 4 согласно SEQ ID NO: 50. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из по меньшей мере 6 или 7 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 согласно SEQ ID NO: 50.

Аминокислотная последовательность согласно SEQ ID NO: 50, в которой по меньшей мере одно положение содержит замену, в контексте настоящего изобретения называется «вариантной последовательностью PRAME». В частности, одно положение содержит замену а на аланин (SEQ ID NO: 318-324). Пептиды, имеющие вариантную последовательность PRAME, также называют в настоящем документе вариантными пептидами PRAME. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с вариантными пептидами PRAME, в которых по меньшей мере одно из положений 1, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, в частности одно из положений 3, 5, 6, 7 и 8, более конкретно одно из положений 3, 5 и 7, содержит замену на аланин в комплексе с белком МНС, с пониженной аффинностью, в частности с K_D , увеличенной в ≥ 2 , ≥ 5 , ≥ 10 , ≥ 20 или \geq раз 30 по сравнению с K_D для связывания с антигенным пептидом PRAME согласно SEQ ID NO: 50. Предпочтительно K_D определяют, как указано в разделе определений выше.

При использовании в антигенсвязывающих белках согласно настоящему изобретению, в частности в биспецифических антигенсвязывающих белках, более конкретно в формате TCER®, аминокислотные последовательности CDR, идентифицированные авторами настоящего изобретения, повышают аффинность связывания, стабильность и специфичность антигенсвязывающих белков, в частности, по сравнению с эталонным белком.

В контексте настоящего изобретения «эталонный белок» относится к белку, с которым сравнивают антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению. Сравнение антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению и эталонного белка проводят в сходных, предпочтительно идентичных экспериментальных условиях, предпочтительно параллельно. Таким эталонным белком может быть антигенсвязывающий белок, содержащий CDR родительского/дикого типа TCR R11P3D3, который раскрыт в WO2018/172533. Эталонный белок предпочтительно имеет тот же формат, что и антигенсвязывающий белок, с которым его сравнивают. В случаях, когда антигенсвязывающий белок представляет собой scTCR, подходящим эталонным белком является scTCR R11P3D3SD (SEQ ID NO: 6), который содержит вариабельные домены TCR R11P3D3, включая стабилизирующие мутации. Например, эталонный белок может представлять собой описанный в настоящем документе TCER®, содержащий CDR TCR R11P3D3. Альтернативно, эталонный белок представляет собой антигенсвязывающий белок, например, TCER®, содержащий CDR «CDR6». CDR «CDR6» представляют собой CDRa1 аминокислотной последовательности DRGSQS (SEQ ID NO: 339), CDRa2 аминокислотной последовательности IYSNGD (SEQ ID NO: 340), CDRa3 аминокислотной последовательности AAVIDNDQGGILT (SEQ ID NO: 341), CDRb1 аминокислотной последовательности PGHRA (SEQ ID NO: 342), CDRb2 аминокислотной последовательности YVHGEE (SEQ ID NO: 343) и CDRb3 аминокислотной последовательности ASSPWDSPNVQY (SEQ ID NO: 344). Эталонный белок может представлять собой CDR6 TCER® (TPP-1109), содержащий первую полипептидную цепь, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 153, и вторую полипептидную цепь, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 154. TPP-1109 содержит UCHT1(V17), рекрутер, соответствующий SEQ ID NO: 108 и 109. Кроме того, эталонный белок может представлять собой scTCR CDR6 с полипептидной цепью, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 357. Авторы настоящего изобретения показывают в примерах, что антигенсвязывающий белок, содержащий CDR CDR6, в частности TCER® TPP-1109, связывается с аминокислотами в положениях 5, 6, 7 и 8, но не 2 и 3 антигенного пептида PRAME-004 (Таблица 16). Таким образом, антигенсвязывающие белки, содержащие CDR CDR6, не связываются с аминокислотой 3 антигенного пептида PRAME-004, которое, напротив, сильно связывается/распознается антигенсвязывающими белками согласно настоящему изобретению.

Аффинность

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению содержат последовательности CDR, выбранные для обеспечения повышенной аффинности в отношении комплекса PRAME-004:МНС (фиг. 2, таблица 3). Как видно из примеров (таблицы 4, 8, 10, 12, 15 и 16), антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению связываются с комплексом PRAME-004:МНС с высокой аффинностью, в частности с $K_D \leq 50$ нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 5 нМ или ≤ 3 нМ.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению обладают повышенной аффинностью, в частности, по сравнению с эталонным белком.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению связывается с комплексом пептида PRAME, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 50 и молекулы HLA, предпочтительно HLA-A*02, с $K_D \leq 100$ нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ, предпочтительно ≤ 5 нМ, более предпочтительно ≤ 3 нМ, например, от 10 до 100 нМ, от 10 до 50 нМ, от 10 до 10 нМ, от 10 до 5 нМ, от 22:00 до 3 нМ.

Согласно одному примеру антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению представляет собой scTCR-Fab и связывается с комплексом пептида PRAME, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 50 и молекулы HLA, предпочтительно HLA-A*02, с K_D от 100 нМ до 50 нМ, от 40 нМ до 30 нМ, от 20 нМ до 15 нМ, предпочтительно от 15 нМ, например, от 10 до 100 нМ, от 10 до 50 нМ, 10 от пМ до 20 нМ, от 5 нМ до 20 нМ.

Согласно другому примеру антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению представляет собой TCER и связывается с комплексом пептида PRAME, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 50 и молекулы HLA, предпочтительно HLA-A*02, с K_D от 100 нМ до 50 нМ, от 10 нМ, предпочтительно от 5 нМ, более предпочтительно от 3 нМ, например, от 10 до 100 нМ, от 10 до 50 нМ, от 10 до 10 нМ, 10 от 10 до 5 нМ, от 10 до 3 нМ.

Способы измерения аффинности, такие как K_D , известны специалистам в данной области техники и включают, например, поверхностный плазмонный резонанс (SPR) и интерферометрию биослоя. Иллюстративный способ определения K_D также описан в разделе примеров. Как известно специалистам в данной области техники, экспериментальные условия, используемые для этих экспериментов, такие как используемый буфер, концентрация белка, могут сильно влиять на результаты.

Соответственно, согласно одному примеру антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению экспрессируются, например, как TCER®, и их анализируют на их аффинность связывания с мономерами HLA-A*02:PRAME-004. Обычно измерения проводят, например, на системе Octet RED384 с использованием, как правило, параметров, рекомендованных производителем. Кратко, кинетику связывания обычно измеряют при 30°C и, например, скорости встряхивания 1000 оборотов в минуту, используя, например, PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA в качестве буфера. Комплексы пептид-HLA, в частности комплекс HLA-A*02/PRAME-004, загружают в биосенсоры, такие как HIS1K, перед анализом серийных разведений TCER®.

Как раскрыто в настоящем документе, антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению специфически связываются с комплексом антигенного пептида PRAME, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO : 50 и молекулы HLA, предпочтительно HLA-A*02. Если антигенсвязывающий белок представляет собой TCR, экспрессируемый на Т-клетке, связывание антигенсвязывающего белка с указанным комплексом может вызывать иммунный ответ при связывании. Соответственно, согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению индуцирует иммунный ответ, предпочтительно, где иммунный ответ характеризуется увеличением уровней интерферона гамма (IFN γ).

Выход

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали в примерах (Таблицы 5, 6, 7, 9, 11 и 14), что антигенсвязывающие белки имеют высокий выход продукта, в частности, выход ≥ 1 мг/л, $\geq 1,5$ мг/л, ≥ 2 мг/л, ≥ 5 мг/л, ≥ 10 мг/л, ≥ 15 мг/л, ≥ 20 мг/л, ≥ 30 мг/л, ≥ 40 мг/л, ≥ 50 мг/л, ≥ 60 мг/л.

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали в примерах (Таблицы 5, 6, 7, 9, 11 и 14), что антигенсвязывающие белки имеют высокий выход продукта, в частности, выход, который увеличен по сравнению с эталонным белком, более конкретно по сравнению с антигенсвязывающим белком, содержащим CDR «CDR6», экспрессируемым в идентичных условиях.

Согласно одному примеру антигенсвязывающий белок представляет собой scTCR-Fab (как описано в примере 2) и имеет выход продукта ≥ 8 мг/л, ≥ 10 мг/л, ≥ 15 мг/л, ≥ 20 мг/л, ≥ 30 мг/л, ≥ 40 мг/л, ≥ 50 мг/л, ≥ 60 мг/л, ≥ 70 мг/л, например, от 8 мг/л до 85 мг/л, от 10 мг/л до 85 мг/л, от 14 до 85 мг/л, от 50 до 85 мг/л.

Согласно другому примеру антигенсвязывающий белок представляет собой TCER, содержащий VL и VH рекрутера UCHT1V17, и имеет выход продукта ≥ 10 мг/л, ≥ 12 мг/л, ≥ 15 мг/л, ≥ 16 мг/л, ≥ 17 мг/л, ≥ 18 мг/л, предпочтительно ≥ 15 мг/л, например, от 10 мг/л до 30 мг/л, от 15 мг/л до 25 мг/л, от 15 мг/л до 30 мг/л, предпочтительно от 15 мг/л до 30 мг/л.

Выход конечного продукта обычно определяют через 10-11 дней после трансфекции. Способы измерения выхода продукта известны специалистам в данной области техники. Иллюстративная процедура описана в разделе примеров.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению имеют улучшенный выход, в частности, по сравнению с эталонным белком, при экспрессии в идентичных условиях.

Стабильность

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали в примерах (Таблицы 5, 6, 7, 9, 11 и 14), что антигенсвязывающие белки обладают высокой стабильностью.

Термин «стабильность» в контексте настоящего изобретения относится к физической стабильности и может быть оценен качественно и/или количественно с использованием различных аналитических методов, которые описаны в данной области техники и рассмотрены, например, в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Для измерения стабильности образец, который содержит антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, может быть протестирован в исследовании стабильности, при котором образец подвергают в течение выбранного периода времени воздействию стрессовых условий с последующим количественным и необязательно качественным анализом химического и физической стабильности с использованием адекватного аналитического метода. В контексте настоящего изобретения эти способы относятся, в частности, к оценке образования агрегатов (например, с использованием эксклюзионной хроматографии (SEC)), измерению мутности (например, с помощью динамического светорассеяния (DLS) или светозатемнения (LO) и/или визуальному осмотру (например, путем определения цвета и прозрачности). Образец считают стабильным, если наблюдается лишь низкая агрегация, как определено ниже.

В контексте настоящего изобретения улучшенная стабильность относится, например, к повышенной физической стабильности при воздействии термического напряжения. Таким образом, недавно разработанные антигенсвязывающие белки согласно

настоящему изобретению могут лучше противостоять стрессовым условиям, особенно термическому стрессу, чем эталонный белок.

«Низкая агрегация» означает, например, что образец, содержащий антигенсвязывающий белок, после воздействия стрессовых условий, например, температуры 40°C, в течение 14 дней в буфере, таком как PBS, имеет содержание мономера $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, например, содержание мономера от 94% до 99%, от 95% до 99%, от 96% до 99%, от 97% до 99%, обычно при измерении методом SEC, например SEC-ВЭЖХ, в буфере, таком как PBS. Для SEC разница в 1%, 2%, 3%, 4%, предпочтительно 1 или 2%, более предпочтительно 1%, от содержания мономера считается существенным отличием в контексте настоящего изобретения в тестируемых условиях в зависимости от используемой колонки, рабочего давления и скорости буфера. Другими словами, когда эталонный антигенсвязывающий белок имеет содержание мономеров 96%, а антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению имеет содержание мономера 97%, содержание мономеров в антигенсвязывающем белке согласно настоящему изобретению значительно отличается и, таким образом, существенно увеличивается по сравнению с эталонным антигенсвязывающим белком при измерении в тех же условиях.

Авторы настоящего изобретения демонстрируют (таблицы 5, 6, 7, 9, 11 и 14), что антигенсвязывающие белки стабильны, в частности, они имеют содержание мономеров $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 97\%$ через 14 дней при 40°C в буфере, таком как PBS.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению стабильны или обладают улучшенной стабильностью, в частности, по сравнению с эталонным белком, при воздействии стрессовых условий в течение определенного периода времени, например, при воздействии в течение 14 дней температура 40°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению не демонстрируют никакой агрегации или проявляют только низкую агрегацию или демонстрируют пониженную агрегацию, в частности, по сравнению с эталонным белком, при воздействии стрессовых условий в течение определенного периода времени, например, при воздействии в течение 14 дней до температуры 40°.

Специфичность

Авторы настоящего изобретения демонстрируют в примерах (фиг. 3-6, таблицы 3, 4, 8, 13, 15), что антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению связывают

антиген-мишень, т.е. антигенный пептид PRAME, содержащий SEQ ID NO: 50 в комплексе с белком МНС, предпочтительно в комплексе с HLA-A*02, с высокой специфичностью.

Как описано выше, авторы настоящего изобретения идентифицировали положения аминокислот 3, 5, 6, 7 и 8, в частности 3, 5 и 7 согласно SEQ ID NO: 50, которые имеют отношение к связыванию антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению с антигенным пептидом PRAME-004, т.е. к «связывающему мотиву» антигенного пептида PRAME-004. Авторы настоящего изобретения идентифицировали потенциальные нецелевые пептиды, которые, например, подобны последовательности и/или мотиву PRAME-004 и, таким образом, имеют повышенный риск связывания антигенсвязывающим белком, связывающимся с PRAME-004.

В контексте настоящего изобретения «подобные пептиды» в настоящем документе относятся к потенциальным нецелевым пептидам, т.е. пептидам, которые потенциально могут связываться антигенсвязывающими белками согласно настоящему изобретению на основании их биохимических/биофизических характеристик, включая без ограничения гомологичные последовательность или аналогичный мотив. Подобные пептиды обычно содержат от 8 до 11 аминокислот в длину. Подобные пептиды в контексте настоящего изобретения обычно презентированы МНС. Кроме того, подобные пептиды в контексте настоящего изобретения включают пептиды, которые содержат или состоят из аминокислотной последовательности, сходной с аминокислотной последовательностью антигенного пептида PRAME-004, более конкретно, пептиды, которые по сравнению с эпитопом антигенного пептида PRAME-004 содержат эпитоп, в котором некоторые или все аминокислоты имеют идентичные и/или сходные биохимические/биофизические характеристики с аминокислотами, составляющими эпитоп пептида PRAME-004. В некоторых примерах подобные пептиды, исследованные в контексте настоящего изобретения, были выбраны из базы данных пептидов, презентированных в опухолевых и нормальных тканях, связанных с HLA-A*02 (база данных XPRESIDENT[®]), с использованием оценки сходства в релевантных для связывания положениях PRAME-004 и требования хотя бы одного обнаружения на нормальных тканях. Связывание антигенсвязывающего белка с подобным пептидом, презентированным белком МНС, может привести к побочным реакциям. Такие побочные реакции могут быть «внеопухолевыми» побочными эффектами, такими как перекрестная реактивность специфического TCR с подобными пептидом в здоровых тканях, как сообщалось в Lowdell *et al.*, *Cytherapy*, published on December 4, 2018).

В частности, следующие пептиды являются подобными пептидами в контексте настоящего изобретения: TMED9-001 (SEQ ID NO: 51), CAT-001 (SEQ ID NO: 52),

DDX60L-001 (SEQ ID NO: 53), LRRC70-001 (SEQ ID NO: 54), PTPLB-001 (SEQ ID NO: 55), HDAC5-001 (SEQ ID NO: 56), VPS13B-002 (SEQ ID NO: 57), ZNF318-001 (SEQ ID NO: 58), CCDC51-001 (SEQ ID NO: 59), IFT17-003 (SEQ ID NO: 60), DIAPH1-004 (SEQ ID NO: 62), FADS2-001 (SEQ ID NO: 63), FRYL-003 (SEQ ID NO: 64), GIMAP8-001 (SEQ ID NO: 65), HSF1-001 (SEQ ID NO: 66), KNT-001 (SEQ ID NO: 67), MAU-001 (SEQ ID NO: 68), MCM4-001 (SEQ ID NO: 69), MPPE1-001 (SEQ ID NO: 71), MYO1B-002 (SEQ ID NO: 72), PRR12-001 (SEQ ID NO: 73), PTRF-003 (SEQ ID NO: 74), RASGRP1-001 (SEQ ID NO: 75), SMARCD1-001 (SEQ ID NO: 76), TGM2-001 (SEQ ID NO: 77), VAV1-001 (SEQ ID NO: 78), VIM-009 (SEQ ID NO: 317) FARSA-001 (SEQ ID NO: 306), ALOX15B-003 (SEQ ID NO: 304), FAM114A2-002 (SEQ ID NO: 305), GPR56-002 (SEQ ID NO: 307), IGHD-002 (SEQ ID NO: 308), NOMAP-3-0972 (SEQ ID NO: 309), NOMAP-3-1265 (SEQ ID NO: 310), NOMAP-3-1408 (SEQ ID NO: 311), NOMAP-3-1587 (SEQ ID NO: 312), NOMAP-3-1768 (SEQ ID NO: 313), NOMAP-5-0765 (SEQ ID NO: 314), PDCD10-004 (SEQ ID NO: 315), TSN-001 (SEQ ID NO: 316), ARMC9-002 (SEQ ID NO: 187), CLI-001 (SEQ ID NO: 188), COPG1-001 (SEQ ID NO: 190), COPS7A-001 (SEQ ID NO: 192), EIF-009 (SEQ ID NO: 194), EXT2-006 (SEQ ID NO: 196), LMNA-001 (SEQ ID NO: 198), PKM-005 (SEQ ID NO: 200), PSMB3-002 (SEQ ID NO: 202), RPL-007 (SEQ ID NO: 204), SPATS2L-003 (SEQ ID NO: 206), SYNE1-002 (SEQ ID NO: 208), TGM2-002 (SEQ ID NO: 210) и TPR-004 (SEQ ID NO: 212).

Термин «специфичность» обычно обозначает способность антигенсвязывающего белка отличать пептид-мишень от подобного пептида, определенного выше. Другими словами, антигенсвязывающий белок связывается с комплексом PRAME-004:МНС с высокой аффинностью, в частности, с K_D ниже 100 нМ, ниже 50 нМ, ниже 10 нМ, предпочтительно ниже 5 нМ, но не связывается в значительной степени с комплексами подобный пептид:МНС.

Специалисту в данной области техники известно, что среди подобных пептидов будут некоторые, которые не связываются антигенсвязывающими белками согласно настоящему изобретению в обнаруживаемой степени, например, пептиды, для которых не обнаруживается сигнал связывания или функциональный ответ, выходящий за пределы фонового уровня, причем «фоновый уровень» относится к сигналу связывания или функциональному ответу, наблюдаемому для негомологичного, «неподобного» пептида или в отсутствие пептида.

Для других подобных пептидов можно обнаружить очень низкое связывание, однако, незначительное связывание. Эти последние подобные пептиды также могут быть описаны как «потенциально релевантные» подобные пептиды. Выражения «нет

значительного связывания», «по существу не связывается» означают, что антигенсвязывающий белок:

1) связывается (например, с комплексом подобный пептид:МНС) с K_D , увеличенной на ≥ 25 , ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , ≥ 75 или ≥ 100 по сравнению с K_D для связывания с комплексом пептид PRAME-004:МНС,

2) демонстрирует значительно сниженный «функциональный ответ» (например, на комплекс подобный пептид:МНС) по сравнению с функциональным ответом на комплекс пептид:МНС PRAME-004, или

3) демонстрирует значительно сниженное обнаружение с помощью меченых мультимеров подобный пептид:МНС по сравнению с обнаружением с мультимерами пептид PRAME-004:МНС.

Аффинность, в частности K_D , предпочтительно измеряют с помощью интерферометрии биослоя (BLI), как описано в разделе примеров. Увеличение K_D для связывания с комплексом подобный пептид:МНС по сравнению с K_D для связывания с комплексом пептид PRAME-004:МНС также может быть выражено как соотношение двух K_D . Например, если K_D для связывания с комплексом подобный пептид:МНС увеличивается в 100 раз по сравнению с K_D для связывания с комплексом пептид PRAME-004:МНС, соотношение K_D «подобный пептид/PRAME-004» равно 100. Специалистам в данной области техники известно, что аффинность в отношении комплекса подобный пептид:МНС может быть не поддающейся измерению, если связывание слишком слабое.

«Функциональный ответ» относится к ответу, измеряемому в функциональном анализе, например, в анализе активации, таком как анализ высвобождения IFN-гамма, или в анализе цитотоксичности, таком как анализ высвобождения LDH, описанном в экспериментальном разделе ниже. Анализ высвобождения IFN-гамма измеряет IFN-гамма, высвобождаемый Т-клетками, которые подвергаются воздействию их специфического комплекса пептид:МНС. Анализ высвобождения LDH измеряет LDH, которая высвобождается клетками-мишенями, экспрессирующими на своей поверхности комплекс пептид:МНС, которые уничтожаются Т-клетками, специфически связывающимися с этим комплексом пептид:МНС. Связывание может осуществляться непосредственно через TCR, экспрессируемый на Т-клетке, или опосредованно через растворимую биспецифическую молекулу, которая связывается с комплексом пептид:МНС и с Т-клеткой (т.е. рекрутирует Т-клетку). Функциональный ответ в анализе высвобождения IFN-гамма считается значительно сниженным, если EC_{50} увеличивается в ≥ 25 , ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , ≥ 75 или ≥ 100 , предпочтительно ≥ 200 , ≥ 300 , ≥ 500 или ≥ 1000 по сравнению с EC_{50} для связывания с комплексом пептид PRAME-004:МНС. Функциональный ответ в анализе высвобождения

LDH считается значительно сниженным, если EC_{50} увеличивается в $\geq 25, \geq 30, \geq 40, \geq 50, \geq 75$ или ≥ 100 , предпочтительно $\geq 200, \geq 300, \geq 500$. или ≥ 1000 по сравнению с EC_{50} для связывания с комплексом пептид PRAME-004:МНС.

Обнаружение с помощью меченых мультимеров «подобный пептид:МНС», в частности, относится к окрашиванию тетрамерами подобный пептид:МНС, при этом антигенсвязывающий белок экспрессируется на поверхности клетки, предпочтительно дрожжевой клетки (примеры 1.1 и 1.2). Обнаружение считается значительно сниженным, если количество положительных (т.е. окрашенных) клеток составляет $\leq 5\%, \leq 3\%$ или $\leq 1\%$ от общего количества клеток, или если количество положительных клеток составляет $\leq 10\%, \leq 5\%$ или $\leq 2,5\%$ положительных клеток, окрашенных тетрамером пептидом PRAME-004:МНС, или если EC_{50} снижается в $\geq 50, \geq 75, \geq 100, \geq 150, \geq 200$.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению сконструированы таким образом, чтобы иметь высокую аффинность в отношении пептида-мишени, избегая при этом связывания с подобными пептидами. Это важное преимущество антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, поскольку связывание с подобными пептидами увеличивает риск побочных эффектов при их присутствии в нормальной ткани. Соответственно, тот факт, что антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению связывают подобные пептиды только с низкой аффинностью, делает их многообещающим противораковым лечением с точки зрения безопасности.

Авторы изобретения демонстрируют, что антигенсвязывающие белки, в частности молекулы TCER®, вызывают цитолиз в клетках T2, загруженных пептидом-мишенью PRAME-004, с помощью анализа высвобождения LDH (Таблица 17). Авторы настоящего изобретения далее демонстрируют, что антигенсвязывающие белки, в частности молекулы TCER®, вызывают цитолиз в PRAME-положительной линии опухолевых клеток посредством анализа высвобождения LDH, в то время как PRAME-отрицательная опухолевая линия клеток не подвергается воздействию при совместной инкубации с молекулами TCER® (фиг. 7-9). Эти эксперименты *in vitro* дополнительно подтверждают безопасность антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению и документально подтверждают, что цитотоксический эффект является высокоселективным в отношении PRAME-положительной опухолевой ткани. Таким образом, молекулы согласно настоящему изобретению демонстрируют благоприятные профили безопасности.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению не связываются в значительной степени по меньшей мере с 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или всеми подобными пептидами, выбранными

из группы, состоящей из TMED9-001, CAT-001, DDX60L-001, LRRC70-001, PTPLB-001, HDAC5-001, VPS13B-002, ZNF318-001, CCDC51-001, IFT17-003, DIAPH1-004, FADS2-001, FRYL-003, GIMAP8-001, HSF1-001, KNT-001, MAU-001, MCM4-001, MPPE1-001, MYO1B-002, PRR12-001, PTRF-003, RASGRP1-001, SMARCD1-001, TGM2-001, VAV1-001, VIM-009, FARSA-001, ALOX15B-003, FAM114A2-002, GPR56-002, IGHD-002, NOMAP-3-0972, NOMAP-3-1265, NOMAP-3-1408, NOMAP-3-1587, NOMAP-3-1768, NOMAP-5-0765, PDCD10-004, TSN-001, ARMC9-002, CLI-001, COPG1-001, COPS7A-001, EIF-009, EXT2-006, LMNA-001, PKM-005, PSMB3-002, RPL-007, SPATS2L-003, SYNE1-002, TGM2-002 и TPR-004, в комплекса МНС.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению не связываются в значительной степени с IFT17-003 в комплексе с МНС.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению демонстрируют значительно сниженный функциональный ответ по меньшей мере на 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или на все подобные пептиды, выбранные из группы, состоящей из TMED9-001, CAT-001, DDX60L-001, LRRC70-001, PTPLB-001, HDAC5-001, VPS13B-002, ZNF318-001, CCDC51-001, IFT17-003, DIAPH1-004, FADS2-001, FRYL-003, GIMAP8-001, HSF1-001, KNT-001, MAU-001, MCM4-001, MPPE1-001, MYO1B-002, PRR12-001, PTRF-003, RASGRP1-001, SMARCD1-001, TGM2-001, VAV1-001, VIM-009, FARSA-001, ALOX15B-003, FAM114A2-002, GPR56-002, IGHD-002, NOMAP-3-0972, NOMAP-3-1265, NOMAP-3-1408, NOMAP-3-1587, NOMAP-3-1768, NOMAP-5-0765, PDCD10-004, TSN-001, ARMC9-002, CLI-001, COPG1-001, COPS7A-001, EIF-009, EXT2-006, LMNA-001, PKM-005, PSMB3-002, RPL-007, SPATS2L-003, SYNE1-002, TGM2-002 и TPR-004, в комплексе с МНС по сравнению с функциональным ответом на комплекс пептид PRAME-004:МНС. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению демонстрируют значительно сниженный функциональный ответ на IFT17-003 в комплексе с МНС по сравнению с функциональным ответом на комплекс пептид PRAME-004:МНС.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению, в частности растворимые биспецифические антигенсвязывающие белки, более конкретно антигенсвязывающие белки формата TCER®, связываются по меньшей мере с 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или всеми подобными

пептидами, выбранными из группы, состоящей из TMED9-001, CAT-001, DDX60L-001, LRRC70-001, PTPLB-001, HDAC5-001, VPS13B-002, ZNF318-001, CCDC51-001, IFT17-003, DIAPH1-004, FADS2-001, FRYL-003, GIMAP8-001, HSF1-001, KNT-001, MAU-001, MCM4-001, MPPE1-001, MYO1B-002, PRR12-001, PTRF-003, RASGRP1-001, SMARCD1-001, TGM2-001, VAV1-001, VIM-009, FARSA-001, ALOX15B-003, FAM114A2-002, GPR56-002, IGHD-002, NOMAP-3-0972, NOMAP-3-1265, NOMAP-3-1408, NOMAP-3-1587, NOMAP-3-1768, NOMAP-5-0765, PDCD10-004, TSN-001, ARMC9-002, CLI-001, COPG1-001, COPS7A-001, EIF-009, EXT2-006, LMNA-001, PKM-005, PSMB3-002, RPL-007, SPATS2L-003, SYNE1-002, TGM2-002 и TPR-004, в частности, выбранными из группы, состоящей из GIMAP8-001, MYO1B-002, SMARCD1-001, VIM-009, FARSA-001, ALOX15B-003, FAM114A2-002, GPR56-002, IGHD-002, NOMAP-3-0972, NOMAP-3-1265, NOMAP-3-1408, NOMAP-3-1587, NOMAP-3-1768, NOMAP-5-0765, PDCD10-004, TSN-001, и/или из группы, состоящей из ARMC9-002, CLI-001, COPG1-001, COPS7A-001, EIF-009, EXT2-006, LMNA-001, PKM-005, PSMB3-002, RPL-007, SPATS2L-003, SYNE1-002, TGM2-002 и TPR-004, в комплексе с МНС с K_D , которая увеличена на ≥ 25 , ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , ≥ 75 или ≥ 100 , по сравнению K_D для связывания с комплексом пептид PRAME-004:МНС. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению, особенно растворимые биспецифические антигенсвязывающие белки, более конкретно антигенсвязывающие белки формата TCER®, связываются с IFT17-003 в комплексе с МНС с K_D , которая увеличена на ≥ 25 , ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , ≥ 75 или ≥ 100 , по сравнению с K_D для связывания с комплексом пептид PRAME-004:МНС.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению, в частности, при экспрессии на поверхности клетки, более конкретно дрожжевой клетки, демонстрируют значительно сниженное обнаружение с помощью меченых мультимеров подобный пептид:МНС, содержащих подобный пептид, выбранный из группы состоящий из TMED9-001, CAT-001, DDX60L-001, LRRC70-001, PTPLB-001, HDAC5-001, VPS13B-002, ZNF318-001, CCDC51-001, IFT17-003, DIAPH1-004, FADS2-001, FRYL-003, GIMAP8-001, HSF1-001, KNT-001, MAU-001, MCM4-001, MPPE1-001, MYO1B-002, PRR12-001, PTRF-003, RASGRP1-001, SMARCD1-001, TGM2-001, VAV1-001, VIM-009, FARSA-001, ALOX15B-003, FAM114A2-002, GPR56-002, IGHD-002, NOMAP-3-0972, NOMAP-3-1265, NOMAP-3-1408, NOMAP-3-1587, NOMAP-3-1768, NOMAP-5-0765, PDCD10-004, TSN-001, ARMC9-002, CLI-001, COPG1-001, COPS7A-001, EIF-009, EXT2-006, LMNA-001, PKM-005, PSMB3-002, RPL-007, SPATS2L-003, SYNE1-002, TGM2-002 и TPR-004, в частности, выбранный из группы, состоящей из TMED9-001, CAT-001, DDX60L-001, LRRC70-001, PTPLB-001, HDAC5-001, VPS13B-002, ZNF318-001,

CCDC51-001, IFT17-003, DIAPH1-004, FADS2-001, FRYL-003, GIMAP8-001, HSF1-001, KNT-001, MAU-001, MCM4-001, MPPE1-001, MYO1B-002, PRR12-001, PTRF-003, RASGRP1-001, SMARCD1-001, TGM2-001, и VAV1-001, более конкретно IFT17-003, в комплексе с МНС, по сравнению с обнаружением с мультимерами пептид PRAME-004:МНС.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению имеют высокий профиль безопасности.

В контексте настоящего изобретения «профиль безопасности» относится к способности отличать опухолевую клетку, в частности опухолевую клетку, презентирующую комплекс PRAME-004:МНС, от здоровой клетки. Эта способность часто выражается указанием окна безопасности.

В контексте настоящего изобретения «окно безопасности» или «терапевтическое окно» относится к параметру, который сравнивает концентрацию соединения, необходимую для индукции определенной степени цитотоксичности, например, 10%, 50%, 90% или 100% цитотоксичности, в отношении опухолевых клеток, в частности, опухолевых клеток, презентирующих комплекс PRAME-004:МНС, с концентрацией, необходимой для индукции цитотоксичности, предпочтительно подобной степени цитотоксичности, более предпочтительно такой же степени цитотоксичности, против здоровых клеток. Например, если концентрация антигенсвязывающего белка, необходимая для индукции 90% цитотоксичности в отношении линии опухолевых клеток, составляет 1 пМ, а концентрация, необходимая для индукции 90% цитотоксичности, например, в отношении здоровых клеток, составляет 1000 пМ, окно безопасности составляет 1000, поскольку цитотоксическая концентрация, необходимая для линии опухолевых клеток, в 1000 раз ниже концентрации, необходимой для здоровых клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления окно безопасности сравнивает концентрацию соединения, необходимую для индукции полумаксимальной (50%) цитотоксичности (EC_{50}) в отношении опухолевых клеток, с концентрацией соединения, необходимой для индукции полумаксимальной (50%) цитотоксичности (EC_{50}) против здоровых клеток. Следовательно, если для антигенсвязывающего белка EC_{50} для линии опухолевых клеток составляет 1 пМ, а EC_{50} , например, для здоровых клеток составляет 1000 пМ, то окно безопасности составляет 1000, поскольку EC_{50} для линии опухолевых клеток в 1000 раз ниже, чем для здоровых клеток.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению характеризуется окном безопасности ≥ 100 , ≥ 500 , \geq

1000, ≥ 2000 , ≥ 3000 , ≥ 4000 , ≥ 5000 , ≥ 6000 , ≥ 8000 , ≥ 10000 , например от 500 до 10 000, предпочтительно от 1 000 до 10 000.

В контексте настоящего изобретения «клетка, презентирующая комплекс PRAME-004:МНС» относится к клетке, которая презентирует на своей поверхности антигенный пептид PRAME в комплексе с молекулой МНС, причем число копий указанного комплекса PRAME-004:МНС можно определить с помощью способов, известных специалистам в данной области техники. Согласно предпочтительным вариантам осуществления клетка, презентирующая комплекс PRAME-004:МНС, представляет собой опухолевую клетку, где опухоль предпочтительно является раком, как определено в настоящем документе ниже в разделе «Терапевтические способы и применения». В контексте настоящего изобретения комплекс PRAME-004:МНС чрезмерно представлен на клеточной поверхности клетки, презентирующей комплекс PRAME-004:МНС, по сравнению с уровнями указанного комплекса на поверхности клеток в нормальных (здоровых) тканях (также называемых «здоровыми клетками»). Под «чрезмерно представленным» подразумевается, что комплекс PRAME-004:МНС присутствует на уровне, по меньшей мере в 1,2 раза превышающем уровень, присутствующий в здоровой ткани, предпочтительно по меньшей мере в 2 раза и более предпочтительно в 5-10 раз превышающем уровень, присутствующий в здоровой ткани или клетках.

Согласно одному варианту осуществления клетка, презентирующая комплекс PRAME-004:МНС, имеет число копий комплекса PRAME-004:МНС более 50, более 80, более 100, более 120, более 150, более 300, более 400, более 600, более 800, более 1000, более 1500, более 2000, предпочтительно число копий PRAME-004:МНС от 50 до 2000, как например, от 80 до 2000, как например, от 100 до 2000, например, от 120 до 2000.

В контексте настоящего изобретения «число копий» относится к количеству комплексов PRAME-004:МНС, как определено в контексте настоящего изобретения, которые присутствуют на клеточной поверхности клетки, такой как клетка, презентирующая PRAME-004:МНС, например, раковая клетка или здоровая клетка. Число копий белка можно определить с помощью множества известных в данной области способов, включая FACS-анализ больных клеток с флуоресцентно мечеными антигенсвязывающими белками.

В контексте настоящего изобретения «здоровые клетки» или клетки нормальной ткани относятся к клеткам, которые не являются опухолевыми клетками, предпочтительно здоровые клетки в контексте настоящего изобретения относятся к клеткам ткани, окружающей клетки, презентирующие PRAME-004:МНС, в частности, окружающей опухолевые клетки, презентирующие комплекс PRAME-004:МНС. Однако в некоторых

случаях и здоровые клетки могут экспрессировать и презентировать на своей поверхности комплекс PRAME-004:MHC. Обычно в здоровых клетках в контексте настоящего изобретения, как будет понятно специалистам в данной области, комплекс PRAME-004:MHC присутствует в меньших количествах (число копий), чем в опухолевой клетке. Соответственно, согласно одному варианту осуществления здоровые клетки имеют число копий комплекса PRAME-004:MHC менее 50, менее 20, менее 10, предпочтительно число копий комплекса PRAME-004:MHC менее 10, предпочтительно число копий комплекса PRAME-004:MHC от 0 до 10.

Здоровые клетки предпочтительно выбирают из группы, состоящей из астроцитов, ГАВА-нейронов, кардиомиоцитов, сердечных микрососудистых эндотелиальных клеток, хондроцитов, эндотелиальных клеток аорты, эндотелиальных клеток коронарной артерии, дермальных микрососудистых эндотелиальных клеток, мезенхимальных стволовых клеток, эпителиальных клеток носа, мононуклеарных клеток периферической крови, гладкомышечных клеток легочной артерии, легочных фибробластов, эпидермальных кератиноцитов, эпителиальных клеток коры почек и гладкомышечных клеток трахеи, предпочтительно астроцитов, в частности астроцитов, происходящих из iPSC, кардиомиоцитов, в частности кардиомиоцитов, происходящих из iPSC, эндотелиальных клеток аорты, мезенхимальных стволовых клеток и гладкомышечных клеток трахеи.

Согласно предпочтительному варианту осуществления концентрация антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению, необходимая для достижения по меньшей мере 90%, предпочтительно 100% цитотоксичности в опухолевой клетке, в частности опухолевой клетке, презентующей комплекс PRAME-004:MHC, в по меньшей мере 100, по меньшей мере в 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000 или по меньшей мере в 10000 раз ниже концентрации, необходимой для достижения по меньшей мере 10%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 90% или 100% цитотоксичности в здоровой клетке, выбранной из группы, состоящей из астроцитов, ГАВА-нейронов, кардиомиоцитов, сердечных микрососудистых эндотелиальных клеток, хондроцитов, эндотелиальных клеток аорты, эндотелиальных клеток коронарной артерии, дермальных микрососудистых эндотелиальных клеток, мезенхимальных стволовых клеток, эпителиальных клеток носа, мононуклеарных клеток периферической крови, гладкомышечных клеток легочной артерии, легочных фибробластов, эпидермальных кератиноцитов, эпителиальных клеток коры почек и гладкомышечных клеток трахеи, предпочтительно астроцитов, в частности астроцитов, происходящих из iPSC, кардиомиоцитов, в частности кардиомиоцитов, происходящих из iPSC, эндотелиальных клеток аорты, мезенхимальных стволовых клеток и гладкомышечных клеток трахеи.

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что CDR, определенные в формуле изобретения, можно применять в антигенсвязывающих белках, которые имеют разные форматы. Например, в экспериментальном разделе авторы настоящего изобретения использовали эти CDR в молекулах TCER[®] и в конструкциях одноцепочечных TCR, таких как биспецифический TCR, содержащий scTCR, слитый с Fab-фрагментом (scTCR-Fab).

Соответственно, специалистам в данной области техники понятно на основе этих экспериментов, что действительно CDR, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в различных антигенсвязывающих белках согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту осуществления эпитоп и характеристики связывания сохраняются при изменении формата антигенсвязывающего белка.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой TCR или антитело. Специалисту в данной области техники известно, что в случаях, когда антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, это «антитело» содержит по меньшей мере последовательности CDR1, CDR3 и необязательно CDR2, происходящие из TCR, как определено в формуле изобретения, и, таким образом, не является нативным или обычным антителом. Однако антигенсвязывающий белок, содержащий, например, CDR, происходящие из TCR, и каркасные области, происходящие из антител, и константные домены, происходящие из антител, будет иметь общую структуру обычного антитела и могут называться «антителом».

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок является биспецифичным, в частности, биспецифическим TCR, биспецифическим антителом или биспецифической молекулой TCR-антитела. Специалисту известно, что также в случаях, когда антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое «антитело», один из антигенсвязывающих сайтов содержит последовательности CDR1, CDR3 и необязательно CDR2, происходящие из TCR, как определено в формуле изобретения, в то время как другой антигенсвязывающий сайт может полностью происходить из антитела.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок имеет человеческое происхождение, что понимается как полученный из локуса человеческого антигена и, следовательно, содержащий человеческие последовательности, в частности, человеческие последовательности TCR или антитела.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок характеризуется как антигенсвязывающий белок с созревшей аффинностью, который способен специфически связывать антигенный пептид PRAME-004, в частности комплекс

PRAME-004:МНС, с более высокой аффинностью, чем родительская молекула, в частности TCR R11P3D3.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок содержит первую полипептидную цепь, содержащую V_A , и вторую полипептидную цепь, содержащую V_B .

Согласно некоторым вариантам осуществления первый и второй полипептид и, следовательно, V_A и V_B расположены на одной полипептидной цепи. Такая одноцепочечная конструкция может представлять собой одноцепочечный TCR (scTCR), одноцепочечное антитело или одноцепочечный биспецифический антигенсвязывающий белок, в частности одноцепочечное биспецифическое антитело, одноцепочечный биспецифический TCR или одноцепочечную биспецифическую молекулу TCR-антитело. Примером одноцепочечного TCR (scTCR) являются конструкции, использованные в примере 1, которые также можно назвать молекулами одноцепочечного переменного домена TCR («scTv»). Примером одноцепочечного «антитела» может быть scFv, в котором CDR заменены CDR, происходящими из TCR. Примером одноцепочечного биспецифического антитела может быть диантитело, в котором один сайт связывания происходит из антитела, а другой сайт связывания происходит из TCR, или которое по меньшей мере содержит CDR, происходящие из TCR. Как обсуждалось выше, такой гибридный антигенсвязывающий белок альтернативно можно назвать одноцепочечной биспецифической молекулой TCR или одноцепочечной биспецифической молекулой TCR-антитело.

Каркасные области

Авторы настоящего изобретения, кроме того, обнаружили, что специфические мутации в каркасной области антигенсвязывающих белков по сравнению с родительским TCR R11P3D3 имеют положительный эффект.

В V_A предпочтительными мутациями являются:

- N20K, которая удаляет встречающийся в природе возможный сайт N-гликозилирования,
- W44K, которая улучшает спаривание, аффинность и стабильность переменных доменов в сочетании с Q44E в V_B , и
- A52F, V55Y, K92T и G93D, повышающие стабильность антигенсвязывающего белка.

В V_B предпочтительными мутациями являются:

- A84D, A84E, A84Q, A84N, A84S, предпочтительно A84D, которые повышают аффинность в отношении комплекса пептид-МС,

- Q44E, которая улучшает спаривание, аффинность и стабильность переменных доменов в сочетании с W44K в V_A, и

- M46P и R48Q, которые повышают стабильность антигенсвязывающего белка. Мутации указаны согласно номенклатуре IMGT.

Соответственно, антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат одну или несколько, предпочтительно все из N20K, W44K, A52F, V55Y, K92T и G93D в V_A (по сравнению с V_α в R11P3D3), и одну или несколько, предпочтительно все из A84D, Q44E, M46P и R48Q в V_B (по сравнению с V_β в R11P3D3).

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать одну или несколько из L2M, L39I и Q14K в V_A (по сравнению с V_α в R11P3D3) и одну или несколько из E11L, E11K и R22H в V_B (по сравнению с V_β в R11P3D3).

Соответственно, антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат одну или несколько, предпочтительно все из следующих аминокислот 20K, 44K, 52F, 55Y, 92T и 93D в V_A и одну или несколько, предпочтительно все из 84D, 44E, 46P и 48Q в V_B.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать одну или несколько из следующих аминокислот 2M, 39I и 14K в V_A и одну или несколько из 11L или 11K и 22H в V_B.

Согласно одному варианту осуществления V_A дополнительно содержит одну или несколько каркасных областей, предпочтительно все каркасные области, выбранные из группы, состоящей из FR1-а, FR2-а, FR3-а и FR4-а, где

- FR1-а содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 345 или SEQ ID NO: 346, или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 345, предпочтительно содержащей K или N, более предпочтительно K, в положении 20 и/или L или M в положении 2,

- FR2-а содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 347 или SEQ ID NO: 348, или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 347, предпочтительно содержащей L, I или M, более предпочтительно L или I, в положении 39, A или D, более предпочтительно A, в положении 47, K или W, предпочтительно K, в положении 44, F или A, предпочтительно F, в положении 52 и/или Y или V, предпочтительно Y, в положении 55,

- FR3-a содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 349 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 349, предпочтительно содержащей T или K, предпочтительно T, в положении 92 и/или D или G, предпочтительно D, в положении 93,

- FR4-a содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 350 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 350, и

V_B дополнительно содержит одну или несколько каркасных областей, предпочтительно все каркасные области, выбранные из группы, состоящей из FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b, где

- FR1-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 351 или SEQ ID NO: 352 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 351, предпочтительно содержащей H или N, более предпочтительно H, в положении 10, E, L или K, предпочтительно E, в положении 11 и/или R или H, в положении 22,

- FR2-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 353 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 353, предпочтительно содержащей R или K, более предпочтительно R, в положении 43, E или Q, предпочтительно E, в положении 44, M или P, более предпочтительно P, в положении 46, и/или R или Q, более предпочтительно Q, в положении 48,

- FR3-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 354 или SEQ ID NO: 355 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 354, предпочтительно содержащей D, A, E, R, K, Q, N или S, более предпочтительно D, A, E, Q, N или S, более предпочтительно D или A, даже более предпочтительно D, в положении 84, и

- FR4-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 356 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 356.

Варианты антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем документе, рассматриваются и явно упоминаются с использованием формулировки «по меньшей мере на 85% идентичны эталонной последовательности», как определено в настоящем документе выше в разделе «Определения». Например, аминокислотные последовательности FR1-a,

FR2-a, FR3-a, FR4-a, FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b могут отличаться от эталонных последовательностей SEQ ID NO: 345, SEQ ID NO: 346, SEQ ID NO: 347, SEQ ID NO: 348, SEQ ID NO: 349, SEQ ID NO: 350, SEQ ID NO: 351, SEQ ID NO: 352, SEQ ID NO: 353, SEQ ID NO: 354, SEQ ID NO: 355 или SEQ ID NO: 356, в зависимости от ситуации, по меньшей мере, одной аминокислотной заменой, в частности, по меньшей мере, одной консервативной аминокислотной заменой и/или заменой каноническими остатками. В частности, последовательности FR1-a, FR2-a, FR3-a и FR4-a, FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b V_A и V_B могут отличаться от эталонных последовательностей SEQ ID NO: 345, SEQ ID NO: 346, SEQ ID NO: 347, SEQ ID NO: 348, SEQ ID NO: 349, SEQ ID NO: 350, SEQ ID NO: 351, SEQ ID NO: 352, SEQ ID NO: 353, SEQ ID NO: 354, SEQ ID NO: 355, или SEQ ID NO: 356, подходящим образом, только консервативными аминокислотными заменами.

Модификации и изменения могут быть сделаны в аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению и в соответствующих последовательностях ДНК, соответственно, и все равно приведут к получению функционального антигенсвязывающего белка или полипептида с желаемыми характеристиками. Модификации могут быть сделаны в V_A и/или V_B, в частности, в каркасных областях или в CDR.

V_A и V_B предпочтительно содержат аминокислотные замены в положении 44 согласно нумерации IMGT по сравнению с TCR R11P3D3. В вариантах осуществления, в которых антигенсвязывающий белок представляет собой TCR, эти замены улучшают спаривание цепей (т.е. спаривание цепей α и β или спаривание γ и δ). Аминокислота, присутствующая в положении 44 в V_A или V_B может быть заменена аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Q, R, D, E, K, L, W, и V. Предпочтительными являются замены W44K в V_A и Q44E в V_B, которые присутствуют в SEQ ID NO: 347, SEQ ID NO: 348 (FR2-a) и SEQ ID NO: 353 (FR2-b), соответственно, что приводит к образованию пары аминокислот v_A44K/v_B44E. Другими подходящими комбинациями являются: v_A44Q/v_B44Q, v_A44D/v_B44R, v_A44R/v_B44D, v_A44E/v_B44K, v_A44D/v_B44K, v_A44K/v_B44D, v_A44R/v_B44E, v_A44E/v_B44R, v_A44L/v_B44W, v_A44W/v_B44L, v_A44V/v_B44W, и v_A44W/v_B44V.

Дополнительные замены и описание можно найти в заявке на патент США № 2018-0162922, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Вариабельные домены

Согласно одному варианту осуществления V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности вариабельного домена, происходящего из TCR,

содержащегося в полипептиде согласно SEQ ID NO: 100, 103, 105, 106, 111, 122, 124, 126, 128, 151, 155, 156, 157, 158, 159, 166, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 178, 179, 180, 181, 183, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 285, 291, 295, 299 или 303, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности варибельного домена, происходящего из TCR, содержащегося в полипептиде согласно SEQ ID NO: 101, 102, 104, 107, 110, 119, 121, 131, 133, 143, 152, 153, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 168, 170, 172, 174, 176, 182, 184, 185, 186, 216, 218, 220, 222, 224, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 282, 284, 296 или 300. Специалист в данной области техники способен различить аминокислотную последовательность варибельных доменов, происходящих из TCR, в полипептидных последовательностях вышеупомянутых SEQ ID NO.

Согласно одному варианту осуществления

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, предпочтительно содержащей CDRa1 согласно SEQ ID NO: 16, CDRa2 согласно SEQ ID NO: 32 и CDRa3 согласно SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, или SEQ ID NO: 9, и необязательно дополнительно содержащей К или N, предпочтительно К, в положении 20, L, M, или I, предпочтительно L или I, в положении 39, К или W, предпочтительно К, в положении 44, F или A, предпочтительно F, в положении 52, Y или V, предпочтительно Y, в положении 55, Т или К, предпочтительно Т, в положении 92 и/или D или G, предпочтительно D, в положении 93, и

- V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 134 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 134, предпочтительно содержащей CDRb1 согласно SEQ ID NO: 10, CDRb2 согласно SEQ ID NO: 36, и CDRb3 согласно SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 301 или SEQ ID NO: 283, и необязательно дополнительно содержащей E, L или K, предпочтительно E, в положении 11, R или H в положении 22, E или Q, предпочтительно E, в положении 44, P или M, предпочтительно P, в положении 46, Q или R, предпочтительно Q, в положении 48 и/или D, A, E, R, K Q, N или S, более предпочтительно D, A, E, Q, N или S, предпочтительно D или A, в положении 84.

Предпочтительно

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, содержащей CDRa1 согласно SEQ ID NO: 16, CDRa2 согласно SEQ ID NO: 32 и CDRa3 согласно SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, или SEQ ID NO: 9, и необязательно дополнительно содержащей К или N, предпочтительно К, в положении 20, L, M, или I, предпочтительно L или I, в положении 39, К или W, предпочтительно К, в положении 44, F или A, предпочтительно F, в положении 52, Y или V, предпочтительно Y, в положении 55, T или K, предпочтительно T, в положении 92 и/или D или G, предпочтительно D, в положении 93, и

- V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 134 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 134, содержащей CDRb1 согласно SEQ ID NO: 10, CDRb2 согласно SEQ ID NO: 36, и CDRb3 согласно SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 301 или SEQ ID NO: 283, и необязательно дополнительно содержащей E, L или K, предпочтительно E, в положении 11, R или H в положении 22, E или Q, предпочтительно E, в положении 44, P или M, предпочтительно P, в положении 46, Q или R, предпочтительно Q, в положении 48 и/или D, A, E, R, K, Q, N, или S, предпочтительно D, A, E, Q, N или S, более предпочтительно D или A, в положении 84.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 137 или SEQ ID NO: 142, и

- V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 135 SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147 или SEQ ID NO: 148.

В частности, предпочтительно

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 134,

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 135,

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 140,

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 136,

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 137, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 134,

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 137, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 135, или

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 137, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 134.

Наиболее предпочтительно, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 134, 135 или 140, в частности, SEQ ID NO: 135. Таким образом, V_A может содержать или состоять из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, и V_B может содержать или состоять из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 135. Альтернативно, V_A может содержать или состоять из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, и V_B может содержать или состоять из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 140.

Варианты антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем документе, рассматриваются и явно упоминаются с использованием формулировки «на по меньшей мере 85% идентичны эталонной последовательности», как определено в настоящем документе выше в разделах «Определения». Например, последовательности V_A и V_B могут отличаться от эталонных последовательностей SEQ ID NO: 132 и SEQ ID NO: 134 соответственно по меньшей мере одной аминокислотной заменой, в частности по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой и/или заменой каноническими остатками. В частности, последовательности V_A и V_B могут отличаться от эталонных последовательностей SEQ ID NO: 132 и SEQ ID NO: 134, соответственно, только консервативными аминокислотными заменами.

Модификации и изменения могут быть сделаны в аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению и в соответствующих последовательностях ДНК, соответственно, и все равно приведут к получению функционального антигенсвязывающего белка или полипептида с желаемыми характеристиками.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одно или несколько из следующего:

- (i) один или несколько дополнительных антигенсвязывающих сайтов,
- (ii) трансмембранную область, необязательно включающую цитоплазматическую сигнальную область,
- (iii) диагностический агент,
- (iv) терапевтический агент или
- (v) РК-модифицирующий фрагмент.

В тех случаях, когда перечисленные выше элементы (i)-(v) представляют собой полипептиды, слитые с антигенсвязывающим белком согласно настоящему изобретению, антигенсвязывающие белки также можно называть «слитыми белками TCR».

Дополнительный антигенсвязывающий сайт предпочтительно происходит из антигена.

«Трансмембранная область» в контексте настоящего изобретения может представлять собой, например, трансмембранный домен TCR альфа или бета.

«Цитоплазматическая сигнальная область» может представлять собой, например, внутриклеточный домен TCR альфа или бета.

В контексте настоящего изобретения «диагностический агент» относится к обнаруживаемой молекуле или веществу, как например, флуоресцентная молекула, радиоактивная молекула или любые другие метки, известные в данной области техники, которые обеспечивают (прямо или косвенно) сигнал.

«Флуоресцентные молекулы», известные в данной области, включают изотиоцианат флуоресцеина (FITC), фикоэритрин (PE), флуорофору для использования в синем лазере (например, PerCP, PE-Cy7, PE-Cy5, FL3 и APC или Cy5, FL4), флуорофору для использования в красном, фиолетовом или УФ-лазере (например, Pacific blue, pacific orange).

«Радиоактивные молекулы» включают без ограничения радиоактивные атомы для скинтиграфических исследований, такие как I^{123} , I^{124} , In^{111} , Re^{186} , Re^{188} , Tc^{99} . Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению также могут содержать спин-метку для визуализации ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известного как

магнитно-резонансная томография, МРТ), такую как йод-123, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Такие диагностические агенты могут быть либо непосредственно связаны (т.е. физически связаны) с антигенсвязывающим белком, либо могут быть связаны не напрямую.

В контексте настоящего изобретения «терапевтический агент» относится к агенту, который оказывает терапевтический эффект. Термины «терапевтический агент» и «лекарственное средство» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Согласно одному варианту осуществления терапевтический агент может представлять собой агент, ингибирующий рост, такой как цитотоксический агент или радиоактивный изотоп.

«Ингибирующий рост агент» или «антипролиферативный агент», которые можно использовать индифферентно, относятся к соединению или композиции, которая ингибирует рост клетки, особенно опухолевой клетки, либо *in vitro*, либо *in vivo*.

В контексте настоящего изобретения термин «цитотоксический агент» относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает разрушение клеток. Термин «цитотоксический агент» включает химиотерапевтические агенты, ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты, а также различные противоопухолевые средства или противораковые агенты, раскрытые ниже. Согласно некоторым вариантам осуществления цитотоксический агент представляет собой таксоид, барвинок, таксаны, майтанзиноид или аналог майтанзиноида, такой как DM1 или DM4, малое лекарственное средство, томаймицин или производное пирролобензодиазепина, производное криптофицина, производное лептомицина, ауристатин или аналог доластатина, пролекарство, ингибиторы топоизомеразы II, ДНК-алкилирующий агент, антитубулиновый агент, аналог СС-1065 или СС-1065.

Термин «радиоактивный изотоп» предназначен для включения радиоактивных изотопов, пригодных для лечения рака, таких как At²¹¹, Bi²¹², Er¹⁶⁹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, In¹¹¹, P³², Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Sr⁸⁹ и радиоактивные изотопы Lu. Такие радиоактивные изотопы обычно излучают преимущественно бета-излучение. Согласно одному варианту осуществления радиоактивный изотоп представляет собой изотоп альфа-источника излучения, более конкретно, торий 227, который излучает альфа-излучение.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению ковалентно присоединены непосредственно или через расщепляемый или нерасщепляемый линкер по меньшей мере к одному ингибирующему

рост агенту. Антигенсвязывающий белок, к которому присоединен по меньшей мере один ингибирующий рост агент, также может называться конъюгатом. Расщепляемый линкер облегчает высвобождение цитотоксического агента или ингибирующего рост агента из антигенсвязывающего белка в клетке. Например, можно использовать кислотолабильный линкер, чувствительный к пептидазе линкер, лабильный к эстеразе линкер, фотоллабильный линкер или дисульфидсодержащий линкер (см., например, патент США № 5208020). Линкер также может быть «нерасщепляемым линкером» (например, линкером SMCC), что в некоторых случаях может привести к лучшей переносимости.

Получение таких конъюгатов, например, иммуноконъюгатов, описано в заявке WO2004/091668 или Hudecz, F., *Methods Mol. Biol.* 298: 209-223 (2005) и Kirin et al., *Inorg Chem.* 44(15): 5405-5415 (2005), содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте, и может быть отнесено специалистами в данной области техники на получение антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, к которым присоединен по меньшей мере один такой ингибирующий рост агент.

Альтернативно, слитый белок, содержащий антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению и цитотоксический или ингибирующий рост полипептид, может быть получен с помощью рекомбинантных методов или пептидного синтеза. Длина ДНК может включать соответствующие участки, кодирующие две части конъюгата, либо примыкающие друг к другу, либо разделенные участком, кодирующим линкерный пептид, который не разрушает желаемые свойства конъюгата.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению также можно использовать в терапии пролекарствами, опосредованной зависимыми ферментами, путем конъюгирования полипептида с ферментом, активирующим пролекарство, который превращает пролекарство (например, пептидиловый химиотерапевтический агент, см. WO 81/01145) в активное противораковое лекарственное средство (см., например, WO 88/07378 и патент США № 4975278).

В контексте настоящего изобретения «РК-модифицирующий фрагмент» относится к фрагменту, который модифицирует фармакокинетику антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению. Соответственно, этот фрагмент модифицирует, в частности, период полужизни и распределение антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению *in vivo*. Согласно предпочтительному варианту осуществления РК-модифицирующий фрагмент увеличивает период полужизни антигенсвязывающего белка. Примеры РК-модифицирующих фрагментов включают без ограничения ПЭГ (Dozier *et al.*, (2015) *Int J Mol Sci.* Oct 28,16(10):25831-64 и Jevsevar *et al.*, (2010)

Biotechnol J. Jan, 5(1):113-28), PASylation (Schlappschy *et al.*, (2013) Protein Eng Des Sel. Aug, 26(8):489-501), альбумин (Dennis *et al.*, (2002) J Biol Chem. Sep 20, 277(38):35035-43), F_c-часть антитела и/или неструктурированные полипептиды (Schellenberger *et al.*, (2009) Nat Biotechnol. Dec, 27(12):1186-90).

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одно или несколько из следующего: фермент, цитокин (такой как человеческий ИЛ-2, ИЛ-7 или ИЛ-15), наноноситель или нуклеиновая кислота.

Второй антигенсвязывающий сайт

Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок дополнительно содержит переменный домен легкой цепи антитела (V_L) и переменный домен тяжелой цепи антитела (V_H). Переменный домен V_L и переменный домен V_H вместе образуют антигенсвязывающий сайт. В дальнейшем этот антигенсвязывающий сайт иногда также называют «вторым антигенсвязывающим сайтом». Антигенсвязывающий сайт, образованный V_L и V_H, предпочтительно связывается с антигеном эффекторной клетки, его также можно назвать «рекрутером», поскольку он рекрутирует эффекторную клетку в опухоль. В контексте настоящего изобретения «эффекторная клетка» относится к Т-клетке или природной клетке-киллеру (NK-клетке).

Согласно предпочтительным вариантам осуществления V_L и V_H связываются с антигеном, выбранным из группы, состоящей из CD2, CD3 (как например, CD3 γ , CD3 δ , и CD3 ϵ цепи), CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD90, CD94, CD95, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, Fc ϵ RI, TCR α/β , TCR γ/δ , HLA-DR и 4-1 BB или их комбинаций, и/или V и V_H связываются с эффекторной клеткой. «Их комбинации» относятся к комплексам двух или более указанных антигенов, например, комплексу TCR α/β CD3. Предпочтительно антиген представляет собой CD3, комплекс TCR α/β CD3 или CD28, более предпочтительно CD3 или комплекс TCR α/β CD3.

Для нацеливания на комплекс TCR-CD3 домены V_H и V_L, происходящие из CD3-специфического гуманизированного антитела hUCHT1 (Zhu *et al.*, Identification of heavy chain residues in a humanized anti-CD3 antibody important for efficient antigen binding and T cell activation. J Immunol, 1995, 155, 1903–1910), можно применять, в частности, домены V_H и V_L, происходящие из вариантов UCHT1 UCHT1-V17, UCHT1-V17opt, UCHT1-V21 или

UCHT1-V23, предпочтительно происходящие из UCHT1-V17, более предпочтительно V_H , содержащий или состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 109, и V_L , содержащий или состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 108. Альтернативно, домены V_H и V_L , происходящие из антитела BMA031, которое нацелено на комплекс $TCR\alpha/\beta$ -CD3 и его гуманизированные варианты (Shearman et al., Construction, expression and characterization of humanized antibodies directed against the human alpha/beta T cell receptor, J Immunol, 1991, 147, 4366-73) можно применять, в частности, V_H и V_L домены, происходящие из вариантов BMA031 BMA031(V36) или BMA031(V10), предпочтительно происходящие из BMA031(V36), более предпочтительно V_H , содержащий или состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 112, или SEQ ID NO: 114 (A02), или SEQ ID NO: 115 (D01), или SEQ ID NO: 116 (A02_H90Y), или SEQ ID NO: 117 (D01_H90Y), и V_L , содержащий или состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 113. Согласно другой альтернативе, V_H и V_L домены, происходящие из CD3ε-специфического антитела H2C (описано в EP2 1 55 783) можно применять, в частности, V_H , содержащий или состоящий из последовательности согласно SEQ ID NO: 118, или SEQ ID NO: 123 (N100D), или SEQ ID NO: 125 (N100E), или SEQ ID NO: 127 (S101A), и V_L , содержащий или состоящий из последовательностей согласно SEQ ID NO: 120. Все положения и определения CDR соответствуют схеме нумерации по Кабату.

Согласно некоторым вариантам осуществления V_H и V_L вместе связываются с комплексом $TCR\alpha/\beta$ CD3, и

V_H содержит

- определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 381 (SYVMH),
- HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G (SEQ ID NO: 382), где X₁ представляет собой A или N, X₂ представляет собой E или Q, и/или X₃ представляет собой Q или K
- HCDR3 и
- Каркасные области тяжелой цепи (HFR) 1-4, и

V_L содержит

- определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 383 (SATSSVSYMH),
- LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 384 (DTSKLAS) и
- LCDR3,

где

- по меньшей мере одна аминокислота HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, и/или по меньшей мере одна аминокислота HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, которая не является положительно заряженной, заменена положительно заряженной аминокислотой кислота, и/или

- по меньшей мере одна аминокислота LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3 и/или по меньшей мере одна аминокислота LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4, которая не является положительно заряженной, заменена положительно заряженной аминокислотой кислота, и/или

- HFR3 содержит остаток тирозина (Y) в положении 90 согласно нумерации Кабата.

- Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит положительно заряженную аминокислоту в тяжелой цепи:

- в положении 31 представляет собой R, K или H,

- в положении 53 представляет собой R, K или H, и/или

- в положении 54 представляет собой R или K, и/или

положительно заряженную аминокислоту в легкой цепи

- в положении 31 представляет собой R или K, и/или

- в положении 56 представляет собой R или K.

Согласно некоторым вариантам осуществления V_H содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 112, 114 - 117 и 366 - 376, и V_L содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 113 и 377 - 380. Предпочтительно, V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 112 или 114 - 117, и V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 113 или 378, предпочтительно 113.

«CD28» экспрессируется на Т-клетках и может обеспечивать костимулирующие сигналы, необходимые для активации Т-клеток. CD28 играет важную роль в пролиферации и выживании Т-клеток, продукции цитокинов и развитии Т-хелперов 2-го типа.

«CD134» также называют Oх40. CD134/OX40 экспрессируется через 24–72 часа после активации и может использоваться для определения вторичной костимулирующей молекулы.

«4-1 ВВ» способен связываться с 4-1 ВВ-лигандом на антигенпрезентирующих клетках (APC), в результате чего генерируется костимулирующий сигнал для Т-клеток.

«CD5» представляет собой еще один пример рецептора, преимущественно обнаруживаемого на Т-клетках. CD5 также обнаруживается на В-клетках на низких уровнях.

«CD95» представляет собой еще один пример рецептора, модифицирующего функции Т-клеток, и также известен как Fas-рецептор, который опосредует передачу апоптотического сигнала с помощью Fas-лиганда, экспрессируемого на поверхности других клеток. Сообщалось, что CD95 модулирует сигнальные пути, управляемые TCR/CD3, в покоящихся Т-лимфоцитах.

«Молекула рецептора, специфического для NK-клеток», представляет собой, например, CD16, рецептор Fc с низкой аффинностью и NKG2D.

Примером рецепторной молекулы, которая присутствует на поверхности как Т-клеток, так и природных клеток-киллеров (NK), является CD2 и другие члены суперсемейства CD2. CD2 способен действовать как костимулирующая молекула на Т- и NK-клетки.

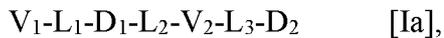
Биспецифические и мультиспецифические антигенсвязывающие белки

Соответственно, антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат V_A и V_B , которые образуют первый антигенсвязывающий сайт, специфический для комплекса PRAME-004:MHC, и V_L и V_H , которые образуют второй антигенсвязывающий сайт, способный связывать эффекторные клетки, предпочтительно Т-клетки. V_A , V_B , V_L и V_H могут быть расположены на одной полипептидной цепи или на нескольких полипептидных цепях, предпочтительно на двух полипептидных цепях. Помимо V_A , V_B , V_L и V_H антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению могут содержать или не содержать домены димеризации, предпочтительно константные домены иммуноглобулина.

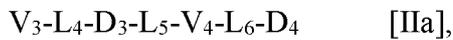
Согласно некоторым вариантам осуществления V_A , V_B , V_L и V_H расположены на двух полипептидных цепях. Предпочтительно каждая полипептидная цепь содержит два переменных домена. Предпочтительно одна полипептидная цепь содержит V_A , а другая полипептидная цепь содержит V_B . Предпочтительно полипептидная цепь, содержащая V_A , содержит один из V_L и V_H , а полипептидная цепь, содержащая V_B , содержит другой из V_L и V_H . Также возможно, что полипептидная цепь, содержащая V_A , содержит как V_L , так и V_H , а полипептидная цепь, содержащая V_B , не содержит ни одного из V_L и V_H , или наоборот. Другая возможность состоит в том, что одна полипептидная цепь содержит V_A , одна полипептидная цепь содержит V_B , и третья полипептидная цепь содержит V_L и V_H .

Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок содержит первую и вторую полипептидные цепи, где

первая полипептидная цепь представлена формулой [Ia]:



и вторая полипептидная цепь представлена формулой [IIa]



где

- V_1 , V_2 , V_3 и V_4 представляют собой переменные домены, где один представляет собой V_A , один из $V_1 - V_4$ представляет собой V_B , один представляет собой V_L , и один представляет собой V_H ,

- D_1 , D_2 , D_3 и D_4 представляют собой домены димеризации и могут присутствовать или отсутствовать, где D_1 и D_3 , и D_2 и D_4 специфически связываются друг с другом, и по меньшей мере одна пара D_1 и D_3 , или D_2 и D_4 присутствует, и

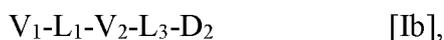
- L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 и L_6 представляют собой линкеры, где L_1 и L_4 присутствуют и L_2 , L_3 , L_5 и L_6 могут присутствовать или отсутствовать.

Предпочтительно один из V_1 , и V_2 представляет собой V_A , один из V_3 , и V_4 представляет собой V_B , и из оставшихся двух переменных доменов один представляет собой V_L , а другой представляет собой V_H , другими словами, V_A и V_B расположены на разных полипептидных цепях, и V_L , и V_H расположены на разных полипептидных цепях.

Домены димеризации предпочтительно представляют собой домены гетеродимеризации, которые опосредуют гетеродимеризацию первой полипептидной цепи со второй полипептидной цепью, но не гомодимеризацию двух первых или двух вторых полипептидных цепей. Согласно предпочтительным вариантам осуществления пара доменов димеризации (например, D_1 и D_3 , и/или D_2 и D_4) содержит константные домены иммуноглобулина, такие как происходящие из антител C_L и C_{H1} , или C_L-F_c и $C_{H1}-F_c$, или TCR-происходящие C_α и C_β , или пару доменов C_{H3} , или пару доменов F_c , где домены C_{H3} и F_c предпочтительно содержат введенные мутации, которые вызывают гетеродимеризацию, например, мутации выступ во впадину.

Согласно даже более предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок содержит первую и вторую полипептидные цепи, где

первая полипептидная цепь представлена формулой [Ib]:



и вторая полипептидная цепь представлена формулой [IIb]:



где

- V_1, V_2, V_3, V_4 представляют собой переменные домены, где один представляет собой V_A , один представляет собой V_B , один представляет собой V_L , и один представляет собой V_H ,

- D_2 и D_4 представляют собой домены димеризации, специфически связывающиеся друг с другом, предпочтительно F_c -домены, и

- L_1, L_3, L_4 и L_6 представляют собой линкеры, где L_3 , и L_6 могут присутствовать или отсутствовать.

Как описано в отношении формул Ia и IIa, предпочтительно V_A и V_B расположены на разных полипептидных цепях, и V_L и V_H расположены на разных полипептидных цепях, и домены димеризации представляют собой домены гетеродимеризации.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления D_2 и D_4 представляют собой пару F_c доменов F_{c1} и F_{c2} , в частности, D_2 представляет собой F_{c1} , и D_4 представляет собой F_{c2} , где F_{c1} и F_{c2} являются одинаковыми или разными, предпочтительно разными, и предпочтительно содержат мутации, вызывающие гетеродимеризацию. Согласно одному варианту осуществления F_{c1} содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 150 (впадина), и F_{c2} содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 149 (выступ), или *наоборот*. В частности, когда F_{c1} расположен на полипептидной цепи, содержащей V_L , и F_{c2} расположен на полипептидной цепи, содержащей V_H , F_{c1} содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 149 (выступ), и F_{c2} содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 150 (впадина), и когда F_{c1} расположен на полипептидной цепи, содержащей V_H , и F_{c2} расположен на полипептидной цепи, содержащей V_L , F_{c1} содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 150 (впадина), и F_{c2} содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 149 (выступ).

Специалистам в данной области техники понятно, что в антигенсвязывающих белках, содержащих первую и вторую полипептидные цепи, представленные формулами Ia и IIa или Ib и IIb, соответственно, V_A и V_B , и V_L и V_H могут иметь параллельную ориентацию, как в формате DVD, или перекрестную ориентацию, как в формате CODV.

В формулах Ia и IIa или Ib и IIb, V_A, V_B, V_L и V_H могут иметь следующее расположение:

(1) V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_B , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_L ,

(2) V_1 представляет собой V_B , V_2 представляет собой V_H , V_3 представляет собой V_L , и V_4 представляет собой V_A ,

(3) V_1 представляет собой V_B , V_2 представляет собой V_L , V_3 представляет собой V_H , и V_4 представляет собой V_A ,

(4) V_1 представляет собой V_L , V_2 представляет собой V_B , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_H ,

(5) V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_B , V_3 представляет собой V_L , и V_4 представляет собой V_A ,

(6) V_1 представляет собой V_B , V_2 представляет собой V_H , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_L ,

(7) V_1 представляет собой V_L , V_2 представляет собой V_B , V_3 представляет собой V_H , и V_4 представляет собой V_A ,

(8) V_1 представляет собой V_B , V_2 представляет собой V_L , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_H ,

(9) V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_L , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_B ,

(10) V_1 представляет собой V_L , V_2 представляет собой V_H , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_B ,

(11) V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_L , V_3 представляет собой V_B , и V_4 представляет собой V_A , или

(12) V_1 представляет собой V_L , V_2 представляет собой V_H , V_3 представляет собой V_B , и V_4 представляет собой V_A .

Предпочтительно V_A , V_B , V_L и V_H имеют ориентацию, описанную в (1)-(8), т.е. V_A и V_B расположены на разных полипептидных цепях, и V_L и V_H расположены на разных полипептидных цепях. Более предпочтительно, V_A , V_B , V_L , и V_H имеют ориентацию, описанную в (1)-(4), т.е. V_A и V_B , и V_L и V_H имеют перекрестную ориентацию.

Линкеры L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 определены в настоящем документе выше в разделе «определения». Согласно некоторым вариантам осуществления определенная длина линкера может быть предпочтительной для конкретного формата. Однако знания, касающиеся длин линкеров и их аминокислотных последовательностей, относятся к общим знаниям в данной области техники, а линкеры, а также аминокислотные последовательности линкера для различных форматов являются частью уровня техники и раскрыты в настоящем документе выше в процитированных источниках.

Особенно предпочтительно антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению имели формат TCER®. Согласно вариантам осуществления формата TCER® антигенсвязывающий белок содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, представленные формулами [IIa] и [IIb], как определено выше, где

- V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_B , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_L ,

V_1 представляет собой V_B , V_2 представляет собой V_H , V_3 представляет собой V_L , и V_4 представляет собой V_A ,

V_1 представляет собой V_B , V_2 представляет собой V_L , V_3 представляет собой V_H , и V_4 представляет собой V_A , или

V_1 представляет собой V_L , V_2 представляет собой V_B , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_H ,

- L_3 и L_6 отсутствуют,

- L_1 и L_4 предпочтительно содержат или состоят из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 214, и

- D_2 и D_4 представляют собой пару доменов F_c F_{c1} и F_{c2} , где F_{c1} и F_{c2} являются различными и содержат мутацию, вызывающую гетеродимеризацию, предпочтительно мутацию «выступ во впадину».

Согласно предпочтительным вариантам осуществления

- V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 108, и V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 109, или

- V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 113, и V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 или SEQ ID NO: 117, или

- V_L содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 120, и V_H содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, \ или SEQ ID NO: 127.

Согласно особенно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок содержит первую полипептидную цепь, выбранную из SEQ ID NO: 100, 103, 105, 106, 111, 122, 126, 128, 151, 155, 156, 157, 158, 159, 166, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 178, 179, 180, 181, 183, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 285, 291, 295, 299 и 303, и вторую полипептидную цепь, выбранную из SEQ ID NO: 101, 102, 104, 107, 110, 119, 121, 131, 133, 143, 152, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 168, 170, 172, 174, 176, 182, 184, 185, 186, 216, 218, 220, 222, 224, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 282, 284, 296 или 300.

Согласно даже более предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок содержит первую полипептидную цепь, выбранную из SEQ ID NO: 100, 103, 105, 151, 156, 158, 166, 167, 175, 178, 180, 183, 193, 285, 291, 295, 299 и 303, более предпочтительно выбранную из SEQ ID NO: 100, 103, 105, 167, 183, 193, 285, 291, 295, 299 и 303, и вторую полипептидную цепь, выбранную из SEQ ID NO: 101, 102, 104, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 170, 172, 174, 176, 182, 185, 186, 284, 296 или 300, более предпочтительно выбранную из SEQ ID NO: 101, 102, 104, 160, 162, 176, 186, 284, 296 или 300.

Согласно наиболее предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок содержит

- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 100 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 101, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 103 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 102, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 105 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 104, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 167 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 160, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 183 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 176, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 193 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 186, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 285 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 284, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 291 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 284, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 295 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 186, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 295 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 296, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 299 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 162, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 285 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 300, или

- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 303 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 162, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 291 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 300,
даже более конкретно
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 158 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 300, или
- первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 291 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 164.

Таким образом, согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления, антигенсвязывающий белок может содержать первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 158 и вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 300.

scTCR

Согласно некоторым вариантам осуществления первый и второй полипептид, и таким образом, V_A и V_B расположены на одной полипептидной цепи. Согласно таким вариантам осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению может быть описан как одноцепочечный TCR. Однако, в зависимости от последовательностей FR и константных доменов, содержащихся в антигенсвязывающем белке, его также можно называть молекулой одноцепочечного антитела или одноцепочечной молекулой TCR-антитела, как обсуждалось выше.

scTCR может содержать переменный домен, происходящий из первого TCR, или, по меньшей мере, содержащий CDR, происходящие из первого TCR, переменный домен, происходящий из второго TCR, или по крайней мере содержащий CDR, происходящие из второго TCR, и константный домен первого или второго TCR. TCR, другими словами, одноцепочечный TCR содержит переменный домен, происходящий из одного TCR (например, из α - или γ -цепи), и целую цепь (например, β - или δ -цепь) другого TCR, или наоборот. Кроме того, scTCR необязательно может содержать один или несколько линкеров, предпочтительно пептидных линкеров, которые соединяют домены вместе. Также предложен такой scTCR согласно настоящему изобретению, который слит с человеческим цитокином, таким как IL-2, IL-7 или IL-15.

Согласно одному варианту осуществления указанный одноцепочечный TCR находится в одном из одноцепочечных форматов, выбранных из группы, состоящей из $V_A-L_t-V_B$, $V_B-L_t-V_A$, $V_A-C_\alpha-L_t-V_B$, $V_A-C_\beta-L_t-V_B$, $V_A-L_t-V_B-C_\beta$, $V_A-L_t-V_B-C_\alpha$, $V_A-C_\alpha-L_t-V_B-C_\beta$, $V_A-C_\beta-L_t-V_B-C_\alpha$, предпочтительно $V_A-L_t-V_B$, $V_B-L_t-V_A$, где V_A представляет собой первый

вариабельный домен, как определено в настоящем документе выше, и где V_B представляет собой второй вариабельный домен, как определено в настоящем документе выше, C_α и C_β представляют собой константные домены TCR альфа и бета, которые присутствуют или отсутствуют, соответственно, и L_1 представляет собой линкер, который присутствует или отсутствует и как определено в настоящем документе выше в разделе «Определения».

Согласно конкретным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению представляет собой scTCR, содержащий аминокислотную последовательность согласно любому из SEQ ID NO: 79-87 или 89-92, или аминокислотную последовательность на по меньшей мере 85 % идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 79-87 или 89-92, предпочтительно аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 87.

scTCR-Fab

Одноцепочечный TCR может содержать дополнительный вариабельный домен, связанный либо на C-, либо на N-конце, в частности V_L и/или V_H , как описано выше.

Согласно одному варианту осуществления такой дополнительный вариабельный домен может быть связан посредством линкера L_k . Согласно одному предпочтительному варианту осуществления линкер L_k представляет собой линкер, как определено в настоящем документе выше, или последовательность шарнир- C_{H1} аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 360.

Согласно конкретным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению представляет собой scTCR-Fab, содержащий первую полипептидную цепь, содержащую V_A , V_B и V_L или V_H , предпочтительно V_H , и вторую полипептидную цепь, содержащую другой из V_L , и V_H , предпочтительно V_L . Предпочтительно scTCR-Fab содержит первую полипептидную цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 94-98 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 94-98, и вторую полипептидную цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 93 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 93.

Полноразмерный TCR

Согласно другому варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению содержит две полипептидные цепи, где V_A содержится в

(полноразмерной) α - или γ -цепи TCR, и V_B содержится в (полноразмерной) β - или δ -цепи TCR. Согласно таким вариантам осуществления антигенсвязывающий белок предпочтительно имеет структуру обычного $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR, как описано выше. Согласно одному варианту осуществления TCR представляет собой $\alpha\beta$ TCR и содержит последовательность константного домена α -цепи (TRAC) согласно SEQ ID NO: 361 и последовательность константного домена β -цепи (TRBC1 или TRBC2) согласно SEQ ID NO: 362.

Согласно одному варианту осуществления последовательности константного домена TCR могут происходить из любого подходящего вида, такого как любое млекопитающее, например, человек, крыса, обезьяна, кролик, осел или мышь, предпочтительно человек. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления последовательности константного домена TCR могут быть слегка модифицированы, например, путем введения гетерологичных последовательностей, предпочтительно последовательностей мыши, которые могут повысить экспрессию и стабильность TCR. Кроме того, могут быть введены дополнительные стабилизирующие мутации, известные из уровня техники (например, WO2018/104407, PCT/EP2018/069151, WO 2011/044186, WO 2014/018863), такие как замена неблагоприятных аминокислот в переменных областях, и/или введение дисульфидного мостика между доменами C TCR, и удаление неспаренного цистеина.

В частности, последовательности константного домена TCR могут быть модифицированы путем усечения или замены для удаления нативной дисульфидной связи между Cys4 экзона 2 TRAC и Cys2 экзона 2 TRBC1 или TRBC2. Последовательность (последовательности) константного домена альфа- и/или бета-цепи также может быть модифицирована путем замены остатков цистеина на Thr 48 TRAC и Ser 57 TRBC1 или TRBC2, причем указанные цистеины образуют дисульфидную связь между константными доменами альфа и бета TCR. TRBC1 или TRBC2 могут дополнительно включать мутацию цистеина на аланин в положении 75 константного домена и мутацию аспарагина на аспарагиновую кислоту в положении 89 константного домена. Константный домен может дополнительно или альтернативно содержать дополнительные мутации, замены или делеции относительно нативных последовательностей TRAC и/или TRBC1/2. Термин TRAC и TRBC1/2 охватывает природные полиморфные варианты, например, N - K в положении 4 TRAC (Bragado et al Int Immunol. 1994 Feb,6(2):223-30).

Настоящее изобретение также включает частицы, отображающие антигенсвязывающий белок, в частности TCR, и включение указанных частиц в библиотеку частиц. Такие частицы включают без ограничения фаг, дрожжи, рибосомы или клетки

млекопитающих. Способы получения таких частиц и библиотек известны в данной области техники (например, см. WO2004/044004, WO01/48145, Chervin et al. (2008) J. Immuno. Methods 339.2: 175-184).

Нуклеиновые кислоты, векторы и рекомбинантные клетки-хозяева

Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей или состоящей из последовательность, кодирующей антигенсвязывающий белок согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Термин «нуклеиновая кислота» относится в контексте настоящего изобретения к одно- или двухцепочечным олиго- или полимерам дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных оснований или того и другого. Нуклеотидные мономеры состоят из нуклеинового основания, пятиуглеродного сахара (например, без ограничения рибозы или 2'-дезоксирибозы) и от одной до трех фосфатных групп. Обычно нуклеиновая кислота образуется посредством фосфодиэфирных связей между отдельными нуклеотидными мономерами. В контексте настоящего изобретения термин «нуклеиновая кислота» включает без ограничения молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), но также включает синтетические формы нуклеиновых кислот, содержащие другие связи (например, пептидные нуклеиновые кислоты, как описано у Nielsen et al. (Science 254:1497-1500, 1991). Обычно нуклеиновые кислоты представляют собой одно- или двухцепочечные молекулы и состоят из встречающихся в природе нуклеотидов. Указание одноцепочечной нуклеиновой кислоты также определяет (по меньшей мере частично) последовательность комплементарной цепи. Нуклеиновая кислота может быть одно- или двухцепочечной или может содержать части как двухцепочечных, так и одноцепочечных последовательностей. На примере двухцепочечной последовательности: Молекулы многоцепочечных нуклеиновых кислот могут иметь 3'- или 5'-выступы, и поэтому не требуется или не предполагается, что они полностью двухцепочечные по всей своей длине. Термин нуклеиновая кислота включает хромосомы или хромосомные сегменты, векторы (например, векторы экспрессии), кассеты экспрессии, голый полимер ДНК или РНК, праймеры, зонды, кДНК, геномную ДНК, рекомбинантную ДНК, кРНК, мРНК, тРНК, микроРНК (миРНК) или малую интерферирующую РНК (миРНК). Нуклеиновая кислота может быть, например, одноцепочечной, двухцепочечной или трехцепочечной без ограничения какой-либо конкретной длиной. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты содержит или кодирует комплементарные последовательности в дополнение к любой явно указанной последовательности.

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или могут представлять собой нуклеиновые кислоты в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота является «выделенной» или «по существу очищенной» при очистке от других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными методами.

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению можно получить с использованием стандартных методов молекулярной биологии, включая без ограничения методы амплификации и обратной транскрипции РНК. После получения фрагментов ДНК, кодирующих, например, переменные цепи, этими фрагментами ДНК можно дополнительно манипулировать с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК, например, для преобразования генов переменной области в гены полноразмерной цепи. В этих манипуляциях фрагмент ДНК, кодирующий вариант, функционально связывается с другой молекулой ДНК или с фрагментом, кодирующим другой белок, например, с константной областью или гибким линкером. Термин «функционально связанный» в этом контексте предназначен для обозначения, что два фрагмента ДНК соединены функциональным образом, например, так, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются в рамке считывания, или так, что белок экспрессируется под контролем желаемого промотора. Выделенная ДНК, кодирующая переменную область, например, переменную альфа-область и/или переменную бета-область, может быть преобразована в ген с полной длиной цепи путем функционального связывания ДНК, кодирующей переменную область, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области. Последовательности генов константных областей человека, например, TCR или антител, известны в данной области техники, и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

Обычно указанная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК или РНК, которая может быть включена в подходящий вектор.

Первый полипептид и второй полипептид, описанные в настоящем документе, могут кодироваться одной молекулой нуклеиновой кислоты или двумя отдельными молекулами нуклеиновой кислоты.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к векторам экспрессии и клеткам-хозяевам для продукции антигенсвязывающих белков или их функциональных фрагментов, описанных в настоящем документе.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту настоящего изобретения.

Термины «вектор», «вектор клонирования» и «вектор экспрессии» относятся к носителю, с помощью которого последовательность ДНК или РНК (например, чужеродный ген) может быть введена в клетку-хозяина, чтобы трансформировать хозяина и стимулировать экспрессию (например, транскрипцию и трансляцию) введенной последовательности.

Для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих антигенсвязывающие белки или их функциональные фрагменты, можно использовать различные векторы экспрессии. Как вирусные, так и невирусные векторы экспрессии можно использовать для продукции антигенсвязывающих белков или их функциональных фрагментов, описанных в настоящем документе, в клетке-хозяине млекопитающего. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, плазмиду, космиды, эписомы, искусственную хромосому, фаг или вирусный вектор.

Такие векторы могут содержать регуляторные элементы, такие как промотор, энхансер, терминатор и т.п., чтобы вызывать или направлять экспрессию указанного полипептида при введении субъекту. Примеры промоторов и энхансеров, используемых в векторе экспрессии для клеток животных, включают ранний промотор и энхансер SV40 (Mizukami T. et al. 1987), промотор и энхансер LTR вируса лейкоза мышей Молони (Kuwana Y et al. 1987), промотор (Mason JO et al. 1985) и энхансер (Gillies SD et al. 1983) тяжелой цепи антитела и т.п.

Например, невирусные векторы, подходящие для экспрессии полинуклеотидов и полипептидов, описанных в настоящем документе, в клетках млекопитающих (например, клетках человека или не относящихся к человеку клетках) включают все подходящие векторы, известные в данной области техники для экспрессии белков. Другие примеры плазмид включают реплицирующиеся плазмиды, содержащие начало репликации, или интегративные плазмиды, такие как, например, pUC, pcDNA, pBR и т.п.

Термин «вирусный вектор» относится к конструкции вектора нуклеиновой кислоты, которая включает по меньшей мере один элемент вирусного происхождения, и обладает способностью упаковываться в вирусную частицу вектора, и кодирует по меньшей мере экзогенную нуклеиновую кислоту. Вектор и/или частицу можно использовать с целью переноса представляющей интерес нуклеиновой кислоты в клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*. В данной области техники известны многочисленные формы вирусных векторов. Полезные вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторов на основе SV40, вируса папилломы, вируса Эпштейна-Барра, векторов вируса коровьей оспы и вируса леса Семлики (SFV). Рекомбинантные вирусы могут быть получены способами, известными в

данной области техники, например, путем трансфекции упаковывающих клеток или временной трансфекции хелперными плазмидами или вирусами. Типичные примеры клеток, упаковывающих вирус, включают клетки PA317, клетки PsiCRIP, клетки GPenv+, клетки 293 и т.д. Подробные протоколы получения таких рекомбинантных вирусов с дефектами по репликации можно найти, например, в WO 95/14785, WO 96/22378, US 5882877, US 6013516, US 4861719, US 5278056 и WO 94/19478.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие первый полипептид и второй полипептид, описанные в настоящем документе, могут присутствовать в одном и том же векторе или в отдельных векторах. Первый полипептид и второй полипептид, описанные в настоящем документе, могут присутствовать в одном и том же векторе или в отдельных векторах.

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей антигенсвязывающий белок согласно первому аспекту, нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту или вектор согласно третьему аспекту настоящего изобретения. Клетка-хозяин может быть трансфицирована, инфицирована или трансформирована нуклеиновой кислотой и/или вектором согласно настоящему изобретению.

Термин «трансформация» означает введение «чужого» (т.е. внешнего) гена, последовательности ДНК или РНК в клетку-хозяина, так что клетка-хозяин будет экспрессировать введенный ген или последовательность для продукции желаемого вещества, обычно антигенсвязывающего белка или его функционального фрагмента, описанных в настоящем документе. Клетка-хозяин, которая получает и экспрессирует введенную ДНК или РНК, является «трансформированной».

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению можно использовать для получения рекомбинантного антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению в подходящей системе экспрессии. Термин «система экспрессии» означает клетку-хозяина и совместимый вектор в подходящих условиях, например, для экспрессии белка, кодируемого чужеродной ДНК, переносимой вектором и введенной в клетку-хозяин.

Общие системы экспрессии включают клетки-хозяева и плазмидные векторы *E.coli*, клетки-хозяева насекомых и векторы бакуловируса, а также клетки-хозяева и векторы млекопитающих. Другие примеры клеток-хозяев включают без ограничения прокариотические клетки (такие как бактерии) и эукариотические клетки (такие как дрожжевые клетки, клетки млекопитающих, клетки насекомых, растительные клетки и т.д.). Конкретные примеры включают *E. coli*, *Kluyveromyces* или *Saccharomyces* дрожжи, клеточные линии млекопитающих (например, клетки Vero, клетки CHO, клетки 3T3, клетки COS, клетки HEK и т.д.), а также первичные или устоявшиеся культуры клеток млекопитающих (например, полученные из лимфоцитов, фибробластов, эмбриональных

клеток, эпителиальных клеток, нервных клеток, адипоцитов и т.д.). Примеры также включают клетку SP2/0-Ag14 мыши (ATCC CRL1581), клетку P3X63-Ag8.653 мыши (ATCC CRL1580), клетку CHO, в которой дефектен ген дигидрофолатредуктазы (Urfaub G *et al*, 1980), клетку YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 крысы (ATCC CRL1662) и т.п. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка YB2/0 может быть предпочтительной, поскольку активность ADCC химерных или гуманизированных антител усиливается при экспрессии в этой клетке.

Согласно указанному выше, согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, который определен в настоящем документе выше, или нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, или вектор, кодирующий антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, где указанная клетка-хозяин предпочтительно представляет собой а) лимфоцит, такой как Т-лимфоцит или клетка-предшественник Т-лимфоцита, например, CD4 или CD8-положительная Т-клетка, или б) клетку для рекомбинантной экспрессии, такую как клетка яичника китайского хомячка (CHO).

В частности, для экспрессии некоторых антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, в частности антигенсвязывающих белков, содержащих два полипептида, которые не связаны, вектор экспрессии может быть любого типа, в котором ген, кодирующий тяжелую цепь антитела, и ген, кодирующий легкую цепь антитела, существует в отдельных векторах, или относится к типу, в котором оба гена существуют в одном и том же векторе (тандемный тип). С точки зрения простоты конструирования вектора экспрессии антигенсвязывающего белка, легкости введения в клетки животных и баланса между уровнями экспрессии Н- и L-цепей антитела в клетках животных предпочтительным является вектор экспрессии гуманизированного антитела тандемного типа (Shitara K *et al*. J Immunol Methods. 1994 Jan. 3, 167(1-2):271-8). Примеры вектора экспрессии гуманизированных антител тандемного типа включают pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 и тому подобное.

Согласно одному варианту осуществления такие рекомбинантные клетки-хозяева можно использовать для продукции по меньшей мере одного антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению.

Фармацевтическая композиция

Согласно пятому настоящему изобретению относится к фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению,

нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению, вектор согласно настоящему изобретению или клетку-хозяин согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Было показано, что антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению способны оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Таким образом, антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению полезны для разрушения опухолевых клеток у пациента. Иммунный ответ у пациента можно индуцировать путем прямого введения пациенту описанных антигенсвязывающих белков, в идеале в сочетании с агентом, повышающим иммуногенность (т.е. адъювантом). Можно ожидать, что иммунный ответ, возникающий в результате такой терапевтической вакцинации, будет высокоспецифичным в отношении опухолевых клеток, поскольку пептид SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50) не презентирован или чрезмерно презентирован в нормальных тканях при сопоставимом числе копий, что предотвращает риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток тканей пациента.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающему белку согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

В контексте настоящего изобретения термины «фармацевтическая композиция» или «терапевтическая композиция» относятся к соединению или композиции, способным вызывать желаемый терапевтический эффект при надлежащем введении субъекту.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект также упоминается как пациент.

Такие терапевтические или фармацевтические композиции могут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению или антигенсвязывающего белка, дополнительно содержащего терапевтический агент, в смеси с фармацевтически или физиологически приемлемым агентом состава, выбранным с учетом пригодности для способа введения.

Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению обычно поставляют как часть стерильной фармацевтической композиции, которая обычно включает фармацевтически приемлемый носитель и/или фармацевтически приемлемый разбавитель.

«Фармацевтически» или «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным соединениям и композициям, которые не вызывают неблагоприятных, аллергических или других нежелательных реакций при введении млекопитающему, особенно человеку, в зависимости от обстоятельств. Фармацевтически приемлемый

носитель или вспомогательное вещество относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу или вспомогательному веществу в составе любого типа.

«Фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество» может также называться «фармацевтически приемлемым разбавителем» или «фармацевтически приемлемыми носителями» и может включать растворители, наполнители, стабилизаторы, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты и т.п., которые физиологически совместимы. Соответственно, согласно одному варианту осуществления носитель представляет собой водный носитель.

Согласно другому аспекту водный носитель способен придавать улучшенные свойства при объединении с описанным в настоящем документе антигенсвязывающим белком, например, улучшенную растворимость, эффективность и/или улучшенную иммунотерапию.

Форма фармацевтических композиций, путь введения, доза и схема лечения, естественно, зависят от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, возраста, веса и пола пациента и т.д. Эта фармацевтическая композиция может быть в любой подходящей форме (в зависимости от желаемого способа введения пациенту). Она может доставляться в виде единичной лекарственной формы, обычно в запечатанном контейнере, и может быть представлена как часть набора. Такой набор обычно (хотя и не обязательно) включает инструкции по применению. Оно может включать множество указанных единичных лекарственных форм.

Эмпирические соображения, такие как биологический период полувыведения, обычно способствуют определению дозы. Частота введения может быть определена и скорректирована в ходе терапии и основана на уменьшении количества раковых клеток, поддержании уменьшения количества раковых клеток, уменьшении пролиферации раковых клеток или уничтожении раковых клеток. Альтернативно, могут быть подходящими составы антигенсвязывающего белка с пролонгированным высвобождением. В данной области техники известны различные составы и устройства для достижения замедленного высвобождения.

Согласно одному варианту осуществления дозы антигенсвязывающих белков могут быть определены эмпирически у индивидуумов, которым было сделано одно или несколько введений. Индивидуумам вводят возрастающие дозы антигенсвязывающего белка. Для оценки эффективности антигенсвязывающего белка можно следить за маркером состояния раковых клеток. К ним относятся прямые измерения пролиферации и гибели раковых

клеток с помощью FACS и других методов визуализации, улучшение здоровья, оцениваемое такими измерениями, или повышение качества жизни, измеряемое общепринятыми тестами, или увеличение продолжительности жизни. Специалисту в данной области техники очевидно, что доза будет варьироваться в зависимости от индивидуума, стадии заболевания, а также от применявшихся в прошлом и сопутствующих способов лечения.

В частности, фармацевтические композиции согласно четвертому аспекту настоящего изобретения содержат носители, которые фармацевтически приемлемы для состава, пригодного для инъекций. Это могут быть, в частности, изотонические, стерильные солевые растворы (мононатрий- или динатрийфосфат, хлориды натрия, калия, кальция или магния и т.п. или смеси таких солей) или сухие, особенно лиофилизированные композиции, которые при добавлении, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического раствора, позволяют получить растворы для инъекций.

Дозы, используемые для введения, могут быть адаптированы в зависимости от различных параметров и, в частности, в зависимости от используемого способа введения, соответствующей патологии или, альтернативно, желаемой продолжительности лечения.

Для получения фармацевтических композиций эффективное количество антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению можно растворить или диспергировать в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии, составы, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный раствор пропиленгликоля, и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций для немедленного применения. Во всех случаях форма должна быть стерильной и жидкой настолько, чтобы ее можно было легко вводить. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей можно приготовить в воде, смешанной соответствующим образом с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также можно приготовить в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. При обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант, препятствующий размножению микроорганизмов.

Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению может быть включен в композицию в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые

соли включают кислотно-аддитивные соли (образованные свободными аминогруппами белка) и которые образованы неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или органическими кислотами, такими как уксусная, щавелевая, винная, миндальная, и тому подобное. Соли, образованные свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и органических оснований, таких как изопропиламин, триметиламин, глицин, гистидин, прокаин и тому подобное.

Стерильные растворы для инъекций получают путем включения активных соединений в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются способы вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Получение более или весьма концентрированных растворов для прямой инъекции также охватывается, где применение DMSO в качестве растворителя приводит к чрезвычайно быстрому проникновению, доставляя высокие концентрации активных агентов к небольшой площади опухоли.

После получения растворы вводят способом, совместимым с лекарственной формой, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводить в различных лекарственных формах, таких как растворы для инъекций, описанные выше, но также можно использовать капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п.

Способы получения антигенсвязывающих белков

Согласно шестому аспекту настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего белка согласно первому аспекту настоящего изобретения, предусматривающему

- (a) предоставление клетки-хозяина,
- (b) предоставление генетической конструкции, содержащей кодирующую последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок,

- (с) введение указанной генетической конструкции в указанную клетку-хозяин, и
- (d) экспрессию указанной генетической конструкции указанной клеткой-хозяином, и необязательно
- (е) отбор клеток, которые экспрессируют и/или секретируют указанный антигенсвязывающий белок.

Согласно одному варианту осуществления способ дополнительно предусматривает выделение и очистку антигенсвязывающего белка от клетки-хозяина и необязательно восстановление антигенсвязывающего белка в Т-клетке. Специалист в данной области техники способен выбрать подходящие клетки-хозяева для экспрессии антигенсвязывающего белка.

Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению может быть получен любым способом, известным в данной области техники, например, без ограничений, любым химическим, биологическим, генетическим или ферментативным способом, либо отдельно, либо в комбинации.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению подходящим образом выделяют из культуральной среды с помощью процедур очистки антител, таких как, например, белковая А-сефарозная хроматография, гидроксилapatитная хроматография, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Согласно одному варианту осуществления выделение экспрессированных антигенсвязывающих белков или полипептидов в контексте настоящего изобретения относится к проведению хроматографии на белке А, селективной каппа-хроматографии и/или эксклюзионной хроматографии, предпочтительно хроматографии на белке А и/или эксклюзионной хроматографии, более предпочтительно хроматография на белке А и эксклюзионной хроматографии.

Зная аминокислотную последовательность желаемой последовательности, специалист в данной области может получить антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению стандартными способами получения полипептидов. Например, их можно синтезировать, используя хорошо известный твердофазный метод, в частности, используя коммерчески доступное устройство для синтеза пептидов (например, от Applied Biosystems, Foster City, California) и следуя инструкциям производителя. Альтернативно, антитела и антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению могут быть получены методами рекомбинантной ДНК и трансфекции генов, хорошо известными в данной области техники (см. Morrison SL. *et al.* (1984) и патентные документы US5202238 и US5204244). Например, фрагменты могут быть получены как продукты экспрессии ДНК после включения последовательностей ДНК, кодирующих желаемый (поли)пептид, в

векторы экспрессии и введения таких векторов в подходящие эукариотические или прокариотические хозяева, которые будут экспрессировать желаемый полипептид, из которых он может быть впоследствии выделен с использованием известных способов.

Согласно одному примеру, т.е. в случае TCER[®], последовательности ДНК, кодирующие различные комбинации V_H и V_L, и переменную альфа (V_{alpha}), и переменную бета (V_{beta}), а также кодирующие линкеры, могут быть получены, например, с помощью синтеза гена. Полученные последовательности ДНК могут быть клонированы в рамке считывания в векторы экспрессии, кодирующие шарнирную область, домен CH₂ и CH₃, происходящие, например, из человеческого IgG4 [номер доступа: K01316] и IgG1 [номер доступа: P01857], соответственно, и могут быть далее сконструированы. Конструирование можно проводить с включением мутаций типа «выступ во впадину» в CH₃-домены с дополнительной стабилизацией межцепочечных дисульфидных связей или без нее, удалением сайта N-гликозилирования в CH₂ (например, мутация N297Q), введением F_c-мутаций слайсинга или введением дополнительной стабилизации дисульфидной связи в V_L, и V_H, соответственно, согласно способам, описанным в Reiter et al. (Stabilization of the Fv Fragments in Recombinant Immunotoxins by Disulfide Bonds Engineered into Conserved Framework Regions. *Biochemistry*, 1994, 33, 5451 – 5459).

Способы получения гуманизированных антител на основе обычных методов рекомбинантной ДНК и трансфекции генов хорошо известны в данной области (см., например, Riechmann L. *et al.* 1988, Neuberger MS. *et al.* 1985) и могут быть легко применены для получения антигенсвязывающих белков.

Согласно одному примеру векторы для экспрессии рекомбинантных антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению были разработаны как моноцистронные, например, контролируемые промоторными элементами, происходящими из HCMV, производными pUC19. Плазмидную ДНК амплифицировали, например, в *E. coli* стандартными методами культивирования и затем очищали с использованием коммерческих наборов (Macherey & Nagel). Очищенную плазмидную ДНК использовали для временной трансфекции, например, клеток CHO-S согласно инструкциям производителя (система ExpiCHO[™], Thermo Fisher Scientific). Трансфицированные клетки CHO культивировали, например, в течение 6-14 дней, например, при температуре от 32°C до 37°C и одной-двух подачах раствора ExpiCHO[™] Feed.

Кондиционированный клеточный супернатант очищали, например, фильтрацией (0,22 мкм) с использованием, например, Sartoclear Dynamics[®] Lab Filter Aid (Sartorius). Биспецифические антигенсвязывающие белки очищали, например, с использованием системы Äkta Pure 25 L FPLC (GE Lifesciences), оборудованной для проведения поточной

аффинной и эксклюзионной хроматографии. Аффинную хроматографию проводили, например, на колонках с белком А или L (GE Lifesciences) в соответствии со стандартными протоколами аффинной хроматографии. Например, эксклюзионную хроматографию проводили непосредственно после элюирования (рН 2,8) из аффинной колонки для получения мономерного белка высокой чистоты, используя, например, колонки Superdex 200 pg 16/600 (GE Lifesciences) в соответствии со стандартными протоколами. Концентрации белка определяли, например, с помощью системы NanoDrop (Thermo Scientific) с использованием расчетных коэффициентов экстинкции в соответствии с предсказанными белковыми последовательностями. При необходимости концентрацию корректировали с помощью устройств Vivaspin (Sartorius). Наконец, очищенные молекулы хранили, например, в фосфатно-солевом буфере в концентрации приблизительно 1 мг/мл при температуре 2-8°C.

Качество очищенных биспецифических антигенсвязывающих белков определяли, например, способом ВЭЖХ-SEC на колонках MabPac SEC-1 (5 мкм, 7,8×300 мм), прогоняя, например, в 50 мМ фосфата натрия, рН 6,8, содержащего 300 мМ NaCl в системе Vanquish UHPLC-System.

Терапевтические способы и применения

Согласно седьмому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку согласно первому аспекту, нуклеиновой кислоте согласно второму аспекту, вектору согласно третьему аспекту, клетке-хозяину согласно четвертому аспекту или фармацевтической композиции согласно пятому аспекту для применения в медицине, в частности, для применения для диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания. Для терапевтического применения (т.е. профилактики и/или лечения) антигенсвязывающий белок предпочтительно содержит первый антигенсвязывающий сайт, связывающийся с антигенным пептидом PRAME в комплексе с МНС (т.е. антигенсвязывающий сайт, образованный V_A и V_B), и второй антигенсвязывающий сайт, связывающийся с антигеном эффекторной клетки (т.е. антигенсвязывающий сайт, образованный V_L и V_H). Авторы настоящего изобретения продемонстрировали *in vitro* в экспериментальном разделе для нескольких биспецифических соединений согласно настоящему изобретению цитотоксическую активность этих конструкций в отношении PRAME-положительных линий раковых клеток, таких как Hs695T и U2OS. Авторы настоящего изобретения, кроме того, продемонстрировали, что указанная цитотоксическая активность является высокоспецифичной и ограничивается PRAME-положительными клетками, поскольку

биспецифические антигенсвязывающие белки индуцируют только маргинальный лизис в клеточных линиях, не презентующих пептид PRAME-004.

Соответственно, антигенсвязывающие белки настоящего изобретения, в частности биспецифические антигенсвязывающие белки, такие как TCER®, можно применять для лечения рака. Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению можно применять в терапевтических целях у людей и/или млекопитающих животных, отличных от человека. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению могут связываться с опухолевыми клетками и уменьшать рост и/или уничтожать опухолевые клетки, презентующие комплекс пептид SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50):MHC на своей клеточной поверхности. Понятно, что антигенсвязывающий белок вводят в концентрации, которая способствует связыванию в физиологических (например, *in vivo*) условиях. Согласно другому варианту осуществления антигенсвязывающие белки можно применять для иммунотерапии, направленной на опухолевые клетки различных тканей, таких как легкие, молочная железа, яичник или почка. Согласно другому варианту осуществления антигенсвязывающие белки сами по себе могут связываться с опухолевыми клетками, уменьшать их рост и/или уничтожать.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики пролиферативного заболевания или нарушения, предусматривающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка, нуклеиновой кислоты или вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, как определено в настоящем документе выше в разделе «Антигенсвязывающий белок», «Нуклеиновые кислоты» или «Фармацевтические композиции».

Согласно конкретному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего пролиферативным заболеванием, предусматривающему введение указанному субъекту Т-клеток, экспрессирующих антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению на поверхности клетки

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа у субъекта, страдающего пролиферативным заболеванием, предусматривающему введение указанному субъекту композиции, содержащей Т-клетки, экспрессирующие антиген-распознающую конструкцию согласно настоящему изобретению на поверхности клетки.

Согласно одному варианту осуществления иммунный ответ, упомянутый в указанном способе, представляет собой цитотоксический ответ Т-клеток.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению или вектор согласно настоящему изобретению, клетка-хозяин согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению предназначены для применения для диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению антигенсвязывающего белка, нуклеиновой кислоты или вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения или профилактики пролиферативного заболевания или нарушения у субъекта.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа у пациента, страдающего раком, который презентует пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50) в комплексе с белком МНС, предусматривающим введение пациенту антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению, где указанный рак выбран из группы раковых заболеваний, состоящей из острого миелолейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, рака желчного пузыря, глиобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, амеланотической меланомы, неходжкинской лимфомы, аденокарциномы немелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного немелкоклеточного рак легкого, рака яичников, рака пищевода, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легкого, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, остеосаркомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректальной карциномы и синовиальной саркомы.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению антигенсвязывающего белка, нуклеиновой кислоты или вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для лечения или профилактики заболевания или нарушения у субъекта.

Термины «субъект» или «индивидуум» используются взаимозаменяемо и могут представлять собой, например, человека или млекопитающее, не являющееся человеком, предпочтительно человека.

В контексте настоящего изобретения термины «лечение» или «терапия» относятся к терапевтическому применению (т.е. у субъекта, страдающего данным заболеванием) и означают обращение вспять, облегчение, ингибирование прогрессирования одного или нескольких симптомов такого нарушения или состояние. Следовательно, лечение

относится не только к лечению, которое приводит к полному излечению заболевания, но также к лечению, которое замедляет прогрессирование заболевания и/или продлевает выживаемость субъекта.

Под «профилактикой» подразумевается профилактическое применение (т.е. у субъекта, имеющего риск развития данного заболевания).

Согласно одному варианту осуществления «заболевание» или «нарушение» представляет собой любое состояние, при котором может быть полезно лечение антигенсвязывающим белком согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту осуществления это включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые предрасполагают субъекта к рассматриваемому нарушению. Термин «нуждающийся в лечении» относится к субъекту, у которого уже имеется нарушение, а также к субъекту, у которого нарушение необходимо предотвратить.

Согласно конкретному варианту осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению являются биспецифическими, более конкретно TCER[®], как описано в настоящем документе.

«Пролиферативные заболевания», такие как рак, включают нерегулируемую и/или неадекватную пролиферацию клеток.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления пролиферативное заболевание представляет собой рак.

Согласно другому варианту осуществления рак представляет собой рак, который характеризуется чрезмерной экспрессией PRAME-антигена, мутантного и/или происходящего из PRAME опухолеассоциированного антигена, ассоциированного с МНС.

Соответственно, особенно предпочтительным раком является PRAME-положительный рак.

В контексте настоящего изобретения рак считается «PRAME-«положительным»», если родственный пептид, такой как, например, пептид PRAME-004, представлен в >98% всех случаев рака согласно рекомендациям NCI. При всех других показаниях, указанных в настоящем документе, можно провести биопсию, как это принято при лечении этих видов рака, и пептид можно идентифицировать с помощью XPresident[®] и родственных способов (согласно WO 03/100432, WO 2005/076009, WO 2011/128448, WO 2016/107740, US 7,811,828, US 9,791,444, и US 2016/0187351, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Согласно одному варианту осуществления рак легко оценить (т.е. диагностировать) например, с использованием антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению. Способы

идентификации рака, экспрессирующего антиген, с использованием антигенсвязывающего белка известны специалистам в данной области. Следует отметить, что термины «рак» и «карцинома» не используются в настоящем документе взаимозаменяемо, поскольку карцинома представляет собой особый тип рака, возникающий в коже или в тканях, которые выстилают или покрывают органы тела.

Согласно одному варианту осуществления рак, который является PRAME-«положительным», т.е. который презентрует целевой пептид, выбран из группы, состоящей из острого миелолейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, рака желчного пузыря, глиобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, амеланотической меланомы, неходжкинской лимфомы, аденокарциномы немелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного немелкоклеточного рак легкого, рака яичников, рака пищевода, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легкого, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, остеосаркомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректальной карциномы и синовиальной саркомы, предпочтительно рак молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких, рака яичников, рака пищевода, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия и синовиальной саркомы.

Согласно одному варианту осуществления рак, который представляет собой рак, который характеризуется чрезмерной экспрессией PRAME-антигена, мутантного и/или происходящего из PRAME опухолеассоциированного антигена, ассоциированного с МНС, легко оценить, например, с использованием антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению. Способы идентификации рака, экспрессирующего антиген, с использованием антигенсвязывающего белка известны специалистам в данной области.

К источникам, раскрывающим рекомендации по терапии рака относится Cancer, Principles and Practice of Oncology, 4th Edition, DeVita *et al*, Eds. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa. (1993). Соответствующий терапевтический подход выбирают в соответствии с конкретным типом рака и другими факторами, такими как общее состояние пациента, что признано в соответствующей области. Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению можно применять сам по себе или можно добавить к схеме терапии с использованием других противоопухолевых агентов при лечении пациента, страдающего раком.

Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок можно вводить одновременно, до или после различных лекарственных средств и способов лечения, широко используемых при лечении рака, таких как, например, химиотерапевтические средства, нехимиотерапевтические средства, противоопухолевые средства и/или облучение.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения пациента, страдающего раком, который презентует пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50) в комплексе с белком МНС, предусматривающим введение пациенту антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению, где указанный рак выбран из группы раковых заболеваний, состоящей из острого миелолейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, рака желчного пузыря, глиобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, амеланотической меланомы, неходжкинской лимфомы, аденокарциномы немелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного немелкоклеточного рак легкого, рака яичников, рака пищевода, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легкого, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, остеосаркомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректальной карциномы и синовиальной саркомы.

контексте настоящего изобретения «диагноз» относится к медицинскому диагнозу и относится к определению того, какое заболевание или состояние объясняет симптомы и признаки у субъекта.

Под «терапевтически эффективным количеством» антигенсвязывающего белка или его фармацевтической композиции понимают достаточное количество антигенсвязывающего белка для лечения указанного пролиферативного заболевания при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому медицинскому лечению. Однако следует понимать, что общее ежедневное использование антигенсвязывающих белков, нуклеиновой кислоты или вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению будет определяться лечащим врачом в пределах здравого медицинского суждения. Конкретный терапевтически эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая заболевание, подлежащее лечению, и тяжесть нарушения, активность используемого специфического антигенсвязывающего белка, конкретная используемая композиция, возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и диета пациента, время введения, путь введения и скорость выведения используемого конкретного полипептида,

продолжительность лечения, лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с используемым конкретным полипептидом, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины. Например, специалистам в данной области хорошо известно, что дозы соединения начинают с уровней, более низких, чем те, которые необходимы для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект.

Согласно одному варианту осуществления эффективность лечения антигенсвязывающим белком согласно настоящему изобретению анализируют *in vivo*, например, на мышинной модели рака и путем измерения, например, изменений объема опухоли между обработанной и контрольной группами.

Фармацевтические композиции, векторы, нуклеиновые кислоты и клетки согласно настоящему изобретению могут быть предоставлены по существу в чистой форме, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% чистоты.

Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению или вектор согласно настоящему изобретению, клетка-хозяин согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению могут быть введены любым возможным способом.

Как раскрыто в настоящем документе, согласно некоторым вариантам осуществления клетки-хозяева, как определено в настоящем документе выше, используют в описанных в настоящем документе медицинских целях или способах лечения. Согласно тому же варианту осуществления клетка-хозяин предпочтительно представляет собой а) лимфоцит, такой как Т-лимфоцит или клетка-предшественник Т-лимфоцита, например, CD4 или CD8-положительная Т-клетка, наиболее предпочтительно Т-клетка.

Соответственно, клетку-хозяин согласно настоящему изобретению, предпочтительно Т-клетки, можно применять в качестве активных ингредиентов терапевтической композиции. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени aberrантно экспрессируют полипептид, содержащий пептид SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50), причем способ предусматривает введение пациенту эффективного количества клеток-хозяев, предпочтительно Т-клеток. В контексте этого способа клетки-хозяева, однажды введенные субъекту, предпочтительно вызывают иммунный ответ.

Согласно одному аспекту иммунный ответ, вызванный TCR, или ответ T-клеток может относиться к пролиферации и активации эффекторных функций, индуцированных пептидом, таким как SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50), *in vitro* или *in vivo*. Например, для цитотоксических T-клеток, рестриктированных MHC класса I, эффекторными функциями могут быть лизис клеток-мишеней, презентующих соответствующий импульсу пептид, соответствующий импульсу пептид-предшественник или естественный пептид, секреция цитокинов, предпочтительно интерферона-гамма, TNF-альфа или IL- 2, индуцированная пептидом, секреция эффекторных молекул, например, гранзимов или перфоринов, индуцированная пептидом, или дегрануляция.

Соответственно, клетка-хозяин, как определено в настоящем документе выше, может происходить от субъекта (аутологичная) или от другого индивидуума: предпочтительно, чтобы указанный другой индивидуум был здоровым.

Под «здоровым» подразумевается, что субъект, как правило, имеет хорошее здоровье, предпочтительно имеет компетентную иммунную систему и более предпочтительно не страдает каким-либо заболеванием, которое можно легко проверить и обнаружить.

Согласно конкретному примеру клетка-хозяин представляет собой T-клетку. Соответственно, в контексте настоящего изобретения, когда T-клетка, как определено в настоящем документе выше, используется в качестве лекарственного средства, обычно T-клетки собирают у субъекта путем афереза. Затем T-клетки подвергают генетической инженерии для экспрессии антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению на поверхности своих клеток, затем генетически сконструированные T-клетки размножают и затем повторно вводят субъекту. В этом примере антигенсвязывающий белок предпочтительно представляет собой TCR.

В другом подходе клетка-хозяин может представлять собой стволовую клетку, такую как мезенхимальная стволовая клетка, и она сконструирована для экспрессии антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению. В этом примере антигенсвязывающий белок представляет собой растворимый белок, такой как антитело, scTCR или диатело, как определено в настоящем документе выше.

Соответственно, клетка-хозяин трансфицирована, инфицирована или трансформирована нуклеиновой кислотой и/или вектором согласно настоящему изобретению, как описано в настоящем документе выше в разделе «нуклеиновые кислоты, векторы и рекомбинантные клетки-хозяева».

Когда клетку-хозяина трансфицируют для экспрессии антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению, предпочтительно, чтобы клетка содержала вектор

экспрессии, способный экспрессировать антигенсвязывающий белок. Клетка-хозяин может тогда называться активированной клеткой-хозяином.

Протоколы так называемой адоптивного переноса Т-клеток хорошо известны в данной области техники. Обзоры можно найти в: Gattioni *et al.* and Morgan *et al.* (Gattioni, L. *et al.*, Nat.Rev.Immunol. 6 (2006): 383-393, Morgan, R. A. *et al.*, Science 314 (2006): 126-129).

Ряд других способов можно использовать для получения Т-клеток *in vitro*. Например, аутологичные лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, можно использовать для получения CTL. Plebanski *et al.* (Plebanski, M. *et al.*, Eur.J Immunol 25 (1995): 1783-1787) использовали аутологичные лимфоциты периферической крови (PLB) при получении Т-клеток. Кроме того, В-клетки можно использовать для производства аутологичных Т-клеток.

Аллогенные клетки также можно использовать для получения Т-клеток, и способ подробно описаны в патенте США 6805861, включенном в настоящий документ посредством ссылки

Клетки-хозяева, экспрессирующие антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, направленный против пептидов SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50), полезны в терапии. Таким образом, согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к активированным клеткам-хозяевам, которые можно получить вышеуказанными способами согласно настоящему изобретению.

Активированные клетки-хозяева, полученные указанным выше способом, могут специфически распознавать клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, содержащий пептид SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50).

Под «аберрантной экспрессией» авторы настоящего изобретения также подразумевают, что полипептид чрезмерно экспрессируется по сравнению с уровнями экспрессии в нормальных (здоровых) тканях, или что ген является молчащим в ткани, из которой возникла опухоль, но в опухоли он экспрессируется. Под «чрезмерной экспрессией» авторы настоящего изобретения подразумевают, что полипептид присутствует на уровне, по меньшей мере в 1,2 раза превышающем уровень, присутствующий в нормальной ткани, предпочтительно по меньшей мере в 2 раза и более предпочтительно по меньшей мере в 5 или 10 раз выше уровня, присутствующего в нормальной ткани.

Согласно одному аспекту клетка-хозяин, в частности Т-клетка, узнает клетку путем взаимодействия через ее антигенсвязывающий белок, в частности ее TCR, с комплексом PRAME-004 (например, связывание). Клетки-хозяева применимы в способе уничтожения

клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени аберрантно экспрессируют полипептид, содержащий пептид SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50), при этом пациенту вводят эффективное количество активированных клеток-хозяев. Т-клетки, которые вводят пациенту, могут быть получены от пациента и активированы, как описано выше (т.е. они являются аутологичными Т-клетками). Альтернативно, Т-клетки принадлежат не пациенту, а другому человеку. Конечно, предпочтительно, если индивидуум является здоровым индивидуумом. Под «здоровым человеком» авторы настоящего изобретения подразумевают, что человек в целом имеет хорошее здоровье, предпочтительно имеет компетентную иммунную систему и более предпочтительно не страдает каким-либо заболеванием, которое можно легко проверить и обнаружить.

In vivo клетками-мишенями для CD8-положительных Т-клеток согласно настоящему изобретению могут быть клетки опухоли (которые иногда экспрессируют МНС класса II) и/или стромальные клетки, окружающие опухоль (опухолевые клетки) (которые иногда также экспрессируют МНС класса II, (Dengjel, J. *et al.*, Clin Cancer Res 12 (2006): 4163-4170).

Диагностическое применение

PRAME экспрессируется на поверхности раковых клеток, экспрессирующих PRAME, как определено в настоящем документе выше. Антиген PRAME представляет собой маркер рака и, следовательно, может быть использован для определения эффективности противораковой терапии или выявления рецидива заболевания.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку согласно первому аспекту, нуклеиновой кислоте согласно второму аспекту, вектору согласно третьему аспекту, клетке-хозяину согласно четвертому аспекту или фармацевтической композиции согласно пятому аспекту для применения в качестве диагностического агента, в частности, для применения в качестве диагностического агента *in vivo*. Согласно предпочтительным вариантам осуществления диагностический агент предназначен для диагностики пролиферативного заболевания. Согласно более предпочтительным вариантам осуществления диагностический агент предназначен для диагностики рака, который презентует пептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 50) в комплексе с белком МНС, предпочтительно, где указанный рак выбран из группы раковых заболеваний, состоящей из острого миелолейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, рака желчного пузыря, глиобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, амеланотической меланомы, неходжкинской лимфомы, аденокарциномы

немелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного немелкоклеточного рак легкого, рака яичников, рака пищевода, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легкого, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, остеосаркомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректальной карциномы и синовиальной саркомы.

Специалисту известно, что для диагностических целей антигенсвязывающий белок содержит V_A и V_B , но предпочтительно не V_L и V_H .

Согласно варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению применяют в качестве компонента анализа в контексте терапии, нацеленной на опухоли, экспрессирующие PRAME, для определения чувствительности пациента к терапевтическому агенту, мониторинга эффективности противораковой терапии или выявления рецидива заболевания после лечения. В частности, антигенсвязывающий белок, содержащий домены V_A , и V_B , как определено в настоящем документе, применяют в качестве компонента диагностического анализа, где биспецифический антигенсвязывающий белок применяют в качестве компонента терапевтического средства.

Таким образом, дополнительным объектом настоящего изобретения является антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению для применения для обнаружения *in vivo* экспрессии PRAME у субъекта или для применения для *ex vivo* или *in vitro* обнаружения экспрессии PRAME в биологическом образце субъекта. Указанное обнаружение может быть предназначено, в частности, для

- a) диагностирования рака у субъекта, или
- b) определение восприимчивости пациента, страдающего раком, к терапевтическому агенту, нацеленному на PRAME, или
- c) мониторинг эффективности противораковой терапии против PRAME или выявление рецидива рака после противораковой терапии против PRAME, в частности, для терапии биспецифическим препаратом согласно настоящему изобретению, путем обнаружения экспрессии поверхностного белка PRAME на опухолевых клетках.

Согласно варианту осуществления антигенсвязывающий белок предназначен для применения *in vitro* или *ex vivo*.

Наборы

Наконец, настоящее изобретение также относится к наборам, содержащим по меньшей мере один антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту осуществления набор содержит

а) по меньшей мере один антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, как определено в настоящем документе выше в разделе «антигенсвязывающие белки»,

б) необязательно упаковочный материал и

с) необязательно этикетку или вкладыш в упаковку, содержащийся в указанном упаковочном материале, указывающие на то, что указанный антигенсвязывающий белок эффективен для лечения рака или для применения для лечения рака.

Согласно родственному варианту осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению содержится в одно- и/или многокамерных предварительно заполненных шприцах (например, жидкостных шприцах и лиошприцах).

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение охватывает наборы для получения единицы введения однократной дозы.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, упомянутый в пункте а) набора согласно настоящему изобретению, представляет собой высушенный антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, содержащийся в первом контейнере. Кроме того, набор дополнительно содержит второй контейнер с водным составом.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления набор содержит

а) первый контейнер, содержащий по меньшей мере один высушенный антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, как определено в настоящем документе выше в разделе «Антигенсвязывающие белки»,

б) второй контейнер, содержащий водный состав,

с) необязательно упаковочный материал и

д) необязательно этикетку или вкладыш в упаковку, содержащийся в указанном упаковочном материале, указывающие на то, что указанный антигенсвязывающий белок эффективен для лечения рака или может применяться для лечения рака.

Водный состав обычно представляет собой водный раствор, содержащий фармацевтически приемлемые носители, как определено в настоящем документе выше в разделе «фармацевтические композиции».

Согласно родственному варианту осуществления «первый контейнер» и «второй» контейнер относятся к камерам многокамерных предварительно заполненных шприцев (например, лиошприцов).

В настоящем документе термин «и/или» представляет собой грамматический союз, который следует интерпретировать как охватывающий возможность возникновения одного или нескольких случаев, которые он соединяет. Например, формулировка «такие белки с нативной последовательностью могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных способов и/или способов синтеза» означает, что белки с нативной последовательностью могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных и способов синтеза или белки с нативной последовательностью могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных способов или белки с нативной последовательностью могут быть получены с использованием способов синтеза.

Кроме того, в настоящем документе термин «содержащий» следует интерпретировать как охватывающий все конкретно упомянутые признаки, а также необязательные, дополнительные, неуказанные. В контексте настоящего изобретения термин «содержащий» также раскрывает вариант осуществления, в котором отсутствуют какие-либо признаки, кроме специально упомянутых признаков (*т.е.* «состоящий из»).

Кроме того, форма единственного числа не исключает множественное число. Сам факт того, что определенные меры упомянуты во взаимно различных зависимых пунктах формулы изобретения, не означает, что комбинация этих мер не может быть использована с пользой.

Настоящее изобретение далее описано более подробно со ссылкой на следующие чертежи и примеры. Все источники и патентные документы, процитированные в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки. Хотя настоящее изобретение было проиллюстрировано и подробно описано в предшествующем описании, примеры следует рассматривать как иллюстративные или примерные, а не ограничительные.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Превращение TCR в стабилизированный scTCR с помощью поверхностного дисплея дрожжей. Молекулы ScTCR, презентированные на поверхности трансформированных *Saccharomyces cerevisiae* EBY100, окрашивали антителом против Мус-FITC для определения уровня экспрессии и меченным PE тетрамером HLA-A*02/PRAME-004 для исследования функционального связывания. Немодифицированный scTCR R11P3D3 (левая панель, SEQ ID NO: 5) сравнивали с R11P1D3_стабилизированным вариантом scTCR, несущим девять стабилизирующих каркасных мутаций и три

одноточечные мутации в CDR (правая панель, SEQ ID NO: 6), который был получен из выбора библиотеки scTCR.

Фиг. 2. Созревание аффинности scTCR CDR1 альфа посредством поверхностного дисплея дрожжей. Стабилизированные scTCR, содержащие немодифицированные и созревшие CDR1 альфа, окрашивали мономером HLA-A*02/PRAME-004 в концентрации 10 нМ. Контрастное окрашивание смесью тетрамеров HLA-A*02/ SimPer, каждый из которых применяется в концентрации 10 нМ, содержащей пептиды (SEQ ID NO: 51-59) с высоким сходством последовательностей с PRAME-004 (SEQ ID NO: 50). Стабилизированный scTCR R11P3D3SD (SEQ ID NO: 6) с немодифицированной последовательностью CDR1 альфа-цепи SSNFYN (SEQ ID NO: 13, нижняя правая панель) сравнивали с вариантами scTCR, содержащими последовательности CDR1 альфа-цепи с созревшей аффинностью VKEFQD, NKEFQD, TREFQD, NREFQD, TSEFQD, TKEFQD, VREFQD, TAEFQD, VSEFQD, VAEFQD, IKEFQN, VREFQN и TAEFQN (SEQ ID NO: 16-28), соответственно. SSNFYN (SEQ ID NO 13) представляет собой соответствующую последовательность CDRa1 стабилизированного scTCR R11P3D3SD.

Фиг. 3. Связывание клонов scTCR дрожжей с высокой аффинностью с подобными пептидами. Дрожжевые клоны, несущие стабилизированные scTCR с созревшими CDR (SEQ ID NO: 79-87 и 89-92), окрашивали 100 нМ мономерами HLA-A*02, содержащими целевой пептид PRAME-004 или один из 7 подобных пептидов (SEQ ID NO: 52 - 56 и 58 - 59).

Фиг. 4. Связывание клонов scTCR дрожжей с высокой аффинностью с подобными пептидами. Дрожжевые клоны, несущие стабилизированные scTCR с созревшими CDR (SEQ ID NO: 79 - 87 и 89 - 92), окрашивали 100 нМ мономерами HLA-A*02, содержащими целевой пептид PRAME-004 или один из 19 подобных пептидов (SEQ ID NO: 51, 57, 60, 62-69 и 71-78). R16P1C10_CDR6_scTCR (SEQ ID NO 357) добавляли в качестве эталона, но только связывание с PRAME-004 и IFT17-003 (SEQ ID NO 60) оценивали для этого клона.

Фиг. 5. Определение мотива связывания с дрожжей scTCR клонами с высокой аффинностью. Дрожжевые клоны, несущие стабилизированные scTCR с созревшими CDR (SEQ ID NO: 79, 80, 82, 83 и 85-87), окрашивали PRAME-004, а также вариантами пептида PRAME-004, содержащими замены аланина (SEQ ID NO: 318-324) в контексте HLA-A*02, при применении в концентрациях 10 нМ, 3 нМ, 1 нМ и 0,3 нМ.

Фиг. 6. Скрининг подобных пептидов для растворимых молекул scTCR-Fab. Связывание с 14 подобными пептидами (SEQ ID NO: 187, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210 и 212) в контексте HLA-A*02 анализировали на концентрацию 1 мкМ

scTCR -Fab с использованием интерферометрии биослоя. Верхняя кривая на каждом графике представляет связывание scTCR-Fab с целевым мономером HLA-A*02/PRAME-004.

Фиг. 7. Цитотоксичность *in vitro* молекул TCER® на мишень-положительных и мишень-отрицательных опухолевых клеточных линиях. РВМС здорового HLA-A*02-положительного донора инкубировали либо с мишень-положительной линией опухолевых клеток Hs695T (●), либо с мишень-отрицательной, но HLA-A*02-положительной линией опухолевых клеток T98G (○), соответственно, при соотношении 1:10 в присутствии возрастающих концентраций TCER®. Цитотоксичность, индуцированную TCER®, определяли количественно через 48 часов совместного культивирования путем измерения высвобожденного LDH. Результаты экспериментов по оценке TPP-93 и TPP-79 показаны на верхней и нижней панели, соответственно.

Фиг. 8. Цитотоксичность *in vitro* молекулы TCER® TPP-105 на мишень-положительных и мишень-отрицательных линиях опухолевых клеток. РВМС здорового HLA-A*02-положительного донора инкубировали либо с мишень-положительной линией опухолевых клеток Hs695T (●), либо с мишень-отрицательной, но HLA-A*02-положительной линией опухолевых клеток T98G (○), соответственно, при соотношении 1:10 при наличии возрастающих концентраций TPP-105. Цитотоксичность, индуцированную TCER®, определяли количественно через 48 часов совместного культивирования путем измерения высвобожденного LDH.

Фиг. 9. Сводные данные о цитотоксичности молекул TCER® слота III. Значения EC₅₀ кривых зависимости ответа от дозы, полученных в анализах высвобождения LDH, рассчитывали с использованием нелинейной аппроксимации 4-точечной кривой. Для каждой оцениваемой молекулы TCER® показаны расчетные значения EC₅₀ на мишень-положительной линии опухолевых клеток Hs695T (●), U2OS (○), и мишень-отрицательной, но HLA-A*02-положительной линии опухолевых клеток T98G (*). Таким образом, каждый символ представляет собой один анализ с использованием РВМС, полученных от различных HLA-A*02-положительных доноров. Для TPP-871/T98G оценивали EC₅₀, так как T98G не распознается TPP-871.

Фиг. 10. Цитотоксичность *in vitro* вариантов TCER® сота III на клетках T2, загруженных различными концентрациями пептида-мишени. Цитотоксичность определяли путем количественного определения LDH, высвободившегося в супернатанты. РВМС человека использовали в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т 5:1. Считывание проводили через 48 часов.

Фиг. 11. Анализ безопасности для клеток нормальной ткани для выбранных вариантов TCER[®] слота III. TCER[®]-опосредованную цитотоксичность против 5 различных типов клеток нормальной ткани, экспрессирующих HLA-A*02, оценивали по сравнению с цитотоксичностью, направленной против PRAME-004-положительных опухолевых клеток Hs695T. PBMC здорового донора HLA-A*02+ совместно культивировали в соотношении 10:1 с нормальными тканевыми клетками или опухолевыми клетками Hs695T (с тремя повторениями) в смеси 1:1 соответствующей среды нормальных тканевых клеток (4, 10a или 13a) и Т-клеточной среды (LDH-AM) или только Т-клеточной среде. Через 48 часов лизис клеток нормальной ткани и клеток Hs695T оценивали путем измерения высвобождения LDH (набор LDH-Glo™, Promega).

Фиг. 12. Анализ безопасности для клеток нормальной ткани для выбранных вариантов TCER[®] слота IV. TCER[®]-опосредованную цитотоксичность против 10 различных типов клеток нормальной ткани, экспрессирующих HLA-A*02, оценивали по сравнению с цитотоксичностью, направленной против PRAME-004-положительных опухолевых клеток Hs695T. PBMC здорового донора HLA-A*02+ совместно культивировали в соотношении 10:1 с нормальными тканевыми клетками или опухолевыми клетками Hs695T (с тремя повторениями) в смеси 1:1 соответствующей среды нормальных тканевых клеток (3, 4, 8a, 10a, 13a или 16a) и Т-клеточной среды (LDH-AM) или только Т-клеточной среде. Через 48 часов лизис клеток нормальной ткани и клеток Hs695T оценивали путем измерения высвобождения LDH (набор LDH-Glo™, Promega).

Фиг. 13. Анализ безопасности для клеток нормальной ткани для выбранных вариантов TCER[®] слота IV. TCER[®]-опосредованную цитотоксичность против 6 различных типов клеток нормальной ткани, экспрессирующих HLA-A*02, оценивали по сравнению с цитотоксичностью, направленной против PRAME-004-положительных опухолевых клеток Hs695T. PBMC здорового донора HLA-A*02+ совместно культивировали в соотношении 10:1 с нормальными тканевыми клетками или опухолевыми клетками Hs695T (с тремя повторениями) в смеси 1:1 соответствующей среды нормальных тканевых клеток (10a, 13a или 16a) и Т-клеточной среды (LDH-AM). Через 48 часов лизис клеток нормальной ткани и клеток Hs695T оценивали путем измерения высвобождения LDH (набор LDH-Glo™, Promega).

Примеры

Пример 1. Одноцепочечный TCR (формат scTCR)

Пример 1.1. Получение стабильного scTCR

Для настоящего изобретения TCR R11P3D3 (SEQ ID NO: 1 и 2, полноразмерные) превращали в одноцепочечную конструкцию TCR (scTCR R11P3D3, SEQ ID NO: 5) с использованием переменных доменов альфа (SEQ ID NO: 3) и бета (SEQ ID NO: 4) и соответствующей последовательности глицин-серинового линкера (SEQ ID NO: 61). Для созревания TCR посредством поверхностного дисплея дрожжей ДНК соответствующей последовательности синтезировали и трансформировали в *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 (MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2-delta200 his3-delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL) (ATCC® MYA-4941™) вместе с дрожжевым вектором дисплея на основе pCT302 (Boder and Wittrup, *Methods Enzymol.* 2000,328:430-44.). Полученный слитый белок после гомологичной рекомбинации в дрожжах (SEQ ID NO: 325) содержит лидерный пептид на N-конце белка Aga2p (SEQ ID NO: 88) (Boder and Wittrup, *Nat Biotechnol.* 1997 Jun,15(6):553-7), представляющий интерес белок, а именно scTCR R11P3D3 (SEQ ID NO: 5) или его варианты и дополнительные пептидные метки (FLAG и Myc (SEQ ID NO: 99 и 288)) для определения уровня экспрессии слитого белка. Библиотеки вариантов scTCR создавали посредством ПЦР с использованием вырожденных праймеров, а трансформацию дрожжевых клеток проводили, как описано в WO 2018/091396, и в результате получали до 10⁹ клонов дрожжей на библиотеку.

Процесс отбора клонов дрожжей, несущих мутантные варианты scTCR с улучшенным связыванием с PRAME-004 в контексте HLA-A*02, по существу проводили, как описано Smith et al. (*Methods Mol Biol.* 2015,1319:95-141). Экспрессию, определенную с помощью окрашивания Myc tag-FITC, и, в частности, функциональное связывание посредством окрашивания тетрамером HLA-A*02/PRAME-004, применяли для отбора наиболее перспективных кандидатов (фиг. 1). Превращение scTCR с помощью поверхностного дисплея дрожжей выявило девять каркасных мутаций в сочетании с тремя одноточечными мутациями CDR, что привело к стабилизации scTCR R11P3D3SD (SEQ ID NO: 6), демонстрирующего улучшенную экспрессию, а также связывание тетрамера HLA-A*02/PRAME-004.

Пример 1.2. Созревание аффинности стабилизированного scTCR, мотив связывания и оценка специфичности

Для создания молекул scTCR с более высокой аффинностью связывания с HLA-A*02/PRAME-004 все CDR созревали индивидуально с использованием ранее

идентифицированного стабилизированного scTCR R11P3D3SD (SEQ ID NO: 6). Остатки CDR рандомизировали с использованием вырожденных ДНК-олигопраймеров, по существу, как описано ранее (Smith et al., Methods Mol Biol. 2015,1319:95-141). Полученные библиотеки ДНК трансформировали, как описано в примере 1.

Для отбора вариантов scTCR R11P3D3SD с повышенной аффинностью и специфичности в каждом раунде отбора использовали уменьшающиеся концентрации тетрамера или мономера HLA-A*02/PRAME-004. После четырех раундов отбора отдельные клоны scTCR выделяли и секвенировали, в результате чего было получено множество CDR-последовательностей с созревшей аффинностью. Как показано на примере scTCR с созревшими последовательностями CDRa1 (SEQ ID NO: 16 - 28, фиг. 2), сильное улучшение связывания мономеров HLA-A*02/PRAME-004 также может быть продемонстрировано для scTCR с созревшими CDRa2 и CDRb2 (SEQ ID NO: 29-32 и 35-45, Таблица 3). Селективность связывания HLA-A*02/PRAME-004 сохранялась во время созревания, что подтверждается низким уровнем связывания scTCR со смесью тетрамеров HLA-A*02, содержащих пептиды (подобные пептиды или SimPeps) с высокой степенью сходства последовательности с пептидом PRAME-004 (SEQ ID NO: 50). Все выбранные варианты созревания scTCR показали значительное окрашивание мономерами HLA-A*02/PRAME-004 в концентрации 10 нМ, тогда как незревший стабилизированный scTCR R11P3D3SD в качестве эталона не показал окрашивания (фиг. 2 и таблица 3). Кроме того, связывание созревшего scTCR со смесью подобных пептидов, нанесенных в формате тетрамеров HLA-A*02 с высокой авидностью в концентрации 10 нМ, не могло быть обнаружено или демонстрировало только низкие сигналы по сравнению со связыванием мономера HLA-A*02/PRAME-004, что подтверждает способность вариантов созревания scTCR связывать пептид-мишень PRAME-004 высокоспецифичным образом.

Таблица 3. Данные по связыванию scTCR, которые несут дрожжи, с мутантными CDR2. Стабилизированный scTCR, содержащий немодифицированные и созревшие CDR2 альфа и CDR2 бета, окрашивали 10 нМ мономера HLA-A*02/PRAME-004 и контрастно окрашивали смесью тетрамеров HLA-A*02, каждый из которых применяли в концентрации 10 нМ, содержащей пептиды (подобные пептиды или SimPeps, SEQ ID NO: 51-59) с высоким сходством последовательности с PRAME-004 (SEQ ID NO: 50). *: соответствующий CDR из R11P3D3SD_scTCR (SEQ ID NO: 6)

CDRa2		Дрожжевые клетки, положительно окрашенные		CDRb2		Дрожжевые клетки, положительно окрашенные	
Последовательность	SEQ ID NO	HLA-A*02/PRAME-004, мономер	HLA-A*02/SimPep, Смесь тетрамеров	Последовательность	SEQ ID NO	HLA-A*02/PRAME-004, мономер	HLA-A*02/SimPep, Смесь тетрамеров
FGPYGKE	32	61,0%	8,1%	YQNTAV	37	66,9%	3,8%
FGPYGRE	30	59,0%	6,6%	YQNTAL	38	51,6%	3,3%
FGPYGTE	31	64,5%	10,9%	FQNTAT	39	57,4%	3,8%
FGPYGVE	29	54,5%	5,7%	MQNSAV	40	69,2%	4,2%
MTSNGDE*	14	3,6%	3,3%	FQNTAL	41	62,0%	5,5%
				MQNTAI	42	60,7%	4,6%
				LQNTAV	43	60,5%	3,3%
				MQNTAV	44	58,0%	4,4%
				YQNTAI	35	51,7%	2,9%
				FQNTAV	36	66,9%	3,3%
				FNNNEP*	15	1,9%	2,5%

Для дальнейшего повышения аффинности клонов scTCR созревшие CDR, идентифицированные в описанных выше библиотеках CDR, систематически объединяли в одну библиотеку ДНК и трансформировали в *Saccharomyces cerevisiae* EBY100, как описано в примере 1.1. Эта библиотека была выбрана с использованием мономера HLA-A*02/PRAME-004, и scTCR из отдельных клонов дрожжей секвенировали и анализировали на предмет их связывания с мономерами HLA-A*02, содержащими либо пептид-мишень PRAME-004, либо один пептид, полученный из группы из 26 пептидов (подобных пептидов), имеющих сходство последовательностей с PRAME-004 (SEQ ID NO: 51-60, 62-

69 и 71-78). Все выбранные варианты scTCR с высокой аффинностью (SEQ ID NO: 79 - 87 и 89 - 92) прочно связывались с мономером HLA-A*02/PRAME-004 со значениями EC₅₀ связывания в низком наномолярном или субнаномолярном диапазоне (Таблица 4), как вычислено путем аппроксимации нелинейной 4-точечной кривой. За исключением SMARCD1-001 (SEQ ID NO: 76), который провоцировал сигнал связывания, немного превышающий фоновый уровень (фиг. 4), ни один из вариантов scTCR (SEQ ID NO: 79-87 и 89-92) не демонстрировал связывания выше фонового уровня с любым из подобных пептидов (SEQ ID NO: 51-60, 62-69 и 71-78) в контексте мономеров HLA-A*02, нанесенных в концентрации 100 нМ (фиг. 3, фиг. 4, таблица 4). Представленные данные подтверждают высокую специфичность связывания вариантов scTCR с комбинированными мутациями CDR, свойства связывания которых превосходили эталонный scTCR (R16P1C10_CDR6_scTCR, SEQ ID NO 357), который показал сильное связывание с IFT17-003 (SEQ ID NO 60) на уровне неотличимом от связывания с PRAME-004 (фиг. 4).

Набор выбранных scTCR с высокой аффинностью, полученных из поверхностного дисплея дрожжей, дополнительно исследовали на предмет их функционального эпитопа на пептиде-мишени в контексте презентации HLA-A*02, называемого мотивом связывания. Эту проблему решали путем одиночных замен аланина в положениях 1, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 пептида-мишени PRAME-004 (SEQ ID NO: 318 - 324) и оценки связывания дрожжевых клеток, несущих scTCR, с соответствующими вариантами пептида PRAME-004 в контексте HLA-A*02. Четыре концентрации (10 нМ, 3 нМ, 1 нМ, 0,3 нМ) мономеров HLA-A*02 с PRAME-004 или соответствующими аланинзамещенными пептидами использовали для окрашивания дрожжевых клеток, несущих scTCR с высокой аффинностью, и выявили широкий мотив связывания для всех вариантов scTCR с сильным распознаванием положений 3, 5 и 7, что подтверждается отсутствием сигналов окрашивания при всех протестированных концентрациях мономера. Для положений 6 и 8 пептида PRAME-004 можно предположить вклад в мотив связывания, поскольку замены аланина в этих положениях значительно снижают сигналы окрашивания, даже если это наблюдалось с меньшей строгостью, чем для положений 3, 5 и 7. Для положений 1 и 4 пептида PRAME-004 можно было определить лишь незначительный вклад или вообще отсутствие вклада в мотив связывания, поскольку замены аланина приводили к интенсивности окрашивания, почти сравнимой с интенсивностью, наблюдаемой для пептида-мишени PRAME-004 (фиг. 5 и Таблица 4).

Для дальнейшего анализа пять клонов scTCR R11P3D3SDA7_A02_scTCR (SEQ ID NO: 79), R11P3D3SDA7_A09_scTCR (SEQ ID NO: 82), R11P3D3SDA7_A10_scTCR (SEQ ID NO: 83), R11P3D3SDA7_B03_scTCR (SEQ ID NO: 85) и R11P3D3SDA7_B06_scTCR (SEQ

ID NO: 87) превращали в биспецифический формат scTCR-Fab для определения дальнейших свойств белка (см. следующий пример).

Таблица 4. Данные по связыванию scTCR, который несут дрожжи, и растворимых молекул scTCR-Fab и соответствующих последовательностей вариабельной цепи. Для дрожжевых клеток, несущих scTCR, связывание с мономерами HLA-A*02/PRAME-004 представлено как значения EC₅₀, и связывание с 26 подобными пептидами (SEQ ID NO: 51–60, 62–69 и 71–79) в контексте 100 нМ мономера HLA-A*02 представлено как количество пептидов, не обнаруживающих связывания. Положения связывающих мотивов, составляющих функциональный эпитоп PRAME-004, определяли с помощью аланинового сканирования, и указаны положения с сильным и средним (положения в скобках) влиянием на связывание scTCR. Пять растворимых молекул scTCR-Fab (TPP-70 - TPP-74) оценивали на аффинность связывания (K_D) с мономером HLA-A*02/PRAME-004 и на связывание с набором из 14 подобных пептидов (см. пример 2). n.d.: не определено

Название молекулы	ID NO последовательности	Мутации FRa (по сравнению с родительским TCR)	CDRa1	CDRa2	CDRa3	Мутации FRb (по сравнению с родительским TCR)	CDRb1	CDRb2	CDRb3	scTCR на дрожжевых клетках			растворимые scTCR-Fab	
										EC50 Для связывания HLA-A*02/PRAME-004 [нМ]	Подобные пептиды без связывания	Положение мотива связывания	K _D для связывания HLA-A*02/PRAME-004 (нМ)	Подобные пептиды без связывания
R11P3D3S D_стабилизированный scTCR	6	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	SSNF YN	MTSNG DE	ALYNNN DMR	L11E, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	FNNN EP	ASSPGSTD TQY	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

R11P3D3S DA7_A02_ scTCR TPP-70	79, и 93 и 94	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	TREF QD	FGPYG VE	ALYNNN DMR	L11E, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	FQNT AV	ASSPGSTD TQY	0,53	25/26	3,5,7 (6,8)	11,7	14/14
R11P3D3S DA7_A05_ scTCR	80	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	TKEF QD	FGPYG VE	ALYNNN DMR	L11E, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	FQNT AV	ASSPGATD TQY	0,28	25/26	3,5,7 (6,8)	n.d.	n.d.
R11P3D3S DA7_A06_ scTCR	81	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	TREF QD	FGPYG KE	ALYNNN DMR	L11E, R22H, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	FQNT AV	ASSPGSTD TQY	0,33	25/26	n.d.	n.d.	n.d.
R11P3D3S DA7_A09_ scTCR TPP-71	82, и 93 и 95	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	TKEF QD	FGPYG RE	ALYNNN DMR	L11E, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	FQNT AV	ASSPGATD TQY	0,29	25/26	3,5,7 (6,8)	11,1	14/14
R11P3D3S DA7_A10_ scTCR TPP-72	83, и 93 и 96	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	SSNF YN	FGPYG VE	ALYNNN DMR	L11E, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	FNSE TV	ASSPGATD TQY	0,4	25/26	3,5,7 (6,8)	4,38	14/14

R11P3D3S DA7_B01_ scTCR	84	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	NKEF QD	FGPYG VE	ALYNNN DMR	L11E, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	YQN TAV	ASSPGATD TQY	0,24	25/26	n.d.	n.d.	n.d.
R11P3D3S DA7_B03_ scTCR TPP-73	85, и 93 и 97	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	NKEF QD	FGPYG TE	ALYNNN DMR	L11E, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	FQNT AV	ASSPGSTD TQY	0,31	25/26	3,5,7 (6,8)	12,5	14/14
R11P3D3S DA7_B04_ scTCR	86	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	SSNF YN	FGPYG KE	ALYNNN DMR	L11E, R22H, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	YQN TAI	ASSPGSTD TQY	2,26	25/26	3,5,7 (6,8)	n.d.	n.d.
R11P3D3S DA7_B06_ scTCR TPP-74	87, и 93 и 98	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	VKEF QD	FGPYG KE	ALYNNN DMR	L11E, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	FQNT AV	ASSPGATD TQY	0,81	25/26	3,5,7 (6,8)	6,41	14/14
R11P3D3S DA7_F11_s cTCR	89	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	VKEF QD	FGPYG KE	ALYNNN DMR	H10N, R22H, L11E, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	FNSE TV	ASSPGSTD TQY	1,42	25/26	n.d.	n.d.	n.d.

R11P3D3S DA7_G11_ scTCR	90	W44K, A47D, A52F, V55Y, K92T, G93D	NKEF QD	FGPYG RE	ALYNNN DMR	L11E, R43K, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	YQN TAV	ASSPGATD TQY	0,65	25/26	n.d.	n.d.	n.d.
R11P3D3S DA7_H08_ scTCR	91	W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	TREF QD	FGPYG TE	ALYNNN DMR	L11E, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	YQN TAV	ASSSGATD TQY	0,67	25/26	n.d.	n.d.	n.d.
R11P3D3S DA7_H09_ scTCR	92	L39M, W44K, A52F, V55Y, K92T, G93D	TKEF QD	FGPYG VE	ALYNNN DMR	L11E, Q44E, M46P, R48Q	SGH NS	FQNT AV	ASSPGSTD TQY	0,91	25/26	n.d.	n.d.	n.d.

Пример 2. Получение и определение характеристик растворимых молекул scTCR-Fab

TCR, состоящие из доменов V α и V β , конструировали, получали и протестировали в одноцепочечном формате (scTCR), связанном с Fab-фрагментом гуманизированного UCNT1-антитела (Таблица 5 и Таблица 18). Векторы для экспрессии рекомбинантных белков сконструировали как моноцистронные, контролируемые промоторными элементами HCMV, pUC19-производными. Плазмидную ДНК амплифицировали в *E.coli* стандартными методами культивирования и затем очищали с использованием имеющихся в продаже наборов (Macherey & Nagel). Очищенную плазмидную ДНК использовали для временной трансфекции клеток CHO. Трансфицированные CHO-клетки культивировали в течение 10-11 дней при температуре от 32°C до 37°C.

Кондиционированный клеточный супернатант очищали фильтрацией (0,22 мкм) с использованием Sartoclear Dynamics® Lab Filter Aid (Sartorius). Биспецифические молекулы очищали с использованием системы Äkta Pure 25 L FPLC (GE Lifesciences), оборудованной для проведения поточной аффинной и эксклюзионной хроматографии. Аффинную хроматографию проводили на колонках с белком L (GE Lifesciences) в соответствии со стандартными протоколами аффинной хроматографии. Эксклюзионную хроматографию проводили непосредственно после элюирования (pH 2,8) из аффинной колонки для получения мономерного белка высокой чистоты с использованием колонок Superdex 200 pg 16/600 (GE Lifesciences) в соответствии со стандартными протоколами. Концентрации белка определяли с помощью системы NanoDrop (Thermo Scientific) с использованием расчетных коэффициентов экстинкции в соответствии с предсказанными белковыми последовательностями. При необходимости концентрацию корректировали с помощью устройств Vivaspin (Sartorius). Наконец, очищенные молекулы хранили в фосфатно-солевом буфере в концентрации приблизительно 1 мг/мл при температуре 2–8°C. Выход конечного продукта рассчитывали после завершения очистки и получения состава.

Качество очищенных биспецифических молекул определяли методом ВЭЖХ-SEC на колонках MabPac SEC-1 (5 мкм, 4×300 мм), работающих в 50 мМ фосфате натрия, pH 6,8, содержащем 300 мМ NaCl, в системе Vanquish uHPLC.

Тестирование стабильности при стрессе проводили путем инкубации молекул, составленных в PBS, в течение двух недель при 40°C. Целостность, содержание агрегатов, а также извлечение мономеров анализировали с помощью анализа ВЭЖХ-SEC, как описано выше.

Таблица 5. Сводные данные по продуктивности и стабильности при стрессе, полученные для молекул scTCR-Fab

Вариант scTCR-Fab	Выход конечного продукта (мг/л)	Содержание мономеров после получения (%)	Содержание мономеров через 14 дней при 40°C (%)
TRP-70	14,3	97,12	87,82
TRP-71	10,0	85,87	64,15
TRP-72	51,4	98,21	48,41
TRP-73	59,4	98,33	92,76
TRP-74	78,0	98,69	95,62

Молекулы scTCR-Fab TRP-70 – TRP-74 анализировали на предмет их аффинности связывания с мономерами HLA-A*02, содержащими пептид-мишень PRAME-004, с помощью интерферометрии биослоя. Измерения проводили на системе Octet RED384 с использованием параметров, рекомендованных производителем. Анализы проводили при смещении датчика 3 мм и скорости сбора данных 5 Гц. Кинетику связывания измеряли при 30°C и скорости встряхивания 1000 оборотов в минуту, используя PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA в качестве буфера. Меченные His мономеры HLA-A*02/PRAME-004 загружали на биосенсоры HIS1K перед анализом серийных разведений молекул scTCR-Fab. Оценку данных проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis HT. Сильную аффинность связывания определяли для молекул scTC-Fab со значениями K_D в диапазоне от 4 нМ до 12 нМ (таблица 4). Кроме того, варианты scTCR-Fab исследовали на связывание с 14 подобными пептидами (SEQ ID NO: 187, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210 и 212). Скрининг с использованием подобных пептидов осуществляли с помощью интерферометрии биослоя, по существу, как описано выше, анализируя высокую концентрацию молекул scTCR-Fab 1 мкМ, чтобы обеспечить обнаружение слабых сигналов связывания. Ни один из созревших вариантов scTCR не продемонстрировал связывания ни с одним из протестированных подобных пептидов (фиг. 6). scTCR из TRP-74 использовали для создания биспецифических молекул альтернативных форматов, таких как формат TCER®.

Пример 3. Формат рецептора взаимодействия с Т-клетками (TCER[®])

Пример 3.1. Получение и определение характеристик растворимого scTCR в биспецифическом формате TCER[®]

Для конструирования молекул TCER[®] последовательности ДНК, кодирующие VH и VL, полученные либо из hUCHT1(Var17), нового гуманизированного варианта анти-CD3 антитела UCHT1, либо из BMA031(V36), гуманизированного антитела, связывающегося с комплексом TCR/CD3, либо анти-CD3-антитела ID4, а также последовательности, кодирующие Valpha и Vbeta, и соответствующие линкеры, получали путем генного синтеза. Полученные последовательности ДНК клонировали в рамке экспрессии в векторы экспрессии, кодирующие шарнирную область, домены CH2 и CH3, происходящие из человеческого IgG1 [номер доступа: P01857]. Домены CH2 и CH3 сконструировали таким образом, чтобы они содержали различные мутации (включая мутацию N297Q) для устранения связывания с гамма-рецепторами Fc и комплементом, а также для включения структуры «выступ во впадину» в домены CH3 с дополнительной стабилизацией межцепочечных дисульфидных связей. Получение, очистку и определение характеристик молекул TCER[®] (Таблица 6, Таблица 18) осуществляли, как описано в примере 2.

Таблица 6. Сводные данные по продуктивности и стабильности при стрессе, полученные для молекул TCER[®]

Вариант TCER [®]	Va, Vb (SEQ ID NO)	Рекуртер	Выход конечного продукта (мг/л)	Мономер (%)	Мономер (%) через 14 дней при 40°C
TRP-93	129, 130	UCHT1-V17	18,8	94,49	n/a
TRP-79	129, 130	BMA031(V36)	66,2	99,47	n/a
TRP-105	129, 130	ID4	54,2	98,50	97,91

Функциональность молекул TCER[®] в отношении уничтожения HLA-A*02-положительной линии опухолевых клеток, презентирющей пептид-мишень PRAME-004 на своей клеточной поверхности (например, Hs695T), оценивали с помощью анализов высвобождения LDH. Кроме того, оценивали HLA-A*02-положительную, но PRAME-004-отрицательную линию опухолевых клеток (например, T98G) для определения характеристик неспецифической или нецелевой активности вариантов TCER[®]. Линии опухолевых клеток совместно инкубировали с PBMC от здорового HLA-A*02-положительного донора в соотношении 1:10 в присутствии возрастающих концентраций

TCER[®]. Цитотоксичность, индуцированную TCER[®], определяли количественно через 48 часов совместного культивирования путем измерения высвобожденного LDH. Значения EC₅₀ кривых зависимости ответа от дозы рассчитывали с использованием нелинейной аппроксимации 4-точечной кривой. Результаты, репрезентативные для 3 молекул TCER[®] (таблица 6, таблица 18), показаны на фиг. 7 и 8. Результаты показывают, что все 3 молекулы TCER[®], использующие разные домены рекрутирующих антител, функциональны и индуцируют опосредованную Т-клетками цитотоксичность строго зависимым от PRAME-004 образом.

Пример 3.2. Слот I

Молекулы TCER[®] конструировали с использованием доменов VH и VL, происходящих из hUCHT1(Var17) или BMA031(V36), а также Valpha, и Vbeta, как описано выше (пример 3.1). Получение, очистку и определение характеристик молекул TCER[®] (Таблица 7, Таблица 18) осуществляли, как описано в примере 2..

Таблица 7. Сводные данные по продуктивности и стабильности при стрессе, полученные для молекул TCER[®] слота I

TCER[®] вариант	Рекрутер	Выход конечного продукта (мг/л)	Мономер (%)	Мономер (%) через 14 дней при 40°C
TRP-106	UCHT1-V17	2,92	96,97	94,11
TRP-108	UCHT1-V17	4,30	95,44	94,10
TRP-109	BMA031(V36)	34,00	97,8	93,82
TRP-110	BMA031(V36)	50,00	97,12	92,70
TRP-111	BMA031(V36)	61,30	98,04	94,46
TRP-112	UCHT1-V17	2,47	96,75	92,71
TRP-113	UCHT1-V17	2,24	97,79	95,95
TRP-114	UCHT1-V17	2,64	97,68	95,37
TRP-115	UCHT1-V17	1,80	97,84	94,15
TRP-116	UCHT1-V17	3,26	97,54	94,13
TRP-117	UCHT1-V17	3,02	97,29	94,33
TRP-118	UCHT1-V17	2,13	98,09	95,11
TRP-119	UCHT1-V17	3,04	97,56	95,18

TPP-120	UCHT1-V17	2,58	97,57	94,52
TPP-121	UCHT1-V17	2,74	97,92	92,80
TPP-122	UCHT1-V17	3,22	96,9	92,77
TPP-123	UCHT1-V17	2,48	97,16	92,62
TPP-124	UCHT1-V17	2,68	96,38	90,73
TPP-125	UCHT1-V17	2,48	96,56	92,33
TPP-126	UCHT1-V17	1,76	96,71	90,62
TPP-127	UCHT1-V17	2,68	96,37	90,95
TPP-128	UCHT1-V17	1,81	97,25	90,44
TPP-129	UCHT1-V17	1,47	96,94	89,55

Варианты TCER[®] слота I TPP-106, TPP-108 – TPP-129 анализировали на предмет их аффинности связывания с комплексом целевой пептид-HLA (HLA-A*02/PRAME-004) посредством интерферометрии биослоя. Измерения проводили на системе Octet RED384, как описано выше. Сильную аффинность связывания определяли при значениях K_D в диапазоне от 3 нМ до 10 нМ (Таблица 8). Эти данные показывают дополнительные эффекты улучшения аффинности мутаций TCR bA84D и aN114Y, в то время как мутации bT115L/K, bL11E, bP46M, bQ48R, aN20K, по-видимому, не влияют на аффинность связывания. Кроме того, определяли аффинность связывания для трех выбранных подобных пептидов, служащих потенциальными нецелевыми пептидами в контексте HLA-A*02, и вычисляли окна K_D 26-168-кратном диапазоне. Окна K_D более чем 25-кратные уже обеспечивают хорошие терапевтические окна.

Таблица 8. Значения K_D для связывания вариантов TCER[®] слота I с HLA-A*02/PRAME-004 и окна K_D для трех выбранных подобных пептидов, служащих потенциальными нецелевыми пептидами, измеренные с помощью интерферометрии биослоя.

TCER[®] вариант	Рекрутер	PRAME- 004 K_D (M)	K_D(GIMAP8- 001)/ K_D(PRAME- 004)	K_D(SMARCD1- 001)/ K_D(PRAME- 004)	K_D(MYO1B- 002)/ K_D(PRAME- 004)
TPP-108	UCHT1- V17	1,03E-08	168	нет связывания	нет связывания

TPP-112	UCHT1-V17	4,68E-09	39	380	нет связывания
TPP-106	UCHT1-V17	4,08E-09	42	272	нет связывания
TPP-110	BMA031(V36)	1,33E-08	He анализировали	He анализировали	He анализировали
TPP-111	BMA031(V36)	4,98E-09	He анализировали	He анализировали	He анализировали
TPP-109	BMA031(V36)	4,45E-09	He анализировали	He анализировали	He анализировали
TPP-113	UCHT1-V17	5,24E-09	33	322	нет связывания
TPP-114	UCHT1-V17	5,68E-09	37	225	нет связывания
TPP-115	UCHT1-V17	5,06E-09	38	221	нет связывания
TPP-116	UCHT1-V17	5,18E-09	31	205	нет связывания
TPP-117	UCHT1-V17	3,42E-09	34	41	нет связывания
TPP-118	UCHT1-V17	3,29E-09	49	51	нет связывания
TPP-119	UCHT1-V17	4,57E-09	30	213	нет связывания
TPP-120	UCHT1-V17	5,49E-09	28	324	нет связывания
TPP-121	UCHT1-V17	5,41E-09	26	98	нет связывания
TPP-122	UCHT1-V17	4,43E-09	31	174	нет связывания
TPP-123	UCHT1-V17	3,63E-09	28	33	нет связывания
TPP-124	UCHT1-V17	3,43E-09	30	32	нет связывания

TRP-125	UCHT1-V17	5,98E-09	18	248	нет связывания
TRP-126	UCHT1-V17	5,37E-09	41	221	нет связывания
TRP-127	UCHT1-V17	5,24E-09	34	195	нет связывания
TRP-128	UCHT1-V17	3,75E-09	40	52	нет связывания
TRP-129	UCHT1-V17	3,05E-09	40	47	нет связывания

Пример 3.3. Слот II

Далее молекулы TCER[®] конструировали с использованием доменов VH и VL, происходящих из BMA031(V36) или ID4, а также Valpha и Vbeta, как описано выше (пример 3.1). Получение, очистку и определение характеристик соответствующих молекул TCER[®] (Таблица 9, Таблица 18) осуществляли, как описано в примере 2, при этом все молекулы на основе ID4 очищали с использованием колонок MAbSelect SuRE (GE Lifesciences).

Таблица 9. Сводные данные по продуктивности и стабильности при стрессе, полученные для молекул TCER[®] слота II.

Белок	Рекрутер	Выход конечного продукта (мг/л)	Мономер (%)	Мономер (%) через 14 дней при 40°C
TRP-207	BMA031(V36)	31,8	98,92	95,22
TRP-208	BMA031(V36)	n/a	96,96	92,61
TRP-209	BMA031(V36)	32,2	98,87	94,79
TRP-210	BMA031(V36)	19,6	98,15	92,35
TRP-211	BMA031(V36)	44,8	98,60	96,35
TRP-212	BMA031(V36)	34,4	97,66	98,53
TRP-213	BMA031(V36)	53,2	98,12	92,45
TRP-214	BMA031(V36)	45,2	98,26	92,08
TRP-215	BMA031(V36)	33,8	99,21	95,15
TRP-216	BMA031(V36)	4,5	96,53	85,24

TPP-217	BMA031(V36)	26,0	98,16	93,87
TPP-218	BMA031(V36)	19,8	98,24	94,49
TPP-219	ID4	>22,8	71,07	36,49
TPP-220	ID4	21,8	98,36	94,94
TPP-221	ID4	49,2	97,80	96,51
TPP-222	ID4	45,4	98,23	95,79
TPP-227	ID4	48,2	97,60	93,67
TPP-228	ID4	12,1	97,55	94,30
TPP-229	ID4	45,6	97,22	96,99
TPP-230	ID4	47,4	97,29	97,07

Варианты TCER[®] слота II TPP-207 – TPP-222 и TPP-227 – TPP-230 анализировали на предмет их аффинности связывания с комплексом целевой пептид-HLA (HLA-A*02/PRAME-004) посредством интерферометрии биослоя. Измерения проводили на системе Octet RED384, как описано выше. Сильную аффинность связывания определяли при значениях K_D в диапазоне от 1 нМ до 7 нМ (Таблица 10). Более высокую аффинность связывания наблюдали для идентичных вариантов TCR (т.е. идентичных V_A и V_B) в комбинации с рекрутером ID4 по сравнению с комбинацией с рекрутером BMA031(V36) (TPP-219 – TPP-222 по сравнению с TPP-211 – TPP-214). Как наблюдали для молекул TCER[®] слота I (пример 3.2), эффекты улучшения аффинности мутаций TCR bA84D и aN114Y могут быть подтверждены для вариантов TCER[®], полученных в слоте II, тогда как снова не было обнаружено никакого влияния на аффинность для мутаций bT115L/K, bP46M, bQ48R, AN20K.

Мотивы связывания TCR оценивали для выбранных молекул TCER[®]. Для определения мотивов связывания измеряли аффинность связывания в отношении комплекса целевой пептид-HLA (HLA-A*02/PRAME-004), а также в отношении комплексов с вариантами PRAME-004, несущими замены аланина в положениях пептида 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. Измерения аффинности выполняли в системе Octet RED384 или HTX, как описано выше. Положения PRAME-004 считали частью мотива связывания TCR, если для вариантов аланинзамещенного пептида обнаруживали по меньшей мере двукратное снижение аффинности связывания или сигнала (измеренного для самой высокой анализируемой концентрации). Все варианты TCER[®] продемонстрировали широкие мотивы связывания, распознающие по меньшей мере четыре положения пептида PRAME-004 (Таблица 10).

TPP-221	ID4	2,28E-09	2,61E-09	-x3-5678x	1,1	11,0	1,2	100,0	4,1	24,2	3,2
TPP-222	ID4	1,47E-09	1,30E-09	-x3-5678x	1,4	2,9	1,2	100,0	2,2	5,5	2,1
TPP-227	ID4	6,89E-09									
TPP-228	ID4	3,46E-09									
TPP-229	ID4	6,48E-09									
TPP-230	ID4	2,93E-09	2,63E-09	-x3-5678x	1,3	13,0	1,9	100,0	3,9	26,7	3,3

Пример 3.4. Слот Па

На основе данных, полученных для предыдущих вариантов TCER[®] (пример 3.3), были созданы новые варианты, несущие систематические замены выбранных положений аминокислот TCR, для которых положительный эффект на свойства белка или свойства связывания можно было обнаружить в предыдущих экспериментах. Получение, очистку и определение характеристик соответствующих молекул TCER[®] (Таблица 11 и Таблица 18) осуществляли, как описано в примере 3.3. Данные по продуктивности и стабильности при стрессе приведены в таблице 11.

Таблица 11. Сводные данные по продуктивности и стабильности при стрессе, полученные для молекул TCER[®] слота Па.

TCER [®] вариант	Рекрутер	Выход конечного продукта (мг/л)	Мономер (%)	Мономер (%) через 14 дней при 40°C
TPP-235	BMA031(V36)	40,4	98,12	96,16
TPP-236	BMA031(V36)	48,5	98,34	98,08
TPP-237	BMA031(V36)	55,0	97,98	98,21
TPP-238	BMA031(V36)	37,8	98,21	98,15
TPP-239	BMA031(V36)	27,4	98,19	97,22
TPP-240	BMA031(V36)	44,2	98,68	95,72
TPP-241	BMA031(V36)	42,8	98,45	98,02
TPP-242	BMA031(V36)	23,6	98,82	98,54
TPP-243	BMA031(V36)	44,8	98,81	98,10
TPP-244	BMA031(V36)	22,6	98,21	98,27
TPP-245	BMA031(V36)	59,2	98,81	98,32
TPP-246	BMA031(V36)	4,7	92,20	79,35
TPP-247	BMA031(V36)	2,7	93,80	82,82

TPP-248	BMA031(V36)	2,4	92,07	80,49
TPP-249	BMA031(V36)	3,0	92,38	81,45
TPP-250	BMA031(V36)	3,8	93,10	79,11
TPP-252	BMA031(V36)	5,6	93,86	80,14
TPP-253	BMA031(V36)	3,7	94,86	86,09
TPP-254	BMA031(V36)	3,0	94,66	81,85
TPP-255	BMA031(V36)	12,0	92,40	82,01
TPP-256	BMA031(V36)	12,5	97,34	92,67
TPP-257	BMA031(V36)	8,2	95,27	85,31
TPP-258	BMA031(V36)	5,1	96,50	84,32
TPP-259	BMA031(V36)	2,4	97,31	88,55
TPP-260	BMA031(V36)	2,6	96,69	86,45
TPP-261	BMA031(V36)	7,9	97,37	91,72
TPP-262	BMA031(V36)	6,6	96,71	91,53
TPP-263	BMA031(V36)	3,6	93,72	86,61
TPP-264	BMA031(V36)	3,3	93,25	82,35
TPP-265	BMA031(V36)	9,9	91,87	83,48
TPP-266	BMA031(V36)	8,6	95,67	90,72
TPP-267	BMA031(V36)	6,0	94,51	85,97
TPP-268	BMA031(V36)	0,9	93,64	87,21
TPP-269	BMA031(V36)	0	n/a	n/a
TPP-270	BMA031(V36)	1,7	97,30	91,83
TPP-271	BMA031(V36)	2,2	95,13	87,69
TPP-272	BMA031(V36)	2,9	95,16	87,63
TPP-220	ID4	5,9	97,36	94,81
TPP-273	ID4	5,2	97,77	92,43
TPP-274	ID4	2,6	97,11	95,06
TPP-275	ID4	2,2	96,47	94,08
TPP-276	ID4	1,8	97,02	95,39
TPP-277	ID4	2,7	96,84	94,89
TPP-279	ID4	5,4	98,03	95,9

Варианты TCER[®] слота Па TPP-235 – -250, -252 – -268, -270 – -277, -279 анализировали на их аффинность связывания с комплексом целевой пептид-HLA (HLA-

A*02/PRAME-004) с помощью интерферометрии биослоя. Измерения проводили на системе Octet RED384 или HTX, как описано выше. Сильная аффинность связывания была обнаружена при значениях K_D в интервале от 2 нМ до 15 нМ (Таблица 12). Аминокислотные замены в положении bA84 показали, что bA84D является наиболее предпочтительной заменой. В положении aN114 были обнаружены альтернативные аминокислотные замены с аффинностью, сравнимой с aN114Y, такие как A, H, I и L. Были идентифицированы альтернативы bT115K/L со сравнимой аффинностью, включая R, A, I и V. Введение мутации bA110S немного снизило аффинности соответствующих вариантов.

Мотивы связывания оценивали для выбранных вариантов TCER[®]. Для определения мотивов связывания измеряли аффинность к комплексу целевой пептид-HLA (HLA-A*02/PRAME-004), а также к комплексам с вариантами PRAME-004, несущими аланиновые замены в положениях пептида 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, как описано выше. Положения PRAME-004 считали частью мотива связывания TCR, если для вариантов аланинамещенного пептида обнаруживали по меньшей мере двукратное снижение аффинности связывания или сигнала (измеренного для самой высокой анализируемой концентрации). Все протестированные варианты TCER[®] продемонстрировали широкие мотивы связывания, распознающие по меньшей мере три положения пептида (Таблица 12).

Помимо мотивов связывания, специфичность связывания выбранных вариантов TCER[®] слота II и IIa дополнительно анализировали с помощью интерферометрии биослоя на предмет связывания с набором из 16 подобных пептидов, потенциально служащих в качестве нецелевых пептидов. Измерения проводились на системе Octet HTX, как описано выше. Для анализа комплексы пептид-HLA, содержащие целевой пептид PRAME-004, отдельные пептиды из набора подобных пептидов или контрольный пептид загружали на биосенсоры HIS1K и связывание вариантов TCER[®] анализировали при высокой концентрации TCER[®] 1 мкМ. Сигнал ответа в конце 5-минутной фазы ассоциации использовали для вычисления относительного сигнала связывания подобных пептидов по сравнению с целевым пептидом PRAME-004 для выбранных вариантов TCER[®] (Таблица 13). В этих условиях даже события связывания с очень низкой аффинностью, которые можно охарактеризовать как незначительные (например, связывание с K_D , увеличенной в ≥ 25 , ≥ 30 , ≥ 40 , ≥ 50 , ≥ 75 или ≥ 100 по сравнению с K_D для связывания с комплексом пептид PRAME-004 :MHC). Среди 16 проанализированных подобных пептидов 11 пептидов не показали никакого связывания ни с одним из выбранных вариантов TCER[®]. Связывание с более низкими сигналами по сравнению с PRAME-004 было обнаружено для пяти из 16 подобных пептидов, и четыре из этих пептидов были проанализированы более подробно

TPP-255	BMA031(V36)	6,13E-09										
TPP-256	BMA031(V36)	3,12E-09	4,08E-09	-x3-5-7-x	1,0	2,9	0,9	100,0	1,8	6,4	1,8	
TPP-257	BMA031(V36)	3,52E-09										
TPP-258	BMA031(V36)	4,79E-09										
TPP-259	BMA031(V36)	4,80E-09										
TPP-260	BMA031(V36)	4,31E-09										
TPP-261	BMA031(V36)	3,45E-09										
TPP-262	BMA031(V36)	3,29E-09	4,18E-09	-x3-5-7-x	1,0	3,3	0,8	100,0	1,8	6,5	1,7	
TPP-263	BMA031(V36)	3,87E-09										
TPP-264	BMA031(V36)	7,39E-09										
TPP-265	BMA031(V36)	6,72E-09										
TPP-266	BMA031(V36)	3,81E-09	4,57E-09	-x3-5678x	1,1	8,1	1,3	100,0	2,7	10,3	2,3	
TPP-267	BMA031(V36)	4,78E-09										
TPP-268	BMA031(V36)	6,00E-09										
TPP-270	BMA031(V36)	5,74E-09										
TPP-271	BMA031(V36)	4,08E-09										
TPP-272	BMA031(V36)	4,11E-09	5,70E-09	-x3-5678x	1,2	6,9	1,1	100,0	2,4	9,8	2,6	

Таблица 13. Относительные сигналы связывания для подобных пептидов (в процентах от сигналов, обнаруживаемых для пептида-мишени PRAME-004) выбранных вариантов TCER[®] слота II и IIa, как измерено с помощью интерферометрии биослоя

Пептид	TPP-214	TPP-230	TPP-239	TPP-241	TPP-256	TPP-266
	Рекрутер: BMA031 (V36)	Рекрутер: ID4	Рекрутер: BMA031 (V36)	Рекрутер: BMA031 (V36)	Рекрутер: BMA031 (V36)	Рекрутер: BMA031 (V36)
PRAME-004	100	100	100	100	100	100
SMARCD1-001	82	60	65	60	49	19
GIMAP8-001	70	48	55	56	38	-3
FARSA-001	69	35	49	72	17	-5
NOMAP-3-1408	46	11	24	25	7	-12
VIM-009	41	10	28	24	10	11
буферный контроль	0	1	0	0	1	0
FAM114A2-002	-11	-7	-5	-4	-3	-6
PDCD10-004	-12	-10	-14	-14	-14	-13
NOMAP-5-0765	-14	-12	-18	-16	-17	-18
IGHD-002	-15	-12	-15	-15	-10	-15
TSN-001	-16	-12	-17	-18	-17	-18
NOMAP-3-1587	-16	-14	-16	-17	-18	-18
DDX5-001 (отрицательный контроль)	-17	-13	-16	-17	-17	-16
ALOX15B-003	-18	-15	-15	-19	-14	-17

NOMAP-3-1768	-18	-16	-19	-19	-21	-19
GPR56-002	-18	-14	-19	-19	-17	-19
NOMAP-3-1265	-18	-13	-16	-20	-15	-20
NOMAP-3-0972	-22	-17	-22	-23	-20	-23

Пример 3.5. Слот III

Далее TCER[®] конструировали с использованием доменов VH и VL, происходящих из BMA031(V36) или его модифицированных вариантов (A02 и D01), или ID4, а также Valpha и Vbeta, как описано выше (пример 3.1). В качестве эталона создавали дополнительную молекулу TCER[®] на основе рекрутирующего антитела UCNT1-V17 (TRP-1109). Конструкции ДНК, кодирующие соответствующие молекулы, создавали, как описано выше. Полученные плазмиды использовали для трансфекции клеток CHO-S посредством электропорации (MaxCyte) для временной экспрессии и продукции вариантов TCER[®] (Таблица 14 и Таблица 18). Очистку, составление и первоначальную характеристику молекул проводили, как указано выше в примере 3.3.

Таблица 14. Сводные данные по продуктивности и стабильности при стрессе, полученные для молекул TCER[®] слота III

TCER[®] вариант	Va, Vb (SEQ ID NO)	Рекрутер	Выход конечного продукта (мг/л)	Мономер (%)	Мономер (%) через 14 дней при 40°C
TRP-230	132, 135	ID4	73,8	98,83	95,13
TRP-871	137, 135	ID4	80,0	98,92	97,33
TRP-222	132, 134	ID4	70,6	98,80	97,46
TRP-872	137, 134	ID4	62,5	98,77	97,87
TRP-214	132, 134	BMA31(V36)	36,2	97,94	94,98
TRP-876	137, 134	ID4	36,9	97,94	92,28
TRP-666	132, 136	BMA31(V36)A02	49,7	97,59	93,11
TRP-879	137, 134	BMA31(V36)A02	43,5	92,98	90,42
TRP-891	137, 134	BMA31(V36)D01	40,0	98,18	94,94

TPP-669	132, 136	BMA31(V36)D01	72,9	97,83	94,66
TPP-894	132, 135	BMA31(V36)D01	40,2	97,45	93,11
TPP-1109	(CDR6)	UCHT1-V17	13,6	98,10	92,62

Эффективность молекул TCER[®] в отношении уничтожения HLA-A*02-положительных линий опухолевых клеток, презентующих различные уровни целевого пептида PRAME-004 на поверхности клеток, оценивали с помощью анализов высвобождения LDH. Кроме того, HLA-A*02-положительную, но PRAME-004-отрицательную линию опухолевых клеток (например, T98G) оценивали для характеристики неспецифической или нецелевой активности вариантов TCER[®]. Линии опухолевых клеток совместно инкубировали с эффекторами PBMC, полученными от здоровых HLA-A*02-положительных доноров, в соотношении 1:10 и в присутствии возрастающих концентраций TCER[®]. Цитотоксичность, индуцированную TCER[®], определяли количественно через 48 часов совместного культивирования путем измерения высвобожденного LDH. Значения EC₅₀ кривых зависимости ответа от дозы рассчитывали с использованием нелинейной аппроксимации 4-точечной кривой. Значения EC₅₀ для двух PRAME-004-положительных линий опухолевых клеток (Hs695T и U2OS) и PRAME-004-отрицательной линии опухолевых клеток (T98G) были определены в различных экспериментах с разными донорами PBMC и графически суммированы на фиг. 9.

Варианты TCER[®] слота III TPP-214, -222, -230, -666, -669, -871, -872, -876, -879, -891, -894 анализировали на их аффинность связывания с комплексом целевой пептид-HLA (HLA-A*02/PRAME-004) методом интерферометрии биослоя. Измерения проводили на системе Octet HTX при 30°C. Анализы проводили при смещении датчика 3 мм и частоте сбора данных 5 Гц на биосенсорах HIS1K в 16-канальном режиме с использованием PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA в качестве буфера для анализа. Следующую последовательность стадий анализа повторяли для измерения всех аффинностей связывания: регенерация (5 с, 10 mM глицина, pH 1,5)/нейтрализация (5 с, буфер для анализа, один цикл регенерации состоит из четырех повторов регенерации/нейтрализации), исходный уровень (60 с), буфер для анализа), загрузка (120 с, пептид-HLA 10 мкг/мл), исходный уровень (120 с, буфер для анализа), ассоциация (300 с, двукратное серийное разведение TCER[®] в диапазоне от 100 нМ до 1,56 нМ) или от 50 до 0,78 нМ, буфер для анализа в качестве эталона), диссоциация (300 с, буфер для анализа). Оценку данных проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis HT. Вычитание эталонного сенсора осуществляли для вычитания потенциальной диссоциации пептида-HLA, загруженного на биосенсор (через

биосенсор, загруженный пептидом-НЛА, измеренным в буфере). Кривые данных выравняли с сходной линией (среднее значение за последние 5 с), проводили межстадийную коррекцию для стадии диссоциации, применяли фильтрацию Савицкого - Голея, и кривые глобально подгоняли с использованием модели связывания 1:1 (с R_{max} , не связанным с сенсором). Сильную аффинность связывания обнаруживали при значениях K_D в диапазоне от 2 нМ до 5 нМ (таблица 15). Таким образом, связывание с VIM-009 не имеет значения, и определение аффинности связывания NOMAP-3-1408 не было сочтено необходимым на основании его сигналов связывания, сравнимых с VIM-009. Для одного взаимодействия было рассчитано 50-кратное окно K_D . Однако для этого взаимодействия, а также для некоторых других, значение R_{max} , рассчитанное с помощью алгоритма подгонки, было слишком низким, поэтому взаимодействие считается более слабым, чем рассчитанное, и, следовательно, окно больше. Соответствующие взаимодействия указаны в таблице 15. Для дальнейшего анализа специфичности различных вариантов мотивы связывания определяли путем измерения аффинности в отношении комплекса целевой пептид-НЛА, а также в отношении аланинзамещенных вариантов в положениях 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Измерения проводили на системе Octet HTX при 30°C. Анализы проводили при смещении датчика 3 мм и частоте сбора данных 5 Гц на биосенсорах HIS1K в 16- или 8-канальном режиме с использованием PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA в качестве буфера для анализа. Следующую последовательность стадий анализа повторяли для измерения всех аффинностей связывания: регенерация (5 с, 10 мМ глицина, pH 1,5)/нейтрализация (5 с, буфер для анализа, один цикл регенерации состоит из четырех повторов регенерации/нейтрализации), исходный уровень (60 с, буфер для анализа), загрузка (120 с, пептид-НЛА 10 мкг/мл), исходный уровень (120 с, буфер для анализа), ассоциация (150 с, двукратное серийное разведение TCER® в диапазоне от 400 нМ до 6,25 нМ, буфер для анализа в виде эталон), диссоциация (300 с, буфер для анализа). Оценку данных проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis HT. Вычитание эталонного сенсора осуществляли для вычитания потенциальной диссоциации пептида-НЛА, загруженного на биосенсор (через биосенсор, загруженный соответствующим пептидом-НЛА, измеренным в буфере). Кривые данных выравняли с исходным уровнем (среднее значение за последние 5 с), проводили межстадийную коррекцию для стадии диссоциации, применяли фильтрацию Савицкого-Голея, и кривые глобально подгоняли с использованием модели связывания 1:1 (с R_{max} , не связанным с датчиком). Положение считали частью мотива связывания по меньшей мере при 2-кратном снижении аффинности или сигнала связывания (измерено для самой высокой анализируемой концентрации). Все протестированные варианты TCER® продемонстрировали широкие мотивы связывания,

распознающие по меньшей мере четыре и вплоть до всех анализируемых пептидных положений (Таблица 16). Положительное влияние на мотив связывания наблюдали для bA84, aN114L и bA110S/bT115A, что соответствует предыдущим данным. Для сравнения анализировали мотив связывания альтернативной эталонной молекулы TCER[®], нацеленной на PRAME-004 (TPP-1109). Этот TCER[®] распознает положения 5-8 пептида и, таким образом, связывание ограничивается этим участком пептида, в то время как положения, распознаваемые вариантами TCER[®] слота III, более равномерно распределены по всему пептиду.

Варианты TCER[®] слота III TPP-214, -222, -230, -666, -669, -871, -872, -876, -879, -891, -894 дополнительно охарактеризовали по их способности убивать клетки T2, загруженные различными уровнями пептида-мишени. После загрузки клеток T2 соответствующими концентрациями PRAME-004 в течение 2 часов загруженные пептидом клетки T2 совместно культивировали с PBMC человека при соотношении E:T 5:1 в присутствии возрастающих концентраций вариантов TCER[®] в течение 48 часов. Уровни LDH, высвободившейся в супернатант, количественно определяли с использованием набора для анализа нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96 (Promega). Все варианты TCER[®] продемонстрировали мощное уничтожение загруженных PRAME-004 клеток T2 с субпиколярными значениями EC₅₀ при концентрации пептидной загрузки 10 нМ (Фиг. 10, Таблица 17). Значения EC₅₀ увеличивались при уменьшении уровня загрузки PRAME-004. Однако даже при очень низкой загрузочной концентрации PRAME-004, равной 10 мкМ, уничтожение индуцировали все варианты TCER[®], за исключением TPP-214.

Таблица 15. Значения K_D для связывания с HLA-A*02/PRAME-004 и окна K_D четырех выбранных нецелевых пептидов, как измерено с помощью интерферометрии биослоя для вариантов TCER[®] слота III

TCER [®] вариант	Рекрутер	Va, Vb (SEQ ID NO)	K _D	K _D	K _D	K _D	K _D
			PRAME-004 (M)	FARSA-001/ PRAME-004	GIMAP8-001/ PRAME-004	SMARCD1- 001/	VIM-009/ PRAME-004
TPP-230	ID4	132, 135	3,05E-09	-	120 ^l	130 ^l	-
TPP-871	ID4	137, 135	2,89E-09	-	-	-	-
TPP-222	ID4	132, 134	1,56E-09	118	69	74	112 ^l
TPP-872	ID4	137, 134	1,60E-09	95	103	119 ^l	2153
TPP-214	BMA031(V36)	132, 134	2,43E-09	216	59	66	389

TRP-876	BMA031(V36)A02	137, 134	2,43E-09	86	80	267	160 ¹
TRP-666	BMA031(V36)A02	132, 136	3,37E-09	507	142	121	171
TRP-879	BMA031(V36)A02	132, 135	4,55E-09	-	-	-	-
TRP-891	BMA031(V36)D01	137, 134	2,34E-09	76	85	254	146 ¹
TRP-669	BMA031(V36)D01	132, 136	3,65E-09	83 ¹	50 ¹	84	165
TRP-894	BMA031(V36)D01	132, 135	5,18E-09	-	-	-	-

¹Окна K_D , как ожидается, будут выше значений, приведенных в таблице (расчетные значения R_{max} для этих взаимодействий слишком низкие из-за общего низкого уровня сигналов связывания).

Таблица 16. Значения K_D для связывания с HLA-A*02/PRAME-004 и окна K_D вариантов Ala-замещенного пептида для определения мотива связывания, как измерено с помощью интерферометрии биослоя для вариантов TCER[®] слота III. Для положения 5 задан порог 100 для окна K_D . Распознавание этого положения является по меньшей мере 100-кратным

TCER [®] вариант	Рекру- тер	Va, Vb (SEQ ID NO)	PRAME-004 $K_{D, мотив (M)}$	Мотив связы- вания	K_D Ala/мишень						
					A1	A3	A4	A5	A6	A7	A8
TRP-230	ID4	132, 135	3,03E-09	-x3- 5678x	1,2	12,2	1,7	100,0	3,9	25,5	3,0
TRP-871	ID4	137, 135	2,47E-09	1x34567 8x	2,5	39,3	4,7	100,0	16,5	89,9	8,3
TRP-222	ID4	132, 134	1,50E-09	-x3-5- 78x	1,1	2,3	0,9	100,0	1,8	4,3	1,8
TRP-872	ID4	137, 134	1,48E-09	-x3- 5678x	1,1	7,6	1,1	100,0	3,0	17,5	2,7
TRP-214	BMA0 31 (V36)	132, 134	3,17E-09	-x3-5- 78x	0,9	2,1	0,8	100,0	1,6	4,6	1,7
TRP-876	BMA0 31 (V36)A 02	137, 134	2,87E-09	-x3-567- x	1,0	6,8	1,0	100,0	2,3	13,9	2,0

TPP-666	BMA0 31 (V36)A 02	132, 136	3,84E-09	-x3- 5678x	1,1	7,9	1,2	100,0	2,6	9,7	2,1
TPP-879	BMA0 31 V36)A 02	132, 135	6,15E-09	-x3- 5678x	1,1	12,5	1,6	100,0	3,5	27,5	2,6
TPP-891	BMA0 31 (V36)D 01	137, 134	2,80E-09	-x3- 5678x	1,0	7,2	1,1	100,0	2,6	14,7	2,3
TPP-669	BMA0 31 (V36)D 01	132, 136	3,28E-09	-x3- 5678x	1,1	9,1	1,2	100,0	2,5	11,0	2,4
TPP-894	BMA0 31 (V36)D 01	132, 135	6,04E-09	-x3- 5678x	1,2	14,9	1,9	100,0	3,8	26,4	2,8
TPP-1109	UCHT1 -V17	(CDR6)	2,47E-09	-x-- 5678x	0,9	0,8	1,2	49,0	7,9	55,7	4,1

Таблица 17. Цитотоксичность in vitro вариантов TCER® слота III на клетках T2, загруженных PRAME-004. Клетки T2 совместно культивировали с PBMC человека при соотношении E:T 5:1 в течение 48 часов. Указаны загрузочные концентрации PRAME-004. Значения EC₅₀ и уровни цитотоксичности на плато (вверху) рассчитывали с использованием нелинейной аппроксимации 4-точечной кривой

TCER® вариант	Рек- рутер	Va, Vb (SEQ ID NO)	10 нМ PRAME-004		1 нМ PRAME- 004		100 пМ PRAME-004		10 пМ PRAME-004	
			EC ₅₀ [пМ]	Макс имум						
TPP-230	ID4	132, 135	0,09	109	0,9	139	23,2 ¹	179	145	80

TPP-871	ID4	137, 135	0,13	109	1,6	143	76,5 ^l	90	361	76
TPP-222	ID4	132, 134	полное уничто жение	109	полное уничто жение	78	2,8 ^l	127	58	90
TPP-872	ID4	137, 134	полное уничто жение	109	полное уничто жение	151	4,3 ^l	84	49	74
TPP-876	BMA0 31 (V36) A02	137, 134	0,16	111	2,0	113	24,4	100	539	40
TPP-666	BMA0 31 (V36) A02	132, 136	0,15	113	2,4	113	39,8	100	182	35
TPP-879	BMA0 31 (V36) A02	132, 135	0,54	106	6,2	109	94,4	117	1070	39
TPP-214	BMA0 31 (V36)	132, 134	0,22	108	5,0	109	92,8	102	нет уничто жения	20
TPP-891	BMA0 31 (V36) D01	137, 134	0,19	120	2,2	112	54,0	125	611	45
TPP-669	BMA0 31 (V36) D01	132, 136	0,22	124	3,2	108	84,0	126	246	31
TPP-894	BMA0 31	132, 135	0,87	108	9,9	115	226,0	129	1084	44

	(V36) D01									
TPP-214	BMA0 31 (V36)	132, 134	0,26	121	5,4	111	105,4	99	нет уничто жения	23

¹Высокая вариабельность внутри повторов не позволяет надежно рассчитать EC_{50} .

Таблица 18. Биспецифические молекулы

ID	α- цепь SEQ ID NO	β- цепь SEQ ID NO	ID	α- цепь SEQ ID NO	β- цепь SEQ ID NO	ID	α- цепь SEQ ID NO	β- цепь SEQ ID NO
TPP-70	93	94	TPP-218	167	168	TPP-268	217	260
TPP-71	93	95	TPP-219	177	176	TPP-269	217	262
TPP-72	93	96	TPP-220	179	176	TPP-270	217	264
TPP-73	93	97	TPP-221	181	176	TPP-271	217	266
TPP-74	93	98	TPP-222	183	176	TPP-272	155	268
TPP-93	100	101	TPP-226	159	184	TPP-273	189	270
TPP-79	103	102	TPP-227	105	186	TPP-274	189	272
TPP-105	105	104	TPP-228	189	186	TPP-275	189	274
TPP-106	106	107	TPP-229	191	186	TPP-276	189	276
TPP-108	106	101	TPP-230	193	186	TPP-277	189	278

TPP-109	111	110	TPP-235	195	160	TPP-279	189	282
TPP-110	111	102	TPP-236	197	160	TPP-666	285	284
TPP-111	103	110	TPP-237	199	160	TPP-669	291	284
TPP-112	100	107	TPP-238	201	160	TPP-871	295	186
TPP-113	100	119	TPP-239	203	160	TPP-872	295	296
TPP-114	100	121	TPP-240	205	160	TPP-876	299	162
TPP-115	122	121	TPP-241	207	160	TPP-879	285	300
TPP-116	106	121	TPP-242	209	160	TPP-891	303	162
TPP-117	126	121	TPP-243	211	160	TPP-892	303	284
TPP-118	128	121	TPP-244	213	160	TPP-894	291	300
TPP-119	100	131	TPP-245	215	160	TPP-1292	151	284
TPP-120	100	133	TPP-246	217	216	TPP-1293	156	162
TPP-121	122	133	TPP-247	217	218	TPP-1294	158	284
TPP-122	106	133	TPP-248	217	220	TPP-1295	158	300
TPP-123	126	133	TPP-249	217	222	TPP-1296	303	161
TPP-124	128	133	TPP-250	217	224	TPP-1297	303	163
TPP-125	100	143	TPP-252	217	228	TPP-1298	291	164

TPP-126	122	143	TPP-253	217	230	TPP-1300	291	165
TPP-127	106	143	TPP-254	217	232	TPP-1301	166	300
TPP-128	126	143	TPP-255	217	234	TPP-1302	291	170
TPP-129	128	143	TPP-256	217	236	TPP-1303	291	172
TPP-207	103	152	TPP-257	217	238	TPP-1304	291	174
TPP-208	155	152	TPP-258	217	240	TPP-1305	166	170
TPP-209	157	152	TPP-259	217	242	TPP-1306	166	172
TPP-210	159	152	TPP-260	217	244	TPP-1307	166	174
TPP-211	103	160	TPP-261	217	246	TPP-1308	291	182
TPP-212	155	162	TPP-262	217	248	TPP-1309	291	185
TPP-213	157	162	TPP-263	217	250	TPP-1332	175	186
TPP-214	167	160	TPP-264	217	252	TPP-1333	178	186
TPP-215	169	168	TPP-265	217	254	TPP-1334	180	186
TPP-216	171	168	TPP-266	217	256			
TPP-217	173	168	TPP-267	217	258			

В таблице 18, за исключением TPP-70, TPP-71, TPP-72, TPP-73 и TPP74, термин « α -цепь» относится к полипептидной цепи, содержащей $V\alpha$, т.е. переменный домен, происходящий из α -цепи TCR. Термин « β -цепь» относится к полипептидной цепи, содержащей $V\beta$, т.е. переменный домен, происходящий из β -цепи TCR. Для TPP-70, TPP-

71, TPP-72, TPP-73 и TPP74 « α -цепь» не содержит каких-либо переменных доменов, происходящих из TCR, но « β -цепь» содержит два переменных домена, происходящих из TCR, один происходящий из α -цепи TCR, и один, происходящий из β -цепи TCR.

Пример 3.6. Оценка безопасности выбранных кандидатов TCER[®] слота III

Профиль безопасности молекул TCER[®] TPP-230, TPP-666, TPP-871 и TPP-891 (таблицы 14 – 18) оценивали в экспериментах по уничтожению астроцитов и кардиомиоцитов (полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток), а также артериальных эндотелиальных клеток, мезенхимальных стволовых клеток и гладкомышечных клеток трахеи. На фиг. 11 показаны результаты совместного культивирования вышеуказанных нормальных типов клеток (все экспрессируют HLA-A*02) с эффекторными клетками PBMC от здорового донора HLA-A*02+ в соотношении 1:10 (клетки-мишени:эффекторные клетки) в присутствии возрастающих концентраций TCER[®]. Клетки совместно культивировали в смеси 1:1 соответствующей среды клеток нормальной ткани и среды Т-клеток или только среды Т-клеток (LDH-AM). После 48 часов совместного культивирования супернатанты собирали и TCER[®]- индуцированный лизис клеток нормальной ткани оценивали путем измерения высвобождения LDH с помощью набора LDH-Glo[™] Kit (Promega). Для определения окна безопасности молекулы TCER[®] инкубировали в идентичной установке с PRAME-004-положительной линией опухолевых клеток Hs695T в соответствующей смеси 1:1 среды клеток нормальной ткани и среды Т-клеток с последующей оценкой высвобождения LDH.

Как показано на фиг. 11, цитотоксичность против нормальных тканевых клеток не наблюдали для TPP-230 и TPP-871 даже при самой высокой концентрации TCER[®] 100 нМ. Для TPP-666 и TPP-891 наблюдался некоторый лизис клеток нормальной ткани при концентрации TCER[®] 100 нМ, но при концентрации 10 нМ лизис не был обнаружен. По сравнению с опухолевыми клетками Hs695T, которые демонстрировали выраженный лизис при 100 пМ для всех протестированных молекул TCER[®], а для некоторых молекул даже лизис при концентрации 10 пМ, лизис нормальных тканевых клеток при концентрации 100 нМ указывает на 1000-кратное окно безопасности (TPP- 666 и TPP-891) или более (TPP-230 и TPP-871).

Пример 3.7. Слот IV

Другие TCER[®] конструировали с использованием доменов VH и VL, происходящих из VMA031(V36) или его модифицированных вариантов (A02 и D01), или ID4, а также Valpha и Vbeta, как описано выше (пример 3.1). Конструкции ДНК, кодирующие

соответствующие молекулы, создавали, как описано выше. Полученные плазмиды использовали для трансфекции клеток CHO-S посредством электропорации (MaxCyte) для временной экспрессии и продукции вариантов TCER[®] (Таблица 20 и Таблица 18). Очистку, составление и первоначальную характеристику молекул проводили, как указано выше в примере 3.3.

Таблица 20. Сводные данные по продуктивности и стабильности при стрессе, полученные для молекул TCER[®] слота IV

TCER [®] вариант	α -цепь, цепь (SEQ NO)	β - ID	Рекрутер	Выход конечного продукта (мг/л)	Мономер (%)	Мономер (%) через 14 дней при 40°C
TRP- 1292	151, 284		BMA031(V36) A02_H90Y	42,9	97,53	93,46
TRP- 1294	158, 284		BMA031(V36) D01_H90Y	39,8	97,78	90,61
TRP- 1295	158, 300		BMA031(V36) D01_H90Y	56,5	94,89	91,49
TRP- 1296	303, 161		BMA031(V36) D01	50,7	79,21	75,17
TRP- 1297	303, 163		BMA031(V36) D01	41,3	94,12	86,77
TRP- 1298	291, 164		BMA031(V36) D01	68,1	94,41	89,7
TRP- 1300	291, 165		BMA031(V36) D01	43,9	96,81	87,5
TRP- 1301	166, 300		BMA031(V36) D01	73,7	94,57	90,89
TRP- 1302	291, 170		BMA031(V36) D01	67,3	83,48	79,58
TRP- 1303	291, 172		BMA031(V36) D01	48,5	74,95	71,03
TRP- 1304	291, 174		BMA031(V36) D01	55,0	95,13	88,87

TRP-1305	166, 170	BMA031(V36) D01	51,6	81,55	77,75
TRP-1306	166, 172	BMA031(V36) D01	71,7	86,37	81,18
TRP-1307	166, 174	BMA031(V36) D01	60,7	95,93	88,16
TRP-1308	291, 182	BMA031(V36) D01	61,9	92,28	87,98
TRP-1309	291, 185	BMA031(V36) D01	74,8	98,98	91,11
TRP-1332	175, 186	ID4 вариант	0	n/a	n/a
TRP-1333	178, 186	ID4 вариант	61,1	98,52	95,51
TRP-1334	180, 186	ID4 вариант	61,4	98,42	95,94

В таблице 20 термин « α -цепь» относится к полипептидной цепи, содержащей $V\alpha$, т.е. переменный домен, происходящий из α -цепи TCR. Термин « β -цепь» относится к полипептидной цепи, содержащей $V\beta$, т.е. переменный домен, происходящий из β -цепи TCR.

Эффективность молекул TCER[®] в отношении уничтожения HLA-A*02-положительных линий опухолевых клеток, презентующих различные уровни целевого пептида PRAME-004 на поверхности клеток, оценивали с помощью анализов высвобождения LDH. Кроме того, HLA-A*02-положительную, но PRAME-004-отрицательную линию опухолевых клеток (например, T98G) оценивали для характеристики неспецифической или нецелевой активности вариантов TCER[®]. Линии опухолевых клеток совместно инкубировали с эффекторами PBMC, полученными от здоровых HLA-A*02-положительных доноров, в соотношении 1:10 и в присутствии возрастающих концентраций TCER[®]. Цитотоксичность, индуцированную TCER[®], определяли количественно через 48 часов совместного культивирования путем измерения высвобожденного LDH. Значения EC₅₀ кривых зависимости ответа от дозы рассчитывали с использованием нелинейной аппроксимации 4-точечной кривой. Значения EC₅₀ для PRAME-004-положительной линии опухолевых клеток U2OS и PRAME-004-отрицательной линии опухолевых клеток (T98G)

были определены в различных экспериментах с разными донорами РВМС и приведены в таблице 21.

Таблица 21. Сводные данные анализа высвобождения LDH, полученные для молекул TCER® слота IV

TCER® вариант	EC50 [пМ] для НВС-1005 по сравнению с U2OS	EC50 [пМ] для НВС-1005 по сравнению с T98G	EC50 [пМ] для НВС-848 по сравнению с U2OS	EC50 [пМ] для НВС-848 по сравнению с T98G
TRP-1292	66	22,659	547	77,267
TRP-1294	99	69,150	431	>100,000
TRP-1295	150	>100,000	663	>100,000
TRP-1297	2,526	>100,000	4,096	>100,000
TRP-1298	48	37,953	249	>100,000
TRP-1300	186	>100,000	811	>100,000
TRP-1301	240	>100,000	979	>100,000
TRP-1304	7125	>100,000	13,686	>100,000
TRP-1307	8,056	>100,000	>100,000	>100,000
TRP-1333	226	>100,000	719	>100,000
TRP-1334	217	>100,000	829	>100,000

Варианты TCER® слота IV TRP-1292, -1294 -1298, -1300 -1309, -1333, -1334 анализировали на их аффинность связывания с комплексом целевой пептид-HLA (HLA-A*02/PRAME-004) с помощью интерферометрии биослоя. Измерения проводили на

системе Octet HTX при 30°C. Анализы проводили при смещении датчика 3 мм и частоте сбора данных 5 Гц на биосенсорах HIS1K в 16-канальном режиме с использованием PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA в качестве буфера для анализа. Следующую последовательность стадий анализа повторяли для измерения всех аффинностей связывания: регенерация (5 с, 10 mM глицина, pH 1,5)/нейтрализация (5 с, буфер для анализа, один цикл регенерации состоит из четырех повторов регенерации/нейтрализации), исходный уровень (60 с), буфер для анализа), загрузка (120 с, пептид-HLA 10 мкг/мл), исходный уровень (120 с, буфер для анализа), ассоциация (300 с, двукратное серийное разведение TCER® в диапазоне от 100 нМ до 1,56 нМ) или от 50 до 0,78 нМ, буфер для анализа в качестве эталона), диссоциация (300 с, буфер для анализа). Оценку данных проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis HT. Вычитание эталонного сенсора осуществляли для вычитания потенциальной диссоциации пептида-HLA, загруженного на биосенсор (через биосенсор, загруженный пептидом-HLA, измеренным в буфере). Кривые данных выравнивали исходным уровнем (среднее значение за последние 5 с), проводили межстадийную коррекцию для стадии диссоциации, применяли фильтрацию Савицкого - Голея, и кривые глобально подгоняли с использованием модели связывания 1:1 (с Rmax, не связанным с сенсором). Сильная аффинность связывания была обнаружена при значениях K_D в диапазоне от 2 нМ до 15 нМ (Таблица 22). Кроме того, определяли аффинность связывания для двух ранее идентифицированных потенциальных нецелевых пептидов и рассчитывали окна K_D по сравнению со связыванием целевого пептида-HLA. Измерения проводили на системе Octet RED384 или HTX при 30°C. Анализы проводили при смещении датчика 3 мм и частоте сбора данных 5 Гц на биосенсорах HIS1K в 16-канальном режиме с использованием PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA в качестве буфера для анализа. Следующую последовательность стадий анализа повторяли для измерения всех аффинностей связывания: регенерация (5 с, 10 mM глицина, pH 1,5)/нейтрализация (5 с, буфер для анализа, один цикл регенерации состоит из четырех повторов регенерации/нейтрализации), исходный уровень (60 с), буфер для анализа), загрузка (120 с, пептид-HLA 10 мкг/мл), исходный уровень (120 с, буфер для анализа), ассоциация (300 с, двукратное серийное разведение TCER® в диапазоне от 500 нМ до 7,81 нМ, буфер для анализа в виде эталон), диссоциация (300 с, буфер для анализа). Оценку данных проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis HT. Вычитание эталонного сенсора осуществляли для вычитания потенциальной диссоциации пептида-HLA, загруженного на биосенсор (через биосенсор, загруженный соответствующим пептидом-HLA, измеренным в буфере). Кривые данных выравнивали исходным уровнем (среднее значение за последние 5 с), проводили межстадийную коррекцию для стадии

диссоциации, применяли фильтрацию Савицкого-Голея, и кривые глобально подгоняли с использованием модели связывания 1:1 (с R_{max} , не связанным с сенсором). В целом, для всех вариантов было обнаружено значительно более слабое связывание с потенциальными нецелевыми пептидами по сравнению с целевым пептидом, демонстрирующим окна по меньшей мере 10-кратные и даже полное отсутствие связывания. Соответствующие взаимодействия указаны в таблице 22. Для дальнейшего анализа специфичности вариантов TRP-1294, -1295, -1298, -1333, -1334, мотивы связывания определяли путем измерения аффинности в отношении комплекса целевой пептид-HLA, а также в отношении аланинзамещенных вариантов по положениям 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Измерения проводили на системе Octet HTX при 30°C. Анализы проводили при смещении датчика 3 мм и частоте сбора данных 5 Гц на биосенсорах HIS1K в 16- или 8-канальном режиме с использованием PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA в качестве буфера для анализа. Следующую последовательность стадий анализа повторяли для измерения всех аффинностей связывания: регенерация (5 с, 10 mM глицина, pH 1,5)/нейтрализация (5 с, буфер для анализа, один цикл регенерации состоит из четырех повторов регенерации/нейтрализации), исходный уровень (60 с, буфер для анализа), загрузка (120 с, пептид-HLA 10 мкг/мл), исходный уровень (120 с, буфер для анализа), ассоциация (150 с, двукратное серийное разведение TCER® в диапазоне от 400 нМ до 6,25 нМ, буфер для анализа в виде эталон), диссоциация (300 с, буфер для анализа). Оценку данных проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis HT. Вычитание эталонного сенсора осуществляли для вычитания потенциальной диссоциации пептида-HLA, загруженного на биосенсор (через биосенсор, загруженный соответствующим пептидом-HLA, измеренным в буфере). Кривые данных выравнивали исходным уровнем (среднее значение за последние 5 с), проводили межстадийную коррекцию для стадии диссоциации, применяли фильтрацию Савицкого-Голея, и кривые глобально подгоняли с использованием модели связывания 1:1 (с R_{max} , не связанным с сенсором). Положение считали частью мотива связывания по меньшей мере при 2-кратном снижении аффинности или сигнала связывания (измерено для самой высокой анализируемой концентрации). Все протестированные варианты TCER® продемонстрировали широкие мотивы связывания, распознающие по меньшей мере пять и вплоть до всех анализируемых пептидных положений (Таблица 23).

Таблица 22. Значения K_D для связывания с HLA-A*02/PRAME-004 и окна K_D двух выбранных нецелевых пептидов, как измерено с помощью интерферометрии биослоя для вариантов TCER® слота IV

TCER® вариант	K_D	K_D IFIT-001/ K_D PRAME-004	K_D MCMB-002/ K_D PRAME-004
	PRAME-004 (M)		
TPP-1292	2,55E-09	29,5	18,6
TPP-1294	3,06E-09	30,7	20,4
TPP-1295	3,39E-09	45,2	28,6
TPP-1298	2,47E-09	24,1	17,2
TPP-1300	3,90E-09	20,6	20,7
TPP-1301	5,77E-09	33,6	16,8
TPP-1302	3,92E-09	26,4	16,1
TPP-1303	4,58E-09	23,0	17,6
TPP-1304	2,74E-08	>100	>100
TPP-1305	5,19E-09	23,8	13,7
TPP-1306	5,20E-09	47,2	23,3
TPP-1307	3,97E-08	>100	>100
TPP-1308	1,54E-08	83,4	76,7
TPP-1309	1,33E-08	38,8	9,9
TPP-1333	2,94E-09	27,3	16,0
TPP-1334	2,48E-09	26,7	18,0

Таблица 23. Значения K_D для связывания с HLA-A*02/PRAME-004 и окна K_D вариантов Ala-замещенного пептида для определения мотива связывания, как измерено с помощью интерферометрии биослоя для вариантов TCER® слота IV. Для положения 5 задан порог 100 для окна K_D . Распознавание этого положения является по меньшей мере 100-кратным

TCER® вариант	PRAME-004 $K_{D, \text{мотив}}$ (M)	Мотив связа- ния	K_D Ala/мишень						
			A1	A3	A4	A5	A6	A7	A8
TPP-1294	4,35E-09	-x3-5678x	1,6	10,6	2,0	92,4	3,6	13,8	3,3
TPP-1295	3,87E-09	1x345678x	2,2	21,8	2,8	20,7	5,2	35,3	5,0
TPP-1298	2,87E-09	-x3-5678x	1,4	10,3	1,6	100,0	2,9	9,6	2,8
TPP-1333	2,60E-09	-x3-5678x	1,4	12,8	2,0	100,0	3,9	21,0	3,7
TPP-1334	3,09E-09	-x3-5678x	1,1	9,2	1,6	100,0	3,1	15,9	2,6

Пример 3.8. Оценка безопасности выбранных кандидатов TCER® слота IV

Профиль безопасности молекул TCER® TPP-1294, TPP-1295, TPP-1298, TPP-1333 и TPP-1334 (таблицы 18 и 20–23) оценивали в экспериментах по уничтожению астроцитов, ГАВА-ергических нейронов и кардиомиоцитов (полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, iNA, iHN и iHCM, соответственно), а также легочных фибробластов (HPF), сердечных микрососудистых эндотелиальных клеток (HCMEC), дермальных микрососудистых эндотелиальных клеток (HDMEC), артериальных эндотелиальных клеток (HAoEC), гладкомышечных клеток коронарной артерии (HCASMC), эпителиальных клеток коры почек (HRCePc) и гладкомышечных клеток трахеи (HTSMC). Кроме того, мостиковую молекулу TPP-891 протестировали вместе с другими молекулами TPP-214 и TPP-669 из более ранних слотов. На фиг. 12 и 13 показаны результаты совместного культивирования указанных выше нормальных типов клеток (все экспрессируют HLA-A*02) с эффекторными клетками PBMC от здорового донора HLA-A*02+ в соотношении 1:10 (клетки-мишени : эффекторные клетки) в присутствии возрастающих концентраций TCER®. Клетки совместно культивировали в смеси 1:1 соответствующей среды клеток нормальной ткани и среды Т-клеток или только среды Т-

клеток (LDH-AM). После 48 часов совместного культивирования супернатанты собирали и TCER®-индуцированный лизис клеток нормальной ткани оценивали путем измерения высвобождения LDH с помощью набора LDH-Glo™ Kit (Promega). Для определения окна безопасности молекулы TCER® инкубировали в идентичной установке с PRAME-004-положительной линией опухолевых клеток Hs695T в соответствующей смеси 1:1 среды клеток нормальной ткани и среды Т-клеток с последующей оценкой высвобождения LDH.

Как показано на фиг. 12 и 13, цитотоксичность против нормальных тканевых клеток не наблюдали для любой из тестируемых молекул до концентрации 10 нМ TCER®. В концентрации 100 нМ только мостиковая и эталонная молекулы TPP-891, TPP-669 и TPP-214 демонстрируют несколько повышенный уровень цитотоксичности по сравнению с фоновым. Единственным исключением является TPP-1294 в астроцитах, происходящих из iPSC, с повышенной цитотоксичностью исключительно при 100 нМ. По сравнению с опухолевыми клетками Hs695T, которые демонстрировали выраженный лизис при 100 пМ для всех протестированных молекул TCER®, а для некоторых молекул даже лизис при концентрации 10 пМ, лизис нормальных тканевых клеток при концентрации 100 нМ указывает на 1000-кратное окно безопасности (TPP-1294) или более (TPP-1295, TPP-1298, TPP-1334 и TPP-1335).

Пример 4. Обнаружение пептида PRAME на первичных тканях методом масс-спектрометрии

Для идентификации и относительного количественного определения лигандов HLA методом масс-спектрометрии молекулы HLA из образцов тканей шоковой заморозки очищали и выделяли HLA-ассоциированные пептиды. Выделенные пептиды разделяли, а последовательности идентифицировали с помощью экспериментов в реальном времени по жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) с ионизацией наноэлектрораспылением (nanoESI). Поскольку пептиды были непосредственно идентифицированы как лиганды молекул HLA первичных опухолей, эти результаты являются прямым доказательством естественного процессинга и презентации идентифицированных пептидов на первичной раковой ткани. Полученные данные LC-MS впоследствии обрабатывали и количественно оценивали с использованием запатентованного конвейера количественного анализа данных без меток, сочетающего алгоритмы идентификации последовательностей, спектральной кластеризации, подсчета ионов, выравнивания времени удерживания, деконволюции зарядового состояния и нормализации. Полученные частоты обнаружения мишени приведены ниже в Таблице 19.

Таблица 19. Частота обнаружения пептидов в образцах опухолей. Частота обнаружения мишени обозначается как + (> 0%), ++ (> 10%), +++ (> 30%) или ++++ (> 50%).

Мишень	Частота обнаружения мишени
острый миелолейкоз (AML)	+
рак молочной железы (BRCA)	++
холангиоцеллюлярная карцинома (CCC)	+
хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)	+
Колоректальная карцинома(CRC)	+
рак желчного пузыря (GBC)	++
глиобластома (GBM)	+
гепатоцеллюлярная карцинома (HCC)	+
Плоскоклеточная карцинома головы и шеи (HNSCC)	+
меланома (MEL)	++++
неходжкинская лимфома (NHL)	+
аденокарцинома немелкоклеточного рака легкого (NSCLCadeno)	+
Образцы NSCLC, которые нельзя однозначно отнести к адено-NSCLC или NSCLCsquam (NSCLCother)	++
плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLCsquam)	++
рак яичников (OC)	+++
рак пищевода (OSCAR)	+
почечно-клеточная карцинома (RCC)	++
мелкоклеточный рак легкого (SCLC)	++
карцинома мочевого пузыря (UBC)	+
рак матки и эндометрия (UEC)	++++

Пункты

1. Антигенсвязывающий белок, специфически связывающийся с антигенным пептидом PRAME, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL согласно SEQ ID NO: 50 и находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (MHC), причем антигенсвязывающий белок содержит

(a) первый полипептид, содержащий переменный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где

CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности VKEFQD (SEQ ID NO: 16) или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 16 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ALYNNLDMR (SEQ ID NO: 33), или ALYNNYDMR (SEQ ID NO: 34), или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34 одной, двумя или тремя, предпочтительно одной или двумя, аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

(b) второй полипептид, содержащий переменный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где

CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SGHNS (SEQ ID NO: 10) или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 10 одной или двумя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ASSX₁GX₂X₃DX₄QY (SEQ ID NO: 327), где X₁ представляет собой P, A или T, X₂ представляет собой A или S, X₃ представляет собой T или I, и X₄ представляет собой K или A, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 327 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

2. Антигенсвязывающий белок согласно пункту 1, где

(a) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности FGPYGKE (SEQ ID NO: 32) или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 32 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и/или

(b) CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности FQNTAV (SEQ ID NO: 36) или аминокислотной последовательности CDRb2, отличающейся от SEQ ID NO: 36 одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

3. Антигенсвязывающий белок согласно пункту 1 или 2, где

- Положение 27 последовательности CDRa1 согласно IMGT представляет собой V или содержит замену на аминокислоту, выбранную из L, I, M, F, A, T, N, Q, H, E, D и S, в частности, выбранную из T, N, S и I,
- Положение 28 последовательности CDRa1 согласно IMGT представляет собой K или содержит замену на аминокислоту, выбранную из R, Q, H, N, A, V, S, G, L, I и T, в частности, выбранную из R, A и S,
- Положение 38 последовательности CDRa1 согласно IMGT представляет собой D или содержит замену на аминокислоту, выбранную из E, N, Q, H, K и R, в частности, N,
- Положение 64 последовательности CDRa2 согласно IMGT представляет собой K или содержит замену на аминокислоту, выбранную из R, Q, H, N, T, V, A, L, I, M и F, в частности, выбранную из R, T, и V,
- Положение 114 последовательности CDRa3 согласно IMGT представляет собой L или Y или содержит замену на аминокислоту, выбранную из M, W, H, Q, A, I, K, R, V, D, E, F и N в частности, выбранную из H, Q, A, I, K, R, V, D, E, F и N, более конкретно выбранную из H, Q, A и I,
- Положение 56 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой F или содержит замену на аминокислоту, выбранную из Y, M, L, W, H, V, I и A, в частности, выбранную из Y, M и L,
- Положение 57 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой Q или содержит замену на аминокислоту, выбранную из N, R, D, E, Q, H, K и K, в частности, N, при условии, что аминокислота в положении 57 не представляет собой N, когда аминокислота в положении 63 представляет собой T или S,
- Положение 58 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой N или содержит замену на аминокислоту, выбранную из Q, H, D, K, R, S и T, в частности, S,
- Положение 63 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой T или содержит замену на аминокислоту, выбранную из S, V, A, D, Q и E, в частности, выбранную из S и E, при условии, что аминокислота в положении 63 не представляет собой T или S, когда аминокислота в положении 57 представляет собой N,
- Положение 64 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой A или содержит замену на аминокислоту, выбранную из V, L, I, S, G и T, в частности, T,

- Положение 65 последовательности CDRb2 согласно IMGT представляет собой V или содержит замену на аминокислоту, выбранную из L, I, M, A, T, F и S, в частности, выбранную из I, L и T,

- Положение 108 последовательности CDRb3 согласно IMGT представляет собой P, A или T или содержит замену на аминокислоту, выбранную из V, L, I, S, G, R, K, N и Q, в частности, выбранную из R и S, при условии, что аминокислота в положении 108 не представляет собой N, когда аминокислота в положении 110 представляет собой T или S,

- Положение 110 последовательности CDRb3 согласно IMGT представляет собой A или S или содержит замену на аминокислоту, выбранную из V, L, I, G, T и C, в частности, T, при условии, что аминокислота в положении 110 не представляет собой T или S, когда аминокислота в положении 108 представляет собой N,

- Положение 113 последовательности CDRb3 согласно IMGT представляет собой T или I или содержит замену на аминокислоту, выбранную из V, L и G, и

- Положение 115 последовательности CDRb3 согласно IMGT представляет собой T, K или A или содержит замену на аминокислоту, выбранную из G, L, I, V, R, Q, N, Y, H, E и F, в частности, выбранную из L, I, V, R, Q, N, Y, H, E и F, более конкретно из L, I, V и R.

4. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 3, где указанный антигенсвязывающий белок специфически связывается с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 50 в комплексе с белком MHC, в частности белком HLA, более конкретно HLA-A, даже более конкретно HLA -A*02.

5. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 4, где указанный антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из по меньшей мере 3, 4 или 5 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 5, 6, 7 и 8, в частности, 3, 5 и 7, согласно SEQ ID NO: 50, предпочтительно с функциональным эпитопом, состоящим из аминокислотных положений 3, 5 и 7, или 3, 5, 6 и 7, или 3, 5, 7 и 8, или 3, 5, 6, 7 и 8, согласно SEQ ID NO: 50, но предпочтительно не аминокислотных положений 1 и 4 согласно SEQ ID NO: 50.

6. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 4, где указанный антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из по меньшей мере 6 или 7 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 согласно SEQ ID NO: 50.

7. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 6, где указанный антигенсвязывающий белок связывается с комплексом указанного антигенного пептида PRAME и белка МНС, в частности белка HLA, более конкретно HLA-A, даже более конкретно HLA -A*02, с $KD \leq 100$ нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ, предпочтительно ≤ 5 нМ.

8. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 7, где указанный антигенсвязывающий белок не связывается значительно с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из TMED9-001 (SEQ ID NO: 51), CAT-001 (SEQ ID NO: 52), DDX60L-001 (SEQ ID NO: 53), LRRC70-001 (SEQ ID NO: 54), PTPLB-001 (SEQ ID NO: 55), HDAC5-001 (SEQ ID NO: 56), VPS13B-002 (SEQ ID NO: 57), ZNF318-001 (SEQ ID NO: 58), CCDC51-001 (SEQ ID NO: 59), IFT17-003 (SEQ ID NO: 60), DIAPH1-004 (SEQ ID NO: 62), FADS2-001 (SEQ ID NO: 63), FRYL-003 (SEQ ID NO: 64), GIMAP8-001 (SEQ ID NO: 65), HSF1-001 (SEQ ID NO: 66), KNT-001 (SEQ ID NO: 67), MAU-001 (SEQ ID NO: 68), MCM4-001 (SEQ ID NO: 69), MPPE1-001 (SEQ ID NO: 71), MYO1B-002 (SEQ ID NO: 72), PRR12-001 (SEQ ID NO: 73), PTRF-003 (SEQ ID NO: 74), RASGRP1-001 (SEQ ID NO: 75), SMARCD1-001 (SEQ ID NO: 76), TGM2-001 (SEQ ID NO: 77), VAV1-001 (SEQ ID NO: 78), VIM-009 (SEQ ID NO: 317), FARSA-001 (SEQ ID NO: 306), ALOX15B-003 (SEQ ID NO: 304), FAM114A2-002 (SEQ ID NO: 305), GPR56-002 (SEQ ID NO: 307), IGHD-002 (SEQ ID NO: 308), NOMAP-3-0972 (SEQ ID NO: 309), NOMAP-3-1265 (SEQ ID NO: 310), NOMAP-3-1408 (SEQ ID NO: 311), NOMAP-3-1587 (SEQ ID NO: 312), NOMAP-3-1768 (SEQ ID NO: 313), NOMAP-5-0765 (SEQ ID NO: 314), PDCD10-004 (SEQ ID NO: 315), TSN-001 (SEQ ID NO: 316), ARMC9-002 (SEQ ID NO: 187), CLI-001 (SEQ ID NO: 188), COPG1-001 (SEQ ID NO: 190), COPS7A-001 (SEQ ID NO: 192), EIF-009 (SEQ ID NO: 194), EXT2-006 (SEQ ID NO: 196), LMNA-001 (SEQ ID NO: 198), PKM-005 (SEQ ID NO: 200), PSMB3-002 (SEQ ID NO: 202), RPL-007 (SEQ ID NO: 204), SPATS2L-003 (SEQ ID NO: 206), SYNE1-002 (SEQ ID NO: 208), TGM2-002 (SEQ ID NO: 210) и TPR-004 (SEQ ID NO: 212), в комплексе с белком МНС, предпочтительно указанный антигенсвязывающий белок не связывается значительно с IFT17-003 (SEQ ID NO: 60) в комплексе с белком МНС.

9. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 8, где антигенсвязывающий белок является мультиспецифическим, например, тетра-, три- или биспецифическим, предпочтительно биспецифическим, в частности, указанный антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифический TCR, биспецифическое антитело или биспецифическую молекулу TCR-антитела.

10. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 9, где первый и второй полипептид содержатся в одной полипептидной цепи или двух полипептидных цепях, где предпочтительно V_A содержится в первой полипептидной цепи, и V_B содержится во второй полипептидной цепи.

11. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 10, где V_A дополнительно содержит одну или несколько каркасных областей, предпочтительно все каркасные области, выбранные из группы, состоящей из FR1-a, FR2-a, FR3-a и FR4-a, где

- FR1-a содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 345 или SEQ ID NO: 346, или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 345, предпочтительно содержащей K или N, более предпочтительно K, в положении 20 и/или L или M более предпочтительно L, в положении 2,

- FR2-a содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 347, или SEQ ID NO: 348, или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 347, предпочтительно содержащей L, I или M, более предпочтительно L или I, в положении 39, A или D, более предпочтительно A, в положении 47, K или W, предпочтительно K, в положении 44, F или A, предпочтительно F, в положении 52 и/или Y или V, предпочтительно Y, в положении 55,

- FR3-a содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 349 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 349, предпочтительно содержащей T или K, более предпочтительно T, в положении 92 и/или D или G, предпочтительно D, в положении 93,

- FR4-a содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 350 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 350, и

V_B дополнительно содержит одну или несколько каркасных областей, предпочтительно все каркасные области, выбранные из группы, состоящей из FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b, где

- FR1-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 351 или SEQ ID NO: 352 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 351, предпочтительно содержащей H или N, более предпочтительно H, в положении 10, E, L или K, предпочтительно E, в положении 11 и/или R или H, в положении 22,

- FR2-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 353 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 353, предпочтительно содержащей R или K, более предпочтительно R, в положении 43, E или Q, предпочтительно E, в положении 44, M или P, более предпочтительно P, в положении 46, и/или R или Q, более предпочтительно Q, в положении 48,

- FR3-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 354 или SEQ ID NO: 355 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 354, предпочтительно содержащей D, A, E, R, K Q, N или S, более предпочтительно D, A, E, Q, N или S, более предпочтительно D или A, далее более предпочтительно D, в положении 84, и

- FR4-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 356 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 356.

12. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 11, где

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, предпочтительно содержащей CDRa1 согласно SEQ ID NO: 16, CDRa2 согласно SEQ ID NO: 32 и CDRa3 согласно SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, или SEQ ID NO: 9, и дополнительно K или N, предпочтительно K, в положении 20, L, M, или I, предпочтительно L или I, в положении 39, K или W, предпочтительно K, в положении 44, F или A, предпочтительно F, в положении 52, Y или V, предпочтительно Y, в положении 55, T или K, предпочтительно T, в положении 92 и/или D или G, предпочтительно D, в положении 93, и

- V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 134 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 134, предпочтительно содержащей CDRb1 согласно SEQ ID NO: 10, CDRb2 согласно SEQ ID NO: 36, и CDRb3 согласно SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 301 или SEQ ID NO: 283, и дополнительно E, L или K, предпочтительно E, в положении 11, R или H в положении 22, E или Q, предпочтительно E, в положении 44, P или M, предпочтительно P, в положении 46, Q или R, предпочтительно Q, в положении 48 и/или D, A, E, Q, N, или S, предпочтительно D или A, в положении 84.

13. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 12, где
 - V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 137 или SEQ ID NO: 142, и

- V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147 или SEQ ID NO: 148.

14. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пп. 1 - 13, дополнительно содержащий одно или более из следующего:

- (i) один или несколько дополнительных антигенсвязывающих сайтов,
- (ii) трансмембранную область, необязательно включающую цитоплазматическую сигнальную область,
- (iii) диагностический агент,
- (iv) терапевтический агент и
- (v) РК-модифицирующий фрагмент.

15. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 14, дополнительно содержащий переменный домен легкой цепи антитела (V_L) и переменный домен тяжелой цепи антитела (V_H).

16. Антигенсвязывающий белок согласно пункту 15, где V_L и V_H связываются с антигеном, выбранным из группы, состоящей из CD2, CD3, в частности, CD3 γ , CD3 δ и/или CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD90, CD94, CD95, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, Fc ϵ RI, TCR α/β и TCR γ/δ , HLA-DR и 4-1 BB или их комбинаций, и/или связываются с эффекторной клеткой, в частности Т-клеткой или природной клеткой-киллером (NK-клеткой).

17. Антигенсвязывающий белок согласно пункту 15 или 16, где антигенсвязывающий белок содержит первую и вторую полипептидные цепи,

где

первая полипептидная цепь представлена формулой [Ia]:

$$V_1-L_1-D_1-L_2-V_2-L_3-D_2 \quad [Ia],$$

и вторая полипептидная цепь представлена формулой [IIa]

$$V_3-L_4-D_3-L_5-V_4-L_6-D_4 \quad [IIa],$$

где

- V_1, V_2, V_3 и V_4 представляют собой переменные домены, где один из $V_1 - V_4$ представляет собой V_A , один представляет собой V_B , один представляет собой V_L , и один представляет собой V_H ,

- D_1, D_2, D_3 и D_4 представляют собой домены димеризации и могут присутствовать или отсутствовать, где D_1 и D_3 , и D_2 и D_4 специфически связываются друг с другом, и по меньшей мере одна пара D_1 и D_3 , или D_2 и D_4 присутствует, и

- L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 и L_6 представляют собой линкеры, где L_1 и L_4 присутствуют, и L_2, L_3, L_5 и L_6 могут присутствовать или отсутствовать.

18. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 15 - 17, где антигенсвязывающий белок содержит первую и вторую полипептидные цепи,

где

первая полипептидная цепь представлена формулой [Ib]:

$V_1-L_1-V_2-L_3-D_2$ [Ib],

and вторая полипептидная цепь представлена формулой [IIb]:

$V_3-L_4-V_4-L_6-D_4$ [IIb],

где

- V_1, V_2, V_3, V_4 представляют собой переменные домены, предпочтительно где один из V_1 , и V_2 представляет собой V_A , один из V_3 , и V_4 представляет собой V_B , и из оставшихся двух переменных доменов один представляет собой V_L , а другой представляет собой V_H ,

- D_2 и D_4 представляют собой домены димеризации, предпочтительно F_c -домены, и

- L_1, L_3, L_4 и L_6 представляют собой линкеры, где L_3 и L_6 могут присутствовать или отсутствовать.

19. Антигенсвязывающий белок согласно пункту 17 или 18, где

(1) V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_B , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_L ,

(2) V_1 представляет собой V_B , V_2 представляет собой V_H , V_3 представляет собой V_L , и V_4 представляет собой V_A ,

(3) V_1 представляет собой V_B , V_2 представляет собой V_L , V_3 представляет собой V_H , и V_4 представляет собой V_A ,

(4) V_1 представляет собой V_L , V_2 представляет собой V_B , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_H ,

(5) V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_B , V_3 представляет собой V_L , и V_4 представляет собой V_A ,

(6) V_1 представляет собой V_B , V_2 представляет собой V_H , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_L ,

(7) V_1 представляет собой V_L , V_2 представляет собой V_B , V_3 представляет собой V_H , и V_4 представляет собой V_A ,

(8) V_1 представляет собой V_B , V_2 представляет собой V_L , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_H ,

(9) V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_L , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_B ,

(10) V_1 представляет собой V_L , V_2 представляет собой V_H , V_3 представляет собой V_A , и V_4 представляет собой V_B ,

(11) V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_L , V_3 представляет собой V_B , и V_4 представляет собой V_A , или

(12) V_1 представляет собой V_L , V_2 представляет собой V_H , V_3 представляет собой V_B , и V_4 представляет собой V_A .

20. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 19, содержащий
 - первую полипептидную цепь, выбранную из SEQ ID NO: 100, 103, 105, 106, 111, 122, 126, 128, 151, 155, 156, 157, 158, 159, 166, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 178, 179, 180, 181, 183, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 285, 291, 295, 299 и 303, и

- вторую полипептидную цепь, выбранную из SEQ ID NO: 101, 102, 104, 107, 110, 119, 121, 131, 133, 143, 152, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 168, 170, 172, 174, 176, 182, 184, 185, 186, 216, 218, 220, 222, 224, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 282, 284, 296 или 300.

21. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 13, где V_A содержится в α - или γ -цепи TCR, и/или V_B содержится в β - или δ -цепи TCR.

22. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 21.

23. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно пункту 22.

24. Клетка-хозяин, содержащая антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 21, или нуклеиновую кислоту согласно пункту 22, или вектор согласно пункту 23.

25. Клетка-хозяин согласно пункту 24, где клетка-хозяин представляет собой
 - лимфоцит, предпочтительно Т-лимфоцит или клетку-предшественник Т-лимфоцита, например, CD4 или CD8-положительную Т-клетку, или

- клетку для рекомбинантной экспрессии, такую как клетка яичника китайского хомячка (СНО) или дрожжевая клетка.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 21, нуклеиновую кислоту согласно пункту 22, вектор согласно пункту 23 или клетку-хозяин согласно пункту 24 или 25 и фармацевтически приемлемый носитель.

27. Способ получения антигенсвязывающего белка согласно любому из пунктов 1 - 21, предусматривающий

- a. предоставление клетки-хозяина,
- b. предоставление генетической конструкции, содержащей кодирующую последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 21,
- c. введение указанной генетической конструкции в указанную клетку-хозяин и
- d. экспрессию указанной генетической конструкции указанной клеткой-хозяином.

28. Способ согласно пункту 27, дополнительно предусматривающий выделение и очистку антигенсвязывающего белка от клетки-хозяина и необязательно восстановление антигенсвязывающего белка в Т-клетке.

29. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 21, нуклеиновая кислота согласно пункту 22, вектор согласно пункту 23, клетка-хозяин согласно пункту 24 или 25 или фармацевтическая композиция согласно пункту 26 для применения в медицине.

29. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 21, нуклеиновая кислота согласно пункту 22 или вектор согласно пункту 23, клетка-хозяин согласно пункту 24 или 25 или фармацевтическая композиция согласно пункту 26 для применения для диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания, такого как рак, где указанный рак выбран из группы раковых заболеваний, состоящей из острого миелолейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, рака желчного пузыря, глиобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, амеланотической меланомы, неходжкинской лимфомы, аденокарциномы немелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого, рака яичников, рака пищевода, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легкого, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, остеосаркомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректальной карциномы и синовиальной саркомы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий белок, специфически связывающийся с антигенным пептидом PRAME, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности SLLQHLIGL согласно SEQ ID NO: 50 и находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), причем антигенсвязывающий белок содержит

(а) первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, где

CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности VKEFQD (SEQ ID NO: 16) или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 16 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ALYNNLDMR (SEQ ID NO: 33), или ALYNNYDMR (SEQ ID NO: 34), или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34 одной, двумя или тремя, предпочтительно одной или двумя, аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

необязательно CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности FGPYGKE (SEQ ID NO: 32) или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 32 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

(b) второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где

CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SGHNS (SEQ ID NO: 10) или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 10 одной или двумя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности ASSX₁GX₂X₃DX₄QY (SEQ ID NO: 327), где X₁ представляет собой P, A или T, X₂ представляет собой A или S, X₃ представляет собой T или I, и X₄ представляет собой K или A, или аминокислотной последовательности, отличающейся от SEQ ID NO: 327 одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами, и

необязательно CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности FQNTAV (SEQ ID NO: 36) или аминокислотной последовательности

CDRb2, отличающейся от SEQ ID NO: 36 одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью аминокислотными мутациями, предпочтительно аминокислотными заменами.

2. Антигенсвязывающий белок по п. 1, где указанный антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из по меньшей мере 3, 4 или 5 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 5, 6, 7 и 8, в частности, 3, 5 и 7, согласно SEQ ID NO: 50, предпочтительно с функциональным эпитопом, состоящим из аминокислотных положений 3, 5 и 7, или 3, 5, 6 и 7, или 3, 5, 7 и 8, или 3, 5, 6, 7 и 8, согласно SEQ ID NO: 50, но предпочтительно не аминокислотных положений 1 и 4 согласно SEQ ID NO: 50, или

специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из по меньшей мере 6 или 7 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 согласно SEQ ID NO: 50.

3. Антигенсвязывающий белок по п. 1 или 2, где указанный антигенсвязывающий белок не связывается значительно с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из TMED9-001 (SEQ ID NO: 51), CAT-001 (SEQ ID NO: 52), DDX60L-001 (SEQ ID NO: 53), LRRC70-001 (SEQ ID NO: 54), PTPLB-001 (SEQ ID NO: 55), HDAC5-001 (SEQ ID NO: 56), VPS13B-002 (SEQ ID NO: 57), ZNF318-001 (SEQ ID NO: 58), CCDC51-001 (SEQ ID NO: 59), IFT17-003 (SEQ ID NO: 60), DIAPH1-004 (SEQ ID NO: 62), FADS2-001 (SEQ ID NO: 63), FRYL-003 (SEQ ID NO: 64), GIMAP8-001 (SEQ ID NO: 65), HSF1-001 (SEQ ID NO: 66), KNT-001 (SEQ ID NO: 67), MAU-001 (SEQ ID NO: 68), MCM4-001 (SEQ ID NO: 69), MPPE1-001 (SEQ ID NO: 71), MYO1B-002 (SEQ ID NO: 72), PRR12-001 (SEQ ID NO: 73), PTRF-003 (SEQ ID NO: 74), RASGRP1-001 (SEQ ID NO: 75), SMARCD1-001 (SEQ ID NO: 76), TGM2-001 (SEQ ID NO: 77), VAV1-001 (SEQ ID NO: 78), VIM-009 (SEQ ID NO: 317), FARSA-001 (SEQ ID NO: 306), ALOX15B-003 (SEQ ID NO: 304), FAM114A2-002 (SEQ ID NO: 305), GPR56-002 (SEQ ID NO: 307), IGHD-002 (SEQ ID NO: 308), NOMAP-3-0972 (SEQ ID NO: 309), NOMAP-3-1265 (SEQ ID NO: 310), NOMAP-3-1408 (SEQ ID NO: 311), NOMAP-3-1587 (SEQ ID NO: 312), NOMAP-3-1768 (SEQ ID NO: 313), NOMAP-5-0765 (SEQ ID NO: 314), PDCD10-004 (SEQ ID NO: 315), TSN-001 (SEQ ID NO: 316), ARMC9-002 (SEQ ID NO: 187), CLI-001 (SEQ ID NO: 188), COPG1-001 (SEQ ID NO: 190), COPS7A-001 (SEQ ID NO: 192), EIF-009 (SEQ ID NO: 194), EXT2-006 (SEQ ID NO: 196), LMNA-001 (SEQ ID NO: 198), PKM-005 (SEQ ID NO: 200), PSMB3-002 (SEQ ID NO: 202), RPL-007 (SEQ ID NO: 204), SPATS2L-003 (SEQ ID NO: 206), SYNE1-002 (SEQ ID NO: 208), TGM2-002 (SEQ ID NO: 210) и TPR-004 (SEQ ID

NO: 212), в комплексе с белком МНС, предпочтительно указанный антигенсвязывающий белок не связывается значительно с IFT17-003 (SEQ ID NO: 60) в комплексе с белком МНС.

4. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 3, где антигенсвязывающий белок является мультиспецифическим, например, тетра-, три- или биспецифическим, предпочтительно биспецифическим, в частности, указанный антигенсвязывающий белок представляет биспецифический TCR, биспецифическое антитело или биспецифическую молекулу TCR-антитело.

5. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 4, где

- первый и второй полипептид содержатся в одной полипептидной цепи или двух полипептидных цепях, где предпочтительно V_A содержится в первой полипептидной цепи, и V_B содержится во второй полипептидной цепи, и/или

- переменный домен V_A представляет собой домен V_{α} или V_{γ} , и переменный домен V_B представляет собой домен V_{β} или V_{δ} .

6. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 5, где V_A дополнительно содержит одну или более каркасных областей, предпочтительно все каркасные области, выбранные из группы, состоящей из FR1-a, FR2-a, FR3-a и FR4-a, где

- FR1-a содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 345 или SEQ ID NO: 346, или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 345, предпочтительно содержащей K или N, более предпочтительно K, в положении 20 и/или L или M, более предпочтительно L, в положении 2,

- FR2-a содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 347 или SEQ ID NO: 348, или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 347, предпочтительно содержащей L, I или M, более предпочтительно L или I, в положении 39, A или D, более предпочтительно A, в положении 47, K или W, предпочтительно K, в положении 44, F или A, предпочтительно F, в положении 52 и/или Y или V, предпочтительно Y, в положении 55,

- FR3-a содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 349 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 349, предпочтительно содержащей T или K, более предпочтительно T, в положении 92 и/или D или G, предпочтительно D, в положении 93,

- FR4-a содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 350 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 350, и

V_B дополнительно содержит одну или более каркасных областей, предпочтительно все каркасные области, выбранные из группы, состоящей из FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b, где

- FR1-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 351 или SEQ ID NO: 352 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 351, предпочтительно содержащей H или N, более предпочтительно H, в положении 10, E, L или K, предпочтительно E, в положении 11 и/или R или H, в положении 22,

- FR2-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 353 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 353, предпочтительно содержащей R или K, более предпочтительно R, в положении 43, E или Q, предпочтительно E, в положении 44, M или P, более предпочтительно P, в положении 46, и/или R или Q, более предпочтительно Q, в положении 48,

- FR3-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 354 или SEQ ID NO: 355 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 354, предпочтительно содержащей D, A, E, R, K Q, N или S, более предпочтительно D, A, E, Q, N или S, более предпочтительно D или A, даже более предпочтительно D, в положении 84, и

- FR4-b содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 356 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 356.

7. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 6, где

- V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, предпочтительно содержащей CDRa1 согласно SEQ ID NO: 16, CDRa2 согласно SEQ ID NO: 32 и CDRa3 согласно SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, или SEQ ID NO: 9, и дополнительно K или N, предпочтительно K, в положении 20, L, M, или I, предпочтительно L или I, в положении 39, K или W, предпочтительно K, в положении 44, F или A, предпочтительно F, в положении 52, Y или V, предпочтительно Y, в положении 55, T или K, предпочтительно T, в положении

92 и/или D или G, предпочтительно D, в положении 93, в частности, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 137 или SEQ ID NO: 142, и

- V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 134 или аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичной последовательности согласно SEQ ID NO: 134, предпочтительно содержащей CDRb1 согласно SEQ ID NO: 10, CDRb2 согласно SEQ ID NO: 36, и CDRb3 согласно SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 301 или SEQ ID NO: 283, и дополнительно E, L или K, предпочтительно E, в положении 11, R или H в положении 22, E или Q, предпочтительно E, в положении 44, P или M, предпочтительно P, в положении 46, Q или R, предпочтительно Q, в положении 48 и/или D, A, E, Q, N, или S, предпочтительно D или A, в положении 84, в частности, V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147 или SEQ ID NO: 148.

8. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 7, дополнительно содержащий переменный домен легкой цепи антитела (V_L) и переменный домен тяжелой цепи антитела (V_H), где предпочтительно V_L и V_H связываются с антигеном, выбранным из группы, состоящей из CD2, CD3, в частности, CD3γ, CD3δ и/или CD3ε, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD90, CD94, CD95, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, FcεRI, TCRα/β и TCRγ/δ, HLA-DR и 4-1 BB или их комбинаций, и/или связываются с эффекторной клеткой, в частности Т-клеткой или природной клеткой-киллером.

9. Антигенсвязывающий белок по п. 8, где антигенсвязывающий белок содержит первую и вторую полипептидные цепи, и где

первая полипептидная цепь представлена формулой [Ia]:

$$V_1-L_1-D_1-L_2-V_2-L_3-D_2 \quad [Ia],$$

и вторая полипептидная цепь представлена формулой [IIa]

$$V_3-L_4-D_3-L_5-V_4-L_6-D_4 \quad [IIa],$$

где

- V_1, V_2, V_3 и V_4 представляют собой переменные домены, где один из $V_1 - V_4$ представляет собой V_A , один представляет собой V_B , один представляет собой V_L , и один представляет собой V_H ,

- D_1, D_2, D_3 и D_4 представляют собой домены димеризации и могут присутствовать или отсутствовать, где D_1 и D_3 , и D_2 и D_4 специфически связываются друг с другом, и по меньшей мере одна пара D_1 и D_3 или D_2 и D_4 присутствует, и

- L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 и L_6 представляют собой линкеры, где L_1 и L_4 присутствуют, и L_2, L_3, L_5 и L_6 могут присутствовать или отсутствовать.

10. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 9, содержащий

- первую полипептидную цепь, выбранную из SEQ ID NO: 100, 103, 105, 106, 111, 122, 126, 128, 151, 155, 156, 157, 158, 159, 166, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 178, 179, 180, 181, 183, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 285, 291, 295, 299 и 303, и

- вторую полипептидную цепь, выбранную из SEQ ID NO: 101, 102, 104, 107, 110, 119, 121, 131, 133, 143, 152, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 168, 170, 172, 174, 176, 182, 184, 185, 186, 216, 218, 220, 222, 224, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 282, 284, 296 или 300.

11. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 10.

12. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 11.

13. Клетка-хозяин, содержащая антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 10, или нуклеиновую кислоту по п. 11, или вектор по п. 12, где предпочтительно клетка-хозяин представляет собой лимфоцит, предпочтительно Т-лимфоцит или клетку-предшественник Т-лимфоцита, или клетку для рекомбинантной экспрессии, такую как клетка яичника китайского хомячка (СНО) или дрожжевая клетка.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 10, нуклеиновую кислоту по п. 11, вектор по п. 12 или клетку-хозяин по п. 13 и фармацевтически приемлемый носитель.

15. Способ получения антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1 - 10, предусматривающий

а. предоставление клетки-хозяина,

б. предоставление генетической конструкции, содержащей кодирующую последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 10,

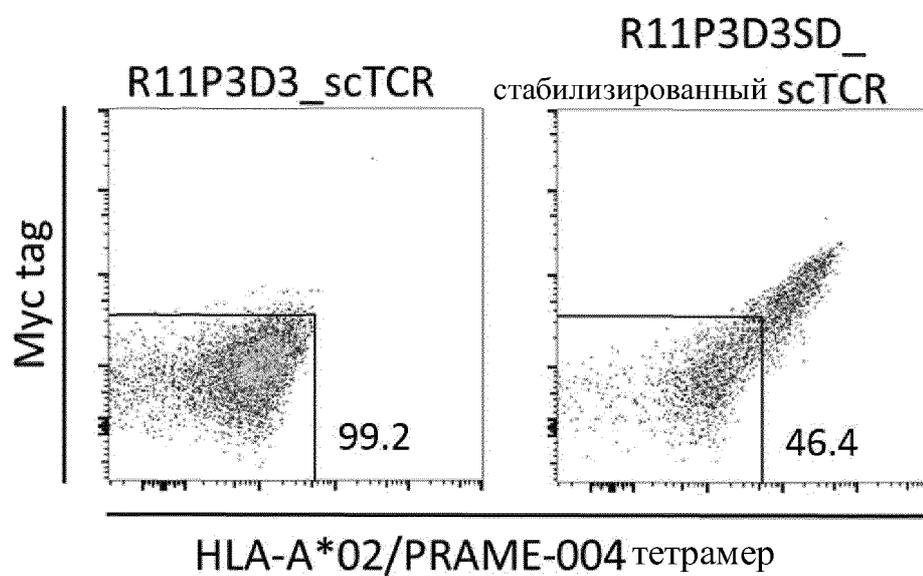
с. введение указанной генетической конструкции в указанную клетку-хозяин и

d. экспрессию указанной генетической конструкции указанной клеткой-хозяином,

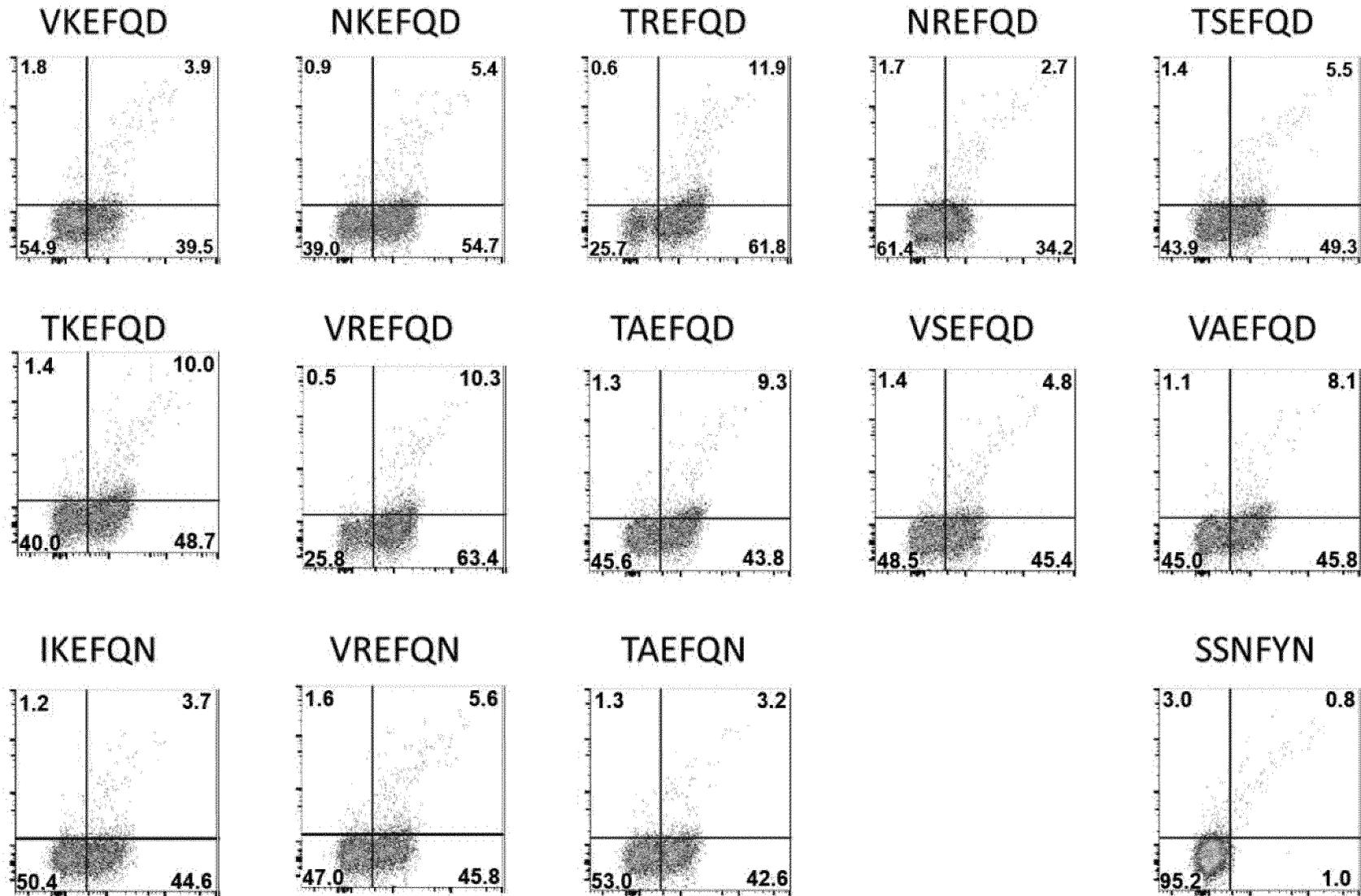
e. необязательно дополнительно предусматривающий выделение и очистку антигенсвязывающего белка от клетки-хозяина и необязательно восстановление антигенсвязывающего белка в Т-клетке.

16. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 10, нуклеиновая кислота по п. 11, вектор по п. 12, клетка-хозяин по п. 13 или фармацевтическая композиция по п. 14 для применения в медицине, в частности, для применения для диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания, такого как рак, где указанный рак выбран из группы раковых заболеваний, состоящей из острого миелолейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, рака желчного пузыря, глиобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, амеланотической меланомы, неходжкинской лимфомы, аденокарциномы немелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного немелкоклеточного рак легкого, рака яичников, рака пищевода, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легкого, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, остеосаркомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректальной карциномы и синовиальной саркомы.

Фиг. 1

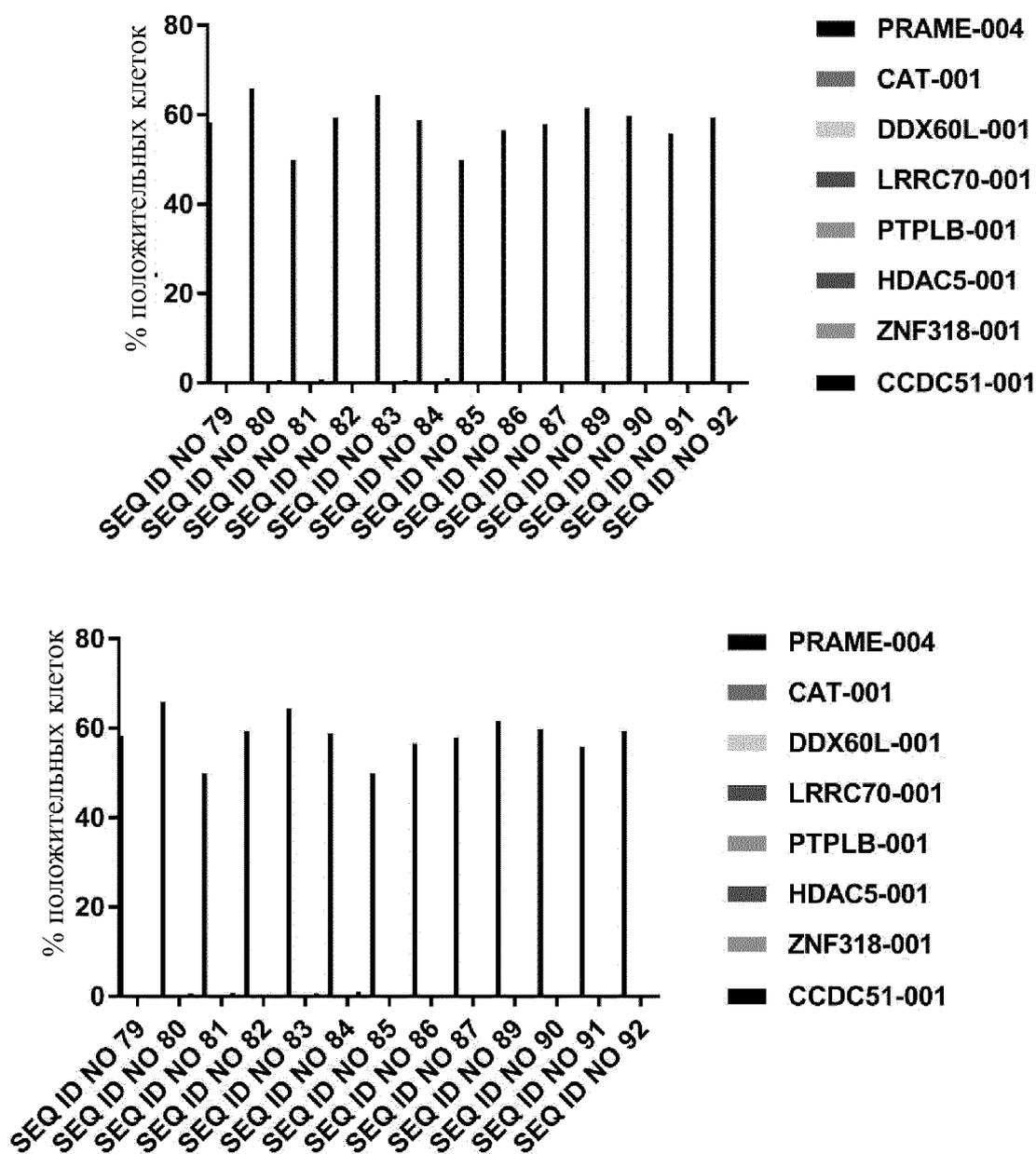


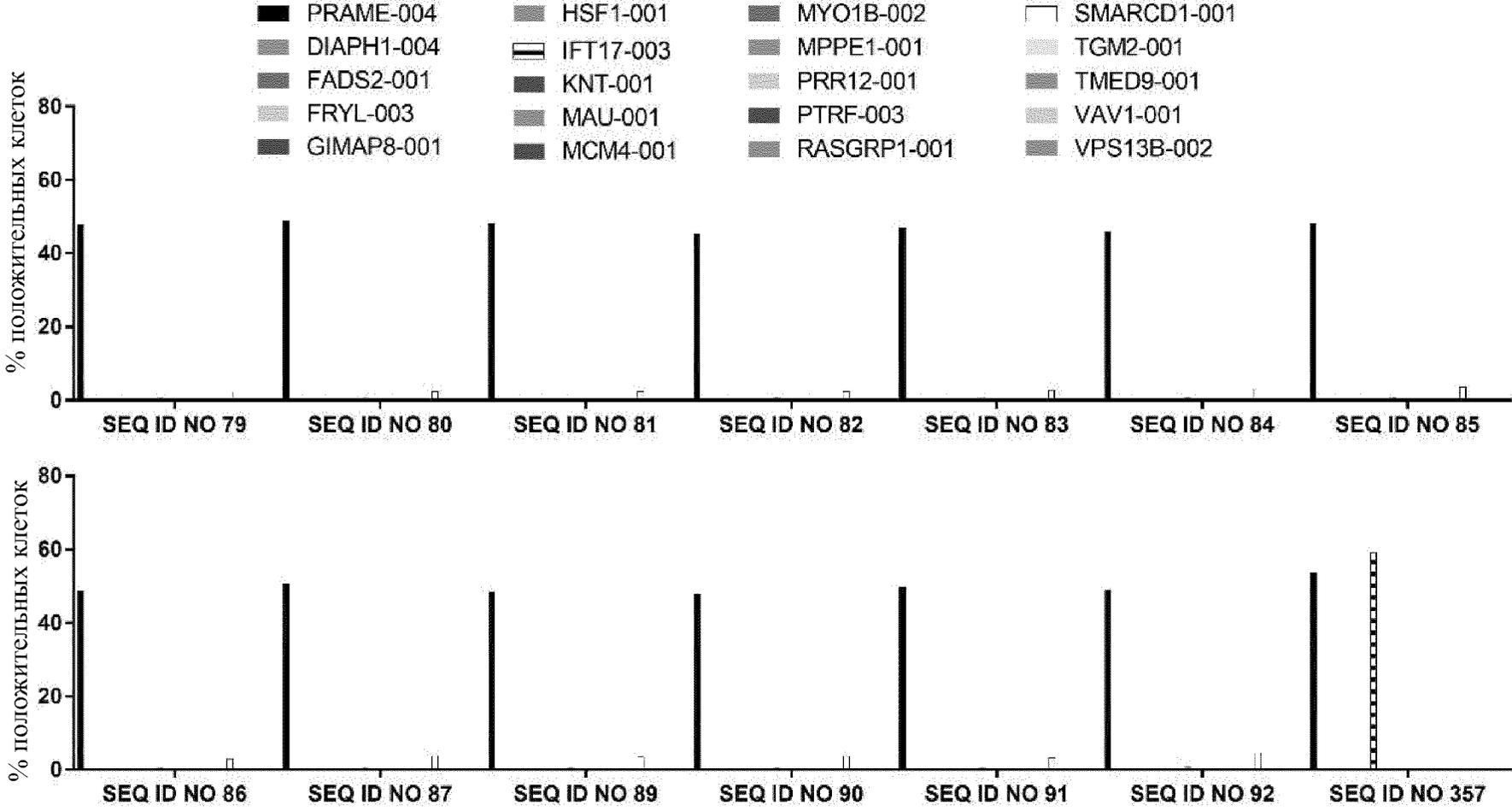
HLA-A*02/SimPer тетрамры (10 нМ каждый)



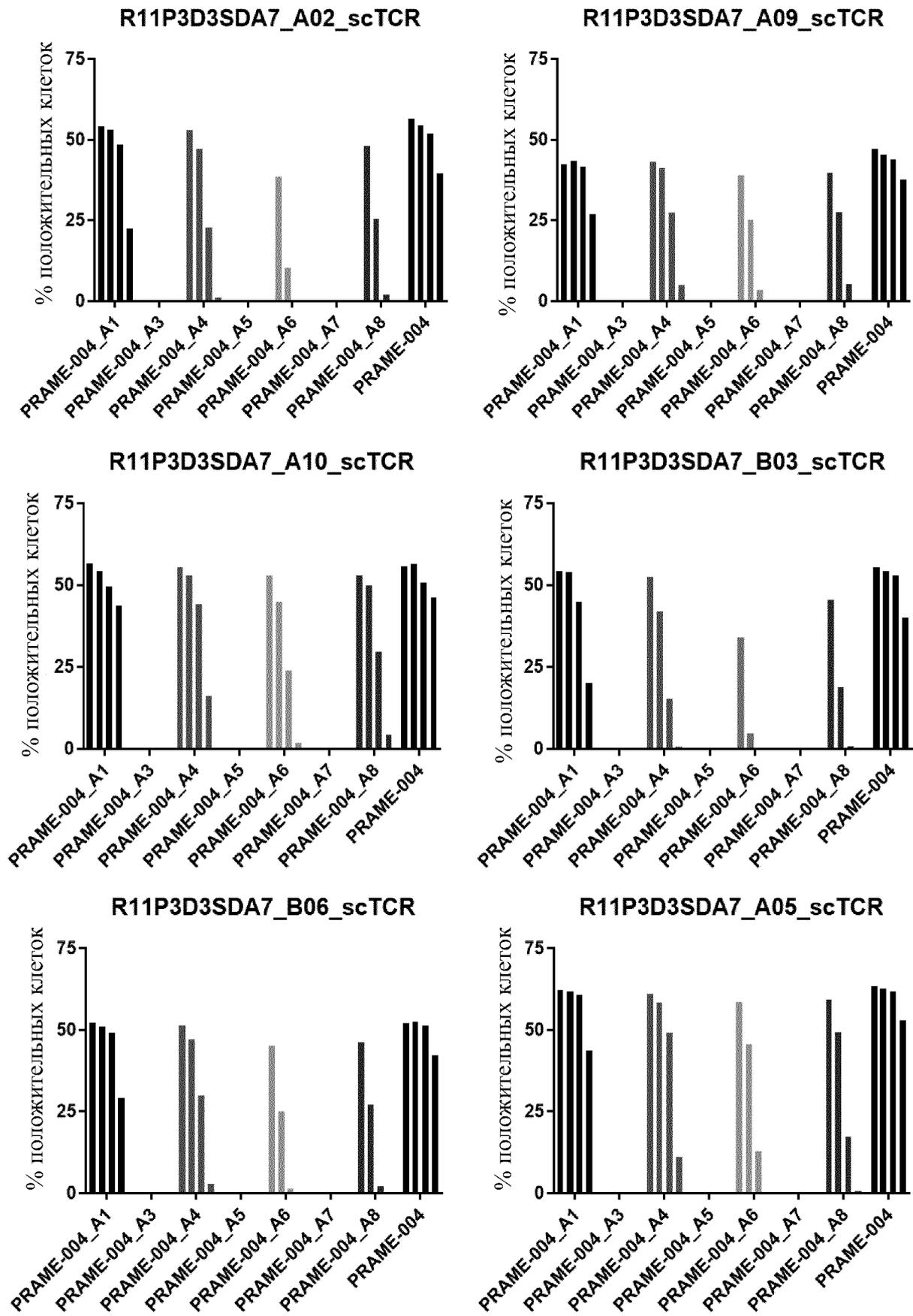
HLA-A*02/PRAME-004 мономер (10 нМ)

Фиг. 3

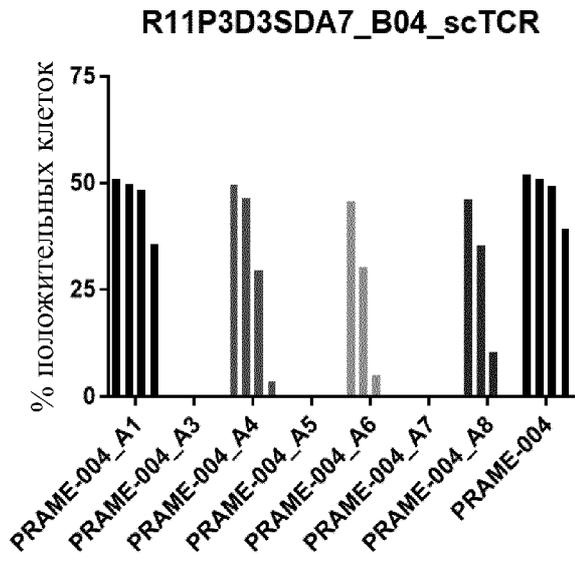




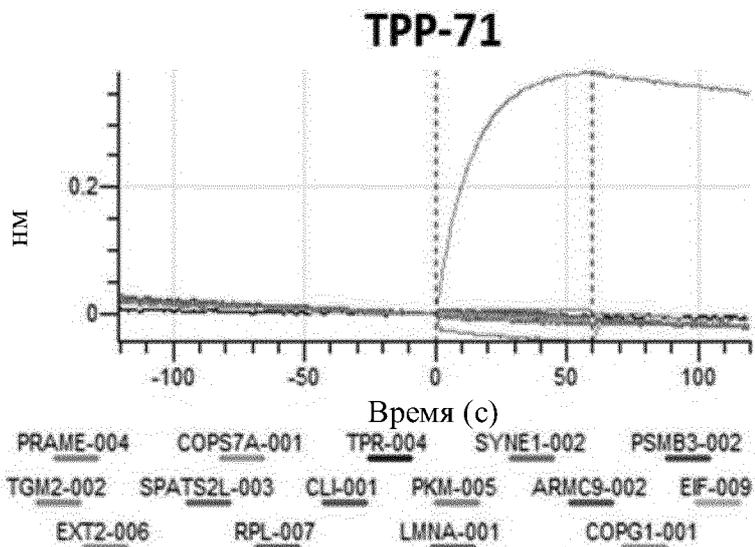
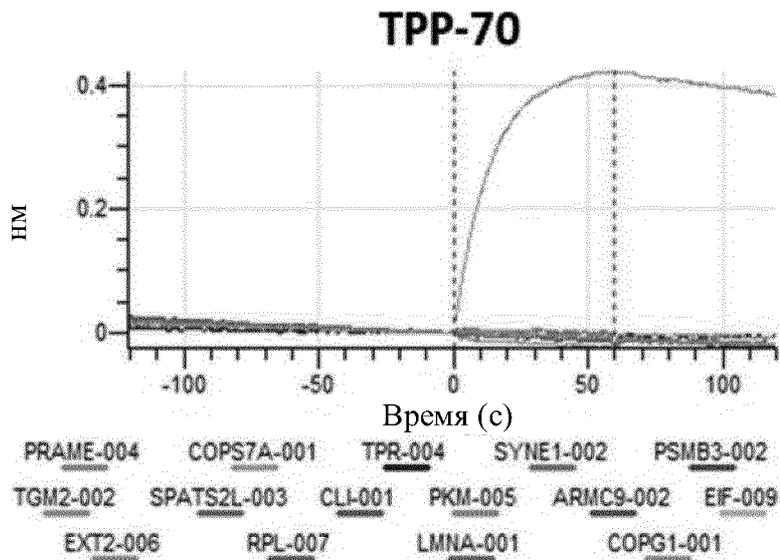
Фиг. 5



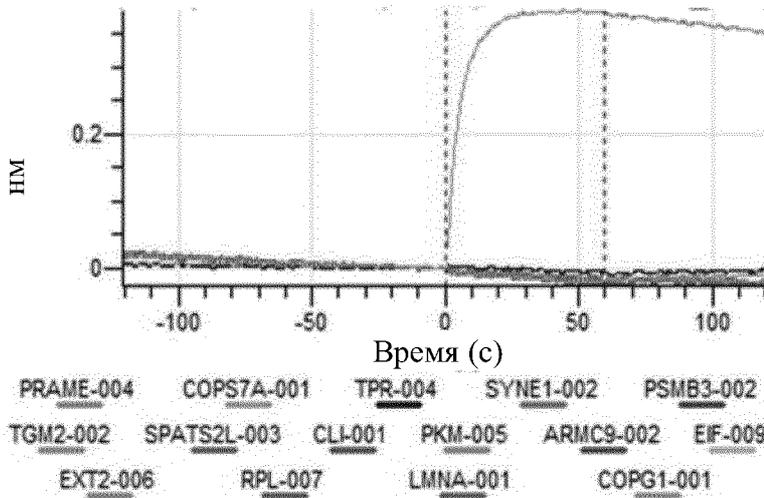
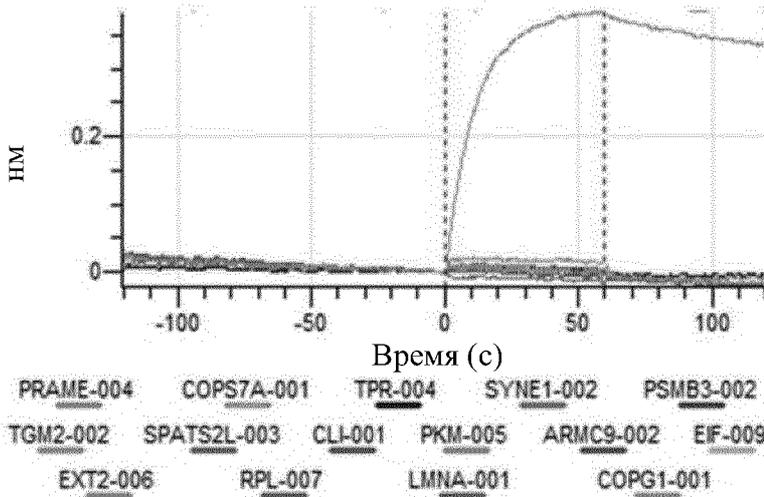
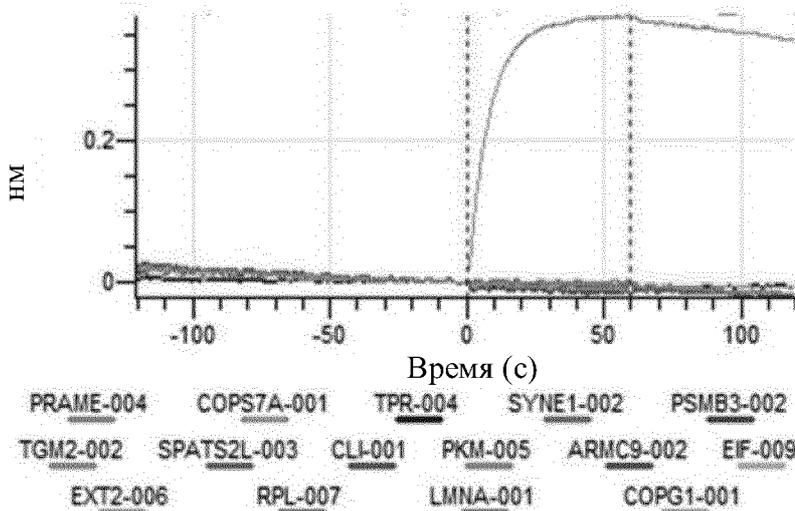
Фиг. 5 (продолжение)



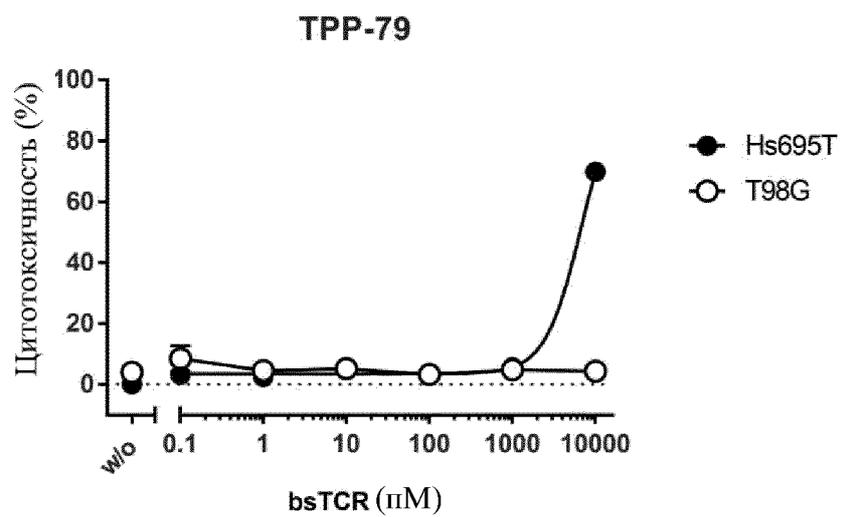
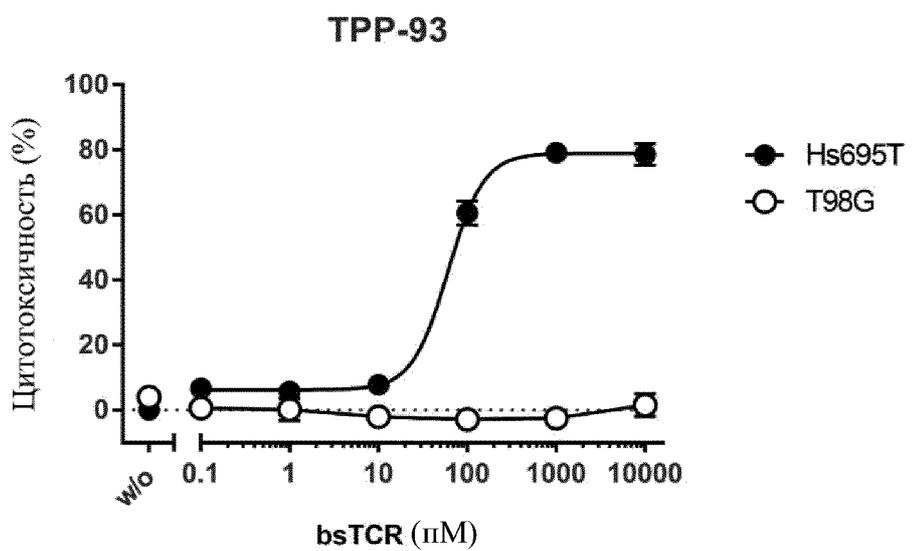
Фиг. 6



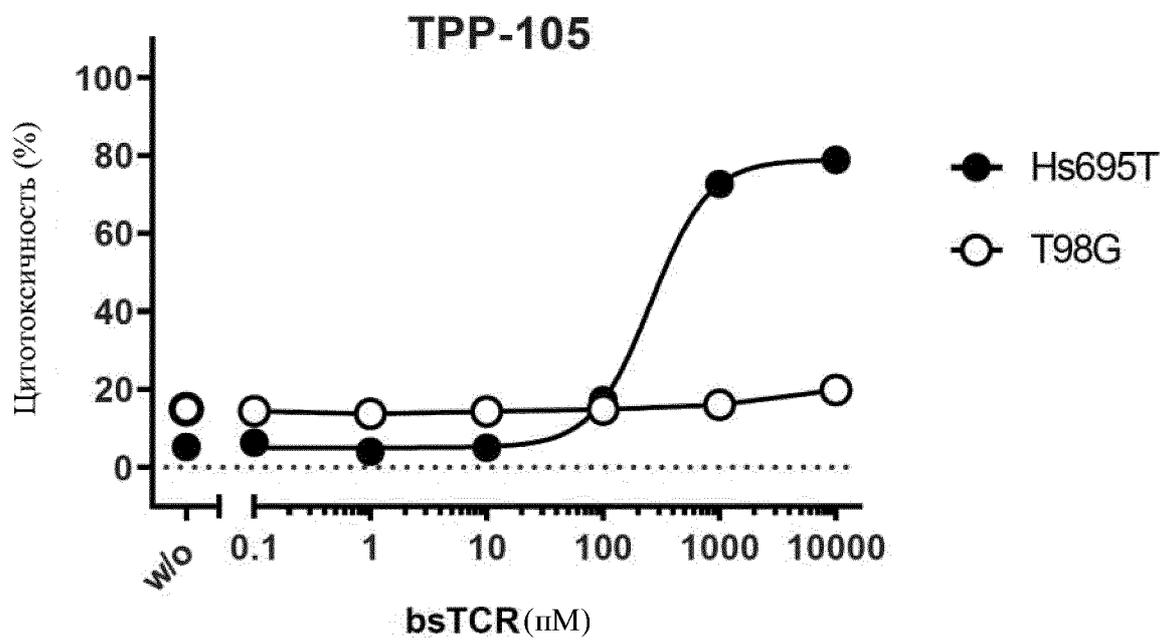
Фиг. 6 (продолжение)

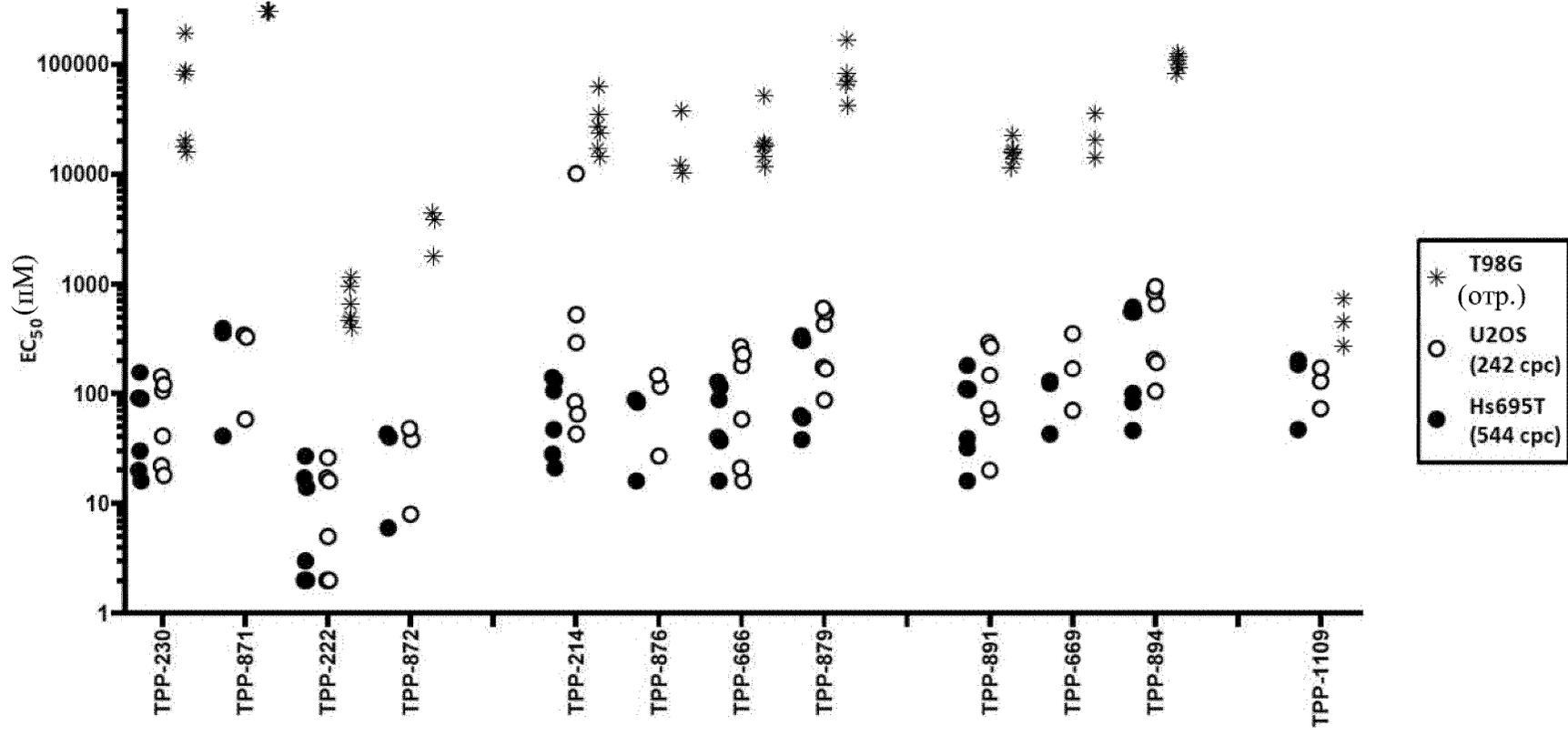
ТРР-72**ТРР-73****ТРР-74**

Фиг. 7



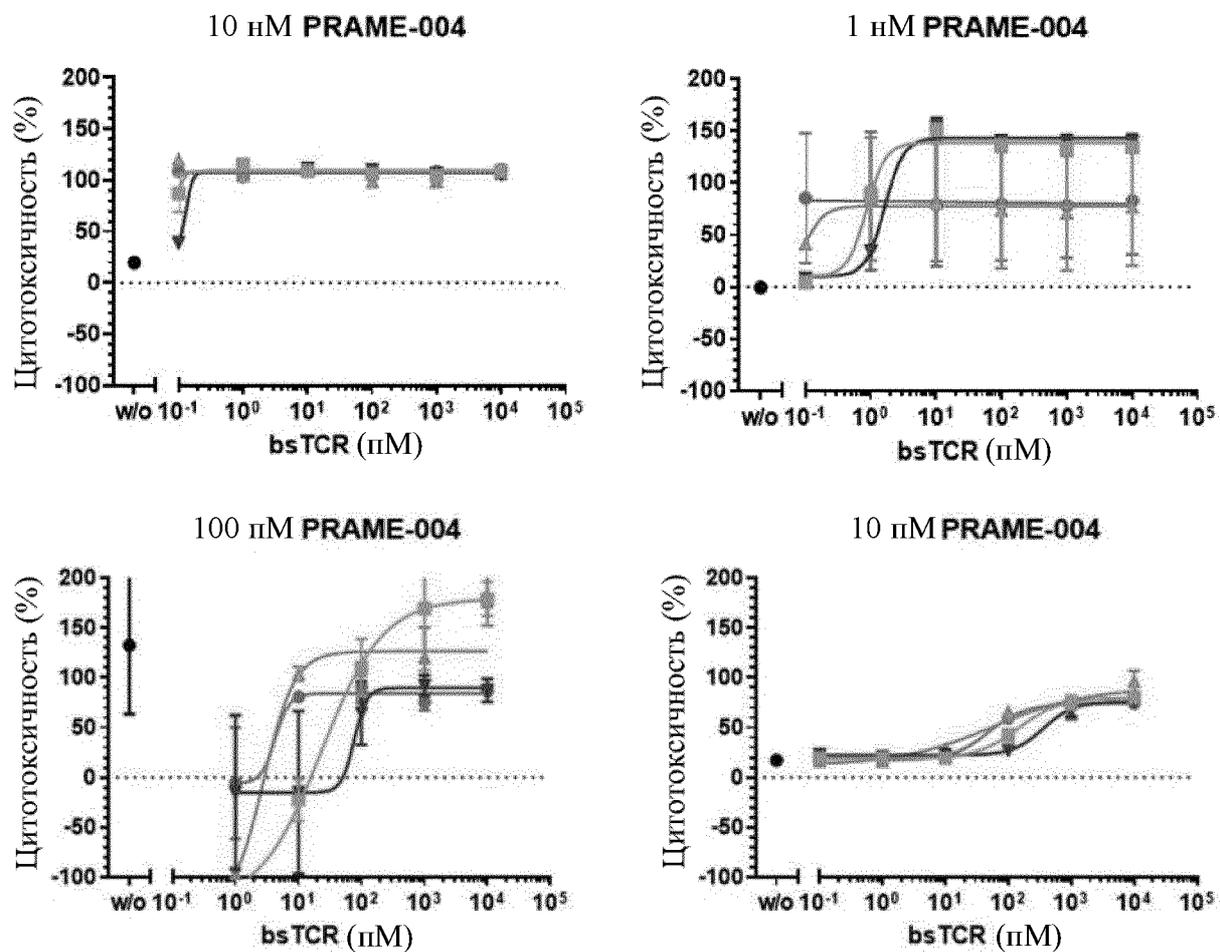
Фиг. 8





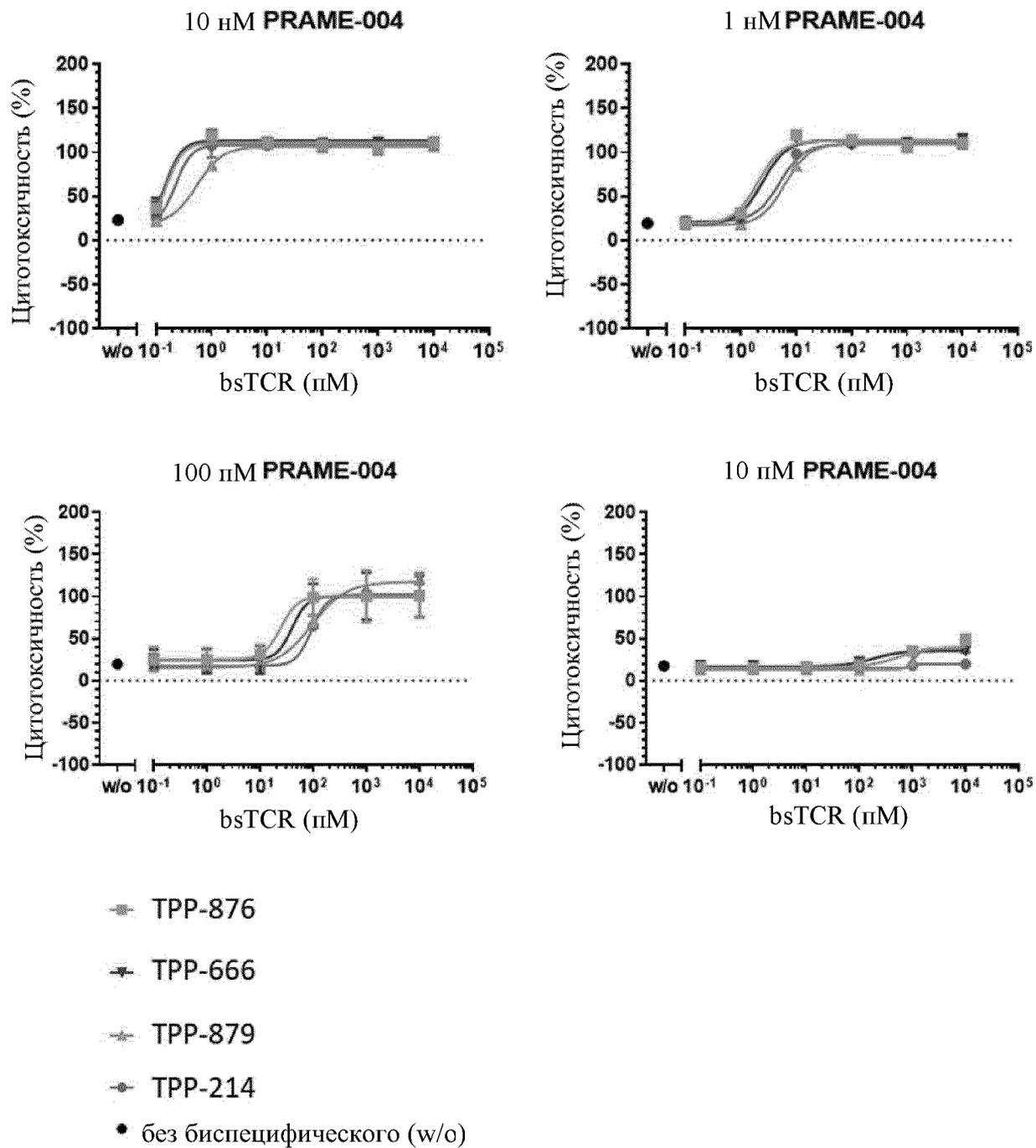
Фиг. 9

Фиг. 10

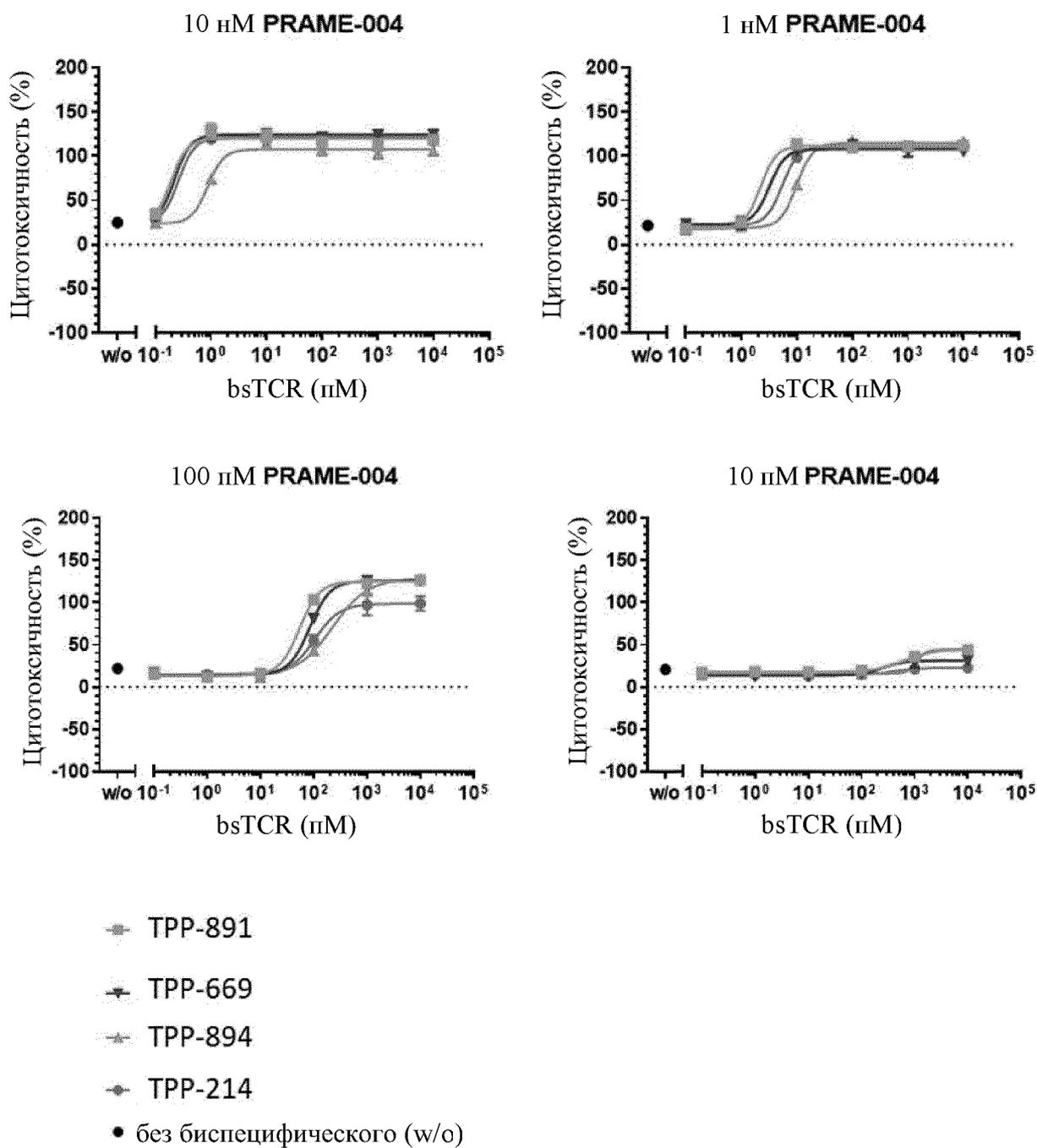


- TPP-230
- ▲ TPP-871
- ★ TPP-222
- ◆ TPP-872
- без биспецифического (w/o)

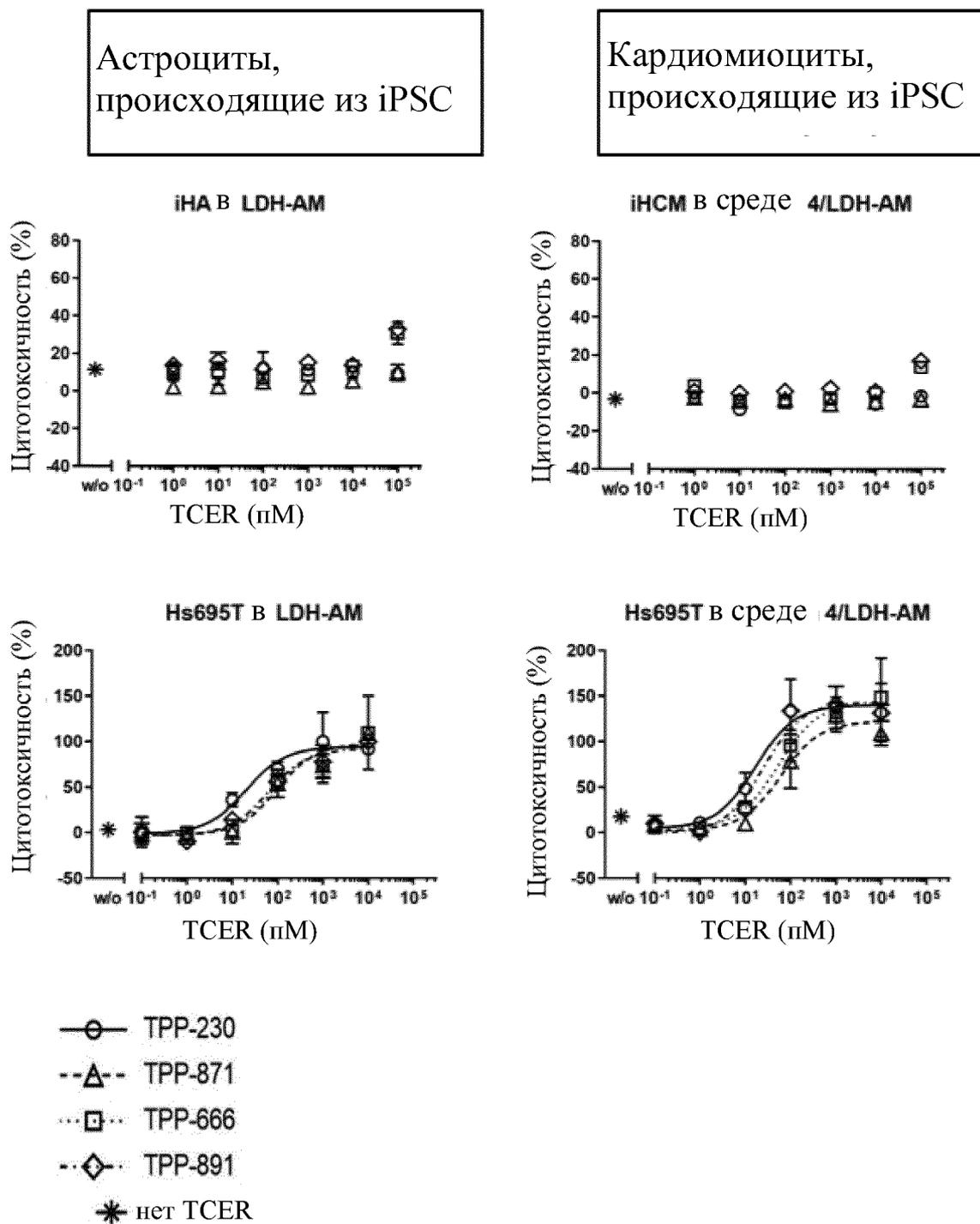
Фиг. 10 (продолжение)



Фиг. 10 (продолжение)



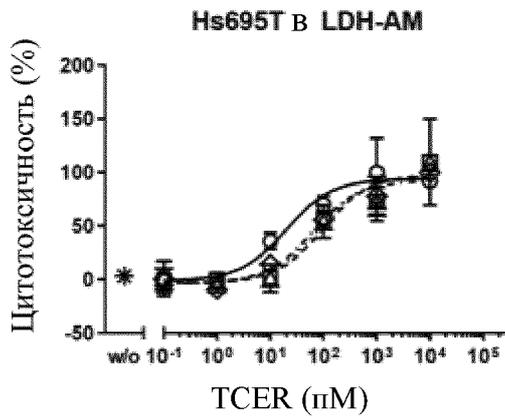
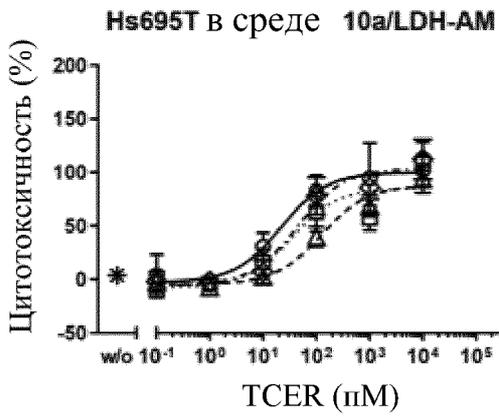
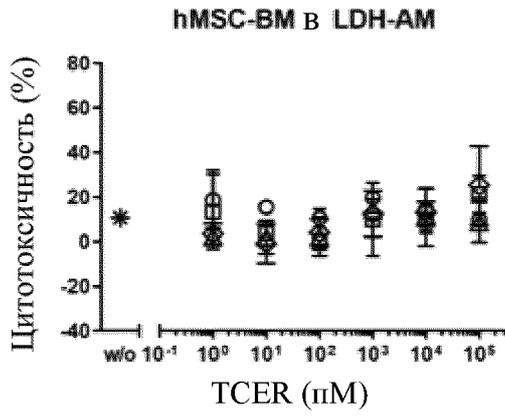
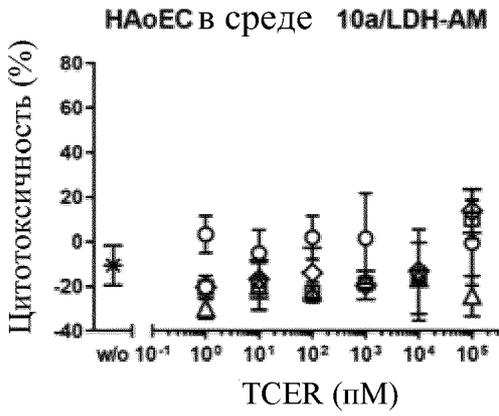
Фиг. 11



Фиг. 11 (продолжение)

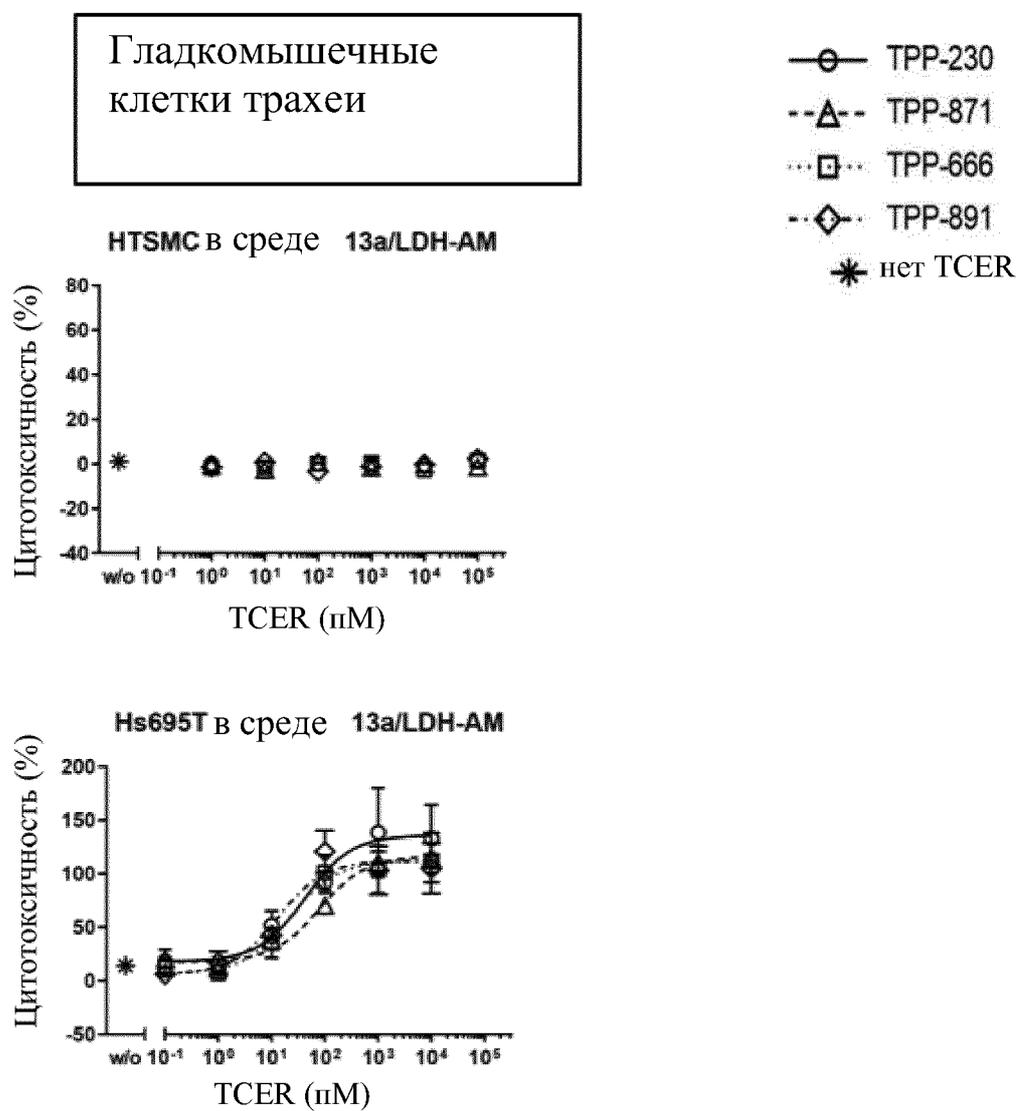
Артериальные
эндотелиальные клетки

Мезенхимальные
стволовые клетки

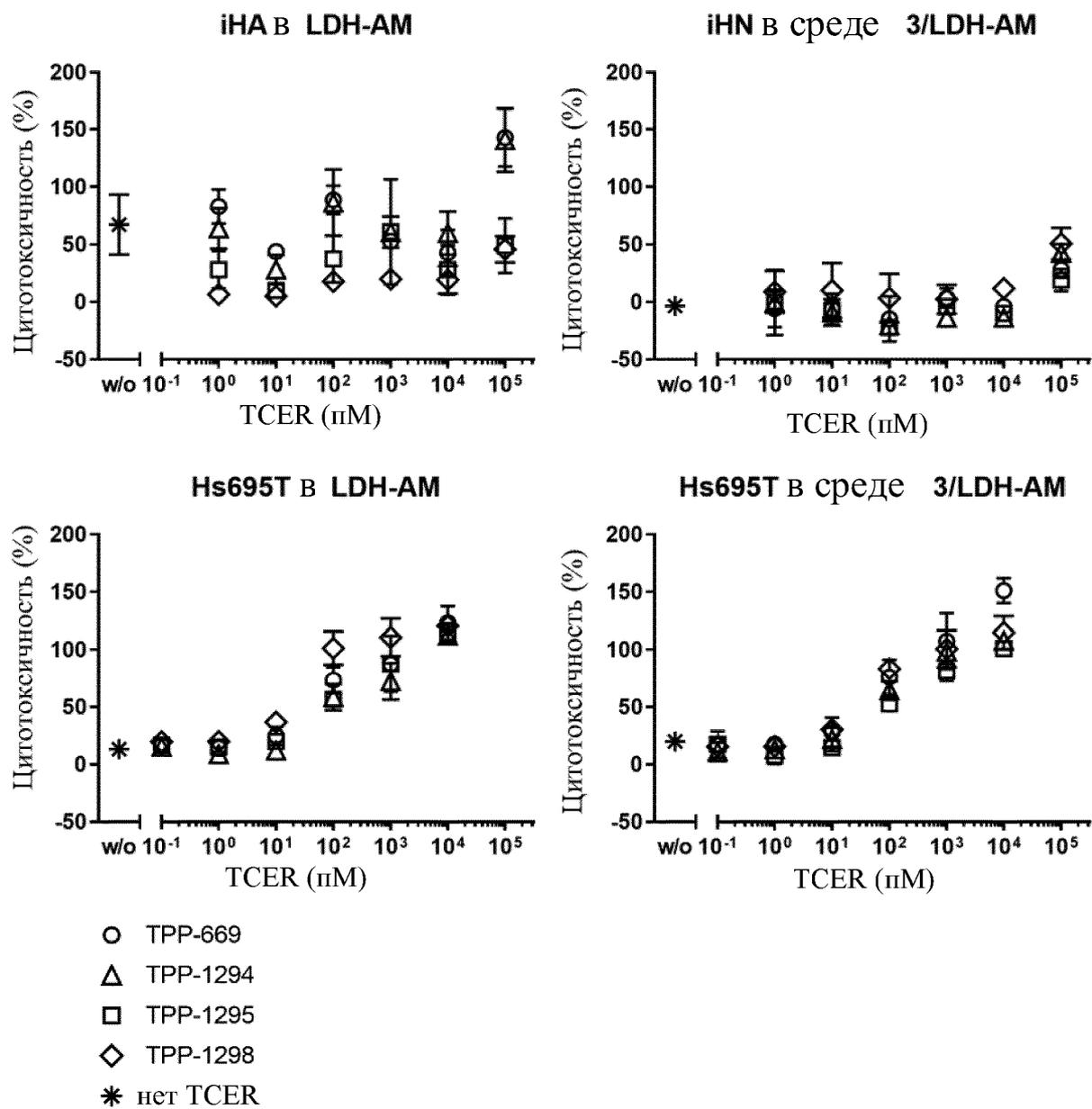


- TPP-230
- △-- TPP-871
- ...□... TPP-666
- ◇-- TPP-891
- * нет TCER

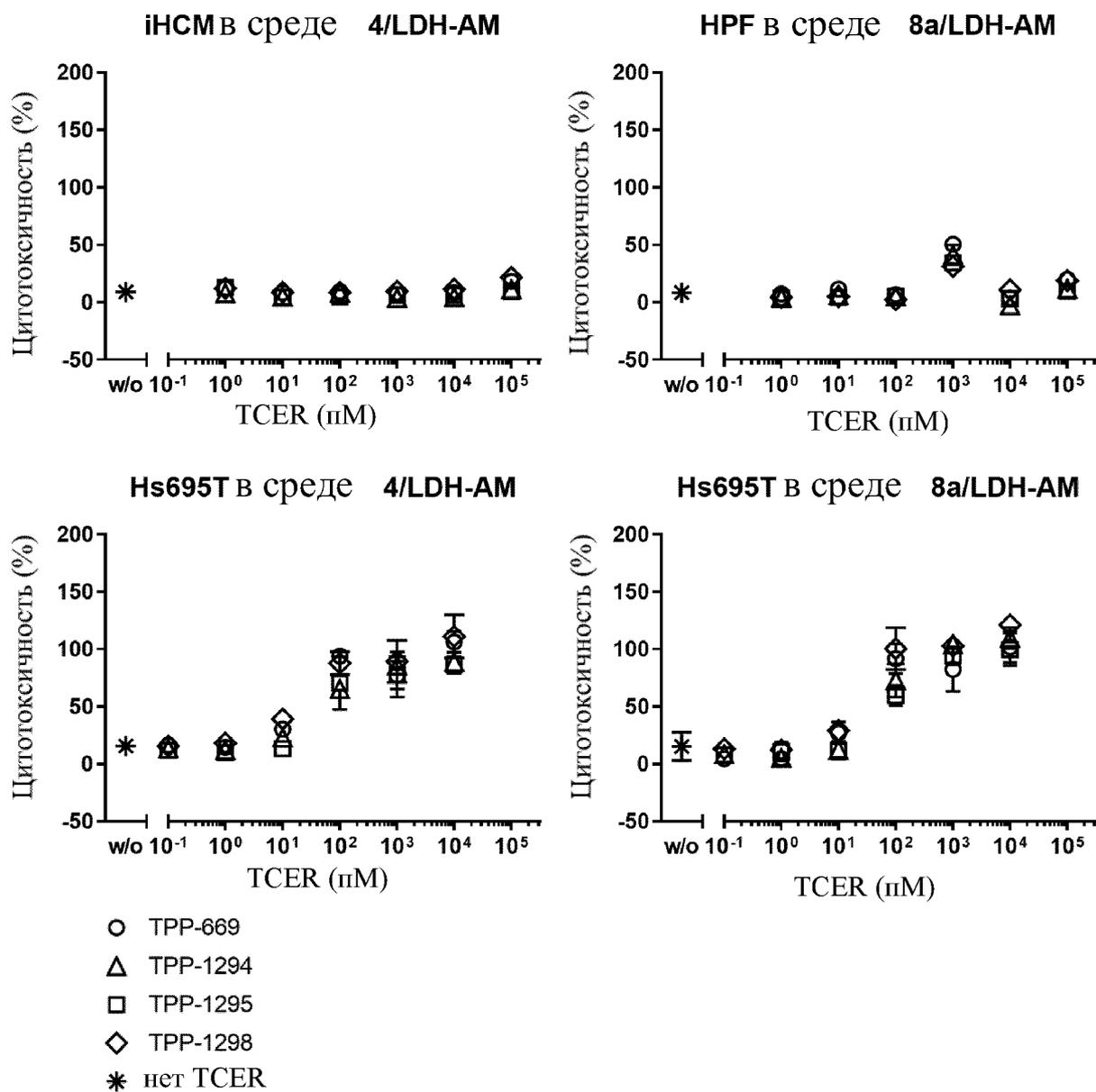
Фиг. 11 (продолжение)



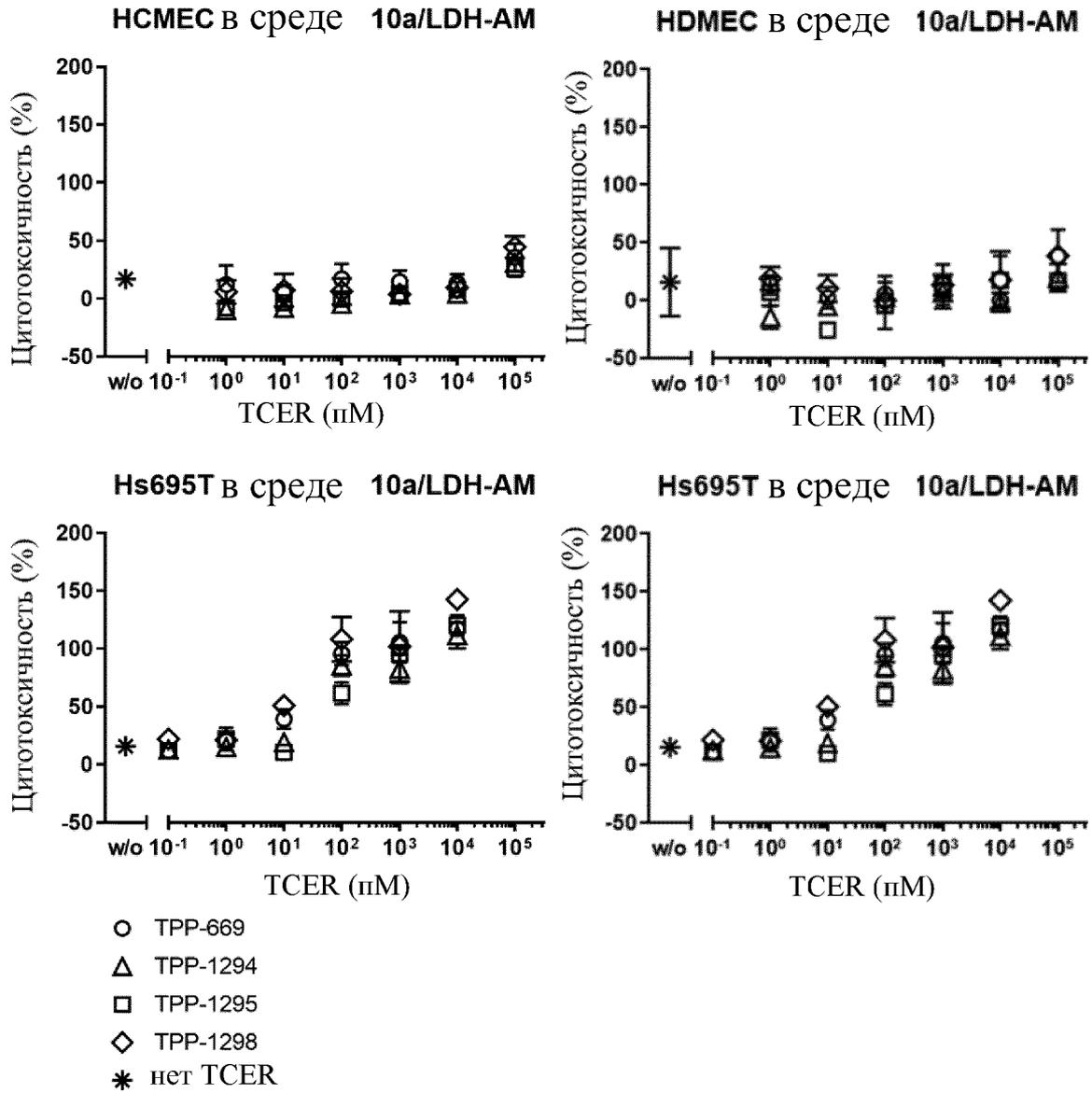
Фиг. 12



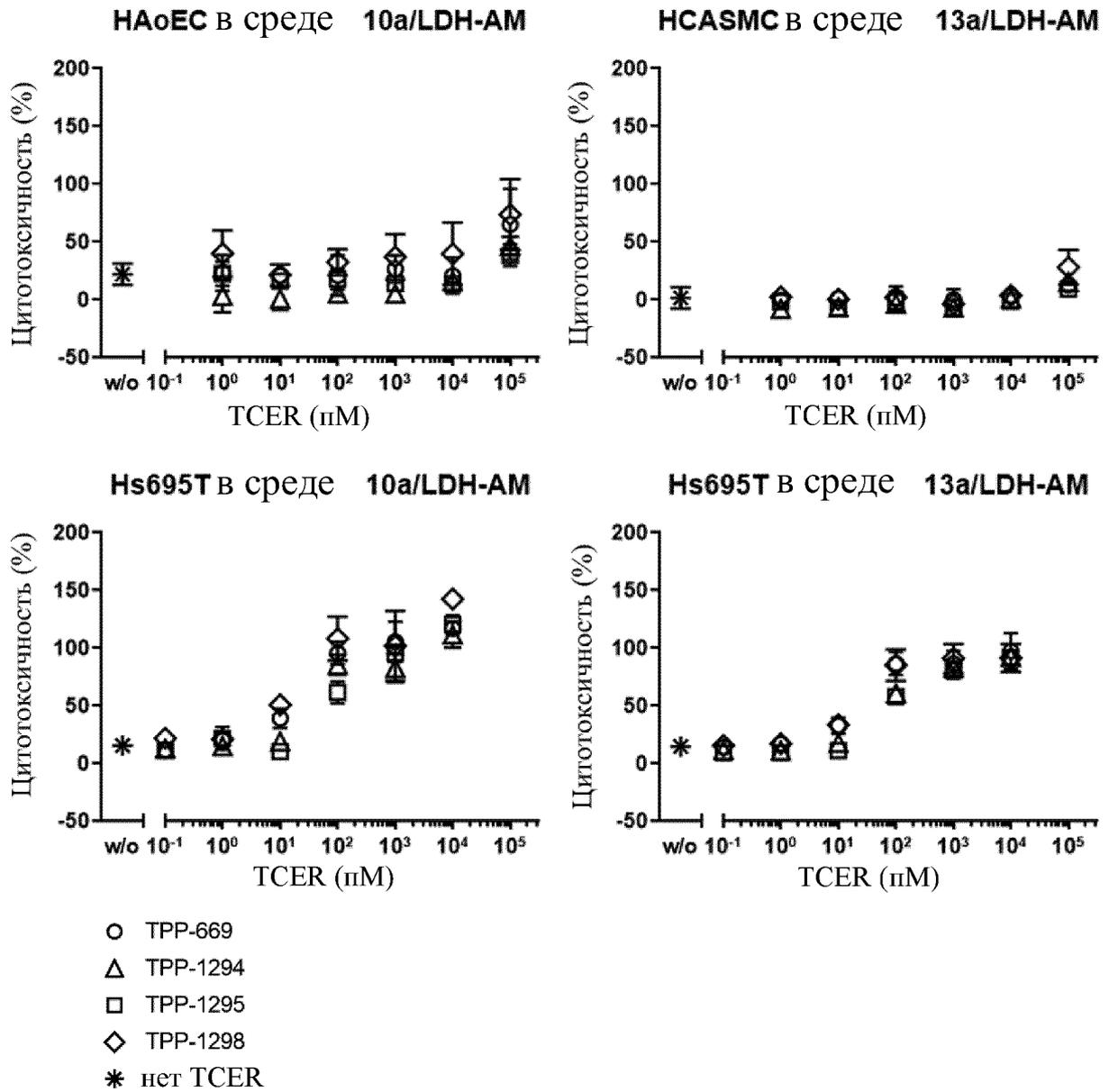
Фиг. 12 (продолжение)



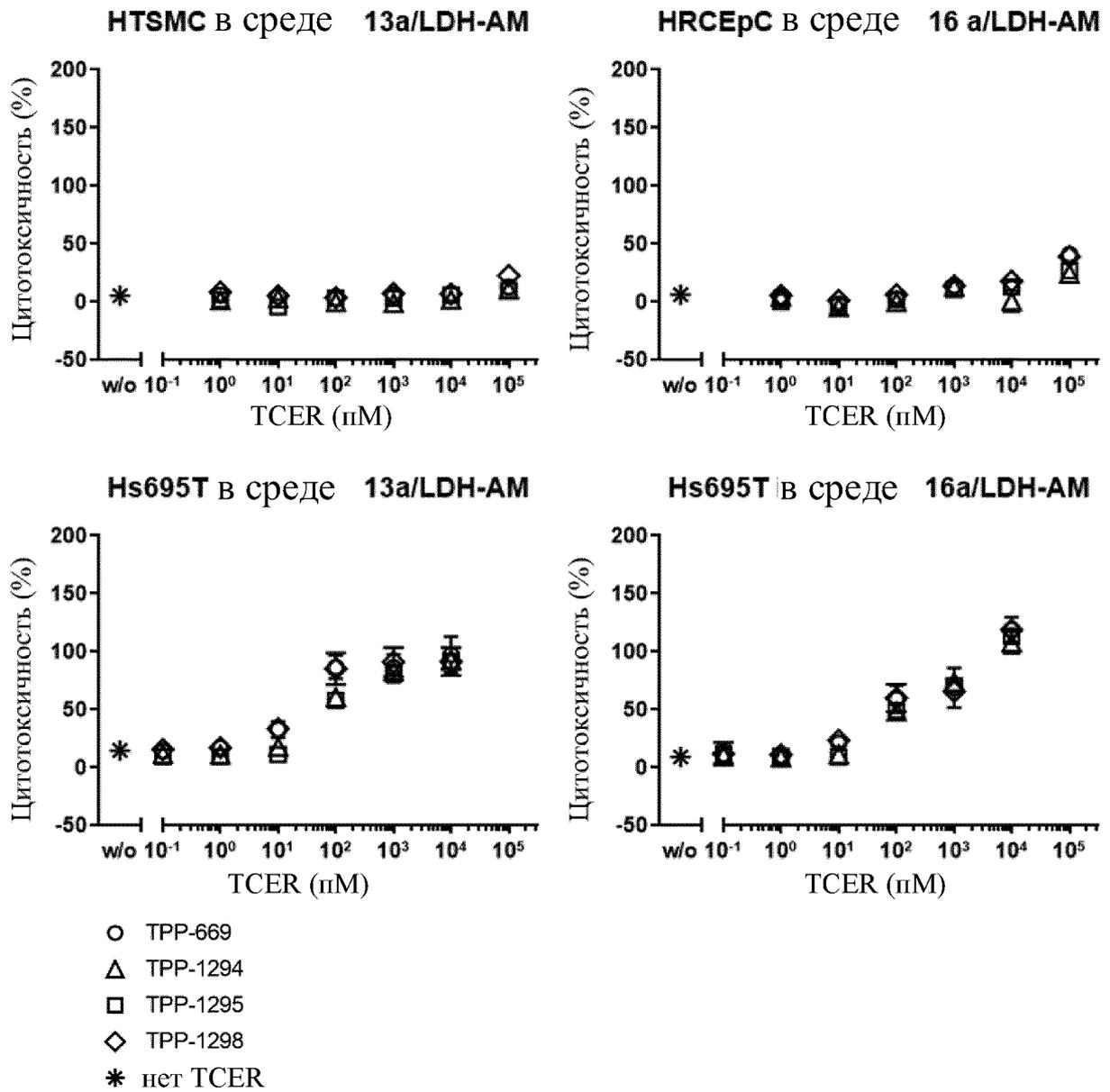
Фиг. 12 (продолжение)



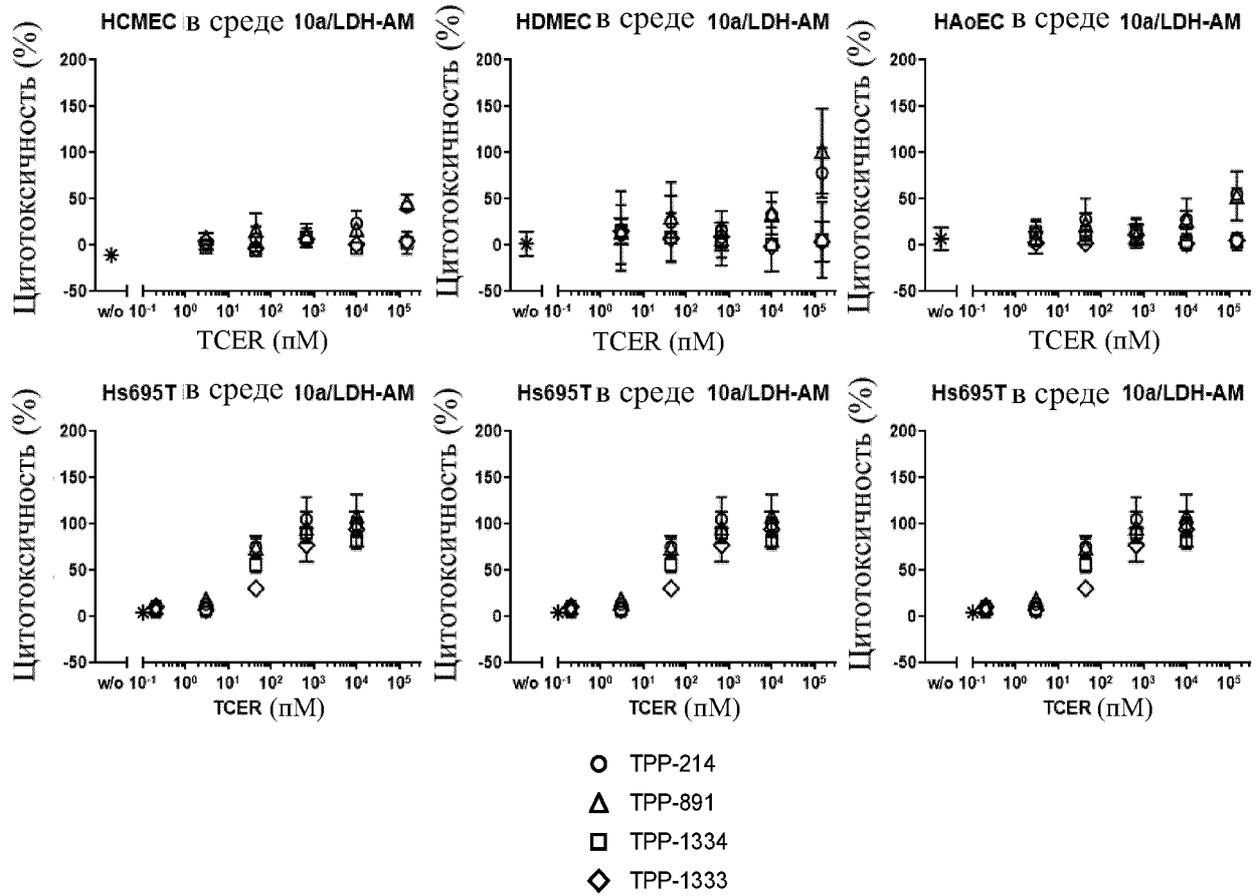
Фиг. 12 (продолжение)



Фиг. 12 (продолжение)



Фиг. 13



Фиг. 13 (продолжение)

