

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048001**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.21**

(21) Номер заявки  
**202192327**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.03.27**

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)  
*C07K 14/47* (2006.01)  
*C07K 14/725* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)

---

(54) **Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К MAGE-A4**

---

(31) **19165387.2**

(32) **2019.03.27**

(33) **EP**

(43) **2022.01.19**

(86) **PCT/EP2020/058779**

(87) **WO 2020/193767 2020.10.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**МЕДИДЖЕН ИММЬЮНОТЕРАПИС  
ГМБХ (DE); РЕГЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Эллинггер Кристиан, Зоммермайер  
Даниэль (DE), Блекберн Парсонс  
Джеффри, Манн Джасдип (US)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(56) **WO-A1-2019036688**

**WO-A1-2017174824**

**WO-A1-2017175006**

**MARIE-THERESE DUFFOUR ET AL.: "A  
MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is  
recognized by cytolytic T lymphocytes", EUROPEAN  
JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 29, 1 January  
1999 (1999-01-01), pages 3329-3337, XP055554573,  
Weinheim, ISSN: 0014-2980, DOI:10.1002/  
(SICI)1521-4141(199910)29:10 < 3329::AID-  
IMMU3329>3.0.CO;2-7, abstract**

---

(57) В соответствии с изобретением предложен выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), специфичный к MAGE-A4, и полипептид, содержащий функциональную часть TCR. Дополнительно предложены поливалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, клетка, экспрессирующая TCR, и фармацевтическая композиция, содержащая TCR. В соответствии с изобретением также предложен TCR для применения в качестве лекарственного средства, в частности TCR для применения для лечения рака.

---

**B1**

**048001**

**048001**

**B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании заявки на европейский патент № 19165387.2, поданной 27 марта 2019 г., содержание которой полностью включено в данную заявку посредством ссылки.

### **Сведения о перечне последовательностей**

Перечень последовательностей, связанных с данной заявкой, предоставлен в текстовом формате вместо бумажной копии и настоящим включен посредством ссылки в описание настоящего изобретения. Текстовый файл, содержащий Перечень последовательностей, назван MED16702PCTST25. Размер текстового файла составляет 146 Кб, он был создан 24 марта 2020 г. и подан в электронном виде через EFS-Web, одновременно с подачей настоящей заявки.

### **Уровень техники**

В соответствии с настоящим изобретением предложены выделенные Т-клеточные рецепторы (TCR), специфичные к MAGE-A4, полипептиды, содержащие функциональную часть TCR, поливалентные комплексы TCR, нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, клетка, экспрессирующая TCR, и композиции и фармацевтические композиции, содержащие их. В соответствии с настоящим изобретением также предложены способы применения перечисленного выше в способах лечения или для получения состава и/или применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения для лечения рака.

### **Описание предшествующего уровня техники**

Т-лимфоциты (или Т-клетки), которые являются частью клеточно-опосредованной иммунной системы, играют главную роль в уничтожении патогенов. Т-клетки развиваются в тимусе и экспрессируют молекулы TCR на своей поверхности, которые позволяют распознавать пептиды, презентированные на молекулах главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), которые экспрессируются на содержащих ядро клетках (это явление известно как презентация антигенов). Антигены, происходящие из патогенов, т.е. чужеродные антигены, презентированные молекулами ГКГС, будут вызывать сильный ответ Т-клеток, тогда как собственные антигены обычно не приводят к ответу Т-клеток благодаря отрицательной селекции специфичных к собственным антигенам Т-клеток в тимусе в процессе развития таких Т-клеток. Иммунная система, следовательно, может различить содержащие ядро клетки, презентующие чужеродные или собственные антигены, и специфично нацелиться на инфицированные клетки и уничтожить их посредством эффективных механизмов высвобождения цитокинов и клеточной цитотоксичности Т-клеток.

Возможности иммунной системы признали перспективным инструментом для терапии рака в будущем. За последние десятилетия в исследованиях начали использовать уникальные свойства Т-клеток, применяя адоптивную клеточную терапию (АКТ), которая включает введение полученных от пациентов лимфоцитов, размноженных *ex vivo*. АКТ является привлекательным решением для лечения рака, так как для нее не требуется компетентность иммунной системы пациентов, и специфичность перенесенных лимфоцитов можно направить против немутированных и, следовательно, слабо иммуногенных антигенов опухолей, которые обычно не могут эффективно запустить ответ аутологических Т-клеток. Хотя было показано, что АКТ является перспективным способом лечения различных типов рака, ее широкое применение в качестве клинической терапии затрудняется необходимостью индивидуального выделения и характеристики специфичных к опухоли Т-клеток от каждого пациента - процесса, который не только может быть трудным и требующим больших затрат времени, но также часто не позволяет получить Т-клетки с высокой авидностью (Xue et al. *Clin. Exp. Immunol.* 2005 Feb; 139(2): 167-172; Schmitt et al., *Hum. Gene Ther.* 2009 Nov; 20(11): 1240-1248.)

Генетический перенос специфичных к антигенам опухоли TCR в первичные Т-клетки может преодолеть некоторые существующие ограничения АКТ, так как он делает возможным быстрое образование опухолерепрессивных Т-лимфоцитов с определенной антигенспецифичностью даже у пациентов с иммунной недостаточностью. Тем не менее, идентификация подходящих клонов Т-клеток, несущих TCR, которые специфично распознают антигены опухоли и проявляют желательное противоопухолевое действие *in vivo*, все еще является предметом современных исследований. Учитывая, что в 2012 г. во всем мире возникло приблизительно 14,1 млн новых случаев рака, и что рак на сегодняшний день вызывает приблизительно 14,6% всех смертей людей по всему миру, срочно требуются новые и эффективные способы лечения. Объектом настоящего изобретения является удовлетворение потребностей, описанных выше.

MAGE-A4 относится к семейству антигенов меланомы (MAGE). Семейство MAGE экспрессируется в различных злокачественных типах опухолей, начиная с меланомы, рака толстой кишки, легкого и заканчивая раком молочной железы и другими опухолями. В частности, семейство MAGE подразделяется на две группы на основании паттерна их экспрессии в тканях, причем подсемейство MAGE-A экспрессируется в зародышевых клетках яичка и aberrантно реэкспрессируется в злокачественных опухолях. Это также применимо к MAGE-A4.

Исследования по экспрессии в опухолевой ткани выявили, что MAGE-A4 (сверх)экспрессируется в 19-35% случаев немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), 13% случаев рака молочной железы, 47% случаев эпителиального рака яичников и 22% случаев колоректального рака (Tajima et al. *Lung cancer* 2003;

42: 23-33; Gure et al. Clin Cancer Res 2005, 11:8055-8062; Kim et al. Int J Mol Med 2012, 29: 656-662; Otte et al. Cancer Res 2001, 61:6682-6688; Daudi et al. PLoS One 2014, 9:e104099; Li et al. Clin Cancer Res 2005, 11:1809-1814).

### Краткое описание изобретения

Целью настоящего изобретения является обеспечение выделенного Т-клеточного рецептора (TCR), специфичного к MAGE-A4.

В частности, TCR специфично распознает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент.

В конкретных вариантах реализации TCR специфично распознает связанную с HLA-A2 форму последовательности аминокислот SEQ ID NO: 1, в частности, TCR распознает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01.

В некоторых вариантах реализации TCR содержит: вариабельную область TCR  $\alpha$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 2, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4, и вариабельную область TCR  $\beta$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 5, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 6 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 7; или вариабельную область TCR  $\alpha$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 13 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 14, и вариабельную область TCR  $\beta$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 15, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 16 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 17; или вариабельную область TCR  $\alpha$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 22, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 23 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 24, и вариабельную область TCR  $\beta$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 25, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 26 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 27. Данные TCR более подробно описаны ниже.

В конкретных вариантах реализации TCR содержит: вариабельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 8 и вариабельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 9; или вариабельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 18 и вариабельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 19; или вариабельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 28 и вариабельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах реализации TCR содержит:  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 10 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 11;  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 20 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 21; или  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 30 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 31.

В других вариантах реализации TCR содержит:  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 87 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 88;  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 89 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 90; или  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 91 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 92.

В некоторых вариантах реализации TCR содержит:  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 102 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 103;  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 108 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 109; или  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 114 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 115.

TCR, предложенные в настоящей заявке, являются выделенными и/или очищенными и могут быть растворимыми или связанными с мембраной.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен выделенный TCR, описанный в настоящей заявке, причем секреция IFN- $\gamma$ , вызванная связыванием TCR, экспрессированным на эффекторной клетке, с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01, может быть более чем в 100 раз выше, предпочтительно 500 раз выше, более предпочтительно 2000 раз выше при связывании с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01, по сравнению со связыванием с нерелевантным пептидом, который презентирован молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01.

В некоторых вариантах реализации последовательность аминокислот TCR может содержать одну или более фенотипически молчащих замен. Кроме того, TCR могут быть мечеными. Подходящие метки известны в данной области техники, и их можно соединить с TCR или вариантом TCR, применяя обычные способы, необязательно посредством линкеров различной длины. Термин "метка" или "метящая

группа" относится к любой детектируемой метке. В качестве дополнения или альтернативы, последовательность аминокислот можно модифицировать, чтобы она содержала терапевтический агент или модифицирующую фармакокинетику группу. Терапевтический агент можно выбрать из группы, состоящей из иммунной эффекторной молекулы, цитотоксического агента и радионуклида. Иммунная эффекторная молекула может представлять собой, например, цитокин. Модифицирующая фармакокинетику группа может представлять собой по меньшей мере одно повторяющееся звено полиэтиленгликоля, по меньшей мере одну гликольную группу, по меньшей мере одну сиалильную группу или их комбинацию.

TCR, в частности, растворимую форму TCR, предложенную в настоящей заявке, можно модифицировать путем присоединения дополнительных функциональных групп, например, для снижения иммуногенности, увеличения гидродинамического размера (размера в растворе), растворимости и/или стабильности (например, благодаря повышенной защите от протеолитической деградации) и/или увеличения времени полужизни в сыворотке. Другие подходящие функциональные группы и модификации включают "переключатели саморазрушения" или "защитные переключатели", которые можно использовать для выключения или включения эффекторных клеток-хозяев, несущих TCR в соответствии с настоящим изобретением, в организме пациента. В настоящей заявке также предложены TCR с измененным паттерном гликозилирования.

Также можно к TCR, в частности, к растворимой форме TCR в соответствии с настоящим изобретением, добавить лекарственное средство или терапевтический компонент, такой как низкомолекулярное соединение. TCR, в частности, растворимую форму TCR в соответствии с настоящим изобретением, можно дополнительно модифицировать, чтобы ввести дополнительные домены, которые помогут идентифицировать, отследить, очистить и/или выделить соответствующую молекулу (метки).

В некоторых вариантах реализации TCR относится к одноцепочечному типу, в котором  $\alpha$  цепь TCR и  $\beta$  цепь TCR связаны линкерной последовательностью, необязательно при этом линкерная последовательность является расщепляемой.

В другом аспекте предложен полипептид, содержащий функциональную часть TCR, описанную в настоящей заявке, причем функциональная часть содержит по меньшей мере одну из последовательностей аминокислот, выбранных из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 4, 7, 14, 17, 24 и 27.

В конкретных вариантах реализации функциональная часть содержит вариабельную область TCR  $\alpha$  и/или вариабельную область TCR  $\beta$ .

В конкретных вариантах реализации предложен поливалентный комплекс TCR, содержащий по меньшей мере два TCR, описанных в настоящей заявке. В более конкретном варианте реализации по меньшей мере один из указанных TCR связан с терапевтическим агентом.

В конкретном варианте реализации предложен слитый белок, содержащий  $\alpha$  цепь TCR и  $\beta$  цепь TCR, причем указанный слитый белок содержит последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 94, 96, 98, 104, 110 и 116.

В конкретных аспектах слитый белок дополнительно содержит сайт расщепления фурином и/или последовательность проскока рибосомы.

В другом аспекте предложена нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, описанный в настоящей заявке, или кодирующая полипептид или слитый белок, описанные выше.

В одном аспекте последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая  $\alpha$  цепь TCR, представлена в любой из последовательностей SEQ ID NO: 69, 77, 85, 99, 105 и 111. В другом аспекте последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая  $\beta$  цепь TCR, представлена в любой из последовательностей SEQ ID NO: 70, 78, 86, 100, 106 и 112. В других аспектах TCR содержит  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 69, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 70;  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 77, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 78;  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 85, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 86;  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 99, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 100;  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 105, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 106; или  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 111, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 112.

В дополнительных аспектах предложен слитый белок, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в любой из последовательностей SEQ ID NO: 93, 95, 97, 101, 107 и 113.

В дополнительном аспекте предложена плаزمиды или вектор, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением, описанные выше. В дополнительном аспекте предложена плазмиды или вектор, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 88; последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90; последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92; последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 103; последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109; или последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 115. Предпочтительно, вектор представляет собой вектор экспрессии или вектор, подходящий для трансдукции или трансфекции клеток, особенно эукариотических клеток. Вектор может, например, представлять собой

ретровирусный вектор, например, гамма-ретровирусный или лентивирусный вектор.

В другом аспекте предложена клетка, экспрессирующая TCR, описанный в настоящей заявке. Клетка может быть выделенной или не встречающейся в природе.

В другом аспекте предложена клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, описанную выше, или плазмиду или вектор, описанные выше. В частности, клетка может содержать: вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту или множество нуклеиновых кислот, описанных выше; или первый вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую цепь альфа TCR, описанную в настоящей заявке, и второй вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую цепь бета TCR, описанную в настоящей заявке.

Клетка может представлять собой лимфоцит периферической крови (ЛПК) или моноклеарную клетку периферической крови (МКПК). Обычно клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку, в частности, Т-клетку. Другие подходящие типы клеток включают гамма-дельта Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK) и NK-подобные Т-клетки (NKT).

В другом аспекте предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в частности, связывающийся с частью TCR, описанной в настоящей заявке, которая опосредует специфичность к MAGE-A4.

В другом аспекте предложена композиция, содержащая: TCR, описанный в настоящей заявке, полипептид, описанный в настоящей заявке, слитый белок, описанный в настоящей заявке, поливалентный комплекс TCR, описанный в настоящей заявке, нуклеиновую кислоту, описанную в настоящей заявке, вектор, описанный в настоящей заявке, клетку, описанную в настоящей заявке, или антитело, описанное в настоящей заявке.

В другом аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая: TCR, описанный в настоящей заявке, полипептид, описанный в настоящей заявке, слитый белок, описанный в настоящей заявке, поливалентный комплекс TCR, описанный в настоящей заявке, нуклеиновую кислоту, описанную в настоящей заявке, вектор, описанный в настоящей заявке, клетку, описанную в настоящей заявке, или антитело, описанное в настоящей заявке.

Обычно фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте предложены TCR, описанный в настоящей заявке, полипептид, описанный в настоящей заявке, поливалентный комплекс TCR, описанный в настоящей заявке, нуклеиновая кислота, описанная в настоящей заявке, вектор, описанный в настоящей заявке, клетка, описанная в настоящей заявке, антитело, описанное в настоящей заявке, композиция, описанная в настоящей заявке, или фармацевтическая композиция для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения для лечения рака. Рак может представлять собой гематологический рак или солидную опухоль. Рак может быть выбран из группы, состоящей из саркомы, рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, немелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, печеночно-клеточной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, колоректального рака, холангиокарциномы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, миелоидного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза. Предпочтительно рак выбран из группы, состоящей из НМРЛ, МРЛ, рака молочной железы, яичников или колоректального рака, саркомы и остеосаркомы.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 показано связывание MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-ГКГС-мультимера с CD8<sup>+</sup> Т-клетками, трансдуцированными различными реактивными по отношению к MAGE-A4 TCR CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из МКПК здорового донора и трансдуцировали тремя различными MAGE-A4-TCR и одним контрольным TCR, который не распознает MAGE-A4. Трансдуцированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки отбирали с помощью FACS, используя в качестве маркера трансдукции константную область бета мыши. После размножения указанных клеток, их окрашивали MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-ГКГС-мультимером и антителами против CD8 и константной области бета мыши (mCb) и анализировали с помощью проточной цитометрии. Гейты были установлены на популяции живых CD8<sup>+</sup>/mCb<sup>+</sup> клеток, и показано окрашивание мультимера/CD8.

На фиг. 2 показано, что трансгенные по MAGE-A4-TCR Т-клетки распознают MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-пептид, презентированный на HLA-A2. Трансгенные Т-клетки совместно культивировали с клетками Т2, нагруженными извне MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-пептидом, или с клетками K562/HLA-A2, которые были трансдуцированы геном MAGE-A4. В качестве отрицательных контролей использовали клетки Т2, нагруженные контрольным пептидом, и нетрансдуцированные клетки K562/HLA-A2, соответственно. Распознавание клеток-мишеней анализировали путем измерения концентрации IFN-γ в супернатантах совместных культур с помощью стандартного ELISA.

На фиг. 3 показана функциональная avidность трансгенных по MAGE-A4-TCR Т-клеток. Трансгенные Т-клетки совместно культивировали с клетками Т2, нагруженными извне ступенчато изменяющимися на порядок концентрациями MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-пептида ( $10^{-12}$  М -  $10^{-4}$  М). Концентрацию IFN-γ в супернатантах совместных культур измеряли с помощью стандартного ELISA.

На фиг. 4А-С показана способность трансгенных по MAGE-A4-TCR Т-клеток (TCR-1, TCR-2 и TCR-3) лизировать MAGE-A4-положительные линии опухолевых клеток HLA-A2-зависимым способом. Трансгенные Т-клетки совместно культивировали с различными MAGE-A4-положительными HLA-A2-положительными линиями опухолевых клеток (NCI-H1703, NCI-H1755), MAGE-A4-отрицательной HLA-A2-положительной линией опухолевых клеток (Saos-2) и MAGE-A4-отрицательной HLA-A2-отрицательной линией опухолевых клеток (A549). Опухолевые клетки, нагруженные MAGE-A4<sub>GVY</sub>-пептидом, использовали в качестве положительного контроля. Цитотоксичность, направленную против линий опухолевых клеток, стабильно трансдуцированных флуоресцентным маркером, измеряли с помощью устройства IncuCyte® ZOOM (Essen Bioscience) путем получения изображений каждые два часа. Для того чтобы проанализировать высвобождение цитокинов, через 24 ч собирали супернатанты совместной культуры и анализировали концентрации IFN- $\gamma$  с помощью стандартного сэндвич-ELISA (BD, набор для ELISA IFN- $\gamma$  человека).

На фиг. 5А-С показано, что трансгенные по MAGE-A4-TCR Т-клетки (TCR-1, TCR-2 и TCR-3) не распознают нормальные клетки человека. Трансгенные Т-клетки совместно культивировали с различными первичными клетками и происходящими из индуцированных полипотентных стволовых клеток (ИПСК) клетками, представляющими важные ткани или органы. Нормальные клетки, нагруженные MAGE-A4<sub>GVY</sub>-пептидом, использовали в качестве положительного контроля. Вызывали экспрессию HLA-A2 на нейронах путем предварительной инкубации с IFN- $\gamma$ . Проводили электропорацию HLA-A2-отрицательных клеток NHBE транскрибированной *in vitro* РНК (TivPHK) HLA-A2, и экспрессию HLA-A2 всеми клетками подтверждали с помощью проточной цитометрии. Для того чтобы проанализировать высвобождение цитокинов, через 24 ч собирали супернатанты совместной культуры и анализировали концентрации IFN- $\gamma$ , а также IL-2 с помощью стандартного сэндвич-ELISA (набор для ELISA IFN- $\gamma$  или IL-2 человека, BD).

На фиг. 6 показано связывание MAGE-A4<sub>GVY</sub>-ГКГС-мультимера с CD3+ Т-клетками, трансдуцированными различными реактивными по отношению к MAGE-A4 полностью человеческими TCR. CD3+ Т-клетки выделяли из МКПК здорового донора и трансдуцировали тремя различными MAGE-A4-TCR и одним контрольным TCR, который не распознает MAGE-A4. После размножения указанных клеток их окрашивали MAGE-A4<sub>GVY</sub>-ГКГС-мультимером и антителом против CD3 и анализировали с помощью проточной цитометрии. Гейты были установлены на популяции живых CD3+ клеток и окрашивание мультимера.

На фиг. 7 показано, что трансгенные по полностью человеческому MAGE-A4-TCR Т-клетки распознают MAGE-A4<sub>GVY</sub>-пептид, презентируемый на HLA-A2. Трансгенные Т-клетки совместно культивировали с клетками Т2, нагруженными извне MAGE-A4<sub>GVY</sub>-пептидом, или с клетками A549/HLA-A2, которые были трансдуцированы геном MAGE-A4. В качестве отрицательных контролей использовали клетки Т2, нагруженные контрольным пептидом, и нетрансдуцированные клетки A549/HLA-A2, соответственно. Распознавание клеток-мишеней анализировали путем измерения концентрации IFN- $\gamma$  в супернатантах совместных культур с помощью анализа Luminex.

На фиг. 8 показана способность трансгенных по полностью человеческому MAGE-A4-TCR Т-клеток специфично реагировать с MAGE-A4-положительными линиями опухолевых клеток HLA-A2-зависимым способом. Трансгенные Т-клетки совместно культивировали с различными MAGE-A4-положительными HLA-A2-положительными линиями опухолевых клеток (A375, NCI-H1703, NCI-H1755), MAGE-A4-положительной HLA-A2-отрицательной линией опухолевых клеток (NCI-H520) и MAGE-A4-отрицательной HLA-A2-положительной линией опухолевых клеток (A549). Для того чтобы проанализировать высвобождение цитокинов, через 24 ч собирали супернатанты совместной культуры и анализировали концентрации IFN- $\gamma$  с помощью анализа Luminex.

На фиг. 9 показана способность трансгенных по полностью человеческому MAGE-A4-TCR Т-клеток лизировать MAGE-A4-положительные линии опухолевых клеток HLA-A2-зависимым способом. Трансгенные Т-клетки совместно культивировали с различными MAGE-A4-положительными HLA-A2-положительными линиями опухолевых клеток (A375, NCI-H1755, A549-HLA-A2-MAGE-A4) и MAGE-A4-отрицательной HLA-A2-положительной линией опухолевых клеток (A549-HLA-A2). Цитотоксичность, направленную против линий опухолевых клеток, измеряли с помощью анализа импеданса, который начинали через 6 ч после начала совместного культивирования.

На фиг. 10 показана способность трансгенных по полностью человеческому MAGE-A4-TCR Т-клеток контролировать MAGE-A4-положительные опухоли, привитые мышам NSG.

На фиг. 11А-С показано число копий вектора (ЧКВ) и экспрессия MAGE-A4 TCR. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими полностью человеческий MAGE-A4 TCR (TCR-5) или улучшенный вариант (TCR-8). А) Результаты измерения ЧКВ в TCR-5 и TCR-8 Т-клетках были сопоставимы. В) Экспрессию TCR на поверхности Т-клетки оценивали путем детектирования GYV-специфичного тетрамера с помощью проточной цитометрии и представили в виде процента от общего количества CD3+ Т-клеток. Экспрессия TCR-8 была повышена по сравнению с экспрессией TCR-5. С) Плотность молекул TCR на поверхности Т-клеток оцени-

вали путем детектирования GYV-специфичного тетрамера с помощью проточной цитометрии и представили в виде среднего геометрического интенсивности флуоресценции (gMFI) всех тетрамер+ TCR Т-клеток. Плотность экспрессии TCR-8 повышена по сравнению с плотностью экспрессии TCR-5.

На фиг. 12А, В показано, что Т-клетки, экспрессирующие полностью человеческий MAGE-A4 TCR (TCR-5) или улучшенный вариант (TCR-8), специфично уничтожают экспрессирующие MAGE-A4 клетки-мишени *in vitro*. А) TCR-5, TCR-8 или нетрансдуцированные (НТД) Т-клетки совместно культивировали с клетками A549.A2 (A2+, MAGE-A4(-)), клетками NCI-H2023 (A2+, MAGE-A4(+)), клетками A375 (A2+, MAGE-A4(+)) или клетками A549.A2.MAGEA4 (A2+, MAGE-A4(+)) при соотношении эффектор:мишень (Э:М) 1:1. Через 24 ч оценивали высвобождение IFN $\gamma$  в качестве биомаркера активности Т-клеток. TCR-5 и TCR-8 Т-клетки секретировали IFN $\gamma$ , когда их совместно культивировали с клетками-мишенями, экспрессирующими MAGE-A4, но не в присутствии MAGE-A4-отрицательных клеток. В) TCR-5 Т-клетки, TCR-8 Т-клетки или нетрансдуцированные (НТД) Т-клетки совместно культивировали с клетками A375 (A2+, MAGE-A4(+)), клетками A549.A2.MAGEA4 (A2+, MAGE-A4(+)) или клетками U2OS (A2+, MAGE-A4(низкий)) при соотношениях Э:М 10:1, 5:1 и 2,5:1. Цитотоксичность измеряли через 6 часов как процент, нормированный на опухолевую клетку отдельно, путем измерения импеданса. TCR-5 и TCR-8 Т-клетки опосредовали сопоставимую цитотоксичность в отношении трех экспрессирующих MAGE-A4 линий клеток.

На фиг. 13А, В показано, что Т-клетки, экспрессирующие полностью человеческий MAGE-A4 TCR (TCR-5) или улучшенный вариант (TCR-8), опосредуют регрессию опухолей у мышей с экспрессирующими MAGE-A4 опухолями. 5 мышам NSG (на каждое условие) вводили путем подкожной инъекции опухолевые клетки MAGEA4(+) A375 и вводили среду, НТД Т-клетки или Т-клетки, экспрессирующие полностью человеческий MAGE-A4 TCR (TCR-5) или улучшенный вариант (TCR-8). Измеряли рост опухоли дважды в неделю и оценивали противоопухолевую активность TCR Т-клеток по сравнению с таковой у мышей, получивших контроли НТД и среду. А) Мыши с опухолями A375 50 мм<sup>3</sup> получили 5 $\times$ 10<sup>6</sup> (слева) или 1,5 $\times$ 10<sup>6</sup> (справа) НТД Т-клеток, TCR-5 Т-клеток или TCR-8 Т-клеток. Как TCR-5, так и TCR-8 Т-клетки контролировали рост опухолей при дозе 5 $\times$ 10<sup>6</sup> Т-клеток, но для TCR-8 Т-клеток выявили повышенный контроль над опухолями при более низкой дозе 1,5 $\times$ 10<sup>6</sup> Т-клеток. В) Мыши с опухолями A375 100 мм<sup>3</sup> получили 10 $\times$ 10<sup>6</sup> НТД Т-клеток, TCR-5 Т-клеток или TCR-8 Т-клеток. TCR-8 Т-клетки опосредовали повышенную регрессию опухоли по сравнению с TCR-5 Т-клетками или НТД Т-клетками.

#### Подробное описание изобретения

##### А. Краткий обзор.

Паттерн экспрессии MAGE-A4 способствует его пригодности в качестве опухолеспецифичной мишени для АКТ. MAGE-A4 содержит эпитоп в виде декапептида (Duffour et al. Eur J Immunol. 1999 10: 3329-37) с последовательностью аминокислот GYVDGRENTV (SEQ ID NO: 1), который презентруется молекулами HLA-A2. В целом, MAGE-A4 является подходящей опухолеспецифичной мишенью для АКТ. Требуется новые, безопасные и эффективные эффекторы TCR, нацеленные на антигены MAGE-A, для иммунотерапии рака. В соответствии с настоящим изобретением предложены Т-клеточные рецепторы, которые эффективно нацеливаются на антигены MAGE-A4 на раковых клетках, и целью настоящего изобретения является удовлетворение такой нереализованной потребности медицины.

##### В. Определения.

Перед более подробным описанием аспектов настоящего изобретения в отношении некоторых из предпочтительных вариантов его реализации предложены следующие общие определения.

Настоящее изобретение, иллюстративно описанное далее, можно подходящим образом осуществить в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не раскрытых в настоящей заявке.

Настоящее изобретение будет описано в отношении конкретных вариантов реализации и со ссылкой на некоторые фигуры, но настоящее изобретение не ограничено ими, а ограничено лишь формулой изобретения.

Когда в описании настоящего изобретения и в формуле изобретения используют термин "включающий", он не исключает другие элементы. Для целей настоящего изобретения, считают, что термин "состоящий из" описывает предпочтительный вариант реализации над таковым, описанным термином "включающий". Если далее в настоящей заявке определено, что группа включает по меньшей мере некоторое количество вариантов реализации, то это также следует понимать как описание группы, которая предпочтительно состоит только из данных вариантов реализации.

Для целей настоящего изобретения термин "полученный" считают описывающим предпочтительный вариант реализации над таковым, описанным термином "доступный к получению". Если далее в настоящей заявке, например, указано, что антитело доступно к получению из определенного источника, то это также следует понимать как описание антитела, которое получено из указанного источника.

При упоминании существительного в единственном числе, например, такое упоминание включает множественное число указанного существительного, если конкретно не указано иное. Термины "около" или "приблизительно" в контексте настоящего изобретения обозначают интервал точности, который, как

поймет специалист в данной области техники, все еще будет гарантировать технический эффект обсуждаемого признака. Данный термин обычно указывает на отклонение от указанного числового значения на  $\pm 10\%$ , и предпочтительно на  $\pm 5\%$ , более предпочтительно на  $\pm 2\%$ , наиболее предпочтительно на  $\pm 1\%$ .

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Термин "по меньшей мере один" относится к одному или более, например, двум, трем, четырем, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более. Специалисты в данной области определяют или смогут установить, используя не более чем проведение обычного исследования, множество эквивалентов конкретных вариантов реализации настоящего изобретения, описанных в настоящей заявке. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения.

Термин "и/или" повсюду, где он используется в настоящей заявке, включает значение "и", "или" и "все или любая другая комбинация элементов, объединенных указанным термином".

Термин "менее чем" или, в свою очередь, "более чем" не включает конкретное число. Например, менее чем 20 означает менее чем указанное число. Аналогично, более чем или выше чем означает более чем или выше чем указанное число, например, более чем 80% означает более чем или выше чем указанное число 80%.

Термин "включая" означает "включая, но не ограничиваясь". "Включая" и "включая, но не ограничиваясь" используют взаимозаменяемо.

Повсюду в описании и формуле изобретения в настоящей заявке в объеме формы единственного числа входит форма множественного числа, если в контексте не требуется иное. В частности, если используется форма единственного числа, то следует понимать, что в объеме описания настоящего изобретения входит множественное число, а также единственное число, если в контексте не требуется иное.

Технические термины используют в их смысле или значении, привычном для специалиста в данной области техники. Если конкретное значение передается конкретными терминами, то определения терминов будут приведены далее в контексте, в котором употребляются данные термины.

Дополнительные определения описаны повсюду в описании настоящего изобретения.

Все публикации, цитированные повсюду в тексте описания настоящего изобретения (включая все патенты, заявки на патент, научные публикации, инструкции и т.д.), либо выше, либо ниже, настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки. Ни один материал, включенный в описание, не должен рассматриваться как признание того, что настоящее изобретение не дает права датировать такой материал более ранним числом в силу предшествующего изобретения. В тех случаях, когда материал, включенный посредством ссылки, противоречит или не соответствует описанию настоящего изобретения, описание будет иметь преимущественную силу над любым таким материалом.

Содержание всех документов и патентных документов, цитированных в настоящей заявке, полностью включено в данную заявку посредством ссылки.

#### C. Вводная информация о TCR.

TCR состоит из двух различных и отдельных белковых цепей, а именно альфа ( $\alpha$ ) цепи TCR и бета ( $\beta$ ) цепи TCR.  $\alpha$  цепь TCR содержит переменную (V), соединительную (J) и константную (C) области.  $\beta$  цепь TCR содержит переменную область (V), область разнообразия (D), соединительную (J) и константную (C) области. Перестроенные области V(D)J обеих цепей  $\alpha$  и  $\beta$  TCR содержат гиперпеременные участки (CDR, определяющие комплементарность участки), среди которых участок CDR3 определяет специфичное распознавание эпитопа. На C-концевой области как  $\alpha$  цепь TCR, так и  $\beta$  цепь TCR содержат гидрофобный трансмембранный домен и оканчиваются коротким цитоплазматическим хвостом.

Обычно TCR представляет собой гетеродимер одной  $\alpha$  цепи и одной  $\beta$  цепи. Данный гетеродимер может связываться с молекулами ГКГС, презентующими пептид.

Термин "переменная область TCR  $\alpha$ ", или "переменная цепь TCR  $\alpha$ ", или "переменный домен" в контексте относится к переменной области  $\alpha$  цепи TCR. Термин "переменная область TCR  $\beta$ " или "переменная цепь TCR  $\beta$ " в контексте относится к переменной области  $\beta$  цепи TCR.

Локусы и гены TCR названы с использованием номенклатуры TCR International Immunogenetics (IMGT) (база данных IMGT, [www.IMGT.org](http://www.IMGT.org); Giudicelli et al. Nucl. Acids Res., 34, D781-D784 (2006); Lefranc и Lefranc, Academic Press 2001).

#### D. MAGE-A4.

В первом аспекте предложен выделенный T-клеточный рецептор (TCR), специфичный к MAGE-A4. MAGE-A4 относится к группе так называемых антигенов рака/яичка. Антигены рака/яичка экспрессируются в различных злокачественных опухолях и зародышевых клетках, но не в других тканях взрослых. Следовательно, MAGE-A4 является интересным иммунотерапевтическим целевым антигеном. Ген человека, кодирующий MAGE-A4, обозначен MAGEA4 (ENSG00000147381).

В частности, TCR, предложенный в настоящей заявке, специфично распознает эпитоп, содержащий аминокислоты с 230 по 239 из MAGE-A4, т.е. последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1 (GVYD-GRENTV; также обозначенную в настоящей заявке MAGE-A4<sub>GVY</sub>) или ее фрагмент.

Обычно TCR распознает пептидный фрагмент антигена, когда тот презентован молекулой главного комплекса гистосовместимости (ГКГС).



Система или комплекс лейкоцитарного антигена человека (HLA) представляет собой комплекс генов, кодирующих белки главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) у людей. HLA-A\*02 (HLA-A2) представляет собой одну конкретную группу аллелей главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) I класса в локусе HLA-A. HLA-A\*02:01 представляет собой конкретный аллель HLA-A\*02.

Таким образом, в конкретном варианте реализации TCR специфично распознает связанную с HLA-A2 форму последовательности аминокислот SEQ ID NO: 1. В еще более конкретном варианте реализации TCR специфично распознает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1, которая представлена молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01.

TCR высокоспецифичен к MAGE-A4 и не проявляет перекрестной реакционной способности с другими пептидами. Это означает, что TCR не распознает нормальные линии клеток человека, включая кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, фибробласты легкого, гепатоциты, эпителиальные клетки коры почки, астроциты, эпителиальные клетки бронхов и нейроны, которые не экспрессируют MAGE-A4. Перекрестную реакционную способность можно измерить по секреции IFN- $\gamma$ , как описано в настоящей заявке.

Термин "специфичный к" в контексте данной заявки означает, что TCR специфично связывается с мишенью. В конкретных вариантах реализации TCR специфичен к MAGE-A4 и специфично связывается с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 1, представленной молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01.

Е. Конкретная последовательность TCR.

CDR3 цепи TCR  $\alpha$  может иметь последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 24.

CDR3 цепи TCR  $\beta$  может иметь последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах реализации предложен выделенный TCR, содержащий  $\alpha$  цепь TCR и  $\beta$  цепь TCR, причем: а)  $\alpha$  цепь TCR содержит определяющий комплементарность участок 3 (CDR3) с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4, и  $\beta$  цепь TCR содержит CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 7; или б)  $\alpha$  цепь TCR содержит CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 14, и  $\beta$  цепь TCR содержит CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 17; или в)  $\alpha$  цепь TCR содержит CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 24, и  $\beta$  цепь TCR содержит CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 27.

В более конкретных вариантах реализации предложен выделенный TCR, причем TCR содержит: а)  $\alpha$  цепь TCR, содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 2, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4, и  $\beta$  цепь TCR, содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 5, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 6 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 7; или б)  $\alpha$  цепь TCR, содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 13 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 14, и  $\beta$  цепь TCR, содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 15, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 16 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 17; или в)  $\alpha$  цепь TCR, содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 22, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 23 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 24,  $\beta$  цепь TCR, содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 25, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 26 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 27.

В предпочтительных вариантах реализации предложены выделенные TCR которые определяют по CDR, в частности, по CDR3  $\alpha$  и  $\beta$  цепей TCR, описанным выше, причем рекомбинантная последовательность TCR модифицирована таким образом, чтобы она содержала мураинизированные, предпочтительно минимальные мураинизированные области C $\alpha$  и C $\beta$ .

В особенно предпочтительных вариантах реализации выделенные TCR определяют по CDR, в частности, по CDR3  $\alpha$  и  $\beta$  цепей TCR, описанным выше, причем рекомбинантная последовательность TCR модифицирована таким образом, чтобы она содержала минимальные мураинизированные области C $\alpha$  и C $\beta$  и гидрофобные мутации аминокислот в трансмембранном домене C $\alpha$ . В конкретных вариантах реализации у таких TCR повышена экспрессия и функциональная avidность по сравнению с TCR, которые не являются минимально мураинизированными и не содержат гидрофобных мутаций в трансмембранной области C $\alpha$ .

В дополнительных предпочтительных вариантах реализации выделенные TCR определяют по CDR, в частности, по CDR3  $\alpha$  и  $\beta$  цепей TCR, описанным выше, причем рекомбинантная последовательность TCR не модифицирована таким образом, чтобы она содержала мураинизированные или минимально мураинизированные области C $\alpha$  и C $\beta$ .

В некоторых вариантах реализации предложен выделенный TCR, причем TCR содержит: а) вари-

бельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 8, и варибельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 9; или б) варибельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, и варибельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 19; или в) варибельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 28, и варибельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 29.

В объем формулировки "по меньшей мере на 80% идентичный", в частности, "с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична" в настоящей заявке входят последовательности аминокислот, по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичные указанной последовательности аминокислот.

В некоторых вариантах реализации TCR содержит  $\alpha$  цепь TCR и  $\beta$  цепь TCR, причем а) последовательность аминокислот варибельной области TCR  $\alpha$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 8 и содержит CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 4, и последовательность аминокислот варибельной области TCR  $\beta$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 9 и содержит CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 7, или б) последовательность аминокислот варибельной области TCR  $\alpha$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 18 и содержит CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 14, и последовательность аминокислот варибельной области TCR  $\beta$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 19 и содержит CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 17; или в) последовательность аминокислот варибельной области TCR  $\alpha$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 28 и содержит CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 24; и последовательность аминокислот варибельной области TCR  $\beta$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 29 и содержит CDR3 с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 27.

В типичных вариантах реализации предложен выделенный TCR, причем TCR содержит: а) варибельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 8 и варибельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 9; или б) варибельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 18 и варибельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 19; или в) варибельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 28 и варибельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 29.

В следующей таблице представлена краткая информация о типичных TCR.

TCR	CDR1 $\alpha$	CDR2 $\alpha$	CDR3 $\alpha$	TRAV	TRAJ	CDR1 $\beta$	CDR2 $\beta$	CDR3 $\beta$	TRBV	TRBJ
1, 4, 7	TSDQSYG	QGSYDEQN	CAMSGDSAGNMLTF	14	39	KGHDR	SFDVKD	CATSDWDRSGDKETQYF	24	2-5
2, 5, 8	TSDPSYG	QGSYDQQN	CAMSGGYTGGFKTIF	14	9	SGDLS	YYNGEE	CASSGGDGDEQFF	9	2-1
3, 6, 9	DSASNY	IRSNVGE	CAASRGTGFQKLVF	13	8	LGHDT	YNNKEL	CASSQFWDGAGDEQYF	3-1	2-7

В примерах можно увидеть, что TCR, предложенные в настоящей заявке, специфичны к MAGE-A4.

Определение процента идентичности между множеством последовательностей предпочтительно осуществляют, применяя прикладную программу AlignX программы Vector NTI Advance™ 10 (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния, США). В этой программе используют модифицированный алгоритм Clustal W. (Thompson et al. Nucl Acids Res 1994; 42: 23-33; Invitrogen Corporation. User Manual 2004; 389-662). Определение процента идентичности осуществляют с помощью стандартных параметров прикладной программы AlignX.

TCR, предложенные в настоящей заявке, являются выделенными или очищенными. "Выделенный" означает, что TCR не присутствует в контексте, в котором он изначально встретился в природе. "Очищенный" означает, например, что TCR освобожден или по существу освобожден от других белков и небелковых компонентов клетки, в которой он изначально возник.

В некоторых вариантах реализации последовательность аминокислот TCR может содержать одну или более фенотипически молчащих замен.

"Фенотипически молчащие замены" также называют "консервативными заменами аминокислот". Концепция "консервативных замен аминокислот" понятна квалифицированному специалисту и предпочтительно означает, что кодоны, кодирующие положительно заряженные остатки (H, K и R), заменяют на кодоны, кодирующие положительно заряженные остатки, кодоны, кодирующие отрицательно заряжен-

ные остатки (D и E), заменяют на кодоны, кодирующие отрицательно заряженные остатки, кодоны, кодирующие нейтральные полярные остатки (C, G, N, Q, S, T и Y), заменяют на кодоны, кодирующие нейтральные полярные остатки, и кодоны, кодирующие нейтральные неполярные остатки (A, F, I, L, M, P, V и W), заменяют на кодоны, кодирующие нейтральные неполярные остатки. Такие изменения могут происходить спонтанно, могут быть введены посредством неспецифичного мутагенеза или могут быть введены посредством направленного мутагенеза. Такие изменения можно сделать, не нарушая важные свойства данных полипептидов. Специалист со средней квалификацией в данной области техники может с легкостью и обычным способом осуществить скрининг вариантов аминокислот и/или нуклеиновых кислот, кодирующих их, чтобы определить с помощью способов, известных в данной области техники, присутствует ли значительное снижение или нарушение у данных вариантов способности связывать лиганд.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность аминокислот TCR модифицирована таким образом, чтобы она содержала детектируемую метку, терапевтический агент или модифицирующую фармакокинетику группу.

Неограничивающими примерами детектируемых меток являются радиоактивные метки, флуоресцентные метки, зонды на основе нуклеиновых кислот, ферменты и контрастные реагенты. Терапевтические агенты, которые можно соединить с TCR, включают радиоактивные соединения, иммуномодуляторы, ферменты или химиотерапевтические агенты. Терапевтические агенты можно заключить в липосому, связанную с TCR, так чтобы соединение можно было медленно высвободить в целевом сайте. Это позволит избежать повреждения во время транспортировки в организме и гарантировать, что терапевтический агент, например токсин, будет оказывать максимальное действие после связывания TCR с соответствующими антигенпрезентирующими клетками. Другими примерами терапевтических агентов являются: пептидные цитотоксины, т.е. белки или пептиды со способностью убивать клетки млекопитающих, такие как рицин, дифтерийный токсин, бактериальный экзотоксин A *Pseudomonas*, ДНКаза и РНКаза. Низкомолекулярные цитотоксические агенты, т.е. соединения со способностью убивать клетки млекопитающих, имеющие молекулярную массу менее 700 дальтон. Такие соединения могут содержать токсичные металлы, способные оказывать цитотоксическое действие. Более того, должно быть понятно, что данные низкомолекулярные цитотоксические агенты также включают пролекарства, т.е. соединения, которые распадаются или преобразуются в физиологических условиях с высвобождением цитотоксических агентов. Такие агенты могут, например, включать доцетаксел, гемцитабин, цисплатин, производные майтансина, рахелмицин, калихеамицин, этопозид, ифосфамид, иринотекан, порфирин натрия фотофрин II, темозоломид, топотекан, триметрексет глюкоронат, митоксантрон, ауристин Е, винкристин и доксорубин; радионуклиды, такие как, йод 131, рений 186, индий 111, иттрий 90, висмут 210 и 213, актиний 225 и астат 213 (присоединение радионуклидов к TCR или их производным можно осуществить, например, с помощью хелатирующих агентов); иммуностимуляторы, также известные как иммуностимулирующее средство, т.е. иммунные эффекторное молекулы, которые стимулируют иммунный ответ. Примерами иммуностимуляторов являются цитокины, такие как IL-2 и IFN- $\gamma$ , антитела или их фрагменты, включая антитела против детерминант Т-клеток или НК-клеток (например, против CD3, против CD28 или против CD16); альтернативные белковые каркасы с подобными антителам свойствами связывания; суперантигены, т.е. антигены, которые вызывают неспецифичную активацию Т-клеток, приводящую к активации поликлональных Т-клеток и массовому высвобождению цитокинов, и их мутанты; хемокины, такие как IL-8, тромбоцитарный фактор 4, стимулирующий рост меланомы белок и т.д., активаторы комплемента; домены ксеногенных белков, домены аллогенных белков, домены вирусных/бактериальных белков, вирусные/бактериальные пептиды.

Молекулы рецепторов антигенов (молекулы Т-клеточного рецептора) на Т-лимфоцитах человека нековалентно связаны с молекулярным комплексом CD3 (T3) на поверхности клетки. Нарушение данного комплекса моноклональными антителами против CD3 вызывает активацию Т-клеток. Таким образом, в некоторых вариантах реализации предложен TCR, описанный в настоящей заявке, связанный (обычно путем слияния с N- или C-концом цепи альфа или бета) с антителом против CD3 или функциональным фрагментом или вариантом указанного антитела против CD3. Фрагменты и варианты/аналоги антитела, которые подходят для применения в композициях и способах, описанных в настоящей заявке, включают миниантитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, фрагменты dsFv и scFv, нанотела (Nanobodies™) (Ablynx (Бельгия)), молекулы, содержащие синтетический одиночный домен переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина, происходящий из антитела верблюдовых (например, верблюда, или ламы, или альпаки), и доменные антитела (содержащие одиночный домен переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина или домен переменной области легкой цепи иммуноглобулина с созревшей аффинностью) (Domantis (Бельгия)) или альтернативные белковые каркасы, которые проявляют подобные антителам свойства связывания, такие как аффитела (включая сконструированное аффитело на основе каркаса белка А (Швеция)) или антикалины (включая сконструированные антикалины Pieris (Германия)).

Терапевтический агент предпочтительно можно выбрать из группы, состоящей из иммунной эффекторной молекулы, цитотоксического агента и радионуклида. Предпочтительно, иммунная эффектор-

ная молекула представляет собой цитокин.

Модифицирующая фармакокинетику группа может, например, представлять собой по меньшей мере одно повторяющееся звено полиэтиленгликоля, по меньшей мере одну гликольную группу, по меньшей мере одну сиалильную группу или их комбинацию. Соединение по меньшей мере одного повторяющегося звена полиэтиленгликоля, по меньшей мере одной гликольной группы, по меньшей мере одной сиалильной группы можно осуществить множеством способов, известных специалистам в данной области техники. В предпочтительном варианте реализации указанные звенья соединяют с TCR ковалентной связью. TCR, предложенные в настоящей заявке, могут быть модифицированы одной или несколькими модифицирующими фармакокинетику группами. В частности, растворимая форма TCR модифицирована одной или несколькими модифицирующими фармакокинетику группами. Модифицирующая фармакокинетику группа может позволить добиться благоприятных изменений в фармакокинетическом профиле терапевтического средства, например, улучшенного времени полужизни в плазме, сниженной или повышенной иммуногенности и улучшенной растворимости.

TCR, предложенные в настоящей заявке, могут быть растворимыми или связанными с мембраной. Термин "растворимый" относится к TCR, находящемуся в растворимой форме (т.е. не имеющему трансмембранных или цитоплазматических доменов), например, для применения в качестве нацеливающего агента для доставки терапевтических агентов к антигенпрезентирующей клетке. Для стабильности, растворимые гетеродимерные  $\alpha\beta$  TCR предпочтительно содержат введенную дисульфидную связь между остатками соответствующих константных доменов, как описано, например, в WO 03/020763. Один или оба константных домена, присутствующих в гетеродимере  $\alpha\beta$ , можно укоротить с С-конца или С-концов, например, на до 15, или до 10 или до 8 или не меньшее количество аминокислот. Для применения в адоптивной терапии, гетеродимерный  $\alpha\beta$  TCR может быть, например, трансфицирован в виде полноразмерных цепей, содержащих как цитоплазматические, так и трансмембранные домены. TCR могут содержать дисульфидную связь, соответствующую таковой, встречающейся в природе, между соответствующими константными доменами альфа и бета, в качестве дополнения или альтернативы, может присутствовать ненативная дисульфидная связь.

TCR, в частности, растворимую форму TCR, предложенную в настоящей заявке, следовательно, можно модифицировать путем присоединения дополнительных функциональных групп, например, для снижения иммуногенности, увеличения гидродинамического размера (размера в растворе), растворимости и/или стабильности (например, путем повышения защиты от протеолитической деградации) и/или увеличения времени полужизни в сыворотке. Другие подходящие функциональные группы и модификации включают "переключатели саморазрушения" или "защитные переключатели", которые можно применять для выключения эффекторных клеток-хозяев, несущих TCR в соответствии с настоящим изобретением, в организме пациента. Примером является индуцируемый "защитный переключатель" каспазы 9 (iCasp9), описанный Gargett и Brown. *Front Pharmacol* 2014; 5: 235. Вкратце, эффекторные клетки-хозяева модифицируют с помощью хорошо известных способов экспрессии домена каспазы 9, димеризация которого зависит от низкомолекулярного димеризирующего лекарственного средства, такого как AP1903/CIP, и приводит к быстрой индукции апоптоза в модифицированных эффекторных клетках. Указанная система, например, описана в EP2173869 (A2). Примеры других "переключателей саморазрушения" или "защитных переключателей" известны в данной области техники, например, Herpes Simplex Virus thymidine kinase (HSV-TK), expression of CD20 and subsequent depletion using anti-CD20 antibody or myc tags (Kieback et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 15;105(2):623-628).

TCR с измененным паттерном гликозилирования также предложены в настоящей заявке. В данной области техники известно, что паттерны гликозилирования могут зависеть от последовательности аминокислот (например, наличия или отсутствия определенных гликозилируемых аминокислотных остатков, которые обсуждаются ниже) и/или клетки или организма хозяина, в которых продуцируется белок. Гликозилирование полипептидов обычно представляет собой либо N-связанное, либо O-связанное гликозилирование. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи остатка аспарагина. Добавление сайтов N-связанного гликозилирования в связывающую молекулу удобно осуществить путем изменения последовательности аминокислот таким образом, чтобы она содержала одну или более трипептидных последовательностей, выбранных из: аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин (где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина). Сайты O-связанного гликозилирования можно ввести путем добавления в исходную последовательность или осуществления в ней замены на один или более остатков серина или треонина.

Другими способами гликозилирования TCR является химическое или ферментативное соединение гликозидов с белком. В зависимости от используемого способа соединения, сахар(а) можно присоединить к: (а) аргинину и гистидину, (б) свободным карбоксильным группам, (с) свободным сульфгидрильным группам, таким как таковые у цистеина, (д) свободным гидроксильным группам, таким как таковые у серина, треонина или гидроксипролина, (е) ароматическим остаткам, таким как таковые у фенилаланина, тирозина или триптофана, или (ф) амидной группе глутамина. Аналогично, дегликозилирование (т.е. удаление углеводных групп, присутствующих на связывающей молекуле) можно осуществить химиче-

ски, например, путем воздействия на TCR трифторметансульфоновой кислотой, или ферментативно путем использования эндо- и экзогликозидаз.

Также возможно добавить лекарственное средство, такое как низкомолекулярное соединение, к TCR, в частности, к растворимой форме TCR в соответствии с настоящим изобретением. Связывания можно добиться с помощью ковалентных связей или нековалентных взаимодействий, например, с помощью электростатических сил. Можно использовать различные линкеры, известные в данной области техники, чтобы получить конъюгаты с лекарственным средством.

TCR, в частности, растворимую форму TCR в соответствии с настоящим изобретением, можно дополнительно модифицировать, чтобы ввести дополнительные домены, которые будут способствовать идентификации, отслеживанию, очистке и/или выделению соответствующей молекулы (метки). Таким образом, в некоторых вариантах реализации  $\alpha$  цепь TCR или  $\beta$  цепь TCR можно модифицировать, чтобы она содержала эпитопную метку.

Эпитопные метки являются примерами пригодных меток, которые можно внедрить в TCR. Эпитопные метки представляют собой короткие участки из аминокислот, которые позволяют связывание специфического антигена и, следовательно, позволяют идентификацию и отслеживание связывания и перемещения растворимых TCR или клеток-хозяев в организме пациента или культивированных клеток (хозяев). Детектирование эпитопных меток и, следовательно, меченого TCR, можно осуществить, применяя множество различных методик. Метки можно дополнительно использовать для стимуляции и размножения клеток-хозяев, несущих TCR в соответствии с настоящим изобретением, путем культивирования клеток в присутствии связывающих молекул (антител), специфичных к указанной метке.

Обычно, TCR можно модифицировать, в некоторых случаях, введением различных мутаций, которые модифицируют аффинность и скорость диссоциации TCR от целевого антигена. В частности, мутации могут повышать аффинность и/или уменьшать скорость диссоциации. Таким образом, TCR может быть мутирован в по меньшей мере одном его CDR и каркасной области варибельного домена.

Тем не менее, в предпочтительном варианте реализации участки CDR TCR не модифицированы или не прошли созревание аффинности *in vitro*, как для рецепторов TCR в разделе "Примеры". Это означает, что участки CDR имеют встречающиеся в природе последовательности. Это может быть предпочтительным, поскольку созревание аффинности *in vitro* может приводить к иммуногенности молекулы TCR. Это может приводить к продукции антитела против лекарственного средства, снижая или инактивируя терапевтический эффект и лечение, и/или к возникновению нежелательных явлений.

Мутация может представлять собой одну или более замен, делеций или вставок. Такие мутации можно ввести с помощью любого подходящего способа, известного в данной области техники, такого как синтез ДНК полимеразная цепная реакция, клонирование на основе ферментов рестрикции, не зависящие от лигирования процедуры клонирования, которые описаны, например, в Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012.

Теоретически, непредсказуемая специфичность TCR с риском перекрестной реакционной способности может возникнуть вследствие ошибочного спаривания между эндогенными и экзогенными цепями TCR. Для того чтобы избежать ошибочного спаривания последовательностей TCR, рекомбинантную последовательность TCR можно модифицировать так, чтобы она содержала минимальные мураинизированные области C $\alpha$  и C $\beta$ , - технология, которая, как было показано, эффективно повышает частоту правильного спаривания нескольких различных трансдуцированных цепей TCR. Мураинизирование TCR (т.е. обмен константных областей человека в цепях альфа и бета на их аналоги из мыши) представляет собой методику, которую широко применяют для улучшения экспрессии TCR на поверхности клеток-хозяев. Без привязки к какой-либо конкретной теории полагают, что мураинизированные TCR более эффективно связываются с корцепторами CD3; и/или что они преимущественно спариваются друг с другом и менее склонны образовывать смешанные TCR на Т-клетках человека, генетически модифицированных *ex vivo* для осуществления экспрессии TCR с желательной антигенной специфичностью, но все еще сохранивших и экспрессирующих свои "исходные" TCR.

Идентифицировали девять аминокислот, отвечающих за улучшенную экспрессию мураинизированных TCR (Sommermeier and Uckert, J Immunol. 2010; 184(11): 6223-6231), и предусмотрели замену одного или всех аминокислотных остатков в константной области цепи альфа и/или бета TCR на соответствующие им остатки из мыши. Такую методику также называют "минимальным мураинизированием", и она дает преимущество повышения экспрессии на поверхности клетки при одновременном уменьшении количества "чужеродных" аминокислотных остатков в последовательности аминокислот и, вследствие этого, уменьшении риска иммуногенности.

В предпочтительном варианте реализации TCR, содержащие минимальные мураинизированные области C $\alpha$  и C $\beta$ , представляют собой TCR-1, содержащий  $\alpha$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 10 и  $\beta$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 11, TCR-2, содержащий  $\alpha$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 20 и  $\beta$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 21, TCR-3, содержащий  $\alpha$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 30 и  $\beta$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 31.

В предпочтительных вариантах реализации TCR содержат минимально мураинизированные области

С $\alpha$  и С $\beta$  и дополнительно содержат гидрофобные мутации аминокислот в трансмембранном домене С $\alpha$ . Было показано, что трансмембранный домен  $\alpha$  цепи TCR вносит вклад в отсутствие стабильности всей цепи и, вследствие этого, влияет на формирование и экспрессию на поверхности всего комплекса TCR-CD3. Замена трех аминокислот в трансмембранном домене TCR  $\alpha$  на гидрофобные аминокислоты лейцин или валин повышала экспрессию и функциональную avidность TCR Haga-Friedman et al. *J. Immunology* 2012; 188: 5538-5546.

В предпочтительном варианте реализации TCR, содержащие минимально мураинизированные области С $\alpha$  и С $\beta$  и гидрофобные замены аминокислот в  $\alpha$  цепи TCR, представляют собой TCR-7, содержащий  $\alpha$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 102 и  $\beta$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 103, TCR-8, содержащий  $\alpha$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 108 и  $\beta$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 109, TCR-9, содержащий  $\alpha$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 114 и  $\beta$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 115.

В некоторых вариантах реализации предложен выделенный TCR, описанный в настоящей заявке, причем указанный TCR относится к одноцепочечному типу, в котором  $\alpha$  цепь TCR и  $\beta$  цепь TCR связаны линкерной последовательностью, необязательно при этом линкер является расщепляемым.

Подходящая одноцепочечная форма TCR содержит первый фрагмент, образованный последовательностью аминокислот, соответствующей вариабельной области TCR  $\alpha$ , второй фрагмент, образованный последовательностью аминокислот, соответствующей вариабельной области TCR  $\beta$ , слитой с N-концом последовательности аминокислот, соответствующей внеклеточной последовательности константной области  $\beta$  цепи TCR, и линкерную последовательность, соединяющую C-конец первого фрагмента с N-концом второго фрагмента. В качестве альтернативы, первый фрагмент может быть образован последовательностью аминокислот, соответствующей вариабельной области  $\beta$  цепи TCR, второй фрагмент может быть образован последовательностью аминокислот, соответствующей последовательности вариабельной области  $\alpha$  цепи TCR, слитой с N-концом последовательности аминокислот, соответствующей внеклеточной последовательности константной области  $\alpha$  цепи TCR. Описанные выше одноцепочечные TCR могут дополнительно содержать дисульфидную связь между первой и второй цепями, причем длина линкерной последовательности и положение дисульфидной связи такие, что последовательности вариабельных доменов первого и второго фрагментов взаимно ориентированы по существу как в нативных T-клеточных рецепторах. В частности, первый фрагмент может быть образован последовательностью аминокислот, соответствующей последовательности вариабельной области  $\alpha$  цепи TCR, слитой с N-концом последовательности аминокислот, соответствующей внеклеточной последовательности константной области  $\alpha$  цепи TCR, второй фрагмент может быть образован последовательностью аминокислот, соответствующей вариабельной области цепи TCR  $\beta$ , слитой с N-концом последовательности аминокислот, соответствующей внеклеточной последовательности константной области цепи TCR  $\beta$ , и между первой и второй цепями можно ввести дисульфидную связь. Линкерная последовательность может представлять собой любую последовательность, которая не нарушает функцию TCR

"Функциональный" слитый белок из  $\alpha$  и/или  $\beta$  цепей TCR должен означать TCR или вариант TCR, например, модифицированный путем добавления, делеции или замены аминокислот, у которого сохранилась по меньшей мере значительная биологическая активность. В случае  $\alpha$  и/или  $\beta$  цепей TCR, это должно означать, что обе цепи остаются способными образовывать T-клеточный рецептор (либо с немодифицированной  $\alpha$  и/или  $\beta$  цепью, либо с  $\alpha$  и/или  $\beta$  цепью другого слитого белка в соответствии с настоящим изобретением), который проявляет свою биологическую функцию, в частности, связывание указанного TCR с конкретным комплексом пептид-ГКГС и/или функциональную передачу сигнала после взаимодействия с конкретным пептидом:ГКГС.

В конкретных вариантах реализации TCR можно модифицировать, чтобы он представлял собой функциональный слитый белок  $\alpha$  и/или  $\beta$  цепей T-клеточного рецептора (TCR), в котором длина указанной эпитопной метки составляет от 6 до 15 аминокислот, предпочтительно от 9 до 11 аминокислот. В другом варианте реализации TCR можно модифицировать, чтобы он представлял собой функциональный слитый белок  $\alpha$  и/или  $\beta$  цепей T-клеточного рецептора (TCR), причем указанный слитый белок  $\alpha$  и/или  $\beta$  цепей T-клеточного рецептора (TCR) содержит две или более эпитопных меток, расположенных на расстоянии друг от друга или расположенных непосредственно одна за другой. В вариантах реализации слитого белка могут содержаться 2, 3, 4, 5 или даже больше эпитопных меток, при условии, что у слитого белка сохраняется биологическая(-ие) активность/активности (он "функционален").

Предпочтителен функциональный слитый белок  $\alpha$  и/или цепей  $\beta$  T-клеточного рецептора (TCR) согласно настоящему изобретению, в котором указанная эпитопная метка выбрана из перечисленных меток, но не ограничена ими: метки CD20 или Her2/неу, или другие обычные метки, такие как метка мус, метка FLAG, метка T7, метка HA (гемагглютинин), метка His, S-метка, метка GST или метка GFP. Метки мус, T7, GST, GFP представляют собой эпитопы, происходящие из существующих молекул. Напротив, FLAG представляет собой синтетическую эпитопную метку, разработанную для высокой антигенности (см., например, патенты США № 4703004 и 4851341). Предпочтительно можно использовать метку мус

благодаря тому, что доступны высококачественные реагенты, применяемые для ее детектирования. Эпитопные метки, несомненно, обладают одной или более дополнительными функциями, помимо распознавания антителом. Последовательности таких меток описаны в литературе и хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники.

В более предпочтительных вариантах реализации выделенный TCR экспрессируется в виде слитого белка, в котором  $\alpha$  цепь TCR и  $\beta$  цепь TCR разделены одним или более сигналами расщепления полипептида. В конкретных вариантах реализации слитый белок содержит от 5' к 3':  $\alpha$  цепь TCR, один или более сигналов расщепления полипептида и  $\beta$  цепь TCR. В конкретных вариантах реализации слитый белок содержит от 5' к 3':  $\beta$  цепь TCR, один или более сигналов расщепления полипептида и  $\alpha$  цепь TCR.

Сигналы расщепления полипептида, предложенные в настоящей заявке, включают, но не ограничены сайтами расщепления протеазой и последовательностями проскока рибосомы. Сигнал расщепления полипептида может быть расположен между каждым из доменов полипептида, описанных в настоящей заявке, например, между  $\alpha$  цепью TCR и  $\beta$  цепью TCR. Кроме того, сигнал расщепления полипептида можно вставить в любую последовательность линкерного пептида. Примеры сигналов расщепления полипептида включают сайты распознавания расщепления полипептидов, такие как сайты расщепления протеазой, сайты расщепления нуклеазой (например, редкие сайты распознавания ферментами рестрикции, сайты распознавания саморасщепляющимся рибозимом) и саморасщепляющиеся вирусные олигопептиды или последовательности проскока рибосомы (см. deFelipe and Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26).

Иллюстративные примеры сайтов расщепления протеазой, подходящих для применения в конкретных вариантах реализации, включают, но не ограничены перечисленными сайтами расщепления: фурином (например, Arg-X-X-Arg, таким как Arg-X-Lys/Arg-Arg или Arg-Gln/Tyr-Lys/Arg-Arg; фурин может дополнительно расщеплять последовательности Arg-Ala-Arg-Tyr-Lys-Arg или Arg-Ala-Arg-Tyr-Lys-Arg-Ser); субтилизинами (например, PC2, PC1/PC3, PACE4, PC4, PC5/PC6, LPC/PC7/PC8/SPC7 и SKI-I); энтерокиназой (например, Asp-Asp-Asp-Aps-Lys\* и Asp/Glu-Arg-\*Met); фактором Ха (например, Glu-Gly-Arg\*); тромбином (например, Leu-Val-Pro-Arg\*Gly-Ser); гранзимом В (например, Ile-Glu-Pro-Asp\*); каспазой-3 (например, Asp-Glu-Val-Asp\*); и тому подобными протеазами.

Иллюстративные примеры саморасщепляющихся вирусных пептидов или последовательностей проскока рибосомы включают, но не ограничены 2A или 2A-подобным сайтом, последовательностью или доменом (Donnelly et al., 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041). В конкретных вариантах реализации вирусный пептид 2A представляет собой пептид 2A афтовируса, пептид 2A потивируса или пептид 2A кардиовируса. В предпочтительных вариантах реализации вирусный пептид 2A выбран из группы, состоящей из: пептида 2A вируса ящура (F2A), пептида 2A вируса А лошадиного ринита (E2A), пептида 2A вируса *Thosea asigna* (T2A), пептида 2A тешовируса-1 свиней (P2A), пептида 2A тейловируса и пептида 2A вируса энцефаломиокардита.

В некоторых вариантах реализации слитый белок содержит  $\alpha$  цепь TCR, сайт протеолитического расщепления и/или последовательность проскока рибосомы и  $\beta$  цепь TCR. В предпочтительных вариантах реализации слитый белок содержит  $\alpha$  цепь TCR, сайт расщепления фурином и/или последовательность проскока рибосомы P2A и  $\beta$  цепь TCR. В других предпочтительных вариантах реализации слитый белок содержит  $\alpha$  цепь TCR, последовательность проскока рибосомы P2A и  $\beta$  цепь TCR.

В конкретных вариантах реализации слитый белок содержит  $\beta$  цепь TCR, сайт протеолитического расщепления и/или последовательность проскока рибосомы и  $\alpha$  цепь TCR. В предпочтительных вариантах реализации слитый белок содержит  $\beta$  цепь TCR, сайт расщепления фурином и/или последовательность проскока рибосомы P2A и  $\alpha$  цепь TCR. В других предпочтительных вариантах реализации слитый белок содержит  $\beta$  цепь TCR, последовательность проскока рибосомы P2A и  $\alpha$  цепь TCR.

В предпочтительных вариантах реализации слитые белки содержат последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 94, 96, 98, 104, 110, и 116.

#### Г. Фрагменты и варианты TCR

В другом аспекте предложен полипептид, содержащий функциональную часть TCR, описанного в настоящей заявке. Функциональная часть может содержать по меньшей мере одну из последовательностей аминокислот, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 27.

В конкретных вариантах реализации полипептид может содержать функциональную часть TCR отдельно, например, в растворимой форме. В качестве альтернативы, полипептид можно комбинировать с другими доменами.

Функциональная часть может опосредовать связывание TCR с антигеном, в частности, с комплексом антиген-ГКГС. В одном варианте реализации функциональная часть содержит вариabельную цепь TCR  $\alpha$  и/или вариabельную цепь TCR  $\beta$ , описанную в настоящей заявке.

Молекула варианта TCR, т.е. молекула, в которой полипептид, содержащий функциональную часть TCR, объединен с другими доменами, может обладать свойствами связывания рецептора TCR, но его можно комбинировать с сигнальными доменами эффекторных клеток (отличных от Т-клеток), в частности, с сигнальными доменами НК-клеток. Следовательно, в некоторых вариантах реализации предложен

белок, содержащий функциональную часть TCR, описанную в настоящей заявке, в комбинации с сигнальными доменами иммунной эффекторной клетки, такой как НК-клетка.

"Связывание" относится к способности специфично и нековалентно соединяться, объединяться или связываться с мишенью.

В другом аспекте предложен поливалентный комплекс TCR, содержащий по меньшей мере два TCR, описанных в настоящей заявке. В одном варианте реализации данного аспекта по меньшей мере две молекулы TCR связаны посредством молекул линкера с образованием поливалентных комплексов. Предпочтительно, комплексы растворимы в воде, так что молекулу линкера следует выбирать соответственно. Предпочтительно, чтобы молекула линкера была способна присоединяться к определенным положениям на молекулах TCR, так что структурное разнообразие образованных комплексов минимизируется. В одном варианте реализации данного аспекта предложен комплекс TCR, в котором полимерная цепь или пептидная линкерная последовательность располагается между аминокислотными остатками каждого TCR, которые не расположены в последовательности варибельной области TCR. Поскольку комплексы могут быть предназначены для применения в медицине, то молекулы линкера следует выбирать с соответствующим учетом их фармацевтической пригодности, например, их иммуногенности. Примеры молекул линкера, которые удовлетворяют описанным выше желательным критериям, известны в данной области техники, например, в области соединения фрагментов антител.

Примерами линкеров являются гидрофильные полимеры и пептидные линкеры. Примерами гидрофильных полимеров являются полиалкиленгликоли. Наиболее часто применяемые полимеры из данного класса получают на основе полиэтиленгликоля или ПЭГ. Тем не менее, другие получают на основе других подходящих, необязательно содержащих заместители, полиалкиленгликолей, которые включают полипропиленгликоль и сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля. Пептидные линкеры состоят из цепей аминокислот и используются для получения простых линкеров или доменов мультимеризации, к которым можно присоединить молекулы TCR.

В одном варианте реализации предложен поливалентный комплекс TCR, в котором по меньшей мере один из указанных TCR связан с терапевтическим агентом.

#### G. Высвобождение цитокинов и хемокинов.

В некоторых вариантах реализации предложен выделенный TCR, описанный в настоящей заявке, полипептид, описанный в настоящей заявке, поливалентный комплекс TCR, описанный в настоящей заявке, причем секреция IFN- $\gamma$  вызвана связыванием TCR в соответствии с настоящим изобретением, экспрессированным на эффекторной клетке, с последовательностью аминокислот, представляющей собой SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01.

Секреция IFN- $\gamma$ , вызванная связыванием TCR в соответствии с настоящим изобретением, экспрессированным на эффекторной клетке, с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01, может быть более чем в 100 раз выше, предпочтительно в 500 раз выше, более предпочтительно в 2000 раз выше при связывании с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентруется молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01, по сравнению со связыванием с нерелевантным пептидом (ASTN1, SEQ ID NO: 56, KLYGLDWAEEL), который презентирован молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01. Секреция IFN- $\gamma$  может быть, например, более чем 100 пг/мл, например, более чем 500 пг/мл или более чем 2000 пг/мл.

Высвобождение цитокинов и хемокинов, такое как секреция IFN- $\gamma$ , можно измерить, применяя анализ *in vitro*, в котором клетки K562 (Greiner et al. 2006, Blood. 2006 Dec 15;108(13):4109-17) трансфицируют TivPHK или трансдуцируют для осуществления экспрессии последовательности аминокислот SEQ ID NO: 1 или нерелевантного пептида, соответственно, и инкубируют с обогащенными CD8<sup>+</sup> и/или не обогащенными CD8<sup>+</sup> МКПК, экспрессирующими TCR, который нужно исследовать, или анализ *in vitro* с использованием клеток T2, нагруженных *in vivo* либо SEQ ID NO: 1, либо нерелевантным пептидом и впоследствии совместно инкубированных с обогащенными CD8<sup>+</sup> и/или не обогащенными CD8<sup>+</sup> МКПК, экспрессирующими TCR, который нужно исследовать.

В некоторых вариантах реализации предложен выделенный TCR, описанный в настоящей заявке, полипептид, описанный в настоящей заявке, или поливалентный комплекс TCR, описанный в настоящей заявке, для которого секреция IFN- $\gamma$ , вызванная связыванием TCR в соответствии с настоящим изобретением, экспрессированным на эффекторной клетке, с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1 или, в частности, с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01, ниже заранее определенного порога. Указанный порог можно определить, используя определенное соотношение эффектора и мишени, составляющее по меньшей мере 2:1.

"Эффекторная клетка" может представлять собой лимфоцит периферической крови (ЛПК) или мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК). Обычно, эффекторная клетка представляет собой эффекторную клетку иммунной системы, в частности, Т-клетку. Другие подходящие типы клеток включают гамма-дельта Т-клетки, естественные клетки-киллеры (НК) и НК-подобные Т-клетки (NKT).

Секреция IFN- $\gamma$  при связывании TCR в соответствии с настоящим изобретением, экспрессированного на эффекторной клетке, с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована



молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01, может быть вызвана при концентрации пептида MAGE-A4, составляющей по меньшей мере  $10^{-7}$  [M], предпочтительно по меньшей мере  $10^{-8}$  [M], более предпочтительно  $10^{-9}$  [M]. В конкретных вариантах реализации, например, в которых соотношение трансгенных по TCR Т-клеток и клеток Т2 составляет 2:1, секреция IFN- $\gamma$  после связывания TCR в соответствии с настоящим изобретением, экспрессированного на эффекторной клетке, с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01, может быть вызвана при концентрации пептида MAGE-A4, составляющей по меньшей мере  $10^{-7}$  [M], предпочтительно по меньшей мере  $10^{-8}$  [M], более предпочтительно  $10^{-9}$  [M].

В соответствии с настоящим изобретением также предложены способы идентификации TCR или его фрагмента, который связывается с целевой последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01, причем указанный способ включает приведение в контакт кандидатного TCR или его фрагмента с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01, и определение того, связывается ли кандидатный TCR или его фрагмент с мишенью и/или опосредует ли иммунный ответ.

Способен ли кандидатный TCR или его фрагмент опосредовать иммунный ответ, можно определить, например, путем измерения секреции цитокинов, такой как секреция IFN- $\gamma$ . Выше описано, что секрецию цитокинов можно измерить, например, с помощью анализа *in vitro*, в котором клетки K562 (или другие АПК), трансфицированные TivPHK, кодирующей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1, инкубируют с обогащенными CD8<sup>+</sup> МПКК, экспрессирующими TCR или молекулу, содержащую фрагмент TCR, который нужно исследовать.

Н. Нуклеиновые кислоты, векторы.

В другом аспекте предложена нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, описанный в настоящей заявке, или кодирующий полинуклеотид, кодирующий TCR, описанный в настоящей заявке.

В следующей таблице представлены последовательности нуклеотидов, кодирующие соответствующие последовательности пептидов.

Полипептид, SEQ ID NO	Полинуклеотид, SEQ ID NO	Описание
2	32	CDR1 $\alpha$ цепи TCR-1
3	33	CDR2 $\alpha$ цепи TCR-1
4	34	CDR3 $\alpha$ цепи TCR-1
5	35	CDR1 $\beta$ цепи TCR-1

6	36	CDR2 $\beta$ цепи TCR-1
7	37	CDR3 $\beta$ цепи TCR-1
10	38	$\alpha$ цепь TCR-1, полноразмерная
11	39	$\beta$ цепь TCR- 1, полноразмерная
12	40	CDR1 $\alpha$ цепи TCR-2
13	41	CDR2 $\alpha$ цепи TCR-2
14	42	CDR3 $\alpha$ цепи TCR-2
15	43	CDR1 $\beta$ цепи TCR-2
16	44	CDR2 $\beta$ цепи TCR-2
17	45	CDR3 $\beta$ цепи TCR-2
20	46	$\alpha$ цепь TCR-2, полноразмерная
21	47	$\beta$ цепь TCR-2, полноразмерная
22	48	CDR1 $\alpha$ цепи TCR-3
23	49	CDR2 $\alpha$ цепи TCR-3
24	50	CDR3 $\alpha$ цепи TCR-3
25	51	CDR1 $\beta$ цепи TCR-3
26	52	CDR2 $\beta$ цепи TCR-3
27	53	CDR3 $\beta$ цепи TCR-3
30	54	$\alpha$ цепь TCR-3, полноразмерная
31	55	$\beta$ цепь TCR-3, полноразмерная
2	63	CDR1 $\alpha$ цепи TCR-4
3	64	CDR2 $\alpha$ цепи TCR-4
4	65	CDR3 $\alpha$ цепи TCR-4
5	66	CDR1 $\beta$ цепи TCR-4
6	67	CDR2 $\beta$ цепи TCR-4
7	68	CDR3 $\beta$ цепи TCR-4
87	69	$\alpha$ цепь TCR-4, полноразмерная
88	70	$\beta$ цепь TCR-4, полноразмерная
12	71	CDR1 $\alpha$ цепи TCR-5
13	72	CDR2 $\alpha$ цепи TCR-5
14	73	CDR3 $\alpha$ цепи TCR-5
15	74	CDR1 $\beta$ цепи TCR-5
16	75	CDR2 $\beta$ цепи TCR-5
17	76	CDR3 $\beta$ цепи TCR-5

89	77	$\alpha$ цепь TCR-5, полноразмерная
90	78	$\beta$ цепь TCR-5, полноразмерная
22	79	CDR1 $\alpha$ цепи TCR-6
23	80	CDR2 $\alpha$ цепи TCR-6
24	81	CDR3 $\alpha$ цепи TCR-6
25	82	CDR1 $\beta$ цепи TCR-6
26	83	CDR2 $\beta$ цепи TCR-6
27	84	CDR3 $\beta$ цепи TCR-6
91	85	$\alpha$ цепь TCR-6, полноразмерная
92	86	$\beta$ цепь TCR-6, полноразмерная
94	93	Слитый белок TCR-4
96	95	Слитый белок TCR-5
98	97	Слитый белок TCR-6
102	99	$\alpha$ цепь TCR-7, полноразмерная
103	100	$\beta$ цепь TCR-7, полноразмерная
104	101	Слитый белок TCR-7
108	105	$\alpha$ цепь TCR-8, полноразмерная
109	106	$\beta$ цепь TCR-8, полноразмерная
110	107	Слитый белок TCR-8
114	111	$\alpha$ цепь TCR-9, полноразмерная
115	112	$\beta$ цепь TCR-9, полноразмерная
116	113	Слитый белок TCR-9

"Молекула нуклеиновой кислоты" и "последовательность нуклеотидов", как правило, означает полимер ДНК или РНК, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным, синтезированным или полученным (например, выделенным и/или очищенным) из природных источников, который может содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды, и который может содержать природную, неприродную или измененную межнуклеотидную связь, такую как фосфоамидатная связь или фосфоротиоатная связь, вместо фосфодиэфирной, находящейся между нуклеотидами немодифицированного олигонуклеотида. Предпочтительно, нуклеиновые кислоты, описанные в настоящей заявке, являются рекомбинантными. В настоящей заявке термин "рекомбинантный" относится к: (i) молекулам, которые сконструированы вне живых клеток путем соединения природных или синтетических фрагментов нуклеиновых кислот с молекулами нуклеиновых кислот, которые могут реплицироваться в живых клетках, или (ii) молекулам, которые являются результатом репликации молекул, описанных в (i) выше. Для целей настоящего изобретения, репликация может представлять собой репликацию *in vitro* или репликацию *in vivo*. Нуклеиновые кислоты можно сконструировать на основе химического синтеза и/или ферментативных реакций лигирования с использованием процедур, известных в данной области техники, или они доступны для приобретения (например, от Genscript, Thermo Fisher и аналогичных компаний). Например, нуклеиновую кислоту можно синтезировать химическим способом (см. Sambrook et al.), используя встречающиеся в природе нуклеотиды или различным образом модифицированные нуклеотиды, разработанные для повышения биологической стабильности указанных молекул или для повышения физической стабильности дуплекса, образованного при гибридизации (например, фосфоротиоатные производные и акридин-замещенные нуклеотиды). Нуклеиновая кислота может содержать любую последовательность нуклеотидов, которая кодирует любой из рекомбинантных TCR, полипептидов или белков, или их функциональные части или функциональные варианты.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены варианты выделенных или очищенных нуклеиновых кислот, причем указанные варианты нуклеиновых кислот содержат последователь-

ность нуклеотидов, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности нуклеотидов, кодирующей TCR, описанный в настоящей заявке. Такой вариант последовательности нуклеотидов кодирует функциональный TCR, который специфично распознает MAGE-A4.

В соответствии с настоящим изобретением также предложена выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеотидов, которая комплементарна последовательности нуклеотидов любой из нуклеиновых кислот, описанных в настоящей заявке, или последовательности нуклеотидов, которая гибридизуется в строгих условиях с последовательностью нуклеотидов любой из нуклеиновых кислот, описанных в настоящей заявке.

Последовательность нуклеотидов, которая гибридизуется в строгих условиях, предпочтительно гибридизуется в условиях с высокой степенью строгости. Под "условиями с высокой степенью строгости" подразумевают, что последовательность нуклеотидов специфично гибридизуется с целевой последовательностью (последовательностью нуклеотидов любой из нуклеиновых кислот, описанных в настоящей заявке) в количестве, которое детектируемо выше, чем при неспецифичной гибридизации. Условия с высокой степенью строгости включают условия, которые позволяют отличить полинуклеотид с точно комплементарной последовательностью или таковой, содержащий лишь несколько рассредоточенных несовпадений, от произвольной последовательности, в которой случайно оказалось несколько небольших участков (например, из 3-10 оснований), которые совпали с указанной последовательностью нуклеотидов. Такие небольшие комплементарные участки легче плавятся, чем полноразмерный комплемент из 14-17 или более оснований, и высокая строгость гибридизации позволяет легко их различить. Условия с относительно высокой степенью строгости будут включать, например, условия с низким содержанием соли и/или высокой температурой, такие как создаваемые приблизительно 0,02 - 0,1 M NaCl или эквивалента при температурах приблизительно 50-70°C. Такие условия с высокой степенью строгости допускают лишь небольшое количество несовпадений, если вообще допускают, между последовательностью нуклеотидов и матрицей или целевой цепью и, в частности, подходят для детектирования экспрессии любого TCR, описанного в настоящей заявке. Обычно понятно, что условия можно сделать более строгими путем добавления возрастающих количеств формамида.

В конкретных вариантах реализации нуклеиновые кислоты кодон-оптимизированы. В настоящей заявке термин "кодон-оптимизированный" относится к замене кодонов в полинуклеотиде, кодирующем полипептид, чтобы повысить экспрессию, стабильность и/или активность полипептида. Факторы, которые влияют на оптимизацию кодонов, включают, но не ограничены одним или более из следующих: (i) вариации в предпочтении кодонов между двумя или более организмами или генами, или таблицы предпочтения синтетически сконструированных кодонов, (ii) вариации в степени предпочтения кодонов в организме, гене или наборе генов, (iii) систематические вариации кодонов, включая контекст, (iv) вариацию кодонов в соответствии с декодирующими их тРНК, (v) вариацию кодонов в соответствии с % GC, либо в общем, либо в одном положении триплета, (vi) вариацию в степени подобию референсной последовательности, например, встречающейся в природе последовательности, (vii) вариацию в отсечке по частоте кодонов, (viii) структурные свойства мРНК, транскрибированных с последовательности ДНК, (ix) исходные знания о функции последовательностей ДНК, на которых должна основываться разработка набора замен кодонов, (x) систематическое изменение наборов кодонов для каждой аминокислоты, и/или (xi) одиночное удаление ложных сайтов инициации трансляции.

В другом варианте реализации предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, описанный в настоящей заявке. Указанный вектор предпочтительно представляет собой плазмиду, челночный вектор, фагмиду, космиду, вектор экспрессии, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор или частицу и/или вектор для применения в генной терапии.

"Вектор" представляет собой любую молекулу или композицию, обладающую способностью переносить последовательность нуклеиновой кислоты в подходящую клетку-хозяина, где может происходить синтез кодируемого полипептида. Обычно, и предпочтительно, вектор представляет собой нуклеиновую кислоту, которую сконструировали, применяя технологии рекомбинантных ДНК, известные в данной области техники, чтобы она содержала желательную последовательность нуклеиновой кислоты. Вектор может включать ДНК или РНК и/или включать липосомы. Вектор может представлять собой плазмиду, челночный вектор, фагмиду, космиду, вектор экспрессии, ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или частицу и/или вектор для применения в генной терапии. Вектор может содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые позволяют ему реплицироваться в клетке-хозяине, такие как точка начала репликации. Вектор также может содержать один или более генов селективируемого маркера и других генетических элементов, известных средним специалистам в данной области техники. Вектор предпочтительно представляет собой вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением, функционально связанную с последовательностями, позволяющими экспрессию указанной нуклеиновой кислоты.

В предпочтительных вариантах реализации вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую  $\beta$  цепь TCR, имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 88, и  $\alpha$  цепь TCR,

имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 87;  $\beta$  цепь TCR, имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 90, и  $\alpha$  цепь TCR, имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 89; цепь TCR  $\beta$ , имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 92, и  $\alpha$  цепь TCR, имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 91; цепь TCR  $\beta$ , имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 103, и  $\alpha$  цепь TCR, имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 102;  $\beta$  цепь TCR, имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 109, и  $\alpha$  цепь TCR, имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 108; или  $\beta$  цепь TCR, имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 115, и  $\alpha$  цепь TCR, имеющую последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 114.

Предпочтительно, вектор представляет собой вектор экспрессии. Более предпочтительно, вектор представляет собой ретровирусный, в частности, гамма-ретровирусный или лентивирусный вектор.

I. Клетки, линии клеток.

В другом аспекте предложена клетка, экспрессирующая TCR, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации клетка является выделенной или не встречающейся в природе. В конкретных вариантах реализации клетка может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, описанный в настоящей заявке, или вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту.

В клетку можно внедрить описанный выше вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный выше TCR, или TivPHK, кодирующую указанный TCR. Клетка может представлять собой лимфоцит периферической крови, такой как T-клетка. Способ клонирования и экзогенной экспрессии TCR, например, описан в Engels et al. *Cancer cell*, 2013; 23(4): 516-526. Трансдукция первичных T-клеток человека лентивирусным вектором, например, описана в Cribbs et al. *BMC Biotechnol.* 2013; 13: 98.

Термин "трансфекция" относится к невирусному процессу, с помощью которого экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты вводят в клетку-хозяина, например, в эукариотическую клетку-хозяина. Стоит отметить, что внедрение или перенос последовательности нуклеиновых кислот не ограничен упомянутыми способами и может быть достигнут любым количеством способов, включая электропорацию, микроинъекцию, доставку с помощью генной пушки, липофекцию или суперфекцию.

Термин "трансдукция" относится к внедрению экзогенной последовательности нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина с применением вирусного вектора, например, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), вируса коровьей оспы, вируса герпеса, ретровируса или лентивируса.

В некоторых вариантах реализации предложена клетка, содержащая: а) вектор экспрессии, который содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, описанную в настоящей заявке, или б) первый вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую цепь альфа TCR, описанную в настоящей заявке, и второй вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую цепь бета TCR, описанную в настоящей заявке.

В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой лимфоцит периферической крови (ЛПК) или мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК). Клетка может представлять собой естественную клетку-киллера (NK), подобную естественному киллеру T-клетку (NKT) или T-клетку. Предпочтительно, клетка представляет собой T-клетку. T-клетка может представлять собой CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> T-клетку или дважды негативные T-клетки, т.е. T-клетки, не экспрессирующие ни CD4, ни CD8. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой подобную стволовой клетке T-клетку памяти.

В предпочтительных вариантах реализации TCR функционирует независимо от корцепторов, т.е. TCR функционирует как в CD8<sup>+</sup>, так и в CD4<sup>+</sup> клетках, например, TCR-5 и TCR-8.

Подобные стволовой клетке T-клетки памяти (TSCM) представляют собой менее дифференцированную субпопуляцию CD8<sup>+</sup> T-клеток, которые характеризуются способностью к самообновлению и длительному сохранению. После того, как эти клетки встречаются с антигеном *in vivo*, они далее дифференцируются в центральные T-клетки памяти (TCM), эффекторные T-клетки памяти (TEM) и терминально-дифференцированные эффекторные T-клетки памяти (TEMRA), при этом некоторые TSCM остаются покоящимися (Flynn et al., *Clinical & Translational Immunology* 2014; 3(7): e20.). У этих оставшихся клеток TSCM выявили способность создавать длительную иммунологическую память *in vivo*, и, следовательно, их считают важной субпопуляцией T-клеток для адоптивной T-клеточной терапии (Lugli et al., *Nature Protocols* 2013; 8: 33-42, Gattinoni et al., *Nat. Med.* 2011; Oct; 17(10): 1290-1297). Иммуно-магнитную селекцию можно использовать, чтобы ограничить пул T-клеток подтипом стволовых T-клеток памяти (см. Riddell et al. *Cancer Journal* 2014; 20(2): 141-144) J. Антитела, нацеленные на TCR.

В другом аспекте предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающийся с частью TCR, описанного в настоящей заявке, которая опосредует специфичность к MAGE-A4. В одном варианте реализации часть TCR, которая опосредует специфичность к MAGE-A4, содержит CDR3 альфа-цепи TCR, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 14 и

SEQ ID NO: 24, и CDR3 бета-цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 27.

Указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может модулировать активность TCR. Оно может блокировать или может не блокировать связывание TCR с MAGE-A4. Его можно применять для модулирования терапевтической активности TCR или в диагностических целях.

К. Фармацевтические композиции, способы лечения и наборы.

В другом аспекте предложены композиции, содержащие TCR, описанный в настоящей заявке, полипептид, содержащий функциональную часть указанного TCR, поливалентный комплекс TCR, описанный в настоящей заявке, нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, клетку, содержащую указанный TCR, или антитело, специфично связывающееся с частью TCR, описанного в настоящей заявке.

В другом аспекте предложены фармацевтические композиции, содержащие TCR, описанный в настоящей заявке, полипептид, содержащий функциональную часть указанного TCR, поливалентный комплекс TCR, описанный в настоящей заявке, нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, клетку, содержащую указанный TCR, или антитело, специфично связывающееся с частью TCR, описанного в настоящей заявке.

Эти активные компоненты в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно используют в такой фармацевтической композиции, в дозах, смешанных с приемлемым носителем или материалом носителя, что заболевание можно лечить или по меньшей мере облегчить. Такая композиция может (дополнительно к активному компоненту и носителю) содержать наполнитель, соли, буфер, стабилизаторы, солюбилизатор и другие материалы, которые представляют собой известный уровень техники.

Термин "фармацевтически приемлемый" описывает нетоксичный материал, который не препятствует эффективности биологической активности активного компонента. Выбор носителя зависит от применения.

Фармацевтическая композиция может содержать дополнительные компоненты, которые повышают активность активного компонента или которые дополняют лечение. Такие дополнительные компоненты и/или факторы могут быть частью фармацевтической композиции, чтобы добиться синергичного действия или минимизировать неблагоприятные или нежелательные действия.

Методики получения или подготовки составов с активными компонентами в соответствии с настоящим изобретением и их применения/лечения опубликованы в источнике Remington: The Science and Practice of Pharmacy, volume I and volume II. 22<sup>nd</sup> Edition, Edited by Loyd V. Allen Jr. Philadelphia, PA: Pharmaceutical Press; 2012, который полностью включен в данную заявку посредством ссылки. Подходящее применение представляет собой парентеральное применение, например, внутримышечные, подкожные, интрамедуллярные инъекции, а также интратекальные инъекции, инъекции непосредственно внутрь желудка, внутривенные, внутриузловые, интраперитонеальные или внутриопухолевые инъекции. Внутривенная инъекция или инфузия является предпочтительным способом лечения пациента.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации фармацевтическую композицию вводят путем инфузии или инъекции. Инъецируемая композиция представляет собой фармацевтически приемлемую жидкую композицию, содержащую по меньшей мере один активный ингредиент, например, размноженную популяцию Т-клеток (например, аутологичную или аллогенную для пациента, которого лечат), экспрессирующих TCR. Активный ингредиент обычно растворяют или суспендируют в физиологически приемлемом носителе, и композиция может дополнительно содержать небольшие количества одного или более нетоксичных вспомогательных веществ, таких как эмульгирующие агенты, консерванты и pH-буферные вещества, и тому подобные агенты. Такие инъецируемые композиции, которые пригодны для применения со слитыми белками в соответствии с настоящим изобретением, обычны; подходящие составы хорошо известны средним специалистам в данной области техники.

Обычно фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Соответственно, в другом аспекте предложены TCR, описанный в настоящей заявке, полипептид, содержащий функциональную часть указанного TCR, поливалентный комплекс TCR, описанный в настоящей заявке, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный TCR, вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, клетка, содержащая указанный TCR, антитело, специфично связывающееся с частью TCR, композиция или фармацевтическая композиция, содержащая одну или более клеток, экспрессирующих TCR, описанный в настоящей заявке, для применения в качестве лекарственного средства.

В некоторых вариантах реализации предложены TCR, описанный в настоящей заявке, полипептид, содержащий функциональную часть указанного TCR, поливалентный комплекс TCR, описанный в настоящей заявке, нуклеиновая кислота, кодирующая указанный TCR, вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, клетка, содержащая указанный TCR, или композиции или фармацевтические композиции, содержащие их, для применения для лечения рака.

В одном варианте реализации для представляет собой гематологический рак или солидную опухоль. Гематологические типы рака также называют раком крови, они не образуют солидные опухоли и, следовательно, рассредоточены по организму. Примерами гематологических типов рака являются лей-

коз, лимфома или множественная миелома. Существует два основных типа солидных опухолей: саркомы и карциномы. Саркомы представляют собой, например, опухоли кровеносного сосуда, кости, жировой ткани, связки, лимфатического сосуда, мышцы или сухожилия.

В одном варианте реализации рак выбран из группы, состоящей из саркомы, рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, немелкоклеточного рака легких, (НМРЛ) мелкоклеточного рака легких (МРЛ), неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, печеночно-клеточной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, колоректального рака, холангиокарциномы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, миелоидного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза. Предпочтительно, рак выбран из группы, состоящей из НМРЛ, МРЛ, рака молочной железы, яичников или колоректального рака, или саркомы. Более предпочтительно, рак выбран из уротелиальных типов рака (рака мочевого пузыря), меланомы, рака головы и шеи, рака яичников, НМРЛ, рака пищевода, типов рака желудка, синовиальной саркомы и миксоидной круглоклеточной липосаркомы (МККЛС).

В одном варианте реализации TCR распознают линии клеток рака легких, такие как линия клеток НМРЛ-NCI-H1703, - и линия клеток метастазов НМРЛ в печень -NCI-H1755.

В настоящей заявке также предложены фармацевтические композиции и наборы, содержащие один или более из (i) выделенного TCR, описанного в настоящей заявке; (ii) вирусных частиц, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный TCR; (iii) иммунных клеток, таких как Т-клетки или НК-клетки, модифицированных для осуществления экспрессии рекомбинантного TCR, описанного в настоящей заявке; (iv) нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный TCR, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены композиции, содержащие частицы лентивирусного вектора, содержащие последовательность нуклеотидов, кодирующую рекомбинантный TCR, описанный в настоящей заявке (или Т-клетки, которые были модифицированы с применением векторных частиц, описанных в настоящей заявке, для осуществления экспрессии рекомбинантного TCR). Такие композиции можно вводить субъектам с помощью способов в соответствии с настоящим изобретением, описанных далее в настоящей заявке.

Композиции, содержащие модифицированные Т-клетки, описанные в настоящей заявке, можно применять в способах и для получения композиций для адоптивной иммунотерапии в соответствии с известными методиками или их вариантами, которые должны быть очевидны для специалистов в данной области на основании настоящего описания.

В некоторых вариантах реализации клетки включают в состав путем сначала их сбора из культуральной среды, а затем промывки и концентрирования клеток в среде и системе упаковки, подходящих для введения ("фармацевтически приемлемый" носитель), в эффективном для лечения количестве. Подходящая для инфузий среда может представлять собой изотоническую среду любого состава, обычно нормальный солевой раствор, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), но также можно применять 5% декстрозу в воде или лактат Рингера. Среду для инфузий можно дополнить сывороточным альбумином человека.

Количество клеток в композиции для эффективного лечения обычно больше, чем 10 клеток и доходит до  $10^6$ , до и включая  $10^8$  или  $10^9$  клеток, и может быть больше, чем  $10^{10}$  клеток. Количество клеток будет зависеть от конечного применения, для которого указанная композиция предназначена, а также от типа клеток, содержащихся в ней. Например, если требуются клетки, которые специфичны к определенному антигену, то популяция будет содержать более 70%, как правило, более 80%, 85% и 90-95% таких клеток. Для применений, предложенных в настоящей заявке, клетки, как правило, находятся в объеме, составляющем литр или менее, необязательно 500 мл или менее, даже 250 мл или 100 мл или менее. Следовательно, плотность требующихся клеток обычно больше, чем  $10^6$  клеток/мл, и, как правило, больше, чем  $10^7$  клеток/мл, как правило, составляет  $10^8$  клеток/мл или больше. Клинически значимое количество иммунных клеток может быть распределено на множество инфузий, которые в совокупности содержат количество клеток, равное или превышающее  $10^9$ ,  $10^{10}$  или  $10^{11}$ .

Фармацевтические композиции, предложенные в настоящей заявке, могут находиться в различных формах, например, в твердой, жидкой, порошкообразной, водной или лиофилизированной форме. Примеры подходящих фармацевтических носителей известны в данной области техники. Такие носители и/или вспомогательные вещества можно включить в состав с помощью обычных способов и можно вводить субъекту в подходящей дозе. Стабилизирующие агенты, такие как липиды, ингибиторы нуклеаз, полимеры и хелатирующие агенты могут предохранять композиции от разрушения внутри организма. В композицию, предназначенную для введения путем инъекции, можно включить одно или более поверхностно-активных веществ, консервантов, смачивающих агентов, диспергирующих агентов, суспендирующих агентов, буферов, стабилизаторов и изотонических агентов.

Рекомбинантные TCR, описанные в настоящей заявке, или частицы вирусных векторов, содержащих последовательность нуклеотидов, кодирующую рекомбинантный TCR, предложенный в настоящей заявке, могут быть упакованы в виде наборов. Наборы в некоторых случаях могут содержать один или более компонентов, таких как инструкции по применению, устройства и дополнительные реагенты, и компоненты, такие как пробирки, контейнеры и шприцы, для осуществления указанных способов. Ти-

пичные наборы могут содержать нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантные TCR, рекомбинантные полипептиды TCR или вирусы, предложенные в настоящей заявке, и, в некоторых случаях, могут содержать инструкции по применению, устройство для обнаружения вируса у субъекта и устройство для введения композиций субъекту.

В соответствии с настоящим изобретением также предложены наборы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие интересующий ген (например, рекомбинантный TCR). В соответствии с настоящим изобретением также предложены наборы, содержащие вирусный вектор, кодирующий интересующую последовательность (например, рекомбинантный TCR) и необязательно полинуклеотидную последовательность, кодирующую ингибитор контрольных точек иммунного ответа.

Наборы, предложенные в настоящей заявке, также включают наборы для осуществления способов детектирования присутствия полинуклеотидов, кодирующих любой один или более из TCR, описанных в настоящей заявке. В частности, такие диагностические наборы могут содержать наборы праймеров, подходящих для амплификации и детектирования, и другие сопутствующие реагенты для проведения глубокого секвенирования для детектирования полинуклеотидов, кодирующих TCR, описанные в настоящей заявке. В дополнительных вариантах реализации наборы, описанные в настоящей заявке, могут содержать реагенты для детектирования TCR, описанных в настоящей заявке, такие как антитела или другие связывающие молекулы. Диагностические наборы также могут содержать инструкции по определению присутствия полинуклеотидов, кодирующих TCR, описанные в настоящей заявке, или по определению присутствия TCR, описанных в настоящей заявке. Набор также может содержать инструкции. Инструкции обычно представлены в материальном виде и описывают компоненты, содержащиеся в наборе, и способы введения, включая способы определения надлежащего состояния субъекта, надлежащего количества дозы и надлежащего способа введения. Инструкции также могут содержать руководство по наблюдению субъекта на всем протяжении лечения.

Наборы, предложенные в настоящей заявке, также могут содержать устройство для введения субъекту композиции, описанной в настоящей заявке. В состав наборов, предложенных в настоящей заявке, можно включить любое из различных известных в данной области техники устройств для введения медикаментов или вакцин. Примеры устройств включают, но не ограничены перечисленными: игла для подкожных инъекций, игла для внутривенных инъекций, катетер, безыгольное устройство для инъекций, ингалятор и дозатор для жидкостей, такой как глазная пипетка. Как правило, устройство для введения вируса из набора будет совместимо с вирусом из набора; например, безыгольное устройство для инъекций, такое как устройство для инъекций под высоким давлением, может быть включено в состав набора с вирусами, которые не повреждаются при инъекции под высоким давлением, но его обычно не включают в состав наборов с вирусами, которые повреждаются при инъекции под высоким давлением.

Наборы, предложенные в настоящей заявке, также могут содержать устройство для введения субъекту соединения, такого как активатор или стимулятор Т-клеток, или агонист TLR, такой как агонист TLR4. Любое из различных известных в данной области техники устройств для введения медикаментов субъекту можно включить в состав наборов, предложенных в настоящей заявке. Примеры устройства включают иглу для подкожных инъекций, иглу для внутривенных инъекций, катетер, безыгольное устройство для инъекций, но не ограничены иглой для подкожных инъекций, иглой для внутривенных инъекций, катетером, безыгольным устройством для инъекций, ингалятором и дозатором для жидкостей, таким как глазная пипетка. Как правило, устройство для введения соединения из набора будет совместимо с желательным способом введения соединения.

В конкретных вариантах реализации составление растворов в фармацевтически приемлемом носителе хорошо известно специалистам в данной области техники, также как известна разработка подходящих схем введения доз и лечения для применения конкретных композиций, описанных в настоящей заявке, в различных схемах лечения, включая, например, энтеральное и парентеральное, например, внутрисосудистое, внутривенное, внутриартериальное, внутрикостное, интравентрикулярное, внутримозговое, интракраниальное, интраспинальное, интратекальное и интрамедуллярное введение и получение состава для такого введения. Квалифицированному специалисту будет понятно, что конкретные варианты реализации, предложенные в настоящей заявке, могут включать другие составы, такие как составы, хорошо известные в области фармацевтики и описанные, например, в источнике Remington: The Science and Practice of Pharmacy, volume I and volume II. 22<sup>nd</sup> Edition. Edited by Loyd V. Allen Jr. Philadelphia, PA: Pharmaceutical Press; 2012, содержание которого полностью включено в данную заявку посредством ссылки.

Все цитируемые в настоящей заявке публикации, заявки на патент и опубликованные патенты включены в него посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация, заявка на патент или опубликованный патент были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылки.

Хотя приведенные выше варианты реализации были описаны в некоторых подробностях путем иллюстрирования и приведения примеров для ясности понимания, для специалиста со средней квалификацией в данной области техники будет понятно, в свете идей, рассмотренных в настоящей заявке, что можно внести в них некоторые изменения и модификации, не отклоняясь от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры предложены исключительно с целью иллюстрирования, но не с целью ограничения. Специалисты в данной области техники сразу определяют различные



некритичные параметры, которые можно изменить или модифицировать, чтобы получить по существу аналогичные результаты.

### Примеры

Пример 1. MAGE-A4-TCR-трансгенные Т-клетки связывают MAGE-A4<sub>GVV</sub>-ГКГС-мультимеры.

Для выделения реактивных по отношению к MAGE-A4 клонов Т-клеток использовали подход примиривания *in vitro*. В системе примиривания использовали зрелые дендритные клетки (зДК) из HLA-A\*02:01-положительных, а также HLA-A\*02:01-отрицательных доноров в качестве антигенпрезентирующих клеток и аутологичные CD8<sup>+</sup>-обогащенные Т-клетки - в качестве отвечающих клеток. Транскрибированная *in vitro* РНК (т-ivРНК), кодирующая ген MAGEA4 человека, служила в качестве источника специфического антигена. После электропорации в зДК, кодирующая MAGE-A4 т-ivРНК транслировалась в белок, а затем процессировалась и презентировалась в виде пептидов кодируемыми HLA-A\*02:01 молекулами на зДК. Для HLA-A\*02:01-отрицательных доноров, дополнительно к т-ivРНК MAGE-A4 использовали т-ivРНК, кодирующую HLA-A\*02:01, чтобы трансгенно экспрессировать соответствующий аллель HLA в антигенпрезентирующих клетках (аллогенный подход). Совместное культивирование *in vitro* Т-клеток с трансфицированными т-ivРНК зДК из того же донора приводило к индукции *de novo* антигенспецифичных Т-клеток, которые служили источником соответствующих TCR. Можно осуществить обогащение антигенспецифичными Т-клетками с помощью различных способов, и их клонируют с помощью метода предельных разведений или осуществляют сортировку отдельных клеток на основе FACS. Последовательности цепей TCR-альфа и TCR-бета реактивных по отношению к MAGE-A4 клонов Т-клеток идентифицировали с помощью секвенирования нового поколения и, после замены константных областей TCR на их аналоги из мыши, клонировали в ретровирусный вектор pES.12-6. МКПК здорового донора выделяли путем центрифугирования в градиенте фиколла. Осуществляли обогащение CD8<sup>+</sup> Т-клетками путем отрицательной магнитной селекции (Miltenyi) и стимулировали в не предназначенных для культивирования тканей 24-луночных планшетах, заранее покрытых МАТ против CD3 (5 мкг/мл) и МАТ против CD28 (1 мкг/мл) (BD Pharmingen, Хайдельберг, Германия). Амфотропные ретровирусные частицы получали путем трансфекции HEK293Т-клеток соответствующими TCR, кодирующими ретровирусную плазмиду и две плазмиды для экспрессии. Во второй день после стимуляции трансдуцировали CD8<sup>+</sup> Т-клетки и в двенадцатый день осуществляли обогащение трансдуцированными CD8<sup>+</sup> клетками с помощью FACS, используя константную область бета мыши в качестве маркера трансдукции, а затем размножали, используя протокол быстрого размножения (Riddell S.R., Science, 1992 Jul 10; 257(5067): 238-41).

В экспериментах, описанных в примерах 2-5, использовали TCR, содержащие мураинизированные области С $\alpha$  и С $\beta$  (т.е. TCR-1, содержащий цепь  $\alpha$  с последовательностью SEQ ID NO: 57 и  $\beta$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 58, TCR-2, содержащий  $\alpha$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 59 и  $\beta$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 60, TCR-3, содержащий  $\alpha$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 61 и  $\beta$  цепь с последовательностью SEQ ID NO: 62). Те же типы экспериментов, описанных в примерах 2-5, также можно осуществить, используя TCR, содержащие минимальные мураинизированные области С $\alpha$  и С $\beta$ , описанные выше.

Результаты.

CD8<sup>+</sup> Т-клетки трансдуцировали тремя различными TCR, выделенными из реактивных по отношению к MAGE-A4 клонов Т-клеток, и одним контрольным TCR, который не распознает MAGE-A4. Их окрашивали MAGE-A4<sub>GVV</sub>-ГКГС-мультимером (MAGE-A4<sup>230-239</sup>, GYDYGRENTV; ImmuneAware) и антителами против CD8 и константной области бета мыши. Все трансгенные по MAGE-A4-TCR популяции Т-клеток очень эффективно (>70%) связывали MAGE-A4<sub>GVV</sub>-ГКГС-мультимер. Не наблюдали окрашивания MAGE-A4<sub>GVV</sub>-ГКГС-мультимера для контрольного TCR. Полученные результаты показали, что можно осуществить трансгенную экспрессию TCR, выделенных из реактивных по отношению к MAGE-A4 клонов Т-клеток, в Т-клетках здорового донора (фиг. 1).

Пример 2. Трансгенные по MAGE-A4-TCR Т-клетки распознают MAGE-A4<sub>GVV</sub>-пептид.

Специфичность к MAGE-A4 трансгенных по TCR Т-клеток подтверждали, следуя описанному далее протоколу.

В качестве клеток-мишеней использовали клетки Т2 (HLA-A\*02пол), которые нагружали насыщенными количествами (10<sup>-5</sup> М) MAGE-A4<sub>GVV</sub>-пептида (SEQ ID NO: 1) или нерелевантного контрольного пептида. Кроме того, клетки К562 трансдуцировали HLA-A\*02:01 и геном MAGE-A4 (К562/А2/MAGE-A4). Клетки К562, трансдуцированные только HLA-A\*02:01, использовали в качестве контроля (К562/А2). Каждую линию клеток-мишеней культивировали совместно с трансгенными по TCR Т-клетками при соотношении 2:1, используя 20000 Т-клеток и 10000 клеток-мишеней. Через 20-24 ч анализировали концентрации IFN- $\gamma$  в супернатантах совместных культур с помощью стандартного сэндвич-ELISA (BD, набор для ELISA IFN- $\gamma$  человека).

Результаты.

MAGE-A4-TCR-трансгенные Т-клетки распознавали нагруженные MAGE-A4<sub>GVV</sub> Т2 и трансдуцированные MAGE-A4 клетки К562, но не распознавали ни одну из контрольных клеток-мишеней. Для тран-

сдурцированных TCR-3 T-клеток выявили распознавание контрольных K562/A2. Полученные результаты показали, что TCR, выделенные из реактивных по отношению к MAGE-A4 клонов T-клеток, оставались функциональными при их переносе в T-клетки здорового донора (фиг. 2).

Пример 3. У трансгенных по MAGE-A4-TCR T-клеток выявили высокую функциональную авидность.

Клетки T2, нагруженные MAGE-A4<sub>GYY</sub>-пептидом, использовали для анализа различий в функциональной авидности трансгенных по MAGE-A4-TCR T-клеток.

Клетки T2 нагружали извне ступенчато изменяющимися на порядок концентрациями ( $10^{-11}$  М -  $10^{-5}$  М) MAGE-A4<sub>GYY</sub>-пептида и совместно культивировали с трансгенными по TCR T-клетками при соотношении 1:2, используя 10000 клеток T2 и 20000 T-клеток. Через 20-24 ч анализировали концентрации IFN- $\gamma$  в супернатантах совместных культур с помощью стандартного сэндвич-ELISA (BD, набор для ELISA IFN- $\gamma$  человека).

Результаты.

При объединении результатов для множества доноров, наиболее высокую функциональную авидность против MAGE-A4<sub>GYY</sub>-пептида, которым были нагружены HLA-A\*02, выявили для TCR-2. Для TCR-1 и TCR-3 выявили несколько меньшую функциональную авидность по сравнению с TCR-2 (фиг. 3).

Пример 4. Трансгенные по MAGE-A4-TCR T-клетки лизируют MAGE-A4-положительные линии опухолевых клеток.

MAGE-A4-положительные HLA-A2-положительные линии опухолевых клеток (NCI-H1703, NCI-H1755), MAGE-A4-отрицательную HLA-A2-положительную линию опухолевых клеток (Saos-2) и MAGE-A4-отрицательную HLA-A2-отрицательную линию опухолевых клеток (A549) использовали в качестве клеток-мишеней. Для анализа цитотоксичности создавали совместные культуры при соотношении эффектора к мишени, составляющем приблизительно 8-16:1 (в зависимости от размера клетки-мишени), с 40000 трансгенных по TCR T-клеток и 5000 (NCI-H1755, NCI-H1703, A549) и 2500 (Saos-2) опухолевых клеток, соответственно, которые были трансдуцированы геном флуоресцентного маркера. Опухолевые клетки, нагруженные насыщенными концентрациями MAGE-A4<sub>GYY</sub>-пептида ( $10^{-5}$  М), использовали в качестве внутреннего положительного контроля. Уменьшение количества флуоресцентных клеток-мишеней (количества клеток на лунку) измеряли каждые три часа в течение суммарного периода времени, составляющего 172 часа, путем наблюдения за живыми клетками (IncuCyte® ZOOM, Essen Bioscience). Для того чтобы проанализировать высвобождение цитокинов, через 24 ч собирали супернатанты совместной культуры и анализировали соответствующие концентрации IFN- $\gamma$  с помощью стандартного сэндвич-ELISA (BD, набор для ELISA IFN- $\gamma$  человека).

Результаты.

Две эндогенно положительные по MAGE-A4 и положительные по HLA-A2 линии опухолевых клеток (NCI-H1703, NCI-H1755) распознавались и лизировались всеми трансгенными по MAGE-A4-TCR T-клетками. Отрицательная по MAGE-A4, но положительная по HLA-A2 линия опухолевых клеток (Saos-2) распознавалась и лизировалась, только когда клетки были нагружены извне насыщенными концентрациями MAGE-A4<sub>GYY</sub>-пептида. Линия клеток отрицательного контроля (A549) не распознавалась и не лизировалась ни одним из MAGE-A4-TCR. Полученные результаты показали, что трансгенные по MAGE-A4-TCR T-клетки могут эффективно лизировать эндогенно положительные по MAGE-A4 опухолевые клетки высокоселективным способом (фиг. 4а, 4б и 4с).

Пример 5. Трансгенные по MAGE-A4-TCR T-клетки не распознают нормальные клетки человека.

Использовали панель нормальных клеток человека, чтобы проанализировать потенциальную специфичную в отношении мишени внеопухолевую токсичность и неспецифичную токсичность, которые могут быть вызваны трансгенными по MAGE-A4-TCR T-клетками.

Исследовали распознавание трансдуцированными MAGE-A4-TCR T-клетками первичных клеток и происходящих из индуцированных полипотентных стволовых клеток (ИПСК) клеток, представляющих важные ткани или органы. HLA-A\*02:01-отрицательные клетки NHBE трансфицировали HLA-A2-tivPHK посредством электропорации для временной экспрессии HLA-A2. Нейроны iCell обрабатывали IFN- $\gamma$  в течение 72 ч перед началом совместного культивирования, чтобы вызвать экспрессию HLA-A2 на поверхности клетки. Экспрессию HLA-A2 на всех типах клеток подтверждали с помощью проточной цитометрии. Для анализа токсичности создавали совместные культуры с 20000 трансгенных по TCR T-клеток и зависящими от типа клеток-мишеней их количествами. В качестве внутреннего положительного контроля все нормальные клетки человека нагружали MAGE-A4<sub>GYY</sub>-пептидом в конечной концентрации  $10^{-5}$  М. Для анализа высвобождения цитокинов, собирали супернатанты совместной культуры через 24 ч и анализировали концентрации IFN- $\gamma$  или IL-2 с помощью стандартного сэндвич-ELISA (BD, набор для ELISA IFN- $\gamma$  или IL-2 человека). Высвобождение IL-2 определили в совместной культуре с нейронами iCell, которые были предварительно обработаны IFN- $\gamma$ , чтобы вызвать экспрессию HLA-A2 на поверхности.

Результаты.

Все первичные клетки и происходящие из индуцированных полипотентных стволовых клеток

(ИПСК) клетки были HLA-A2 положительными в начале совместного культивирования с трансгенными по MAGE-A4-TCR Т-клетками. Более того, трансгенные по MAGE-A4-TCR Т-клетки были способны эффективно распознавать все нормальные клетки, когда отдельные клетки-мишени были нагружены MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-пептидом. Ненагруженные нормальные клетки не распознавались никакими из трансгенных по MAGE-A4 Т-клеток. Для трансгенных по MAGE-A4 Т-клеток не выявили признаков специфичной в отношении мишени внеопухолевой токсичности и неспецифичной токсичности (фиг. 5а, 5b и 5с).

Пример 6. Лентивирусные векторы, кодирующие полностью человеческие MAGE-A4 TCR.

Полинуклеотидные последовательности TCR, идентифицированные в примере 1, были оптимизированы для экспрессии. Лентивирусные векторы, кодирующие полицистронные конструкции TCR, использовали для экспрессии TCR. Полицистронные конструкции TCR содержат  $\alpha$  или  $\beta$  цепь TCR, необязательно сайт расщепления фурином, последовательность проскока рибосомы P2A и соответствующую  $\alpha$  или  $\beta$  цепь TCR. Лентивирусные векторы получали в соответствии с известными способами. См., например, Kutner et al., BMC Biotechnol. 2009;9:10. doi: 10.1186/1472-6750-9-10; Kutner et al. Nat. Protoc. 2009; 4(4):495-505. doi: 10.1038/nprot.2009.22.

Полицистронный полинуклеотид (SEQ ID NO: 93), кодирующий полипротеин MAGE-A4 TCR-4 (SEQ ID NO: 94), содержит  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 70, полинуклеотид, кодирующий последовательность проскока рибосомы, и  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 69.

Полицистронный полинуклеотид (SEQ ID NO: 95), кодирующий полипротеин MAGE-A4 TCR-5 (SEQ ID NO: 96), содержит  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 78, полинуклеотид, кодирующий сайт расщепления фурином, полинуклеотид, кодирующий последовательность проскока рибосомы, и  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 77.

Полицистронный полинуклеотид (SEQ ID NO: 97), кодирующий полипротеин MAGE-A4 TCR-6 (SEQ ID NO: 98), содержит  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 86, полинуклеотид, кодирующий сайт расщепления фурином, полинуклеотид, кодирующий последовательность проскока рибосомы, и  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 85.

Пример 7. Т-клетки, экспрессирующие полностью человеческие MAGE-A4 TCR, связывают MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-ГКГС-мультимеры.

CD3<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из МКПК здорового донора и трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими три различных полностью человеческих MAGE-A4 TCR и контрольный TCR, который не распознает MAGE-A4. После размножения, трансдуцированные Т-клетки окрашивали MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-ГКГС-мультимером (MAGE-A4<sup>230-239</sup>, GVYDGREHTV; ImmuneAware) и антителами против CD3. Гейты были установлены на популяции живых CD3<sup>+</sup> клеток и окрашивание мультимером. Все популяции трансгенных по MAGE-A4-TCR Т-клеток очень эффективно (>70%) связывали MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-ГКГС-мультимер. Для контрольных TCR не наблюдали окрашивания MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-ГКГС-мультимера.

Результаты.

Полученные результаты показали, что можно осуществить трансгенную экспрессию TCR, выделенных из реактивных по отношению к MAGE-A4 клонов Т-клеток, в Т-клетках здорового донора (фиг. 6).

Пример 8. Т-клетки, экспрессирующие полностью человеческие MAGE-A4 TCR, распознают MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-пептид.

Специфичность к MAGE-A4 трансгенных по TCR Т-клеток подтверждали, используя антигензависимую экспрессию цитокинов. Т-клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими полностью человеческие MAGE-A4 TCR, описанные в примере 6, совместно культивировали при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 2:1 с клетками Т2 (HLA-A\*02пол), сенсibilизированными 10 нг/мл MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub>-пептида или нерелевантного контрольного пептида, и с нетрансдуцированными клетками А549/HLA-A2 или А549/HLA-A2, трансдуцированными геном MAGE-A4. Через 20-24 ч анализировали концентрации IFN- $\gamma$  в супернатантах совместных культур, применяя анализ Lumines.

Результаты.

Трансгенные по MAGE-A4-TCR Т-клетки распознавали нагруженные MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub> клетки Т2 и трансдуцированные MAGE-A4 клетки А549, но не распознавали контрольные клетки-мишени. Полученные результаты показали, что Т-клетки из здорового донора-человека, экспрессирующие полностью человеческие MAGE-A4 TCR, специфично реагируют с клетками-мишенями, на которых представлен MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub> пептид (фиг. 7).

Пример 9. У Т-клеток, экспрессирующих полностью человеческие MAGE-A4 TCR, выявили высокую функциональную avidность.

Линии опухолевых клеток, на которых представлен MAGE-A4<sub>G<sub>VY</sub></sub> пептид, использовали для анализа различий в функциональной avidности Т-клеток, экспрессирующие полностью человеческие MAGE-A4-TCR Т-клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими полностью человеческие MAGE-A4 TCR, описанные в примере 6, совместно культивировали при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 5:1 с MAGE-A4-положительными HLA-A2-положительными линиями опухолевых клеток (A375, NCI-H1703, NCI-H1755), MAGE-A4-положительной HLA-A2-отрицательной линией опухолевых клеток (NCI-H520) и MAGE-A4-отрицательной HLA-A2-положительной линией опухолевых

клеток (A549). Через 20-24 ч анализировали концентрации IFN- $\gamma$  в супернатантах совместных культур, применяя анализ Luminex.

Результаты.

При объединении результатов для множества доноров, для MAGE-A4 TCR5 выявили наиболее высокую функциональную avidность против MAGE-A4-положительных HLA-A2-положительных линий опухолевых клеток. Для MAGE-A4 TCR1 и MAGE-A4 TCR-6 выявили меньшую функциональную avidность по сравнению с MAGE-A4 TCR-5 (фиг. 8).

Пример 10. Т-клетки, экспрессирующие полностью человеческие MAGE-A4 TCR, лизируют MAGE-A4-положительные HLA-A2-положительные линии опухолевых клеток.

Т-клетки, трансдуцированные лентивирусными векторами, кодирующими полностью человеческие MAGE-A4 TCR, описанные в примере 6, совместно культивировали при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 5:1 с MAGE-A4-положительными HLA-A2-положительными линиями опухолевых клеток (A375, NCI-H1703, A549-HLA-A2-MAGE-A4) и MAGE-A4-отрицательной HLA-A2-положительной линией опухолевых клеток (A549-HLA-A2). Через 6 ч совместного культивирования измеряли цитотоксичность, направленную против линий опухолевых клеток, с помощью анализа импеданса.

Результаты.

MAGE-A4-положительные HLA-A2 положительные линии опухолевых клеток (A375, NCI-H1703, A549-HLA-A2-MAGE-A4) распознавались и лизировались всеми трансгенными по MAGE-A4-TCR Т-клетками. Лизис MAGE-A4-отрицательной HLA-A2-положительной линии опухолевых клеток (A549-HLA-A2) с использованием трансгенных по MAGE-A4-TCR Т-клеток значительно не отличался от лизиса, наблюдаемого при применении нетрансдуцированных контрольных Т-клеток (фиг. 9).

Пример 11. Т-клетки, экспрессирующие полностью человеческие MAGE-A4 TCR, контролируют MAGE-A4-положительные опухоли *in vivo*  $5 \times 10^6$  MAGE-A4-положительных опухолевых клеток.

A375 вводили путем инъекции в каждый бок 10 мышей NSG. Через десять дней после прививки опухоли мышам вводили  $3,5 \times 10^7$  трансгенных по MAGE-A4-TCR Т-клеток,  $3,5 \times 10^7$  контрольных нетрансдуцированных Т-клеток или среду ФБР. После лечения всем мышам измеряли объемы опухолей кронциркулем дважды в неделю.

Результаты.

Мыши, которым вводили нетрансдуцированные Т-клетки и среду ФБР, не смогли контролировать рост опухоли, и их умерщвляли после достижения опухолью максимального размера, допускаемого протоколом. Мыши, которым вводили трансгенные по MAGE-A4-TCR Т-клетки, контролировали рост опухоли в течение до 35 дней после инфузий Т-клеток (фиг. 10).

Пример 12. Улучшенные MAGE-A4 TCR человека.

Полинуклеотидные последовательности TCR, идентифицированные в примере 1, модифицировали, чтобы повысить экспрессию и функциональную avidность. Константные области  $\alpha$  и  $\beta$  цепей TCR минимально мураинизировали и вводили гидрофобные замены аминокислот в трансмембранный домен константной области  $\alpha$  цепи TCR. Примеры полинуклеотидных последовательностей улучшенных MAGE-A4 TCR представлены в SEQ ID NO: -99-101, 105-107 и 111-113. Примеры полипептидных последовательностей улучшенных MAGE-A4 TC описаны в последовательностях SEQ ID NO: -102-104, 108-110 и 114-116.

Лентивирусные векторы, кодирующие полицистронные конструкции TCR, использовали для осуществления экспрессии улучшенных MAGE-A4 TCR (TCR-7, TCR-8 и TCR-9). Полицистронные конструкции TCR содержат  $\alpha$  или  $\beta$  цепь TCR, необязательно сайт расщепления фурином, последовательность проскока рибосомы P2A и соответствующую  $\alpha$  или  $\beta$  цепь TCR. Лентивирусные векторы получали в соответствии с известными способами. См., например, Kutner et al., BMC Biotechnol. 2009;9:10.doi:10.1186/1472-6750-9-10; Kutner et al. Nat. Protoc. 2009; 4(4):495-505. doi: 10.1038/nprot.2009.22.

Полицистронный полинуклеотид (SEQ ID NO: 101), кодирующий полипротеин MAGE-A4 TCR-7 (SEQ ID NO: 104), содержит  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 100, полинуклеотид, кодирующий последовательность проскока рибосомы, и  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 99.

Полицистронный полинуклеотид (SEQ ID NO: 107), кодирующий полипротеин MAGE-A4 TCR-8 (SEQ ID NO: 110), содержит  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 106, полинуклеотид, кодирующий сайт расщепления фурином, полинуклеотид, кодирующий последовательность проскока рибосомы, и  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 105.

Полицистронный полинуклеотид (SEQ ID NO: 113), кодирующий полипротеин MAGE-A4 TCR-9 (SEQ ID NO: 116), содержит  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 112, полинуклеотид, кодирующий сайт расщепления фурином, полинуклеотид, кодирующий последовательность проскока рибосомы, и  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 111.

Пример 13. Полностью человеческие MAGE-A4 TCR или улучшенные MAGE-A4 TCR можно эффективно экспрессировать на Т-клетках человека.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из трех независимых здоровых доноров, активировали и трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими полностью человеческий MAGE-A4 TCR (TCR-5) или улучшенный MAGE-A4 TCR (TCR-8), или не трансдуцировали в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали для размножения *in vitro* и анализировали встраивание вектора путем измерения числа копий вектора (ЧКВ) и анализировали экспрессию путем применения проточной цитометрии клеток, окрашенных MAGE-A4<sub>GVY</sub>-ГКГС-мультимером (MAGE-A4<sup>230-239</sup>, GYYDGRENTV; ImmuneAware) и антителами против CD3.

Результаты.

ЧКВ для TCR-5 и TCR-8 были сопоставимы, тогда как экспрессия и плотность TCR на поверхности была выше в клетках, трансдуцированных TCR-8, и в клетках, трансдуцированных TCR-5. Фигуры 11A-C.

Пример 14. Т-клетки, экспрессирующие полностью человеческие MAGE-A4 TCR или улучшенные MAGE-A4 TCR, специфично распознают и убивают MAGE-A4+линии клеток *in vitro*.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из трех независимых здоровых доноров, активировали и трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими полностью человеческий MAGE-A4 TCR (TCR-5) или улучшенный MAGE-A4 TCR (TCR-8), или не трансдуцировали (НТД) в качестве отрицательного контроля. Оценивали специфичную реакционную способность экспрессирующих TCR Т-клеток в отношении положительных (+) и отрицательных (-) по MAGEA4 линий опухолевых клеток: A549.A2 (A2+, MAGE-A4(-)); NCI-H2023 (A2+, MAGE-A4(+)); A375 (A2+, MAGE-A4(+)); A549.A2.MAGEA4 (A2+, MAGE-A4(+)) и U2OS (A2+, MAGE-A4(низкий)).

Результаты.

TCR-5 и TCR-8 Т-клетки высвобождали IFN $\gamma$  при совместном культивировании с HLA-A2+/MAGEA4(+) линиями опухолевых клеток, но не при совместном культивировании с HLA-A2+/MAGEA4(-) клетками или при культивировании в отсутствие клеток-мишеней. НТД Т-клетки не высвобождали IFN $\gamma$  ни при одном из условий культивирования; фиг. 12A.

TCR-5 и TCR-8 Т-клетки эффективно убивали HLA-A2+/MAGEA4(+) линии опухолевых клеток при соотношениях Э:М, составляющих 10:1, 5:1 и 2,5:1. НТД Т-клетки не уничтожали HLA-A2+/MAGEA4(+) линии опухолевых клеток ни при каких соотношениях Э:М; фиг. 12B.

Пример 15. Т-клетки, экспрессирующие полностью человеческие MAGE-A4 TCR или улучшенные MAGE-A4 TCR, опосредуют регрессию экспрессирующих MAGE-A4 опухолей *in vivo*.

Положительные по MAGE-A4 опухолевые клетки A375 вводили путем инъекции в каждый бок 5 мышей NSG Мышам с опухолями A375 объемом 50 мм<sup>3</sup> вводили ФБР (среду), нетрансдуцированные Т-клетки (НТД), 5 $\times$ 10<sup>6</sup> TCR-5 или TCR-8 Т-клеток (в левый бок), или 1,5 $\times$ 10<sup>6</sup> TCR-5 или TCR-8 Т-клеток (в правый бок). Мышам с опухолями A375 объемом 100 мм<sup>3</sup> вводили ФБР (среду), нетрансдуцированные (НТД) Т-клетки или 10 $\times$ 10<sup>6</sup> TCR-5 или TCR-8 Т-клеток. Измеряли рост опухоли дважды в неделю и оценивали противоопухолевую активность TCR Т-клеток по сравнению с таковой для мышей, получивших контроль НТД и среду.

Результаты.

TCR-5 и TCR-8 Т-клетки опосредовали сопоставимую регрессию опухолей A375 объемом 50 мм<sup>3</sup> при дозе 5 $\times$ 10<sup>6</sup> TCR+ Т-клеток. TCR-8 Т-клетки опосредовали более высокую регрессию опухолей A375 объемом 50 мм<sup>3</sup> по сравнению с TCR-5 Т-клетками при дозе 1,5 $\times$ 10<sup>6</sup> TCR+ Т-клеток и регрессию опухолей A375 объемом 100 мм<sup>3</sup> при дозе 10 $\times$ 10<sup>6</sup> TCR+ Т-клеток. Т-клетки контроля средой и НТД не опосредовали регрессию опухолей A375 ни при одном из условий.

Настоящее изобретение дополнительно охарактеризовано следующими пунктами.

П.1. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), специфичный к MAGE-A4.

П.2. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), специфичный к MAGE-A4, причем TCR содержит:

а) вариабельную область TCR  $\alpha$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 2, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 3 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4, вариабельную область TCR  $\beta$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 5, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 6 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 7; или

б) вариабельную область TCR  $\alpha$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 13 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 14, вариабельную область TCR  $\beta$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 15, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 16 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 17; или

в) вариабельную область TCR  $\alpha$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 22, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 23 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 24, вариабельную область TCR  $\beta$ , содержащую CDR1 с последовательностью ами-

нокислот SEQ ID NO: 25, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 26 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 27.

П.3. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что TCR специфично распознает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент.

П.4. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что TCR специфично распознает связанную с HLA-A2 форму последовательности аминокислот SEQ ID NO: 1.

П.5. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что TCR специфично распознает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01.

П.6. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что TCR содержит  $\alpha$  цепь TCR, содержащую определяющий комплементарность участок 3 (CDR3) с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 24.

П.7. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что TCR содержит цепь TCR  $\beta$ , содержащую CDR3 с последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 27.

П.8. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что TCR содержит:

а) вариабельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 8, и вариабельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 9; или

б) вариабельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, и вариабельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 19; или

в) вариабельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 28, и вариабельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 29.

П.9. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что TCR содержит:

а) вариабельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 8 и вариабельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 9; или

б) вариабельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 18 и вариабельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 19; или

в) вариабельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 28 и вариабельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 29.

П.10. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что TCR содержит:

а)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 10, и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 11; или

б)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 20, и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 21; или

в)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 30, и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 31.

П.11. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что TCR содержит:

а)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 10 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 11; или

б)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 20 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 21; или

в)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 30 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 31.

П.12. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что TCR содержит:  $\alpha$  цепь TCR и  $\beta$  цепь TCR, причем:

а) последовательность аминокислот вариабельной области TCR  $\alpha$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 8 и содержит CDR3, кодируемый последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 4 последовательность аминокислот вариабельной области TCR  $\beta$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 9 и содержит CDR3, кодируемый

последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 7; или

б) последовательность аминокислот вариабельной области TCR  $\alpha$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 18 и содержит CDR3, кодируемый последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 14; или последовательность аминокислот вариабельной области TCR  $\beta$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 19 и содержит CDR3, кодируемый последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 17; или

с) последовательность аминокислот вариабельной области TCR  $\alpha$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 28 и содержит CDR3, кодируемый последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 24; или последовательность аминокислот вариабельной области TCR  $\beta$  по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 29 и содержит CDR3, кодируемый последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 27.

П.13. Выделенный TCR в соответствии с любым из пп.1-5, отличающийся тем, что TCR содержит:

а)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 10 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 11;

б)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 20 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 21; или

с)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 30 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 31.

П.14. Выделенный TCR в соответствии с любым из пп.1-5, отличающийся тем, что TCR содержит:

а)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 87 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 88;

б)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 89 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 90; или

с)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 91 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 92.

П.15. Выделенный TCR в соответствии с любым из пп.1-5, отличающийся тем, что TCR содержит:

а)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 102 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 103;

б)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 108 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 109; или

с)  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 114 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 115.

П.16. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что указанный TCR является очищенным.

П.17. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что его последовательность аминокислот содержит одну или более фенотипически молчащих замен.

П.18. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что его последовательность аминокислот модифицирована таким образом, чтобы она содержала детектируемую метку, терапевтический агент или модифицирующую фармакокинетику группу.

П.19. Выделенный TCR в соответствии с п.18, отличающийся тем, что терапевтический агент выбран из группы, состоящей из иммунной эффекторной молекулы, цитотоксического агента и радионуклида.

П.20. Выделенный TCR в соответствии с п.19, отличающийся тем, что иммунная эффекторная молекула представляет собой цитокин.

П.21. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что TCR является растворимым или связанным с мембраной.

П.22. Выделенный TCR в соответствии с п.18, отличающийся тем, что модифицирующая фармакокинетику группа представляет собой по меньшей мере одно повторяющееся звено полиэтиленгликоля, по меньшей мере одну гликольную группу, по меньшей мере одну сиалильную группу или их комбинацию.

П.23. Выделенный TCR в соответствии с любым из описанных выше пунктов, отличающийся тем, что указанный TCR относится к одноцепочечному типу, в котором  $\alpha$  цепь TCR и  $\beta$  цепь TCR связаны линкерной последовательностью.

П.24. Выделенный TCR в соответствии с любым из пп.1-23, отличающийся тем, что  $\alpha$  цепь TCR или  $\beta$  цепь TCR модифицирована таким образом, чтобы она содержала эпитопную метку.

П.25. Выделенный полипептид, содержащий функциональную часть TCR в соответствии с любым из пп.1-24, отличающийся тем, что функциональная часть содержит по меньшей мере одну из последовательностей аминокислот, представляющих собой SEQ ID NO: 4, 7, 14, 17, 24 и 27.

П.26. Выделенный полипептид в соответствии с п.25, отличающийся тем, что функциональная часть содержит вариабельную область  $\alpha$  цепи TCR и/или вариабельную область  $\beta$  цепи TCR.

П.27. Слитый белок, содержащий  $\alpha$  цепь TCR и  $\beta$  цепь TCR, причем указанный слитый белок со-

держит последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 94, 96, 98, 104, 110 и 116.

П.28. Поливалентный комплекс TCR, содержащий по меньшей мере два TCR, реализованный в любом одном из пп.1-24.

П.29. Поливалентный комплекс TCR в соответствии с п.28, отличающийся тем, что по меньшей мере один из указанных TCR связан с терапевтическим агентом.

П.30. Выделенный TCR в соответствии с любым из пп.1-24, полипептид в соответствии с п.25 или 26, слитый белок в соответствии с п.27, поливалентный комплекс TCR в соответствии с п.28 или 29, отличающийся тем, что секреция IFN- $\gamma$  вызвана связыванием с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01.

П.31. Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR в соответствии с любым из пп.1-24, кодирующая полипептид в соответствии с п.25 или 26 или кодирующая слитый белок в соответствии с п.27.

П.32. Нуклеиновая кислота в соответствии с п.31, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая  $\alpha$  цепь TCR, представлена в любой из последовательностей SEQ ID NO: 69, 77, 85, 99, 105 и 111.

П.33. Нуклеиновая кислота в соответствии с п.31 или 32, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая цепь TCR  $\beta$ , представлена в любой из последовательностей SEQ ID NO: 70, 78, 86, 100, 106 и 112.

П.34. Нуклеиновая кислота в соответствии с п.31, отличающаяся тем, что TCR содержит  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 69, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 70;  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 77, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 78;  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 85, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 86;  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 99, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 100;  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 105, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 106; или  $\alpha$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 111, и  $\beta$  цепь, кодируемую SEQ ID NO: 112.

П.35. Нуклеиновая кислота в соответствии с п.31, отличающаяся тем, что указанный слитый белок кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в любой из последовательностей SEQ ID NO: 93, 95, 97, 101, 107 и 113.

П.36. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту в соответствии с любым из пп.31-35.

П.37. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую: (а) последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 88; (b) последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90; (c) последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92; (d) последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 103; (e) последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109; или (f) последовательности полипептидов, представленные в SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 115.

П.38. Вектор в соответствии с п.36 или 37, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор экспрессии.

П.39. Вектор в соответствии с любым из пп.36-38, отличающийся тем, что вектор представляет собой ретровирусный вектор.

П.40. Вектор в соответствии с любым из пп.36-39, отличающийся тем, что вектор представляет собой лентивирусный вектор.

П.41. Клетка, экспрессирующая TCR в соответствии с любым из пп.1-24.

П.42. Клетка, содержащая вектор в соответствии с любым из пп.36-40.

П.43. Клетка в соответствии с п.41 или 42, отличающаяся тем, что клетка является выделенной или не встречающейся в природе.

П.44. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту в соответствии с любым из пп.31-35 или вектор в соответствии с любым из пп.36-40.

П.45. Клетка в соответствии с пп.41-44, отличающаяся тем, что клетка содержит:

а) вектор экспрессии, который содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, реализованную в любом одном из пп.28-32;

б) первый вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую цепь альфа TCR, реализованную в любом одном из пп.1-21, и второй вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую цепь бета TCR, реализованную в любом одном из пп.1-21.

П.46. Клетка в соответствии с любым из пп.41-45, отличающаяся тем, что клетка представляет собой лимфоцит периферической крови (ЛПК) или мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК).

П.49. Клетка в соответствии с любым из пп.41-48, отличающаяся тем, что клетка представляет собой Т-клетку.

П.50. Клетка в соответствии с любым из пп.41-48, отличающаяся тем, что клетка представляет собой Т-клетку.

П.51. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое специфично связывается с



частью TCR в соответствии с любым из пп.1-24, которая опосредует специфичность к MAGE-A4.

П.52. Антитело в соответствии с п.51, отличающееся тем, что часть TCR, которая опосредует специфичность к MAGE-A4, содержит:

- а) CDR3 альфа-цепи с последовательностью SEQ ID NO: 4 и/или CDR3 бета-цепи с последовательностью SEQ ID NO: 7; или
- б) CDR3 альфа-цепи с последовательностью SEQ ID NO: 14 и/или CDR3 бета-цепи с последовательностью SEQ ID NO: 17; или
- в) CDR3 альфа-цепи с последовательностью SEQ ID NO: 24 и/или CDR3 бета-цепи с последовательностью SEQ ID NO: 27.

П.53. Композиция, содержащая TCR в соответствии с любым из пп.1-24, полипептид в соответствии с п.25 или 26, слитый белок в соответствии с п.27, поливалентный комплекс TCR в соответствии с п.28 или 29, нуклеиновую кислоту в соответствии с любым из пп.31-35, вектор в соответствии с любым из пп.36 по 40, клетку в соответствии с любым из пп.41 по 50, или антитело в соответствии с п.51 или 52.

П.54. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и TCR в соответствии с любым из пп.1-24, полипептид в соответствии с п.25 или 26, слитый белок в соответствии с п.27, поливалентный комплекс TCR в соответствии с п.28 или 29, нуклеиновую кислоту в соответствии с любым из пп.31 по 35, вектор в соответствии с любым из пп.36-40, клетку в соответствии с любым из пп.41 по 50, или антитело в соответствии с п.51 или 52.

П.55. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель и клетку в соответствии с любым из пп.41-50.

П.56. TCR в соответствии с любым из пп.1-24, полипептид в соответствии с п.25 или 26, слитый белок в соответствии с п.27, поливалентный комплекс TCR в соответствии с п.28 или 29, нуклеиновая кислота в соответствии с любым из пп.31-35, вектор в соответствии с любым из пп.36-40, клетка в соответствии с любым из пп.41-50, антитело в соответствии с п.51 или 52, композиция в соответствии с п.53 или фармацевтическая композиция в соответствии с п.54 или 55 для применения в качестве лекарственного средства.

П.57. TCR в соответствии с любым из пп.1-24, полипептид в соответствии с п.25 или 26, слитый белок в соответствии с п.27, поливалентный комплекс TCR в соответствии с п.28 или 29, нуклеиновая кислота в соответствии с любым из пп.31-35, вектор в соответствии с любым из пп.36-40, клетка в соответствии с любым из пп.41-50, антитело в соответствии с п.51 или 52, композиция в соответствии с п.53 или фармацевтическая композиция в соответствии с п.54 или 55 для применения для лечения рака.

П.58. TCR, полипептид, слитый белок, поливалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота, клетка, антитело, композиция или фармацевтическая композиция в соответствии с п.57, отличающиеся тем, что рак представляет собой гематологический рак или солидную опухоль.

П.59. TCR, полипептид, слитый белок, поливалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота, клетка, антитело, композиция или фармацевтическая композиция в соответствии с п.57 или 58, отличающиеся тем, что рак выбран из группы, состоящей из саркомы, рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака пищевода, немелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, меланомы, печеночно-клеточной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, колоректального рака, холангиокарциномы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, миелоидного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза.

П.60. TCR, полипептид, слитый белок, поливалентный комплекс TCR, нуклеиновая кислота, клетка, антитело, композиция или фармацевтическая композиция в соответствии с п.50 или 51, отличающиеся тем, что рак предпочтительно выбран из группы, состоящей из НМРЛ, МРЛ, рака молочной железы, яичников или колоректального рака, саркомы или остеосаркомы.

## Перечень цитированных источников.

Allen, LD (Editor): Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Volume I and II. Twenty-second edition. Pharmaceutical Press 2012.

Bhan, S, Chuang, A, Negi, SS, Glazer, CA & Califano, JA: MAGEA4 induces growth in normal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis. *Oncol. Rep.* 2012 28, 1498–1502.

Brichard VG, Louahed J, Clay TM: Cancer regression and neurological toxicity cases after anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother* 2013 36:79–81.

Cameron BJ, Gerry AB, Dukes J, Harper JV, Kannan V, Bianchi FC, et al.: Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed Tcells. *Sci Transl Med* 2013 5:197ra103.

Cribbs AP, Kennedy A, Gregory B, Brennan FM: Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells. *BMC Biotechnol.* 2013; 13:98.

Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, Matsuzaki J, Tsuji T, Groman A, Gnjatich S et al.: Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS One* 2014, 9:e104099.

Duffour MT, Chau P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P:

A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1999 Oct; 29(10):3329-37.

Engels B, Engelhard VH, Sidney J, Sette A, Binder DC, Liu RB, Kranz DM, Meredith SC, Rowley DA, Schreiber H: Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity. *Cancer Cell* 2013; 23(4):516-526.

Flynn JK and Gorry PR. Stem memory T cells (TSCM)—their role in cancer and HIV immunotherapies. *Clin Transl Immunology* 2014; 3(7): e20.

Gargett T, Brown MP: The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol.* 2014 Oct 28;5: 235.

Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP: A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med.* 2011;17(10):1290-1297.

Giudicelli, V, et al.: IMGT/LIGM-DB, the IMGT® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences, *Nucl. Acid Research* 2006, 34, D781-D784.

Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ et al.: Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005, 11:8055-8062.

Invitrogen Corporation: Vector NTI Advance™ 10 DNA and protein sequence analysis software. User Manual 2004, 389-662.

Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K et al.: Adoptive transfer of MAGE-A4 T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with recurrent esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2015 21:2268–77.

Kieback E, Charo J, Sommermeyer D, Blankenstein T, Uckert W: A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer. *PNAS* 2008 105 (2) 623-628.

Kim YD, Park HR, Song MH, Shin DH, Lee CH, Lee MK, Lee SY: Pattern of cancer/testis antigen expression in lung cancer patients. *Int J Mol Med* 2012, 29:656-662.

Lefranc and Lefranc: T cell Receptor Factsbook, Academic Press 2001, Elsevier Ltd ISBN 0-12- 441352-8.

Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J: Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 2005, 11:1809-1814.

Linette GP, Stadtmauer EA, Maus MV, Rapoport AP, Levine BL, Emery L et al.: Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* (2013) 122:863–71.

Lugli E, Gattinoni L, Roberto A, Mavilio D, Price DA, Restifo NP, Roederer M: Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells. *Nat Protoc.* 2013;8(1):33-42.

Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z et al.: Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother* (2013) 36:133–51

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

Riddell SR, Sommermeyer D, Berger C, Liu LS, Balakrishnan A, Salter A, Hudecek M, Maloney DG, Turtle CJ: Adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition. *Cancer J.* 2014 ;20(2):141-144.

Sambrook: *Molecular Cloning – 4th Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012, ISBN 978-1-936113-42-2.

Sommermeyer D, Uckert W: Minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells. *J Immunol.* 2010;184(11):6223-6231.

Tajima K, Obata Y, Tamaki H, Yoshida M, Chen YT, Scanlan MJ, Old LJ, Kuwano H, Takahashi T, Takahashi T et al.: Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer* 2003, 42:23-33.

Thompson JF, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 1994, 22: 4673-4680.

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

Как правило, термины, используемые в следующей формуле изобретения, не должны толковаться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами реализации, изложенными в настоящем описании и формуле изобретения, но должны толковаться как включающие все возможные варианты реализации, наряду с полным объемом эквивалентов, на которые такая формула изобретения дает права. Соответственно, формула изобретения не ограничена настоящим описанием.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), специфичный к MAGE-A4, причем указанный TCR содержит

вариабельную область TCR  $\alpha$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 13 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 14, и

вариабельную область TCR  $\beta$ , содержащую CDR1 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 15, CDR2 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 16 и CDR3 с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 17.

2. Выделенный TCR по п.1, отличающийся тем, что указанный TCR специфично распознает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент, предпочтительно при этом указанный TCR специфично распознает связанную с HLA-A2 форму последовательности аминокислот SEQ ID NO: 1, более предпочтительно при этом указанный TCR специфично распознает последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1, которая презентирована молекулой, кодируемой HLA-A\*02:01.

3. Выделенный TCR по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный TCR содержит вариабельную область TCR  $\alpha$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 18 и вариабельную область TCR  $\beta$  с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 19.

4. Выделенный TCR по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный TCR содержит  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 20 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 21.

5. Выделенный TCR по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный TCR содержит  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 89 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 90.

6. Выделенный TCR по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный TCR содержит  $\alpha$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 108 и  $\beta$  цепь TCR с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 109.

7. Поливалентный комплекс TCR, содержащий по меньшей мере два TCR по любому из пп.1-6.

8. Слитый белок, содержащий  $\alpha$  цепь TCR и  $\beta$  цепь TCR, причем указанный слитый белок содержит последовательность аминокислот согласно любой из последовательностей SEQ ID NO: 96 и 110.

9. Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR по любому из пп.1-6 или слитый белок по п.8.

10. Нуклеиновая кислота по п.9, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая  $\alpha$  цепь TCR, представлена в любой из последовательностей SEQ ID NO: 77 и 105, и/или тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая  $\beta$  цепь TCR, представлена в любой из последовательностей SEQ ID NO: 78 и 106.

11. Нуклеиновая кислота по п.9, отличающаяся тем, что указанный слитый белок кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты согласно любой из последовательностей SEQ ID NO: 95 и 107.

12. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.9-11.

13. Вектор по п.12, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой вектор экспрессии.

14. Вектор по п.13, отличающийся тем, что указанный вектор экспрессии представляет собой ретровирусный вектор.

15. Вектор по п.14, отличающийся тем, что указанный ретровирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

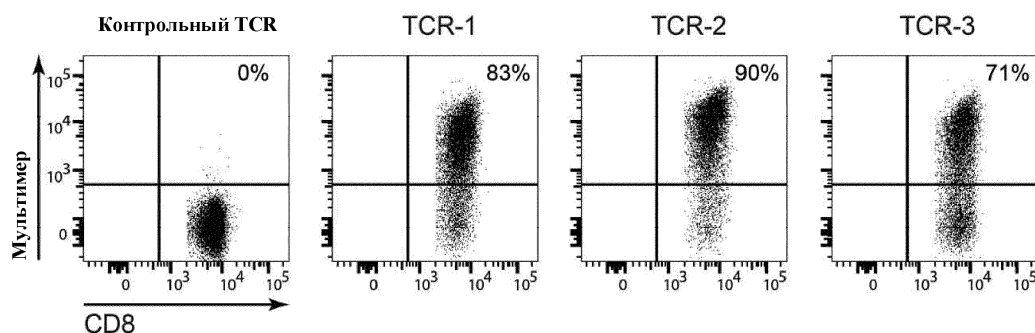
16. Клетка, экспрессирующая TCR по любому из пп.1-6.

17. Клетка по п.16, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку, при этом указанная иммунная эффекторная клетка представляет собой предпочтительно Т-клетку, естественную клетку-киллер (НК) или естественную Т-клетку-киллер (НКТ).

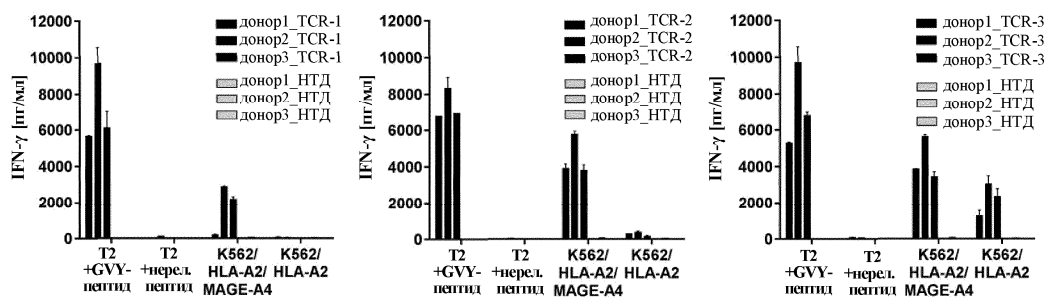
18. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунную эффекторную клетку по п.17.

19. Фармацевтическая композиция по п.18, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

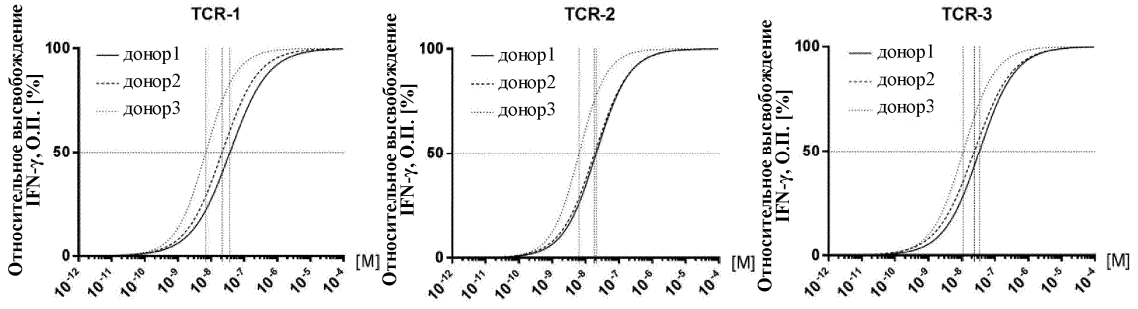
20. Способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в указанном лечении субъекту иммунной эффекторной клетки по п.17.



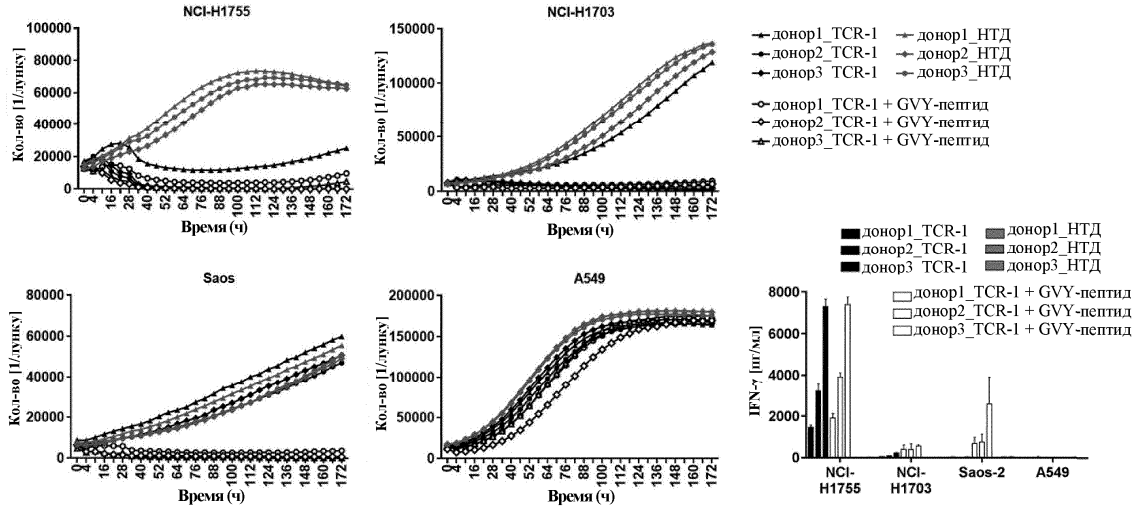
Фиг. 1



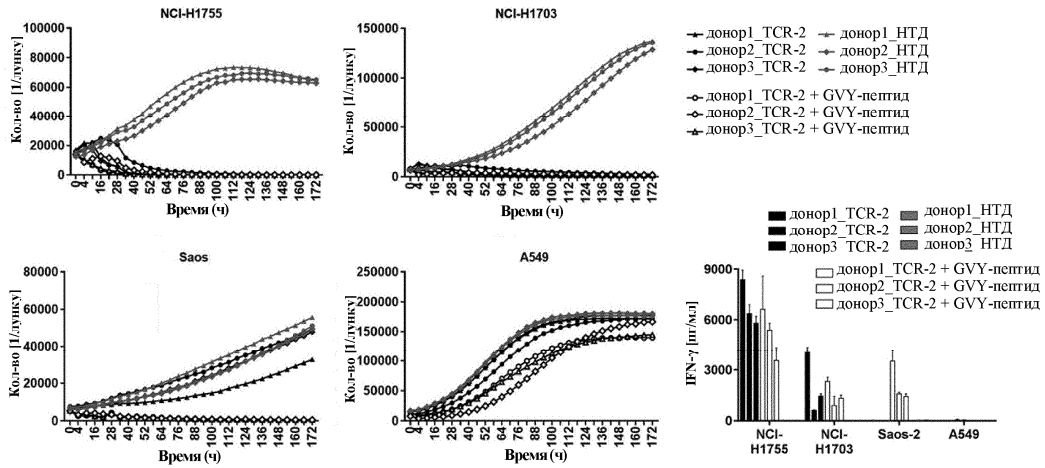
Фиг. 2



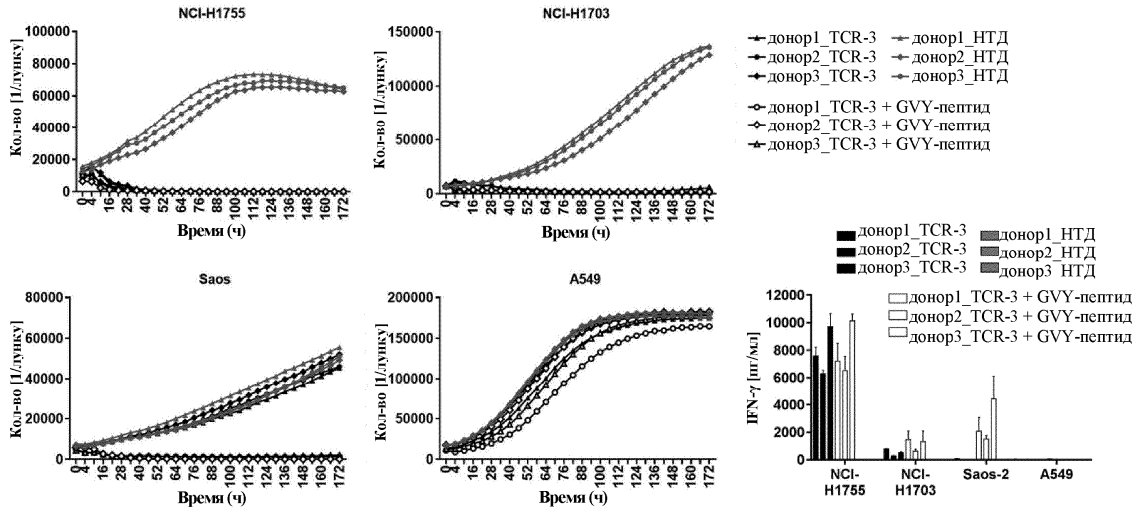
Фиг. 3



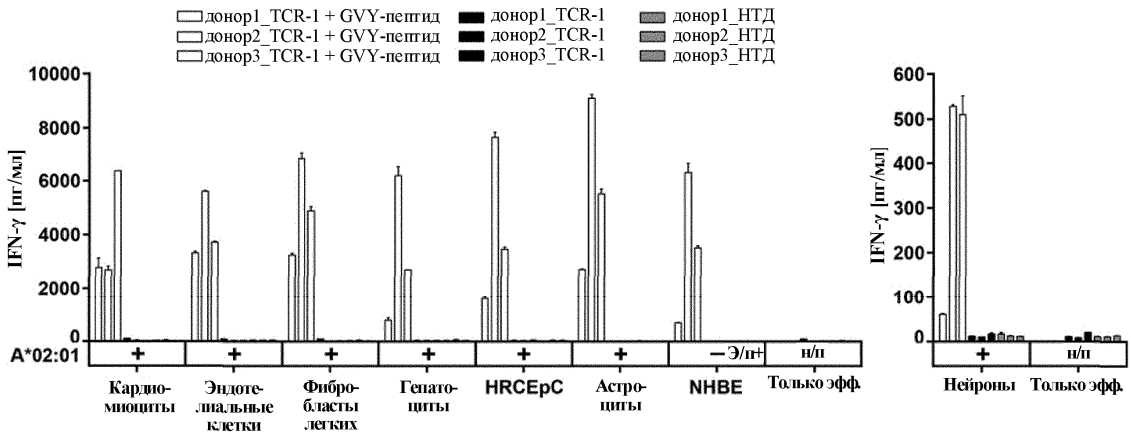
Фиг. 4а



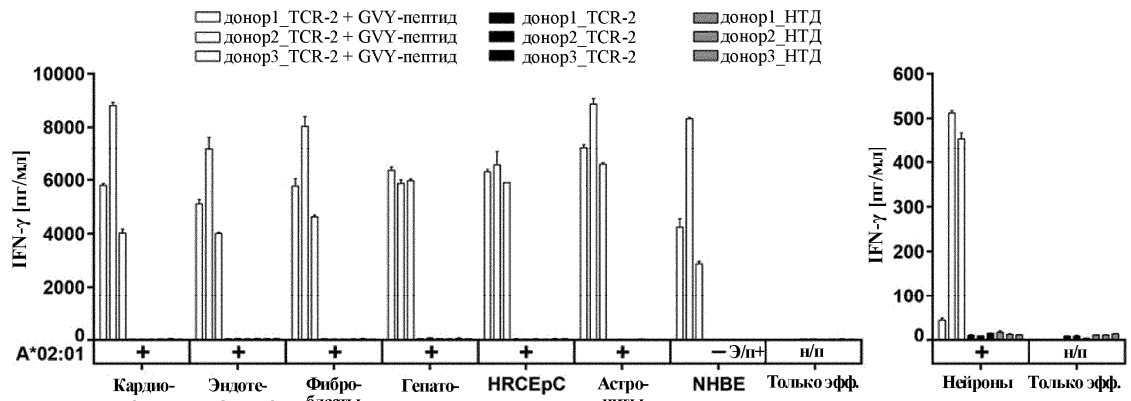
Фиг. 4б



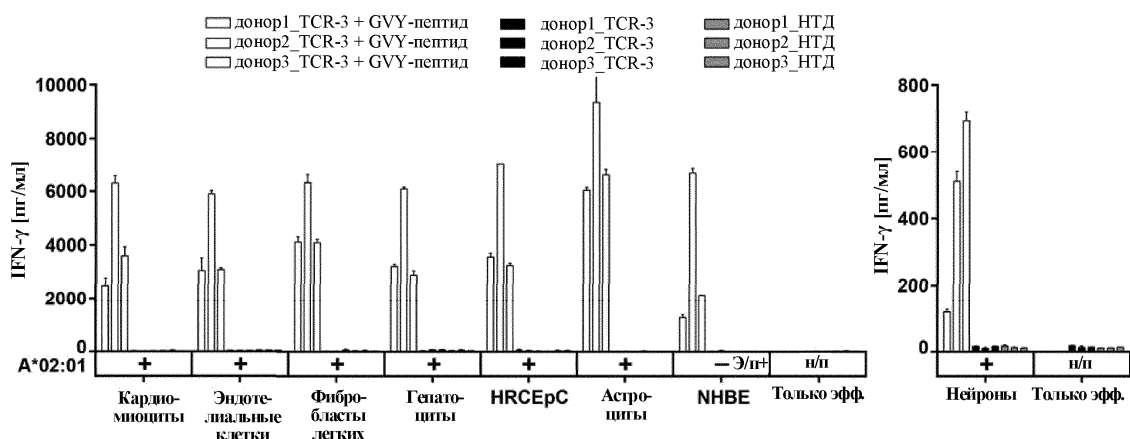
Фиг. 4с



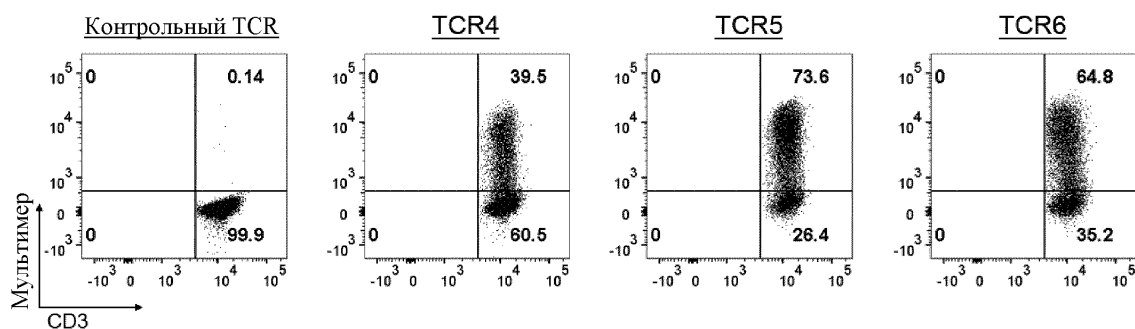
Фиг. 5а



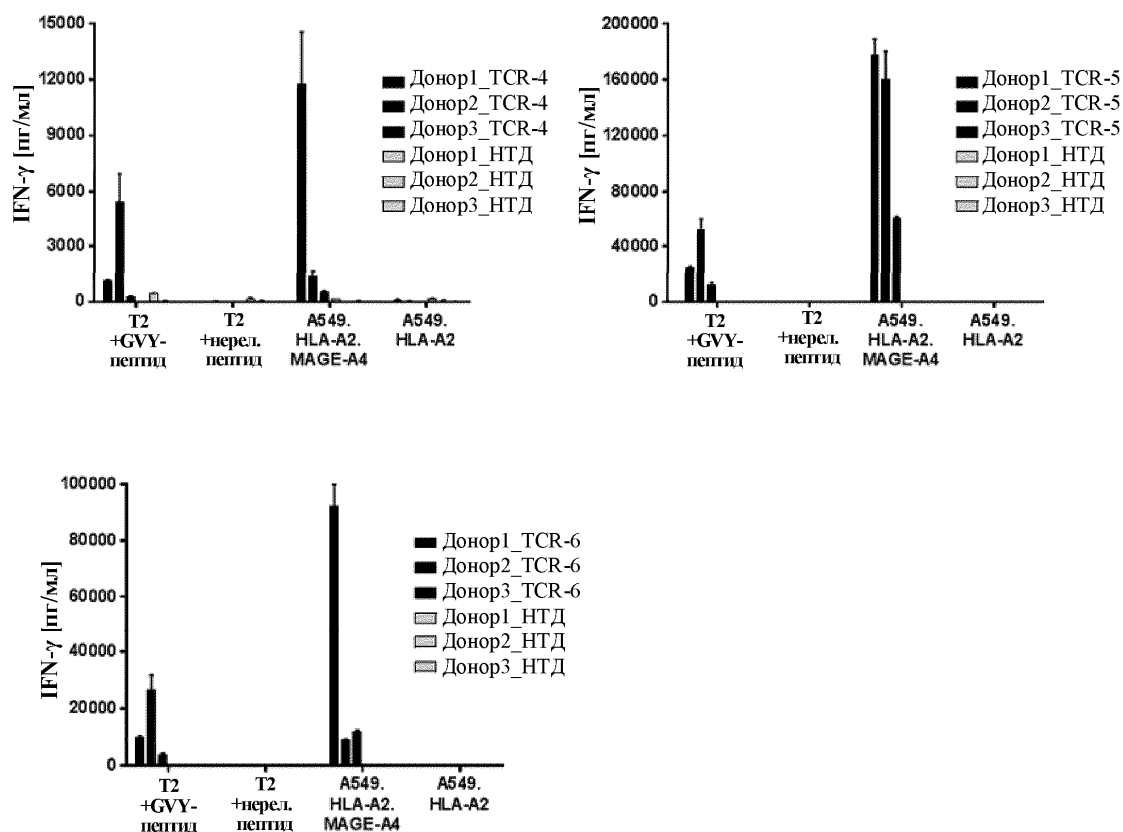
Фиг. 5б



Фиг. 5с

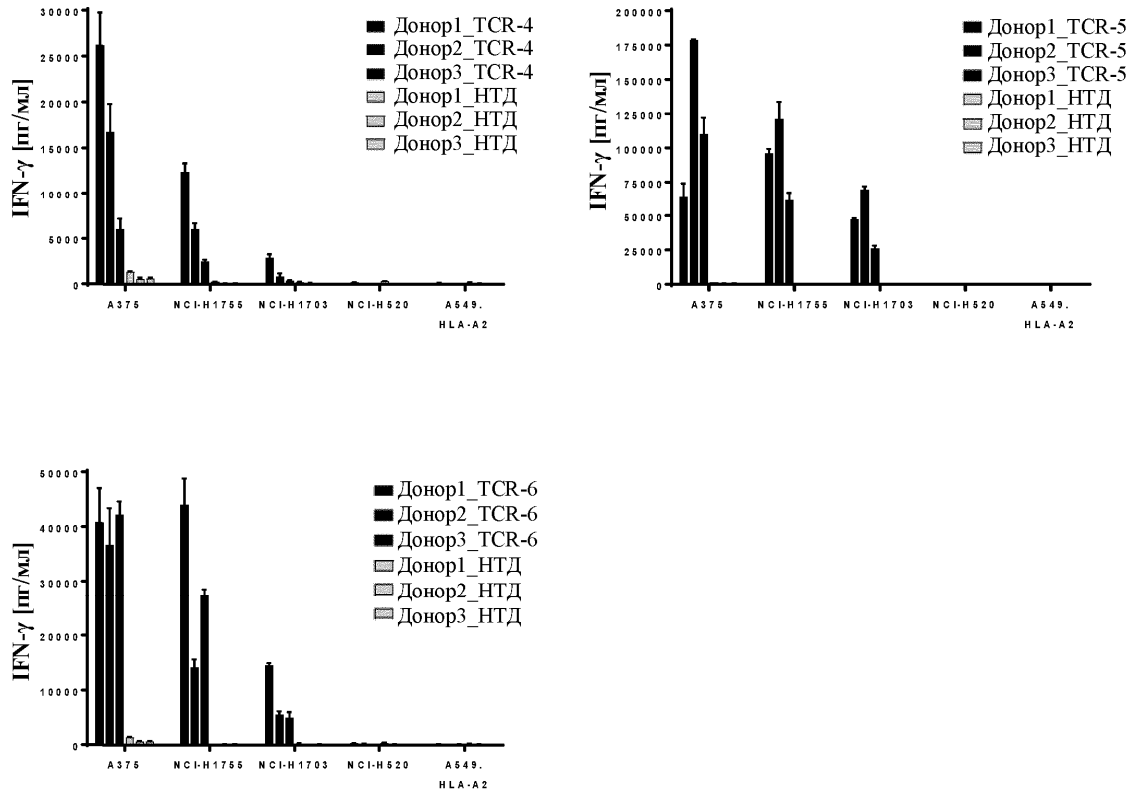


Фиг. 6

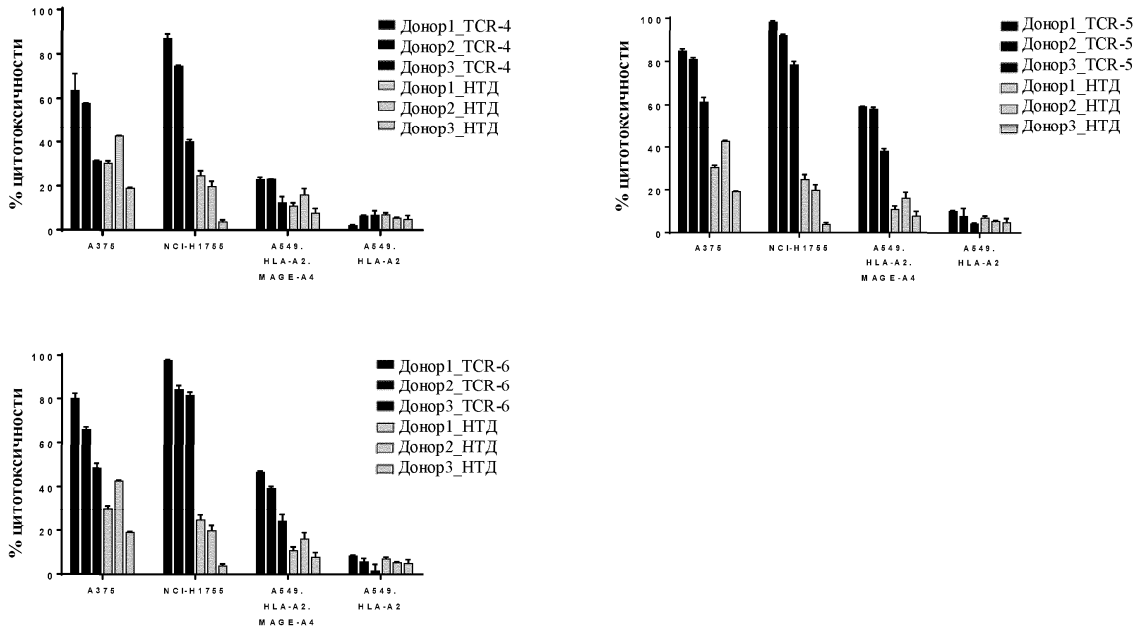


Фиг. 7

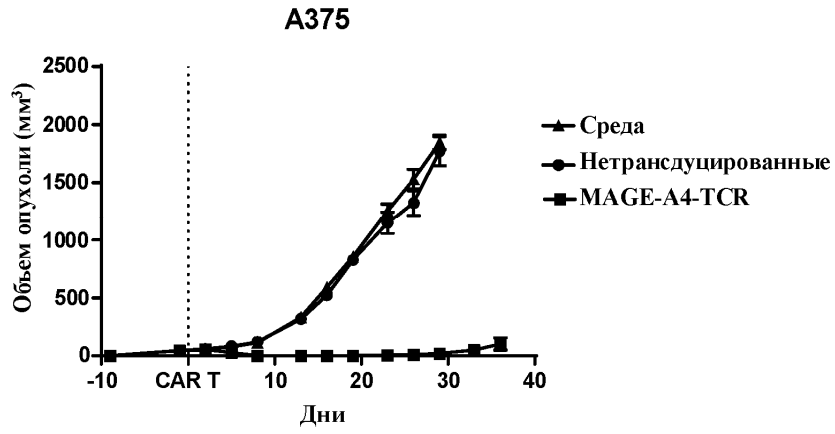




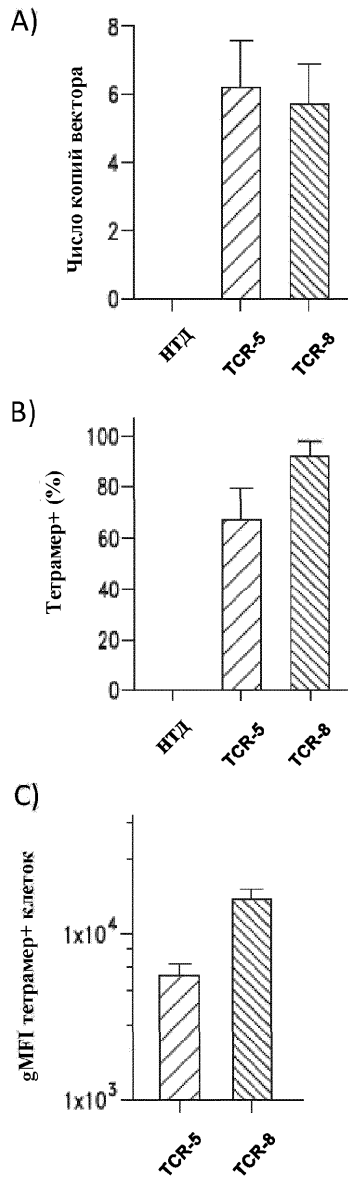
Фиг. 8



Фиг. 9

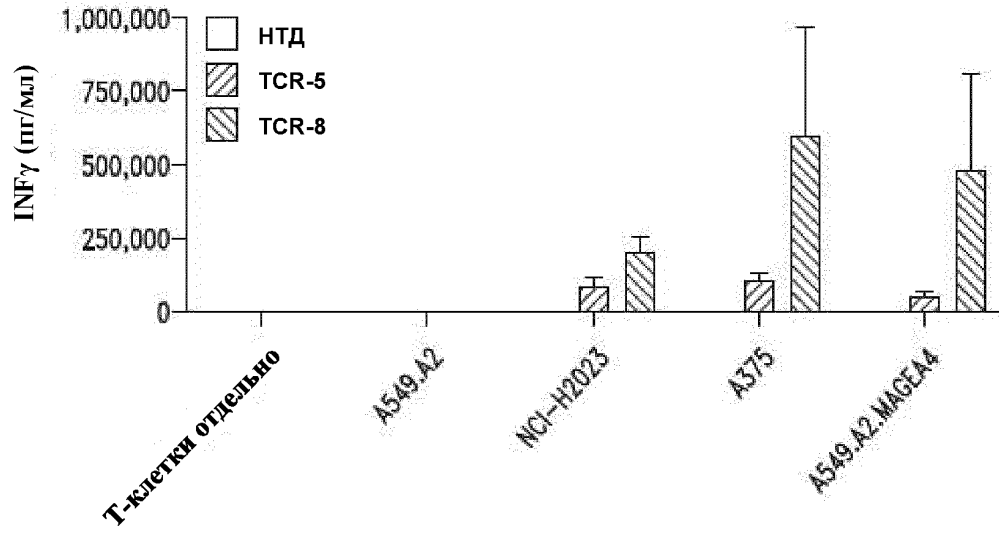


Фиг. 10

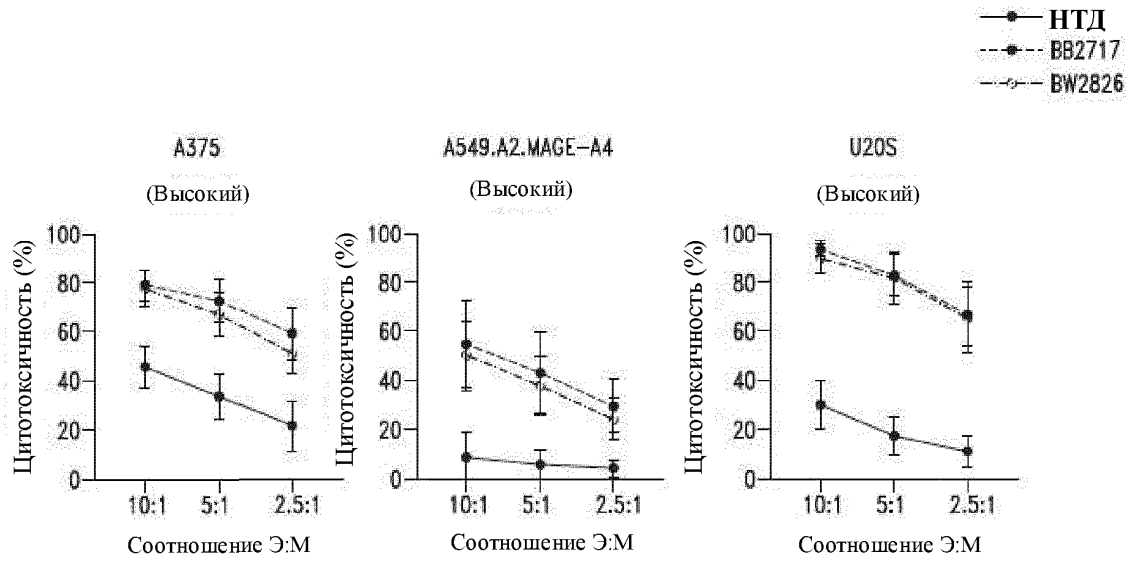


Фиг. 11

A)



B)



Фиг. 12

