

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048202**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.11.07**

**(51)** Int. Cl. **C07K 14/725 (2006.01)**

**(21)** Номер заявки  
**202191107**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.10.23**

---

**(54) Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ NY-ESO-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** **62/749,194**

**(32)** **2018.10.23**

**(33)** **US**

**(43)** **2021.09.17**

**(86)** **PCT/US2019/057543**

**(87)** **WO 2020/086647 2020.04.30**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Бабб Роберт, Баурман Натали, Чэнь  
Ган, Гурер Каган, Хансен Джоанна,  
Ли Вэнь-И, Мигер Томас, Сух Дэвид  
(US)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** **US-A1-2016024174**

**US-A1-2016130319**

**US-A1-2018298338**

**DAHPNE A. SCHMID ET AL:** "Evidence for a TCR Affinity Threshold Delimiting Maximal CD8 T Cell Function", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 184, no. 9, 29 March 2010 (2010-03-29), pages 4936-4946, XP055653362, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1000173 abstract page 4937, left-hand column, paragraph 2 page 4937, right-hand column, paragraph 4 page 4938, right-hand column, last paragraph - page 4939 page 4942, right-hand column, paragraph 2 - page 4943, left-hand column, paragraph 1 page 4943, right-hand column, paragraph 3 figure 6 table 1

**LAURENT DERRÉ ET AL:** "Distinct sets of alphabeta TCRs confer similar recognition of tumor antigen NY-ESO-1 157-165 by interacting with its central Met/Trp residues", PROC NATL ACAD SCI USA, vol. 105, no. 39, 30 September 2008 (2008-09-30), pages 15010-15015, XP055346803, abstract page 15011, right-hand column, last paragraph - page 15012, left-hand column page 15013, right-hand column, paragraph 3 figure 3

---

**(57)** Данное изобретение относится к выделенным Т-клеточным рецепторам (TCR), которые специфически связываются с пептидами плоскоклеточной карциномы пищевода 1 типа Нью-Йорк (NY-ESO-1), экспонируемыми HLA, а также к терапевтическим и диагностическим способам применения этих выделенных TCR.

---

**B1**

**048202**

**048202 B1**

### **Родственные заявки**

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/749194, поданной 23 октября 2018 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

### **Перечень последовательностей**

Данное изобретение включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате с кодировкой ASCII и, таким образом, включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия в формате ASCII, созданная 21 октября 2019 года, имеет название 118003\_10420\_SL.txt и ее размер составляет 74556 байт.

### **Область техники**

Данное раскрытие относится к антигенсвязывающим белкам, которые специфически связываются с пептидом плоскоклеточной карциномы пищевода 1 типа Нью-Йорк (NY-ESO-1), экспонируемым HLA, а также к терапевтическим и диагностическим способам применения этих связывающих белков.

### **Предпосылки изобретения**

T-клеточные рецепторы (TCR) представляют собой связанные с мембраной гетеродимеры, содержащие  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи, напоминающие переменную (V) и константную (C) области иммуноглобулина.  $\alpha$ -цепь TCR включает ковалентно связанную V- $\alpha$ - и C- $\alpha$ -цепь, в то время как  $\beta$ -цепь включает V- $\beta$ -цепь, ковалентно связанную с C- $\beta$ -цепью. V- $\alpha$ - и V- $\beta$ -цепи образуют карман или щель, которые могут связывать антиген в контексте главного комплекса гистосовместимости (MHC) (известного у человека как комплекс HLA). (Davis Ann. Rev. of Immunology 3: 537 (1985); Fundamental Immunology 3rd Ed., W. Paul Ed. Rsen Press LTD. New York (1993)).

TCR представляют собой первичные эффекторы иммунной системы, которые обладают уникальными преимуществами в качестве платформы для разработки терапевтических средств. В то время как терапевтические средства на основе антител ограничиваются распознаванием патогенов в крови и внеклеточных пространствах или целевыми белками на поверхности клетки, T-клеточные рецепторы могут распознавать антигены, экспонируемые молекулами MHC на поверхности клеток, включая антигены, происходящие из внутриклеточных белков. В зависимости от подтипа T-клеток, которые распознают экспонируемый антиген и становятся активированными, TCR могут участвовать в контроле различных иммунных ответов. Например, T-клетки участвуют в регуляции гуморального иммунного ответа посредством индукции дифференцировки B-клеток в клетки, продуцирующие антитела. Кроме того, активированные T-клетки инициируют клеточноопосредованные иммунные ответы. Таким образом, TCR могут распознавать дополнительные мишени, недоступные антителам. Кроме того, сообщалось, что TCR опосредуют уничтожение клеток, повышают B-клеточную пролиферацию и влияют на развитие и тяжесть различных нарушений, включая рак, различные виды аллергии, вирусные инфекции и аутоиммунные нарушения.

Принимая во внимание функцию TCR, антигенспецифические TCR были оценены для применения в иммунотерапии в отношении их способности перенаправлять T-клетки в опухоли, экспрессирующие антиген. TCR будут связываться с небольшим пептидом длиной всего 8-12 аминокислот, который связывается на поверхности целевой клетки с помощью главного комплекса гистосовместимости (MHC). Таким образом, TCR могут распознавать внутриклеточные антигены, происходящие из раковых или вирусных белков, поскольку эти антигены процессируются и экспонируются в виде пептидов в контексте MHC поверхности. Следовательно, TCR могут распознавать дополнительные внутренние клеточные мишени, недоступные для антител или терапевтических средств, которые не могут проникнуть в клетку.

Однако задача данной отрасли состоит в том, чтобы разработать TCR, которые не обладают иммуногенностью при введении пациенту и обладают высокой специфичностью к конкретному пептидному антигену, представляющему интерес, без перекрестной реакции с другими пептидами на MHC или аналогичными эпитопами, обнаруженными в репертуаре природного белка.

NY-ESO-1 или пептид плоскоклеточной карциномы пищевода 1 типа Нью-Йорк представляет собой хорошо известный антиген рака яичек (СТА) с повторной экспрессией при многих типах рака. Его способность вызывать спонтанные гуморальные и клеточные иммунные ответы вместе с его ограниченным паттерном экспрессии сделали его хорошим кандидатом для иммунотерапии рака.

Хотя было разработано несколько вакцин, нацеленных на NY-ESO-1, было получено немного полных гуморальных и клеточных иммунных ответов. Было разработано несколько TCR NY-ESO-1, происходящих от пациентов, однако было обнаружено, что они являются иммуногенными при введении пациенту и перекрестно реагируют с другими пептидами на MHC или аналогичными эпитопами, обнаруженными в репертуаре природного белка. Кроме того, поскольку происходящие от пациентов TCR против большинства опухолевых антигенов представляют собой аутоантигены, TCR, нацеленные на эти антигены, часто либо удалены, либо обладают субоптимальной аффинностью, в первую очередь в результате иммунологической толерантности.

Соответственно, в данной области существует неудовлетворенная потребность в новых нацеливающих агентах на основе T-клеточных рецепторов, которые специфически связываются с антигенами NY-ESO-1, а также в способах получения и применения таких агентов в терапевтических и диагностических целях.

### Краткое описание сущности изобретения

Данное изобретение относится к Т-клеточным рецепторам (TCR), которые были созданы против пептидного антигена NY-ESO-1 в контексте MHC (HLA-A2). Идентифицированные уникальные последовательности TCR продемонстрировали специфическое связывание с небольшим пептидом NY-ESO-1, представленным в бороздке молекулы HLA, и продемонстрировали активацию Т-клеток в репортерном анализе. Кроме того, не было обнаружено перекрестной реактивности по отношению к другим "подобным" пептидам, как продемонстрировано алгоритмом прогнозирования и последующим анализом перекрестной реактивности (специфичности) для исследования TCR против предполагаемых перекрестно-реактивных пептидов.

Соответственно, в одном аспекте в данном изобретении представлены выделенные Т-клеточные рецепторы (TCR), которые специфически связываются с презентруемым HLA-A2 пептидом плоскоклеточной карциномы 1 типа Нью-Йорк антигена рака яичек (NY-ESO-1), содержащим аминокислотную последовательность SLLMWITQC (SEQ ID NO: 111) (NY-ESO-1 (157-165)), при этом TCR имеет свойство, выбранное из группы, состоящей из: (a) не связывается специфически с клетками, экспрессирующими предположительные нецелевые пептиды, но не с пептидом NY-ESO-1, презентруемым HLA-A2, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, определенную с помощью люминесцентного анализа; и (b) активирует Т-клеточный ответ, в два раза больший, чем NY-ESO-1-специфический TCR, происходящий от пациента.

В некоторых вариантах осуществления TCR активирует Т-клеточный ответ приблизительно в два раза больший, или приблизительно в три раза больший, или приблизительно в четыре раза больший, чем NY-ESO-1-специфический TCR, происходящий от пациента, определенный с помощью TCR-опосредованного люминесцентного биоанализа передачи сигналов с участием Т-клеток.

TCR может содержать по меньшей мере один варибельный домен альфа-цепи и/или по меньшей мере один варибельный домен бета-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит варибельный домен альфа-цепи TCR и варибельный домен бета-цепи TCR.

В некоторых вариантах осуществления варибельный домен альфа-цепи содержит области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3, при этом область CDR3 содержит аминокислотную последовательность формулы I (SEQ ID NO: 118):

Cys-N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>-N<sub>4</sub>-N<sub>5</sub>-N<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>-N<sub>8</sub>-N<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-N<sub>15</sub>-Phe (формула I), где

N<sub>1</sub> представляет собой неполярную аминокислоту;

N<sub>2</sub> представляет собой Leu, Tyr, Val или Ala;

N<sub>3</sub> представляет собой Arg, Asn, Thr или Ser;

N<sub>4</sub> представляет собой Pro, Ser, Glu, Ile, Gly, Met, Lys или Thr;

N<sub>5</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Lys;

N<sub>6</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Asp, Ala, Gly, Leu или Asn;

N<sub>7</sub> представляет собой Ser, Asn, Ala, Tyr или Thr;

N<sub>8</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Ser или Gly;

N<sub>9</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly;

N<sub>10</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly или Ser;

N<sub>11</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Trp, Gly, Ser, Gln, Ala или Pro;

N<sub>12</sub> представляет собой Gly, Tyr, Asn, Gln или Ser;

N<sub>13</sub> представляет собой Lys, Ala, Asp, Ile или Asn;

N<sub>14</sub> представляет собой неполярную аминокислоту; и

N<sub>15</sub> представляет собой Gln, Asn, Arg, Thr, Val, Ile или Ser.

В некоторых вариантах осуществления N<sub>1</sub> представляет собой Ala или Ile. В некоторых вариантах осуществления N<sub>14</sub> представляет собой Phe, Leu, Met или Pro.

В некоторых вариантах осуществления варибельный домен бета-цепи содержит области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3, при этом область CDR3 содержит аминокислотную последовательность формулы II (SEQ ID NO: 119):

Cys-N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>-N<sub>4</sub>-N<sub>5</sub>-N<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>-N<sub>8</sub>-N<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-Phe (формула II), где

каждое из N<sub>1</sub> и N<sub>2</sub> независимо представляет собой Ala или Ser;

N<sub>3</sub> представляет собой Ser, Met или Lys;

N<sub>4</sub> представляет собой Tyr, Trp, His, Leu, Thr, Glu или Gln;

N<sub>5</sub> представляет собой Ser, Ala, Thr, Gly, Val или Arg;

N<sub>6</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly, His, Asp, Thr, Pro, Met или Ser;

N<sub>7</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly, Tyr, Asn или Pro;

N<sub>8</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Y;

N<sub>9</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой N;

N<sub>10</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой полярную аминокислоту;

N<sub>11</sub> представляет собой Pro, Glu, Gly или Asp;

N<sub>12</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Glu;

N<sub>13</sub> представляет собой Leu, Ala, Gln или Tyr; и

N<sub>14</sub> представляет собой His, Phe или Thr.

В некоторых вариантах осуществления N<sub>10</sub> представляет собой Ser, Thr, Gln или Tyr.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 варибельного домена альфа-цепи содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1, изложенных в табл. 1, а CDR2 варибельного домена альфа-цепи независимо содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR2, изложенных в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления CDR1 варибельного домена бета-цепи содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1, изложенных в табл. 1, а CDR2 варибельного домена бета-цепи независимо содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR2, изложенных в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного домена альфа-цепи, содержащиеся в любой из последовательностей варибельного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3; и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного домена бета-цепи, содержащиеся в любой из последовательностей варибельного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит варибельный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей варибельного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит варибельный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей варибельного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит: (а) варибельный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей варибельного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3; и (б) варибельный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность со всей аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей варибельного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит:

(а) CDR1 варибельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94 и 104;

(б) CDR2 варибельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 и 105;

(с) CDR3 варибельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96 и 106;

(d) CDR1 варибельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91 и 101;

(е) CDR2 варибельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92 и 102; и

(f) CDR3 варибельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 54, 63, 73, 83, 93 и 103.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит пару аминокислотных последовательностей варибельного домена альфа-цепи/варибельного домена бета-цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9/7; 19/17; 29/27; 39/37; 49/47; 59/57; 69/67; 79/77; 89/87; 99/97; и 109/107.

В данном изобретении также представлены выделенные TCR, которые конкурируют за связывание с любым из выделенных TCR, раскрываемых в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления выделенные TCR по данному изобретению дополнительно содержат детектируемый фрагмент.

Данное изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим выделенный TCR по данному изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель; и выделенные клетки, презентующие TCR по данному изобретению.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к выделенной полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует варибельный домен альфа-цепи выделенных TCR по данному изобретению.

В другом варианте осуществления данное изобретение относится к выделенной полинуклеотидной

молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует переменный домен бета-цепи выделенных TCR по данному изобретению.

Данное изобретение также относится к векторам, содержащим полинуклеотидные молекулы по данному изобретению; и клетки, экспрессирующие векторы по данному изобретению.

В одном аспекте в данном изобретении представлен способ лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества выделенных TCR по данному изобретению, фармацевтических композиций по данному изобретению или множества клеток по данному изобретению, тем самым осуществляя лечение субъекта.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, представляет собой рак, ассоциированный с NY-ESO-1, такой как липосаркома, нейробластома, миелома, метастатическая меланома, синовиальная саркома, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, мелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарная опухоль, мультиформная глиобластома, анапластическая астроцитома, опухоль головного мозга, рак маточных труб, рак эпителия яичников, первичный рак брюшной полости, распространенные солидные опухоли, саркома мягких тканей, меланома, саркома, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, болезнь Ходжкина, множественная миелома, синовиальная саркома, метастатические солидные опухоли, рабдомиосаркома, распространенный миксоид, круглоклеточная липосаркома, метастатическая меланома или рецидивирующий мелкоклеточный рак легких. В некоторых вариантах осуществления рак, ассоциированный с NY-ESO-1, представляет собой липосаркому, нейробластома, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, мелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы или рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR, фармацевтическую композицию или множество клеток вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR, фармацевтическую композицию или множество клеток вводят субъекту подкожно, внутривенно, внутрикочно, внутрибрюшинно, перорально, внутримышечно или внутрочерепно.

В одном аспекте в данном изобретении представлена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая T-клеточный рецептор (TCR), при этом TCR специфически связывается с презентуемым HLA-A2 пептидом плоскоклеточной карциномы 1 типа Нью-Йорк антигена рака яичек (NY-ESO-1), содержащим аминокислотную последовательность SLLMWITQC (SEQ ID NO: 111) (NY-ESO-1 (157-165)), при этом TCR имеет свойство, выбранное из группы, состоящей из: (а) не связывается специфически с клетками, экспрессирующими предположительные нецелевые пептиды, но не с пептидом NY-ESO-1, презентуемым HLA-A2, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, определенную с помощью люминесцентного анализа; и (б) активирует T-клеточный ответ, приблизительно в два раза больший, чем NY-ESO-1-специфический TCR, происходящий от пациента.

В некоторых вариантах осуществления TCR активирует T-клеточный ответ приблизительно в два раза больший, или приблизительно в три раза больший, или приблизительно в четыре раза больший, чем NY-ESO-1-специфический TCR, происходящий от пациента, определенный с помощью TCR-опосредованного люминесцентного биоанализа передачи сигналов с участием T-клеток.

В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере один переменный домен альфа-цепи и/или по меньшей мере один переменный домен бета-цепи TCR.

В некоторых вариантах осуществления TCR содержит области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3 переменного домена альфа-цепи, содержащиеся в любой из последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3; и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного домена бета-цепи, содержащиеся в любой из последовательностей переменного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит переменный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит переменный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей переменного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит (а) переменный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в

табл. 3; и (b) вариабельный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность со всей аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей вариабельного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный антигенсвязывающий белок содержит

(a) CDR1 вариабельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94 и 104;

(b) CDR2 вариабельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 и 105;

(c) CDR3 вариабельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96 и 106;

(d) CDR1 вариабельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91 и 101;

(e) CDR2 вариабельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92 и 102; и

(f) CDR3 вариабельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 54, 63, 73, 83, 93 и 103.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит пару аминокислотных последовательностей вариабельного домена альфа-цепи/вариабельного домена бета-цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9/7; 19/17; 29/27; 39/37; 49/47; 59/57; 69/67; 79/77; 89/87; 99/97; и 109/107.

Данное изобретение также относится к векторам, содержащим выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по данному изобретению; и выделенные клетки, содержащие векторы по данному изобретению.

В одном аспекте в данном изобретении представлен способ лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, включающий введение субъекту множества клеток, содержащих векторы по данному изобретению, тем самым осуществляя лечение субъекта.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, представляет собой рак, ассоциированный с NY-ESO.

В некоторых вариантах осуществления рак, ассоциированный с NY-ESO-1, представляет собой липосаркому, нейробластому, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарную опухоль, мультиформную глиобластому, анапластическую астроцитому, опухоль головного мозга, рак маточных труб, рак эпителия яичников, первичный рак брюшной полости, распространенные солидные опухоли, саркому мягких тканей, меланому, саркому, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, болезнь Ходжкина, множественную миелому, синовиальную саркому, метастатические солидные опухоли, рабдомиосаркому, распространенный миксоид, круглоклеточную липосаркому, метастатическую меланому или рецидивирующий немелкоклеточный рак легких. В некоторых вариантах осуществления рак, ассоциированный с NY-ESO-1, представляет собой липосаркому, нейробластому, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы или рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления множество клеток вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

В данном изобретении представлен выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), который специфически связывается с презентуемым HLA-A2 пептидом плоскоклеточной карциномы 1 типа Нью-Йорк антигена рака яичек (NY-ESO-1), содержащим аминокислотную последовательность SLLMWITQC (SEQ ID NO: 111) (NY-ESO-1 (157-165)), при этом TCR имеет свойство, выбранное из группы, состоящей из: (a) не связывается специфически с клетками, экспрессирующими предположительные нецелевые пептиды, но не с пептидом NY-ESO-1, презентуемым HLA-A2, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, определенную с помощью люминесцентного анализа; и (b) активирует Т-клеточный ответ, имеющий соотношение сигнал/шум, большее или равное NY-ESO-1-специфического TCR, происходящего от пациента, определенное с помощью TCR-опосредованного люминесцентного биоанализа передачи сигнала с участием Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления TCR активирует Т-клеточный ответ приблизительно в два раза больший, или приблизительно в три раза больший, или приблизительно в четыре раза больший, чем NY-ESO-1-специфический TCR, происходящий от пациента, определенный с помощью TCR-опосредованного люминесцентного биоанализа передачи сигналов с участием Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит по меньшей мере один вариабельный домен альфа-цепи и/или по меньшей мере один вариабельный домен бета-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи TCR и вариабельный домен бета-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен альфа-цепи содержит области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3, при этом область CDR3 содержит аминокислотную последователь-

ность формулы I:

Cys-N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>-N<sub>4</sub>-N<sub>5</sub>-N<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>-N<sub>8</sub>-N<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-N<sub>15</sub>-Phe (формула I), где

N<sub>1</sub> представляет собой неполярную аминокислоту;

N<sub>2</sub> представляет собой Leu, Tyr, Val или Ala;

N<sub>3</sub> представляет собой Arg, Asn, Thr или Ser;

N<sub>4</sub> представляет собой Pro, Ser, Glu, Ile, Gly, Met, Lys или Thr;

N<sub>5</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Lys;

N<sub>6</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Asp, Ala, Gly, Leu или Asn;

N<sub>7</sub> представляет собой Ser, Asn, Ala, Tyr или Thr;

N<sub>8</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Ser или Gly;

N<sub>9</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly;

N<sub>10</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly или Ser;

N<sub>11</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Trp, Gly, Ser, Gln, Ala или Pro;

N<sub>12</sub> представляет собой Gly, Tyr, Asn, Gln или Ser;

N<sub>13</sub> представляет собой Lys, Ala, Asp, Ile или Asn;

N<sub>14</sub> представляет собой неполярную аминокислоту; и

N<sub>15</sub> представляет собой Gln, Asn, Arg, Thr, Val, Ile или Ser.

В некоторых вариантах осуществления N<sub>1</sub> представляет собой Ala или Ile. В некоторых вариантах осуществления N<sub>14</sub> представляет собой Phe, Leu, Met или Pro. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен бета-цепи содержит области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3, при этом область CDR3 содержит аминокислотную последовательность формулы II:

Cys-N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>-N<sub>4</sub>-N<sub>5</sub>-N<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>-N<sub>8</sub>-N<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-Phe (формула II), где

каждое из N<sub>1</sub> и N<sub>2</sub> независимо представляет собой Ala или Ser;

N<sub>3</sub> представляет собой Ser, Met или Lys;

N<sub>4</sub> представляет собой Tyr, Trp, His, Leu, Thr, Glu или Gln;

N<sub>5</sub> представляет собой Ser, Ala, Thr, Gly, Val или Arg;

N<sub>6</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly, His, Asp, Thr, Pro, Met или Ser;

N<sub>7</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly, Tyr, Asn или Pro;

N<sub>8</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Y;

N<sub>9</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой N;

N<sub>10</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой полярную аминокислоту;

N<sub>11</sub> представляет собой Pro, Glu, Gly или Asp;

N<sub>12</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Glu;

N<sub>13</sub> представляет собой Leu, Ala, Gln или Tyr; и

N<sub>14</sub> представляет собой His, Phe или Thr.

В некоторых вариантах осуществления N<sub>10</sub> представляет собой Ser, Thr, Gln или Tyr. В некоторых вариантах осуществления CDR1 вариабельного домена альфа-цепи содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1, изложенных в табл. 1, а CDR2 вариабельного домена альфа-цепи независимо содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR2, изложенных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления CDR1 вариабельного домена бета-цепи содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1, изложенных в табл. 1, а CDR2 вариабельного домена бета-цепи независимо содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR2, изложенных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного домена альфа-цепи, содержащиеся в любой из последовательностей вариабельного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3; и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного домена бета-цепи, содержащиеся в любой из последовательностей вариабельного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит вариабельный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей вариабельного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит вариабельный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей вариабельного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит: (а) вариабельный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокис-

лотных последовательностей варибельного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3; и (b) варибельный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность со всей аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей варибельного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит:

(a) CDR1 варибельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94 и 104;

(b) CDR2 варибельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 и 105;

(c) CDR3 варибельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96 и 106;

(d) CDR1 варибельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91 и 101;

(e) CDR2 варибельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92 и 102; и

(f) CDR3 варибельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 54, 63, 73, 83, 93 и 103.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит пару аминокислотных последовательностей варибельного домена альфа-цепи/варибельного домена бета-цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9/7; 19/17; 29/27; 39/37; 49/47; 59/57; 69/67; 79/77; 89/87; 99/97; и 109/107.

В некоторых вариантах осуществления в данном раскрытии представлен выделенный TCR, который конкурирует за связывание с выделенным TCR, описанным выше. В некоторых вариантах осуществления в данном раскрытии представлен выделенный TCR, который дополнительно содержит детектируемый фрагмент.

В данном изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая выделенный TCR, описанный выше, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Данное изобретение относится к выделенной клетке, презентующей TCR, описанный выше. Данное изобретение относится к полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует варибельный домен альфа-цепи выделенного TCR, описанного выше. Данное изобретение относится к полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует варибельный домен бета-цепи выделенного TCR, описанного выше. В данном изобретении представлен вектор, содержащий эту полинуклеотидную молекулу. В данном изобретении представлена клетка, экспрессирующая этот вектор.

В данном изобретении представлен способ лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества выделенного TCR, фармацевтической композиции или множества клеток, описанных выше, тем самым осуществляя лечение субъекта.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, представляет собой рак, ассоциированный с NY-ESO-1. В некоторых вариантах осуществления рак, ассоциированный с NY-ESO-1, представляет собой липосаркому, нейробластому, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарную опухоль, мультиформную глиобластому, анапластическую астроцитому, опухоль головного мозга, рак маточных труб, рак эпителия яичников, первичный рак брюшной полости, распространенные солидные опухоли, саркому мягких тканей, меланому, саркому, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, болезнь Ходжкина, множественную миелому, синовиальную саркому, метастатические солидные опухоли, рабдомиосаркому, распространенный миксоид, круглоклеточную липосаркому, метастатическую меланому или рецидивирующий немелкоклеточный рак легких. В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR, фармацевтическую композицию или множество клеток вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR, фармацевтическую композицию или множество клеток вводят субъекту подкожно, внутривенно, внутриклеточно, внутривенно, перорально, внутримышечно или внутривенно.

В данном изобретении представлена полинуклеотидная молекула, кодирующая T-клеточный рецептор (TCR), при этом TCR специфически связывается с презентуемым HLA-A2 пептидом плоскоклеточной карциномы 1 типа Нью-Йорк антигена рака яичек (NY-ESO-1), содержащим аминокислотную последовательность SLLMWITQC (SEQ ID NO: 111) (NY-ESO-1 (157-165)), при этом TCR имеет свойство, выбранное из группы, состоящей из: (a) не связывается специфически с клетками, экспрессирующими предположительные нецелевые пептиды, но не с пептидом NY-ESO-1, презентуемым HLA-A2, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, определенную с помощью люминесцентного анализа; и (b) активирует T-клеточный ответ, приблизительно в два раза больший, чем NY-ESO-1-специфического TCR, происходящего от пациента, определенный с помощью TCR-

опосредованного люминесцентного биоанализа передачи сигнала с участием Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная молекула кодирует по меньшей мере один переменный домен альфа-цепи и/или по меньшей мере один переменный домен бета-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3 переменного домена альфа-цепи, содержащиеся в любой из последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3; и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного домена бета-цепи, содержащиеся в любой из последовательностей переменного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит переменный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит переменный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей переменного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит (а) переменный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3; и (b) переменный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность со всей аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей аминокислотных последовательностей переменного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления выделенный антигенсвязывающий белок содержит

(a) CDR1 переменного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94 и 104;

(b) CDR2 переменного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 и 105;

(c) CDR3 переменного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96 и 106;

(d) CDR1 переменного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91 и 101;

(e) CDR2 переменного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92 и 102; и

(f) CDR3 переменного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 54, 63, 73, 83, 93 и 103.

В некоторых вариантах осуществления выделенный TCR содержит пару аминокислотных последовательностей переменного домена альфа-цепи/переменного домена бета-цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9/7; 19/17; 29/27; 39/37; 49/47; 59/57; 69/67; 79/77; 89/87; 99/97; и 109/107.

В данном изобретении представлен вектор, содержащий полинуклеотидную молекулу, описанную выше. В данном изобретении представлена выделенная клетка, содержащая этот вектор. В данном изобретении представлен способ лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, включающий введение субъекту множества этих клеток, тем самым осуществляя лечение субъекта. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, представляет собой рак, ассоциированный с NY-ESO. В некоторых вариантах осуществления рак, ассоциированный с NY-ESO, представляет собой липосаркому, нейробластому, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарную опухоль, мультиформную глиобластому, анапластическую астроцитому, опухоль головного мозга, рак маточных труб, рак эпителия яичников, первичный рак брюшной полости, распространенные солидные опухоли, саркому мягких тканей, меланому, саркому, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, болезнь Ходжкина, множественную миелому, синовиальную саркому, метастатические солидные опухоли, рабдомиосаркому, распространенный миксоид, круглоклеточную липосаркому, метастатическую меланому или рецидивирующий немелкоклеточный рак легких. В некоторых вариантах осуществления множество клеток вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

В данном изобретении представлен Т-клеточный рецептор (TCR), который специфически связывается с презентируемым HLA-A2 пептидом плоскоклеточной карциномы 1 типа Нью-Йорк антигена рака яичек (NY-ESO-1), содержащим аминокислотную последовательность SLLMWITQC (SEQ ID NO: 111) (NY-ESO-1 (157-165)), при этом TCR содержит область 3, определяющую комплементарность (CDR3), содержащуюся в переменном домене альфа-цепи любой из SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99 и 109.

В данном изобретении представлен Т-клеточный рецептор (TCR), который специфически связывается с презентруемым HLA-A2 пептидом плоскоклеточной карциномы 1 типа Нью-Йорк антигена рака яичек (NY-ESO-1), содержащим аминокислотную последовательность SLLMWITQC (SEQ ID NO: 111) (NY-ESO-1 (157-165)), при этом TCR содержит область 3, определяющую комплементарность (CDR3), содержащуюся в переменном домене бета-цепи любой из SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97 и 107.

В некоторых вариантах осуществления переменный домен альфа-цепи дополнительно содержит CDR1 и CDR2, при этом CDR1 содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1 переменного домена альфа-цепи, изложенных в табл. 1, а CDR2 независимо содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR2 переменного домена альфа-цепи, изложенных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления переменный домен бета-цепи дополнительно содержит CDR1 и CDR2, при этом CDR1 содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1 переменного домена бета-цепи, изложенных в табл. 1, а CDR2 независимо содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR2 переменного домена бета-цепи, изложенных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит по меньшей мере один переменный домен альфа-цепи и/или по меньшей мере один переменный домен бета-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит переменный домен альфа-цепи TCR и переменный домен бета-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного домена альфа-цепи, содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3; и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного домена бета-цепи, содержащиеся в любой из аминокислотных последовательностей переменного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления TCR содержит переменный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит переменный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей переменного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит: (а) переменный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3; и (b) переменный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность со всей аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей переменного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит:

- (a) CDR1 переменного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94 и 104;
- (b) CDR2 переменного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 и 105;
- (c) CDR3 переменного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96 и 106;
- (d) CDR1 переменного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91 и 101;
- (e) CDR2 переменного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92 и 102; и
- (f) CDR3 переменного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93 и 103.

В некоторых вариантах осуществления TCR содержит пару аминокислотных последовательностей переменного домена альфа-цепи/переменного домена бета-цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9/7, 19/17, 29/27, 39/37, 49/47, 59/57, 69/67, 79/77, 89/87, 99/97 и 109/107. В некоторых вариантах осуществления TCR дополнительно содержит детектируемый фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления TCR имеет значение соотношения целевое связывание/нецелевое связывание, составляющее более 5, более 10, более 15, более 20, более 50, более 100, более 200, более 300, более 400, более 500, более 600, более 700, более 800, более 900 или более 1000. В некоторых вариантах осуществления TCR имеет значение соотношения целевое связывание/нецелевое связывание, составляющее более 10. В некоторых вариантах осуществления TCR имеет значение соотношения целевое связывание/нецелевое связывание, составляющее более 500.

В данном изобретении представлен TCR, который конкурирует за связывание с TCR, описанным выше.

В данном изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая TCR, описанный в

данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Данное изобретение относится к выделенной клетке, презентующей TCR, описанный в данном документе. Данное изобретение относится к полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует переменный домен альфа-цепи TCR, описанного выше. Данное изобретение относится к полинуклеотидной молекуле, содержащей полинуклеотидную последовательность, которая кодирует переменный домен бета-цепи TCR, описанного выше. В данном изобретении представлен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность альфа-цепи или бета-цепи. В данном изобретении представлена выделенная клетка, экспрессирующая этот вектор.

В данном изобретении представлен способ лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества TCR, описанного в данном документе, фармацевтической композиции, описанной в данном документе, или выделенной клетки, описанной в данном документе, тем самым осуществляя лечение субъекта.

В некоторых вариантах осуществления заболевания или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, представляет собой рак, ассоциированный с NY-ESO-1. В некоторых вариантах осуществления рак, ассоциированный с NY-ESO-1, представляет собой липосаркому, нейробластому, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарную опухоль, мультиформную глиобластому, анапластическую астроцитому, опухоль головного мозга, рак маточных труб, рак эпителия яичников, первичный рак брюшной полости, распространенные солидные опухоли, саркому мягких тканей, меланому, саркому, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, болезнь Ходжкина, множественную миелому, синовиальную саркому, метастатические солидные опухоли, рабдомиосаркому, распространенный миксоид, круглоклеточную липосаркому, метастатическую меланому или рецидивирующий немелкоклеточный рак легких. В некоторых вариантах осуществления TCR, фармацевтическую композицию или клетку вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления введение является парентеральным.

В данном изобретении представлена полинуклеотидная молекула, кодирующая T-клеточный рецептор (TCR), при этом TCR специфически связывается с презентуемым HLA-A2 пептидом антигена рака яичек NY-ESO-1, содержащим аминокислотную последовательность SLLMWITQC (SEQ ID NO: 111) (NY-ESO-1 (157-165)), при этом TCR имеет свойство, выбранное из группы, состоящей из: (a) не связывается специфически с клетками, экспрессирующими предположительные нецелевые пептиды, но не с пептидом NY-ESO-1, презентуемым HLA-A2, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, определенную с помощью люминесцентного анализа; (b) не связывается с клетками, экспрессирующими предположительные нецелевые пептиды, определенные с помощью проточнотометрического анализа; (c) активирует T-клеточный ответ приблизительно в два раза больший, чем NY-ESO-1-специфического TCR, происходящего от пациента, определенный с помощью TCR-опосредованного люминесцентного биоанализа передачи сигнала с участием T-клеток; и (d) активирует T-клеточный ответ, приблизительно в два раза больший, чем NY-ESO-1-специфического TCR с созревшей аффинностью (например, путем фагового дисплея), определенный с помощью TCR-опосредованного люминесцентного биоанализа передачи сигнала с участием T-клеток. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная молекула кодирует по меньшей мере один переменный домен альфа-цепи и/или по меньшей мере один переменный домен бета-цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3 переменного домена альфа-цепи, содержащиеся в любой из последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3; и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного домена бета-цепи, содержащиеся в любой из последовательностей переменного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит переменный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит переменный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей переменного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит (a) переменный домен альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность с полной аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей переменного домена альфа-цепи, приведенных в табл. 3; и (b) переменный домен бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% аминокислотную идентичность со всей аминокислотной последовательностью любой из аминокислотных последовательностей переменного домена бета-цепи, приведенных в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит:

(a) CDR1 варибельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94 и 104;

(b) CDR2 варибельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 и 105;

(c) CDR3 варибельного домена альфа-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96 и 106;

(d) CDR1 варибельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91 и 101;

(e) CDR2 варибельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92 и 102; и

(f) CDR3 варибельного домена бета-цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93 и 103.

В некоторых вариантах осуществления TCR содержит пару аминокислотных последовательностей варибельного домена альфа-цепи/варибельного домена бета-цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9/7, 19/17, 29/27, 39/37, 49/47, 59/57, 69/67, 79/77, 89/87, 99/97 и 109/107.

В некоторых вариантах осуществления TCR содержит:

(a) CDR1 варибельного домена альфа-цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124, 130, 137, 145 и 156;

(b) CDR2 варибельного домена альфа-цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 125, 131, 138, 146 и 157;

(c) CDR3 варибельного домена альфа-цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 126, 132, 135, 139, 147, 149, 158, 160 и 161;

(d) CDR1 варибельного домена бета-цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121, 127, 133, 140, 142, 150 и 153;

(e) CDR2 варибельного домена бета-цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 128, 143, 151 и 154; и

(f) CDR3 варибельного домена бета-цепи, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123, 129, 134, 136, 141, 144, 148, 152, 155, 159.

В некоторых вариантах осуществления TCR содержит пару последовательностей нуклеиновой кислоты варибельного домена альфа-цепи/варибельного домена бета-цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/8, 20/18, 30/28, 40/38, 50/48, 60/58, 70/68, 80/78, 90/88, 100/98 и 110/108.

В данном изобретении представлен вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность полинуклеотидной молекулы, описанной выше. В данном изобретении представлена выделенная клетка, содержащая этот вектор. В данном изобретении представлен способ лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, включающий введение субъекту этой клетки. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, представляет собой рак, ассоциированный с NY-ESO-1. В некоторых вариантах осуществления рак, ассоциированный с NY-ESO-1, представляет собой липосаркому, нейробластому, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарную опухоль, мультиформную глиобластому, анапластическую астроцитому, опухоль головного мозга, рак маточных труб, рак эпителия яичников, первичный рак брюшной полости, распространенные солидные опухоли, саркому мягких тканей, меланому, саркому, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, болезнь Ходжкина, множественную миелому, синовиальную саркому, метастатические солидные опухоли, рабдомиосаркому, распространенный миксоид, круглоклеточную липосаркому, метастатическую меланому или рецидивирующий немелкоклеточный рак легких. В некоторых вариантах осуществления клетку вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления клетка, описанная в данном документе, представляет собой первичную клетку, такую как первичный лимфоцит (например, первичный Т-лимфоцит).

Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано следующим подробным описанием и графическими материалами.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 изображена активность указанных TCR, определенная с помощью люминесцентного анализа. Репортерные Т-клетки, экспрессирующие HLA-A2/NY-ESO-1 (157-165)-специфические TCR, культивировали совместно с HLA-A2+ APC, презентующими пептид NY-ESO-1. TCR, полученные из VelociT™, активировали Т-клетки сильнее, чем NY-ESO-специфический контрольный TCR 1G4, происходящий от пациента.

На фиг. 2А, фиг. 2В, фиг. 2С, фиг. 2D и фиг. 2Е изображена специфичность указанных TCR, определенная с помощью люминесцентного анализа. На фиг. 2А изображена специфичность по отношению к нецелевому пептиду EARS2:306-313. На фиг. 2В изображена специфичность по отношению к нецелевому пептиду MAGEN1:90-98. На фиг. 2С изображена специфичность по отношению к нецелевому пептиду

ду FBXL22:4-12. На фиг. 2D изображена специфичность по отношению к нецелевому пептиду URB1:1853-1861. На фиг. 2E изображена специфичность по отношению к муциновому нецелевому пептиду LV9-5. На фиг. 2A-2E раскрыты SEQ ID NO: 111, 114, 111, 115, 111, 116, 111, 117, 111 и 120 соответственно, в порядке появления.

На фиг. 3 изображена разработка конструкции TCR, используемой для экспрессии конструкции TCR001 в первичных Т-клетках. HV обозначает вариабельный домен человека, а MC обозначает константный домен мыши для каждой соответствующей цепи TCR. Промотор EF1a показан стрелкой, а сайт расщепления фурином обозначен сплошным черным прямоугольником.

На фиг. 4 изображена потеря экспрессии эндогенного TCR после электропорации sgRNA, нацеленной на locus TRAC и локусы TRBC1/2. Т-клетки окрашивали антителами к CD3 человека для оценки экспрессии TCR клеточной поверхности.

На фиг. 5A и фиг. 5B изображены данные окрашивания декстранером для обнаружения антиген-специфических Т-клеток, распознающих пептид NY-ESO-1157-165, презентированный HLA-A2. На фиг. 5A изображены данные на 9-й день экспансии до сортировки и непосредственно после сортировки. На фиг. 5B изображены данные после экспансии в течение 12 дней после сортировки.

На фиг. 6 изображены данные цитотоксичности, демонстрирующие, что Т-клетки, экспрессирующие TCR001, лизируют целевые клетки, которые экспрессируют эндогенные уровни NY-ESO-1 (IM9) или сверхэкспрессируют одноцепочечный HLA-A2, несущий пептид NY-ESO-1 (157-165) (IM9<sup>+</sup>). Клетки K562, лишенные экспрессии NY-ESO-1, использовали для обеспечения того, что TCR-опосредованное уничтожение было антигензависимым. Нетрансдуцированные и экспандированные Т-клетки были неспособны уничтожить какую-либо целевую клетку, что указывает на то, что экспрессия TCR001 была необходимой для лизиса целевых клеток.

#### **Подробное описание сущности изобретения**

Данное изобретение относится к Т-клеточным рецепторам (TCR), которые были созданы против пептидного антигена NY-ESO-1 в контексте MHC (HLA-A2). Идентифицированные уникальные последовательности TCR продемонстрировали специфическое связывание с небольшим пептидом NY-ESO-1, представленным в бороздке молекулы HLA, и продемонстрировали активацию Т-клеток в репортерном анализе. Кроме того, не было обнаружено перекрестной реактивности по отношению к другим "подобным" пептидам, как продемонстрировано алгоритмом прогнозирования и последующим анализом перекрестной реактивности (специфичности) для оценки TCR против предполагаемых перекрестно-реактивных пептидов.

#### **I. Определения.**

С целью более легкого понимания данного изобретения сначала определяют определенные термины. Кроме того, следует отметить, что всякий раз, когда приводится значение или диапазон значений параметра, предполагается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также являются частью этого изобретения.

В следующем описании в целях пояснения указаны конкретные номера, материалы и конфигурации для того, чтобы обеспечить полное понимание данного изобретения. Однако для специалиста в данной области техники будет очевидно, что данное изобретение может быть реализовано на практике без этих конкретных деталей. В некоторых случаях хорошо известные признаки могут быть опущены или упрощены, чтобы не затруднять понимание данного изобретения. Кроме того, ссылка в описании на такие фразы, как "один вариант осуществления" или "вариант осуществления" означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с этим вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления данного изобретения. Появление фраз, таких как "в одном варианте осуществления" в различных местах данного описания, не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления.

Формы единственного числа применяются в данном документе для обозначения одного или нескольких (например, по меньшей мере одного) грамматических вариантов. В качестве примера "элемент" означает один или несколько элементов.

Термин "содержащий" или "содержит" используется в данном документе в отношении композиций, способов и их соответствующему (соответствующим) компоненту (компонентам), которые необходимы для данного раскрытия, однако он открыт для включения не указанных элементов, существенных или не существенных.

Термин "состоящий из" относится к композициям, способам и их соответствующим компонентам, как описано в данном документе, которые исключают любой элемент, не упомянутый в этом описании варианта осуществления.

Термин "Т-клеточный рецептор" (TCR), как используется в данном документе, относится к представителю суперсемейства иммуноглобулинов, имеющему вариабельный связывающий домен, константный домен, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост; см., например, Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997), способному специфически связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором MHC. TCR может быть обнаружен на поверхности клетки и обычно состоит из гетеродиме-

ра, имеющего  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи (также известные как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  соответственно) или  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепи (также известные как TCR $\gamma$  и TCR $\delta$  соответственно). Подобно иммуноглобулинам, внеклеточная часть цепей TCR (например,  $\alpha$ -цепь,  $\beta$ -цепь) содержит две области иммуноглобулина, переменную область (например, переменную  $\alpha$ -область TCR или V $\alpha$  и переменную  $\beta$ -область TCR или V $\beta$ ; обычно аминокислоты от 1 до 116 в соответствии с нумерацией Kabat на N-конце) и одну константную область (например, константный домен TCR $\alpha$  или C $\alpha$  и обычно аминокислоты от 117 до 259 в соответствии с Kabat, константный домен TCR $\beta$  или C $\beta$ , обычно аминокислоты от 117 до 295 в соответствии с Kabat), прилегающие к клеточной мембране. Также, как и иммуноглобулины, переменные домены содержат области, определяющие комплементарность (CDR), разделенные каркасными областями (FR). В определенных вариантах осуществления TCR встречается на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов) и ассоциируется с комплексом CD3. Источником TCR по данному изобретению могут быть различные виды животных, такие как человек, мышь, крыса, кролик или другое млекопитающее. В предпочтительных вариантах осуществления источником TCR по данному изобретению является мышь, генетически сконструированная для продуцирования TCR, содержащих альфа- и бета-цепи человека (см., например, публикацию РСТ № WO 2016/164492, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки).

Термин "переменная область" (переменная область альфа-цепи (V $\alpha$ ), переменная область бета-цепи (V $\beta$ )), как используется в данном документе, обозначает каждую из альфа- и бета-цепей, которая непосредственно участвует в связывании TCR с антигеном.

"Константная область" альфа-цепи и бета-цепи не участвует непосредственно в связывании TCR с антигеном, но проявляет различные эффекторные функции.

Термин "антиген", как используется в данном документе, означает любое вещество, которое заставляет иммунную систему продуцировать антитела или специфические клеточно-опосредованные иммунные ответы против него. Антиген, ассоциированный с заболеванием, представляет собой любое вещество, ассоциированное с любым заболеванием, которое заставляет иммунную систему продуцировать антитела или опосредованный специфическими клетками ответ против него.

Термин "NY-ESO-1" или "пептид плоскоклеточной карциномы пищевода 1 типа Нью-Йорк" относится к хорошо известному антигену рака яичек (СТА), который повторно экспрессируется при многих типах рака.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательность полноразмерного NY-ESO-1 представлена в GenBank под номером доступа NM\_001327.2 (SEQ ID NO: 112 и 113 соответственно). Нумерация конкретных нуклеотидных оснований и аминокислот NY-ESO-1 соответствует SEQ ID NO: 112 или 113 соответственно, или соответствующему расположению в другой последовательности NY-ESO-1 (например, последовательности, выровненной по отношению к SEQ ID NO: 112 или 113). Как используется в данном документе, нумерация может быть указана в круглых скобках (например, NY-ESO-1 (157-165)), с помощью нижнего индекса (например, NY-ESO-1<sub>157-165</sub>) или в других форматах, указывающих нумерацию. Термин "NY-ESO-1" включает рекомбинантный NY-ESO-1 или его фрагмент. Термин также включает NY-ESO-1 или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, мышинным или человеческим Fc или сигнальной последовательностью, такой как ROR1. В определенных вариантах осуществления термин включает NY-ESO-1 или его фрагмент в контексте HLA-A2, связанного с HLA-A2 или экспонируемого HLA-A2.

Термин "HLA" относится к системе или комплексу человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), который представляет собой генный комплекс, кодирующий белки главного комплекса гистосовместимости (МНС) у человека. Эти белки клеточной поверхности отвечают за регуляцию иммунной системы человека. HLA, соответствующие МНС I класса (A, B и C), презентуют пептиды изнутри клетки.

Термин "HLA-A" относится к группе лейкоцитарных антигенов человека (HLA), которые кодируются локусом HLA-A. HLA-A представляет собой один из трех основных типов рецепторов клеточной поверхности МНС I класса человека. Рецептор представляет собой гетеродимер и состоит из тяжелой  $\alpha$ -цепи и меньшей  $\beta$ -цепи.  $\alpha$ -цепь кодируется вариантом гена HLA-A, а  $\beta$ -цепь ( $\beta$ 2-микроглобулин) представляет собой инвариантную молекулу  $\beta$ 2-микроглобулина.

Термин "HLA-A2" (который также может называться HLA-A\*0201 или HLA-A\*02:01) представляет собой одну конкретную группу аллелей главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса в локусе HLA-A;  $\alpha$ -цепь кодируется геном HLA-A\*02, а  $\beta$ -цепь кодируется локусом  $\beta$ 2-микроглобулина или B2M.

Термин "специфически связывается" или "специфически связывается с" и т.п. означает, что TCR образует комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать константой равновесной диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^{-6}$  М или менее, например,  $1 \times 10^{-8}$  М или менее (например, меньшее значение  $K_D$  означает более прочное связывание). Способы определения того, связываются ли две молекулы специфически, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Как описано в данном документе, TCR по данному изобретению специфически связываются с презентуемым HLA-A2 пептидом плоскоклеточной карци-

номы пищевода-1 (NY-ESO-1) антигена рака яичек, например, пептидом, содержащим аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1.

Термин "нецелевой пептид" относится к пептиду, который отличается на 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот от целевого пептида (например, пептида NY-ESO-1 (157-165)). В определенных вариантах осуществления термин включает пептид, который отличается менее или 3 аминокислотами от целевого пептида. Например, для 9-мерного пептида, если 1, 2 или 3 аминокислоты не идентичны целевому пептиду, он считается "нецелевым" пептидом. В определенных вариантах осуществления идентичность аминокислот выражается в терминах "степени сходства" (DoS). Если 6 или более аминокислот в 9-мерном пептиде идентичны, DoS равна 6. В определенных вариантах осуществления пептид с DoS  $\leq 6$  считается "нецелевым" пептидом. Термин "нецелевой" пептид также относится к пептиду, который подобен целевому пептиду на основании гомологии последовательности, предположительно связывается с HLA-A2 и содержится в белке, который экспрессируется в основных нормальных тканях. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления TCR по данному раскрытию может связываться с презентруемым HLA-A2 пептидом NY-ESO-1 (например, пептидом, содержащим аминокислотные остатки 157-165 NY-ESO-1) с аффинностью, соответствующей значению  $K_D$ , которое по меньшей мере в десять раз ниже, чем его аффинность связывания по отношению к нецелевому пептиду.

Термин "выделенный" относится к композиции, соединению, веществу или молекуле, измененным человеком по отношению к естественному состоянию. Например, композиция или вещество, встречающееся в природе, выделяется, если они были изменены или удалены из своей исходной среды, или и то, и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, естественно присутствующий в живом животном, не является выделенным, но тот же полинуклеотид или полипептид, является выделенным из сосуществующих материалов в его естественном состоянии, как этот термин используется в данном документе.

Термин "рекомбинантный", как используется в данном документе, относится к TCR по данному изобретению, созданному, экспрессируемому, выделенному или полученному с помощью технологий или способов, известных в данной области техники, таких как технология рекомбинантной ДНК, которые включают, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию. Термин относится к TCR, экспрессируемому у млекопитающего, отличного от человека (включая трансгенных млекопитающих, отличных от человека, например, трансгенных мышей), или в системе экспрессии клеток (например, клетки CHO), или выделенным из библиотеки рекомбинантных комбинаторных антител человека.

Как используется в данном документе, термины "полинуклеотид" и "молекула нуклеиновой кислоты" используются взаимозаменяемо для обозначения полимерных форм нуклеотидов любой длины. Полинуклеотиды могут содержать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и/или их аналоги. Нуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Термин "полинуклеотид" включает, например, одно-, двухцепочечные и трехспиральные молекулы, ген или фрагмент гена, экзоны, интроны, mRNA, tRNA, rRNA, рибозимы, бессмысловые молекулы, cDNA, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, аптамеры, плазмиды, векторы, выделенную ДНК любой последовательности, выделенную РНК любой последовательности, зонды и праймеры нуклеиновых кислот. Молекула нуклеиновой кислоты может также содержать модифицированные молекулы нуклеиновых кислоты (например, содержащие модифицированные основания, сахара и/или межнуклеотидные линкеры).

Термин "полипептид" предназначен для обозначения любого полимера, предпочтительно состоящего по сути из любых из 20 природных аминокислот, независимо от его размера. Хотя термин "белок" часто используется в отношении относительно больших белков, а "пептид" часто используется в отношении небольших полипептидов, использование этих терминов в данной области часто перекрывается. Термин "полипептид" обычно относится к белкам, полипептидам и пептидам, если не указано иное. Пептиды, пригодные в соответствии с данным раскрытием, как правило, обычно составляют от приблизительно 0,1 до 100 кДа или более до приблизительно 1000 кДа, предпочтительно от приблизительно 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 и 50 кДа, по оценкам стандартных методик определения размера молекул, таких как центрифугирование или SDS-электрофорез в полиакриламидном геле.

Термин "вектор" означает молекулу нуклеиновой кислоты, которая способна автономно реплицироваться в клетке-хозяине и может принимать чужеродную ДНК. Вектор несет свою собственную точку начала репликации, один или несколько уникальных сайтов распознавания для рестрикционных эндонуклеаз, которые могут использоваться для вставки чужеродной ДНК, и обычно селективируемые маркеры, такие как гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам, и часто последовательности распознавания (например, промотор) для экспрессии вставленной ДНК. Распространенные векторы включают плазмидные векторы и фаговые векторы.

В некоторых вариантах осуществления TCR по данному изобретению могут быть конъюгированы с фрагментом, таким как лиганд, детектируемый фрагмент или терапевтический фрагмент ("иммуноконъюгат"), такой как цитотоксин, противораковое лекарственное средство или любой другой пригодный терапевтический фрагмент для лечения заболевания или состояния, включая заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, например рак, ассоциированный с NY-ESO-1.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс", как используется в данном документе, относится к

оптическому явлению, которое позволяет анализировать биомолекулярные взаимодействия в реальном времени путем обнаружения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Упсала, Швеция, и Пискатауэй, Нью-Джерси).

Термин "KD", также известный как  $K_D$  или  $K_d$ , предназначен для обозначения константы равновесной диссоциации конкретной биомолекулы и ее партнера по связыванию. Измерения KD особенно пригодны для оценки белок-белковых взаимодействий, например, как при взаимодействии антигенсвязывающего белка с антигеном. Чем меньше значение KD, тем больше (или, например, сильнее) связывающее взаимодействие или аффинность между антигенсвязывающим белком и антигеном (например, мишенью). Чем больше значение KD, тем слабее связывающее взаимодействие или аффинность между антигенсвязывающим белком и антигеном.

Термин "значительная идентичность" или "по сути идентичный", при обозначении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента, указывает на то, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности у по меньшей мере приблизительно 90%, и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, измеряемая с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая значительную идентичность с референтной молекулой нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или по сути аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый референтной молекулой нуклеиновой кислоты.

Идентичность последовательности может быть вычислена с использованием алгоритма, например алгоритм Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) для глобального выравнивания, или алгоритм Смита-Уотермана (Smith and Waterman 1981, J. Mol. Biol. 147: 195-197) для локального выравнивания. Другой предпочтительный алгоритм описан Dufresne et al. в Nature Biotechnology в 2002 году (vol. 20, pp. 1269-71) и используется в программном обеспечении GenePAST (GQ Life Sciences, Inc., Бостон, Массачусетс).

Применительно к полипептидам термин "значительное сходство" или "по сути сходный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие гэпов по умолчанию, имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности, даже более предпочтительно по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена значительно не изменит функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства можно корректировать в сторону повышения в целях коррекции консервативной природы замены. Специалистам в данной области техники хорошо известны средства для создания такой коррекции. См., например, работу Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и 7) серосодержащие боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамин-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в логарифмической матрице правдоподобия PAM250, раскрываемой в работе Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-45, включенной в данный документ посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в логарифмической матрице правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей полипептидов обычно измеряется с помощью программного обеспечения для анализа последовательностей. Компьютерная программа для анализа белков совмещает аналогичные последовательности с помощью показателей сходства, присваиваемых различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию в целях определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между тесно связанными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с помощью FASTA с

применением параметров по умолчанию или рекомендованных параметров, программного обеспечения в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) предусматривает выравнивания и процент идентичности участков наилучшего перекрытия между запрашиваемой и найденной последовательностями (Pearson (2000), выше). Последовательности также можно сравнивать с помощью алгоритма поиска гомологии Смита-Уотермана с использованием поиска аффинных гэпов, при этом штраф за открытие гэпа составляет 12 и штраф за продление гэпа составляет 2, матрица BLOSUM составляет 62. Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по данному изобретению с базой данных, содержащей большое число последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, работы Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

"TCR, происходящий от пациента" представляет собой TCR, который образуется путем выделения альфа- и бета-цепей реактивного TCR NY-ESO-1, выделенного из Т-лимфоцитов, которые опосредуют регрессию опухоли *in vivo* у субъекта, имеющего рак, ассоциированный с NY-ESO-1. Иллюстративный TCR NY-ESO-1, происходящий от пациента, обозначается как 1G4 (см., например, патент США № 8143376, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

Термин "активирует Т-клеточный ответ, имеющий соотношение сигнал/шум, более высокое или равное NY-ESO-1-специфическому TCR, происходящему от пациента" предназначен для обозначения повышения, т.е., повышения приблизительно в 2 раза или более, т.е., повышения приблизительно в 2 раза, т.е., повышения или усиления физиологической активности приблизительно в 2 раза, т.е., повышения передачи сигналов с участием Т-клеток приблизительно в 2 раза, измеряемого, например, с помощью люминесцентного биоанализа, описанного в примере 2. Ссылка на больший Т-клеточный ответ или более сильный Т-клеточный ответ или сигнал активации может использоваться взаимозаменяемо. Различные измерения и анализы Т-клеточного ответа или Т-клеточной активации хорошо известны специалистам в данной области техники.

Под фразой "терапевтически эффективное количество" подразумевается количество, которое дает необходимый эффект, для которого оно вводится. Точное количество будет зависеть от цели лечения и может быть установлено специалистом в данной области техники с использованием известных методик (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*). Термин "эффективное количество" предназначен для охвата таких контекстов, как фармацевтически эффективное количество или терапевтически эффективное количество. Например, в некоторых вариантах осуществления эффективное количество способно обеспечить благоприятное состояние, благоприятный результат, функциональную активность в скрининговом анализе или улучшение клинического состояния.

Как используется в данном документе, термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в нормализации, предупреждении и/или лечении заболевания или нарушения, ассоциированного с NY-ESO-1, такого как рак, ассоциированный с NY-ESO-1 (например, NY-ESO-1-положительный рак). Термин включает субъектов, которые имеют заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, или имеют риск его развития, такого как рак, ассоциированный с NY-ESO-1.

Как используется в данном документе, термин "противораковое лекарственное средство" означает любое средство, пригодное для лечения, облегчения или ингибирования рака, включая, но не ограничиваясь ими, цитотоксины и агенты, такие как антиметаболиты, алкилирующие агенты, антрациклины, антибиотики, антимитотические агенты, прокарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, кортикостероиды, циклофосфамид, митотан (O, P<sup>1</sup>-(DDD)), биопрепараты (например, антитела и интерфероны) и радиоактивные агенты. Как используется в данном документе, термин "цитотоксин или цитотоксический агент" также относится к химиотерапевтическому агенту и означает любой агент, который является вредным для клеток. Примеры включают Тахол® (паклитаксел), темозоламид, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, цисплатин, митомин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пурамицин и их аналоги или гомологи.

Термины "предупреждать", "осуществлять предупреждение", "предупреждение", "профилактическое лечение" и т.п. предназначены для обозначения снижения вероятности развития нарушения или состояния у субъекта, который не имеет нарушения или состояния, но имеет риск их развития или подвержен их развитию. Предупреждение и т.п. не означает предупреждение того, чтобы субъект когда-либо заболел конкретным заболеванием или нарушением. Для предупреждения может потребоваться введение нескольких доз. Предупреждение может включать предупреждение рецидива заболевания у субъекта, у которого были устранены все симптомы заболевания, или предупреждение рецидива рецидивирующе-ремиттирующего заболевания.

II. Т-клеточные рецепторы (TCR) NY-ESO-1 и композиции, содержащие TCR NY-ESO-1.

Т-клетки представляют собой подгруппу клеток, которые вместе с другими типами иммунных клеток (полиморфноядерные, эозинофилы, базофилы, тучные клетки, В-клетки, НК-клетки) составляют кле-

точный компонент иммунной системы. В физиологических условиях Т-клетки выполняют функцию иммунного надзора и устраняют чужеродный антиген. Однако в патологических условиях имеются убедительные доказательства того, что Т-клетки играют важную роль в возникновении и распространении заболевания. При этих нарушениях нарушение иммунологической толерантности Т-клеток, центральной или периферической, является фундаментальным процессом, вызывающим аутоиммунное заболевание.

Т-клетки связывают эпитопы на малых антигенных детерминантах на поверхности антигенпрезентирующих клеток, которые ассоциированы с основным комплексом гистосовместимости (МНС; у мышей) или комплексом лейкоцитарного антигена человека (HLA; у человека). Т-клетки связывают эти эпитопы посредством комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) на поверхности Т-клетки. Т-клеточные рецепторы представляют собой гетеродимерные структуры, состоящие из цепей двух типов:  $\alpha$ - (альфа) и  $\beta$  (бета)-цепи или  $\gamma$ - (гамма) и  $\delta$  (дельта)-цепи.  $\alpha$ -цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, расположенной в  $\alpha$ -локусе (в хромосоме 14 человека или мыши), которая также охватывает весь  $\delta$ -локус, а  $\beta$ -цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, расположенной в  $\beta$ -локусе (в хромосоме 6 мыши или хромосоме 7 человека). Большинство Т-клеток имеют  $\alpha\beta$  TCR; в то время как меньшая часть Т-клеток несет  $\gamma\delta$  TCR.

$\alpha$ - и  $\beta$ -полипептиды Т-клеточных рецепторов (и аналогично полипептиды  $\gamma$  и  $\delta$ ) связаны друг с другом посредством дисульфидной связи. Каждый из двух полипептидов, составляющих TCR, содержит внеклеточный домен, содержащий константную и переменную области, трансмембранный домен и цитоплазматический хвост (трансмембранный домен и цитоплазматический хвост также являются частью константной области). Переменная область TCR определяет его антигенную специфичность и, аналогично иммуноглобулинам, содержит три области, определяющие комплементарность (CDR). TCR экспрессируется на большинстве Т-клеток в организме и, как известно, участвует в распознавании антигенов, ограниченных МНС.  $\alpha$ -цепь TCR содержит ковалентно связанную  $V\alpha$ - и  $C\alpha$ -область, в то время как  $\beta$ -цепь содержит  $V\beta$ -область, ковалентно связанную с  $C\beta$ -областью.  $V\alpha$ - и  $V\beta$ -области образуют карман или щель, которые могут связывать антиген в контексте главного комплекса гистосовместимости (МНС) (или HLA у человека). TCR представляют собой детектирующие молекулы с исключительной специфичностью, которые, как и антитела, обладают огромным разнообразием.

Были раскрыты общая структура молекул TCR и способы получения и применения, включая связывание пептид:главного комплекс гистосовместимости. См., например, PCT/US98/04274; PCT/US98/20263; WO99/60120.

Отличные от человека животные (например, грызуны, например, мыши или крысы) могут быть генетически сконструированы для экспрессии человеческого или гуманизированного Т-клеточного рецептора (TCR), содержащего переменный домен, кодируемый по меньшей мере одним сегментом гена переменной области человеческого TCR, как описано, например, в публикации PCT № WO 2016/164492, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Например, технология мыши VelociT® (Regeneron), генетически модифицированной мыши, которая позволяет продуцировать полностью человеческие терапевтические TCR против опухолевых и/или вирусных антигенов, может быть использована для получения TCR по данному изобретению. Специалисты в данной области техники с помощью стандартных методик мутагенеза в сочетании с анализами, описанными в данном документе, могут получить измененные последовательности TCR и исследовать их в отношении определенной аффинности и/или специфичности связывания. Пригодные методики мутагенеза, известные в данной области техники, включают, но не ограничиваясь ими, синтез гена *de novo*, олигонуклеотид-направленный мутагенез, сайт-специфический мутагенез, мутагенез со сканированием линкера и сайт-направленный мутагенез с помощью ПЦР (см., например, Sambrook et al. (1989) and Ausubel et al. (1999)).

Вкратце, в некоторых вариантах осуществления способы образования TCR к пептиду NY-ESO-1 (157-165) могут включать иммунизацию отличного от человека животного (например, грызуна, например, мыши или крысы), такого как генно-инженерное отличное от человека животное, которое содержит в своем геноме нереаранжированный переменный локус гена TCR человека с пептидом NY-ESO-1 (157-165); позволяя животному вызвать иммунный ответ на пептид; выделение от животного Т-клетки, реактивной к пептиду; определение последовательности нуклеиновой кислоты переменной области человеческого TCR, экспрессируемой Т-клеткой; клонирование переменной области человеческого TCR в нуклеотидную конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты константной области человеческого TCR, так что переменная область человеческого TCR функционально связана с константной областью человеческого TCR; и экспрессию из конструкции человеческого Т-клеточного рецептора, специфичного в отношении пептида NY-ESO-1 (157-165). В некоторых вариантах осуществления стадии выделения Т-клетки, определения последовательности нуклеиновой кислоты переменной области человеческого TCR, экспрессируемой Т-клеткой, клонирования переменной области человеческого TCR в нуклеотидную конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты константной области человеческого TCR и экспрессии Т-клеточного рецептора человека осуществляют с использованием стандартных методик, известных специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая Т-

клеточный рецептор, специфичный для антигена, представляющего интерес, экспрессируется в клетке. В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую TCR, выбирают из клетки CHO, COS, 293, HeLa, PERC.6™ и т.д.

При получении вариантов кодирующих последовательностей TCR специалистам в данной области техники будет понятно, что белки, происходящие от TCR, могут быть модифицированы путем определенных аминокислотных замен, добавлений, делеций и посттрансляционных модификаций без потери или снижения биологической активности. В частности, хорошо известно, что консервативные аминокислотные замены, т.е., замена одной аминокислоты другой аминокислотой аналогичного размера, заряда, полярности и конформации, маловероятно существенно изменят функцию белка. 20 стандартных аминокислот, которые входят в состав белков, можно в общих чертах разделить на четыре группы консервативных аминокислот следующим образом: неполярная (гидрофобная) группа включает аланин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан и валин; полярная (незаряженная, нейтральная) группа включает аспарагин, цистеин, глутамин, глицин, серин, треонин и тирозин; положительно заряженная (основная) группа содержит аргинин, гистидин и лизин; и отрицательно заряженная (кислая) группа содержит аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту. Замена в белке одной аминокислоты другой в пределах одной и той же группы маловероятно окажет отрицательное влияние на биологическую активность белка.

В некоторых вариантах осуществления TCR по данному раскрытию может содержать последовательность CDR (например, последовательность CDR3, такую как V $\alpha$  CDR3 или V $\beta$  CDR3) с 1 или более заменами по сравнению с последовательностью CDR (например, последовательностью CDR3, такой как CDR3 V $\alpha$  или CDR3 V $\beta$ ) из табл. 6. Например, TCR по данному раскрытию может содержать последовательность CDR с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более заменами по сравнению с последовательностью CDR из табл. 6. Как правило, TCR по данному изобретению функционируют путем связывания с презентруемым HLA-A2 пептидом NY-ESO-1 (157-165). Как используется в данном документе, презентруемый HLA пептид (такой как презентруемый HLA-A2 пептид), может относиться к пептиду, который связан с белком лейкоцитарного антигена человека (HLA), например, белком HLA, экспрессируемым на поверхности клетки. Таким образом, TCR, который связывается с презентруемым HLA пептидом, связывается с пептидом, который связывается с помощью HLA, и, возможно, также связывается с самим HLA. Взаимодействие с HLA может придавать специфичность связывания с пептидом, презентруемым конкретным HLA. В некоторых вариантах осуществления TCR связывается с выделенным презентруемым HLA пептидом. В некоторых вариантах осуществления TCR связывается с презентруемым HLA пептидом на поверхности клетки.

Как правило, TCR по данному изобретению может функционировать путем связывания с презентруемым HLA-A2 пептидом NY-ESO-1 (157-165).

Настоящее изобретение включает TCR NY-ESO-1, которые связывают пептид NY-ESO-1 (157-165) в контексте HLA-A2 с высокой специфичностью. В некоторых вариантах осуществления TCR NY-ESO-1 не связываются с пептидом NY-ESO-1 (157-165) в отсутствие HLA-A2, или такое связывание является минимальным. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления TCR NY-ESO-1 не связываются с нецелевым пептидом в контексте HLA-A2, или такое связывание является минимальным. Как используется в данном документе, термин "нецелевой пептид" может относиться к пептиду, который отличается от целевого пептида на 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления специфичность связывания может быть определена путем а) измерения целевого связывания (например, связывания презентруемым HLA-A2 пептидом NY-ESO-1 (157-165)), б) измерения нецелевого связывания и с) количественной оценки разницы между ними, например, путем вычисления соотношения. Это соотношение может быть вычислено, например, путем деления значений, полученных в пунктах а) и б). Измерение целевого и нецелевого связывания может быть достигнуто, например, путем измерения % связывания с пептидом/тетрамерным реагентом HLA (например, тетрамерный реагент NY-ESO-1/HLA или MAGE-H1 90-98/тетрамерный реагент HLA) или с помощью других методик, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления значение соотношения целевое связывание/нецелевое связывание (например, значение, полученное путем деления значений, полученных в пунктах а) и б), описанных выше) TCR по данному раскрытию может составлять более 5, более 6, более 7, более 8, более 9, более 10, более 11, более 12, более 13, более 14, более 15, более 16, более 17, более 18, более 19, более 20, более 21, более 22, более 23, более 24, более 25, более 26, более 27, более 28, более 29, более 30, более 35, более 40, более 45, более 50, более 55, более 60, более 65, более 70, более 75, более 80, более 85, более 90, более 95, более 100, более 110, более 120, более 130, более 140, более 150, более 160, более 170, более 180, более 190, более 200, более 225, более 250, более 275, более 300, более 325, более 350, более 375, более 400, более 425, более 450, более 475, более 500, более 550, более 600, более 650, более 700, более 750, более 800, более 850, более 900, более 950, более 1000, более 1100, более 1200, более 1300, более 1400, более 1500, более 1600, более 1700, более 1800, более 1900 или более 2000. В некоторых вариантах осуществления значение соотношения целевое связывание/нецелевое связывание (например, значение, полученное путем деления значений, полученных в пунктах а) и б), описанных выше) может

составлять от приблизительно 5 до приблизительно 20, от приблизительно 10 до приблизительно 30, от приблизительно 20 до приблизительно 80, от приблизительно 30 до приблизительно 70, от приблизительно 40 до приблизительно 60, от приблизительно 50 до приблизительно 250, от приблизительно 100 до приблизительно 200, от приблизительно 100 до приблизительно 1000, от приблизительно 300 до приблизительно 700, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 800 до приблизительно 1200, от приблизительно 900 до приблизительно 1100, от приблизительно от 800 до приблизительно 1500, от приблизительно 1000 до приблизительно 1400 или от приблизительно 1100 до приблизительно 1300.

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении представлен рекомбинантный антигенсвязывающий белок (например, выделенный антигенсвязывающий белок), который специфически связывается с конформационным эпитопом презентуемого HLA-A2 человеческого пептида NY-ESO-1 (157-165), при этом антигенсвязывающий белок имеет свойство, выбранное из группы, состоящей из: (а) связывает мономерный пептид HLA-A2: NY-ESO-1 (157-165) с константой равновесия диссоциации связывания ( $K_D$ ) менее чем приблизительно 20 нМ, измеряемой в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (b) связывает мономерный пептид HLA-A2:NY-ESO-1 (157-165) с константой равновесия диссоциации связывания ( $K_D$ ) менее чем приблизительно 25 нМ, измеряемой в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C; (с) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:NY-ESO-1 (157-165), с  $EC_{50}$  менее чем приблизительно 6 нМ, и не связывается специфически с клетками, экспрессирующими предположительные нецелевые пептиды, но не презентуемый HLA-A2 пептид NY-ESO-1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, определенную с помощью люминесцентного анализа; (d) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:NY-ESO-1 (157-165), с  $EC_{50}$  менее чем приблизительно 1 нМ и не связывается по сути с клетками, экспрессирующими предположительные нецелевые пептиды, определенные с помощью люминесцентного анализа; (е) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:NY-ESO-1 (157-165), с  $EC_{50}$  менее чем приблизительно 30 нМ, определенной с помощью проточно-цитометрического анализа; (f) связывается с клетками, экспрессирующими пептид HLA-A2:NY-ESO-1 (157-165), с  $EC_{50}$  менее чем приблизительно 75 нМ, определенной с помощью проточно-цитометрического анализа; и (g) конформационный эпитоп содержит одну или несколько аминокислот SEQ ID NO: 111.

В некоторых вариантах осуществления TCR NY-ESO-1 по данному изобретению обладают специфической активностью или аффинностью в отношении NY-ESO-1 (157-165), измеряемой с помощью анализа *in vitro*. Например, в клетки (такие как клетки T2), экспрессирующие HLA, могут быть введены полипептид NY-ESO-1 (157-165) или нецелевой полипептид, тем самым индуцируя клетки презентовать полипептид, связанный с HLA. В качестве альтернативы или в качестве дополнения к применению нецелевого полипептида в качестве контроля можно использовать нецелевой HLA (HLA, отличный от HLA, который распознается TCR, представляющим интерес). Например, нецелевой HLA можно использовать для презентации пептида NY-ESO-1 для исследования специфичности связывания с презентуемым HLA-A2 пептидом NY-ESO-111. Кроме того, контроль может представлять собой линию клеток, которая не экспрессирует ни NY-ESO-1, ни целевой HLA (например, HLA-A2). Клетки можно кокультивировать с популяцией Т-клеток, экспрессирующих TCR, представляющий интерес, и измерять активность как функцию количества цитокина (такого как интерферон гамма), продуцируемого клетками. В некоторых вариантах осуществления анализ может включать кокультивирование популяции TCR-экспрессирующих Т-клеток *in vitro* с нагруженными  $10^{-10}$  М пептидом клетками T2 при соотношении эффекторная клетка:целевая клетка 1:1 ( $1 \times 10^5$  эффекторных клеток/96 лунок) и измерение гамма-интерферона через 24 ч после кокультивирования (например, с помощью Sector Imager Meso Scale Discovery (MSD®)). В определенных вариантах осуществления анализ может включать кокультивирование *in vitro* популяции Т-клеток, экспрессирующих TCR, и эффекторных клеток при соотношении эффекторная клетка:целевая клетка 5:1 ( $2,5 \times 10^5$  эффекторных клеток:  $5 \times 10^4$  целевых клеток), и измерение гамма-интерферона через 24 ч после кокультивирования (например, с помощью Sector Imager Meso Scale Discovery (MSD®)).

Возрастающее количество детектируемых цитокинов может выступать в качестве показателя активности. Активность или специфичность TCR, представляющего интерес, в отношении его целевого пептида по сравнению с контрольным (нецелевым) полипептидом, или активность или специфичность TCR, представляющего интерес, в отношении его целевого пептида, связанного с целевым HLA, по сравнению с целевым пептидом, связанным с нецелевым HLA, может быть 2-кратной или более, 3-кратной или более, 4-кратной или более, 5-кратной или более, 6-кратной или более, 7-кратной или более, 8-кратной или более, 9-кратной или более, 10-кратной или более, 15-кратной или более, 20-кратной или более, 30-кратной или более, 40-кратной или более, 50-кратной или более, 100-кратной или более, 200-кратной или более, 300-кратной или более, 400-кратной или более, 500-кратной или более, 600-кратной или более, 700-кратной или более, 800-кратной или более, 900-кратной или более, 1000-кратной или более, 1500-кратной или более, 2000-кратной или более, 2500-кратной или более, 3000-кратной или более, 4000-кратной или более, 5000-кратной или более, 10000-кратной или более, 20000-кратной или более, 30000-кратной или более, 40000-кратной или более, 50000-кратной или более, 60000-кратной или более,

70000-кратной или более, 80000-кратной или более, 90000-кратной или более или 100000-кратной или более.

В определенных вариантах осуществления TCR NY-ESO-1 по данному изобретению пригодны для ингибирования роста опухоли или задержки прогрессирования рака при профилактическом введении субъекту, нуждающемуся в этом, и могут повышать выживаемость субъекта. Например, введение TCR NY-ESO-1 по данному изобретению может приводить к уменьшению размера первичной опухоли и может предупреждать метастазирование или развитие вторичных опухолей. В определенных вариантах осуществления TCR NY-ESO-1 по данному изобретению пригодны для ингибирования роста опухоли при терапевтическом введении субъекту, нуждающемуся в этом, и могут повышать выживаемость субъекта. Например, введение субъекту терапевтически эффективного количества TCR NY-ESO-1 по данному изобретению может приводить к уменьшению размера и исчезновению подтвержденной опухоли у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении представлен выделенный TCR, который специфически связывается с презентуемым HLA-A2 пептидом NY-ESO-1 (157-165), при этом антигенсвязывающий белок демонстрирует одну или несколько из следующих характеристик: (i) содержит переменный домен альфа-цепи, содержащий области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3, при этом область CDR3 содержит аминокислотную последовательность формулы I (SEQ ID NO: 118):

Cys-N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>-N<sub>4</sub>-N<sub>5</sub>-N<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>-N<sub>8</sub>-N<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-N<sub>15</sub>-Phe (формула I), где

N<sub>1</sub> представляет собой неполярную аминокислоту;

N<sub>2</sub> представляет собой Leu, Tyr, Val или Ala;

N<sub>3</sub> представляет собой Arg, Asn, Thr или Ser;

N<sub>4</sub> представляет собой Pro, Ser, Glu, Ile, Gly, Met, Lys или Thr;

N<sub>5</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Lys;

N<sub>6</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Asp, Ala, Gly, Leu или Asn;

N<sub>7</sub> представляет собой Ser, Asn, Ala, Tyr или Thr;

N<sub>8</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Ser или Gly;

N<sub>9</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly;

N<sub>10</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly или Ser;

N<sub>11</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Trp, Gly, Ser, Gln, Ala или Pro;

N<sub>12</sub> представляет собой Gly, Tyr, Asn, Gln или Ser;

N<sub>13</sub> представляет собой Lys, Ala, Asp, Ile или Asn;

N<sub>14</sub> представляет собой неполярную аминокислоту; и

N<sub>15</sub> представляет собой Gln, Asn, Arg, Thr, Val, Ile или Ser; необязательно при этом N<sub>1</sub> представляет собой Ala или Ile; и/или при этом N<sub>14</sub> представляет собой Phe, Leu, Met или Pro; (ii) содержит переменный домен бета-цепи, содержащий переменный домен бета-цепи, содержащий области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3, при этом область CDR3 содержит аминокислотную последовательность формулы II (SEQ ID NO: 119):

Cys-N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>-N<sub>4</sub>-N<sub>5</sub>-N<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>-N<sub>8</sub>-N<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-Phe (формула II), где

каждое из N<sub>1</sub> и N<sub>2</sub> независимо представляет собой Ala или Ser;

N<sub>3</sub> представляет собой Ser, Met или Lys;

N<sub>4</sub> представляет собой Tyr, Trp, His, Leu, Thr, Glu или Gln;

N<sub>5</sub> представляет собой Ser, Ala, Thr, Gly, Val или Arg;

N<sub>6</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly, His, Asp, Thr, Pro, Met или Ser;

N<sub>7</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Gly, Tyr, Asn или Pro;

N<sub>8</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Y;

N<sub>9</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой N;

N<sub>10</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой полярную аминокислоту;

N<sub>11</sub> представляет собой Pro, Glu, Gly или Asp;

N<sub>12</sub>, который может присутствовать или может не присутствовать, представляет собой Glu;

N<sub>13</sub> представляет собой Leu, Ala, Gln или Tyr;

N<sub>14</sub> представляет собой His, Phe или Thr; необязательно при этом N<sub>10</sub> представляет собой Ser, Thr, Gln или Tyr; (iii) содержит CDR1 переменного домена альфа-цепи, содержащую любую из аминокислотных последовательностей CDR1, изложенных в табл. 1, или их по сути аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности, и CDR2 переменного домена альфа-цепи, независимо содержащую любую из аминокислотных последовательностей



состоящей из SEQ ID NO: 9/7; 19/17; 29/27; 39/37; 49/47; 59/57; 69/67; 79/77; 89/87; 99/97; и 109/107, или его по сути аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности; (xi) не связывается специфически с клетками, экспрессирующими предположительные нецелевые пептиды, но не с презентруемым HLA-A2 пептидом NY-ESO-1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, определенную с помощью люминесцентного анализа; и/или (xii) активирует Т-клеточный ответ приблизительно в два раза больший, чем NY-ESO-1-специфический TCR, происходящий от пациента, например, активирует Т-клеточный ответ приблизительно в три раза больший, или приблизительно в четыре раза больший, чем NY-ESO-1-специфический TCR, происходящий от пациента, определенный с помощью TCR-опосредованного люминесцентного биоанализа передачи сигналов с участием Т-клеток.

TCR по данному изобретению могут обладать одной или несколькими из вышеупомянутых биологических характеристик или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антиген-связывающих белков по данному изобретению будут очевидны специалисту в данной области из обзора данного раскрытия, в том числе демонстрационных примеров данного документа.

В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий TCR NY-ESO-1, описанный в данном документе, вставляют в вектор. Термин "вектор", используемый в данном документе, относится к носителю, в который может быть ковалентно вставлен полинуклеотид, кодирующий белок, так, чтобы вызвать экспрессию этого белка и/или клонирование полинуклеотида. Такие векторы также могут называться "векторами экспрессии". Выделенный полинуклеотид может быть вставлен в вектор с использованием любых подходящих способов, известных в данной области техники, например, но не ограничиваясь этим, вектор может быть расщеплен с использованием соответствующих рестрикционных ферментов, а затем может быть лигирован с выделенным полинуклеотидом, имеющим совпадающие рестрикционные концы. Векторы экспрессии обладают способностью включать и экспрессировать гетерологичные или модифицированные последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие по меньшей мере часть генного продукта, способного транскрибироваться в клетке. В большинстве случаев молекулы РНК затем транслируются в белок. Векторы экспрессии могут содержать множество контрольных последовательностей, которые относятся к последовательностям нуклеиновой кислоты, необходимым для транскрипции и, возможно, трансляции функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. В дополнение к контрольным последовательностям, которые регулируют транскрипцию и трансляцию, векторы и векторы экспрессии могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые также выполняют другие функции и обсуждаются ниже. Вектор экспрессии может содержать дополнительные элементы, например, вектор экспрессии может иметь две системы репликации, что позволяет поддерживать его в двух организмах, например, в клетках человека для экспрессии и в прокариотическом хозяине для клонирования и амплификации.

Вектор экспрессии может иметь необходимые регуляторные элементы выше 5' и ниже 3', такие как промоторные последовательности, такие как промоторы CMV, PGK и EF1 $\alpha$ , сайт распознавания рибосом и связывание с ТАТА-боксом, и 3'-UTR последовательности терминации транскрипции AAUAAA для эффективной транскрипции гена и трансляции в соответствующей клетке-хозяине. Другие подходящие промоторы включают конститутивный промотор раннего промотора обезьяньего вируса 40 (SV40), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор LTR HIV, промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, предранний промотор EBV и промотор вируса саркомы Рауса. Также можно использовать промоторы генов человека, включая, но не ограничиваясь ими, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. В определенных вариантах осуществления индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть векторов, экспрессирующих химерный антигенный рецептор. Это обеспечивает молекулярный переключатель, способный включить экспрессию полинуклеотидной последовательности, представляющей интерес, или выключить экспрессию. Примеры индуцируемых промоторов включают, но без ограничения ими, промотор гена металлотионина, промотор гена глюкокортикоидного рецептора, промотор гена прогестеронового рецептора или промотор гена устойчивости к тетрациклину.

Вектор экспрессии может иметь дополнительную последовательность, такую как б $\chi$ -гистидин (SEQ ID NO: 165), метки с-Мус и FLAG, которые включены в экспрессируемые TCR. Таким образом, вектор экспрессии может быть сконструирован таким образом, чтобы он содержал 5' и 3' нетранслируемые регуляторные последовательности, которые иногда могут функционировать как энхансерные последовательности, промоторные области и/или терминаторные последовательности, которые могут способствовать или усиливать эффективную транскрипцию нуклеиновой (нуклеиновых) кислоты (кислот), представляющей (представляющих) интерес, переносимых в векторе экспрессии. Вектор экспрессии также может быть сконструирован для функции репликации и/или экспрессии (например, транскрипции и трансляции) в конкретном типе клеток, положении в клетке или типе ткани. Векторы экспрессии могут включать селективируемый маркер для поддержания вектора в клетке хозяина или реципиента.

Примерами векторов являются плазмиды, автономно реплицирующиеся последовательности и транспозированные элементы. Дополнительные иллюстративные векторы включают, но не ограничивают-

ся ими, плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как искусственная хромосома дрожжей (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома на основе P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных. Примеры категорий вирусов животных, используемых в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (например, SV40). Примерами векторов экспрессии являются векторы системы бицистронной экспрессии Lenti-X™ (Neo) (Clontech), векторы pCneo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ и pLenti6.2N5-GW/lacZ (Invitrogen) для опосредованного лентивирусом переноса генов и экспрессии в клетках млекопитающих. Кодированные последовательности TCR, раскрываемые в настоящем документе, можно лигировать в такие векторы экспрессии для экспрессии химерного белка в клетках млекопитающих.

В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR по данному изобретению, представлены в вирусном векторе. Вирусный вектор может происходить из ретровируса, лентивируса или вируса пенициллы. Как используется в данном документе, термин "вирусный вектор" относится к конструкции вектора на основе нуклеиновой кислоты, которая содержит по меньшей мере один элемент вирусного происхождения и характеризуется способностью упаковываться в частицу вирусного вектора. Вирусный вектор может содержать кодирующую последовательность для различных белков, описанных в данном документе, вместо несущественных вирусных генов. Вектор и/или частица могут быть использованы для переноса ДНК, РНК или других нуклеиновых кислот в клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*. В данной области техники известны многочисленные формы вирусных векторов.

В определенных вариантах осуществления вирусный вектор, содержащий кодирующую последовательность для TCR, описанного в данном документе, представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Термин "ретровирусный вектор" относится к вектору, содержащему структурные и функциональные генетические элементы, которые в основном происходят от ретровируса. Термин "лентивирусный вектор" относится к вектору, содержащему структурные и функциональные генетические элементы вне LTR, которые в основном происходят от лентивируса.

Ретровирусные векторы для применения в данном документе могут происходить от любого известного ретровируса (например, ретровирусов типа с, таких как вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирус, вирус Фрэнда, вирус стволовых клеток мыши (MSCV) и вирус саркомы Рауса (RSV)). Ретровирусы по данному изобретению также включают вирусы Т-клеточного лейкоза человека, HTLV-1 и HTLV-2, и лентивирусное семейство ретровирусов, таких как вирусы иммунодефицита человека, HIV-1, HIV-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита лошадей (EIV) и другие классы ретровирусов.

Лентивирусный вектор для применения в данном документе относится к вектору, происходящему из лентивируса, группы (или рода) ретровирусов, которые вызывают медленно развивающееся заболевание. Вирусы, включенные в эту группу, включают HIV (вирус иммунодефицита человека; включая HIV 1 типа и HIV 2 типа); вирус висна-маэди; вирус артрита-энцефалита коз; вирус инфекционной анемии лошадей; вирус иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV); и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Получение рекомбинантного лентивируса может быть достигнуто с использованием способов в соответствии с работами Dull et al. and Zufferey et al. (Dull et al., *J. Virol.*, 1998; 72: 8463-8471, и Zufferey et al., *J. Virol.* 1998; 72:9873-9880).

Ретровирусные векторы (т.е., как лентивирусные, так и нелентивирусные) для применения в данном изобретении могут быть созданы с использованием стандартных методик клонирования путем объединения необходимых последовательностей ДНК в порядке и ориентации, описанных в данном документе (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14, и других стандартных лабораторных руководствах; Eglitis, et al. (1985) *Science* 230: 1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6460-6464; Wilson et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8039-8043; Ferry et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254: 1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7640-7644; Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3: 641-647; Dai et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10892-10895; Hwu et al. (1993) *J. Immunol* 150: 4104-4115; патенте США № 4868116; патенте США № 4980286; заявке РСТ WO 89/07136; заявке РСТ WO 89/02468; заявке РСТ WO 89/05345; и заявке РСТ WO 92/07573).

Подходящие источники для получения ретровирусных (т.е., как лентивирусных, так и нелентивирусных) последовательностей для применения при создании векторов включают, например, геномные РНК и cDNA, доступные из коммерчески доступных источников, включая Коллекцию типовых культур (ATCC), Роквилл, Мэриленд. Последовательности также можно синтезировать химическим путем.

Для экспрессии TCR NY-ESO-1 вектор можно ввести в клетку-хозяина, чтобы обеспечить экспрес-

сию полипептида в клетке-хозяине. Векторы экспрессии могут содержать множество элементов для контроля экспрессии, включая, но не ограничиваясь ими, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, селективируемые маркеры и сигнальные последовательности. Эти элементы могут быть выбраны соответствующим образом специалистом в данной области техники, как описано выше. Например, промоторные последовательности могут быть выбраны для стимуляции транскрипции полинуклеотида в векторе. Подходящие промоторные последовательности включают, но не ограничиваются ими, промотор T7, промотор T3, промотор SP6, промотор бета-актина, промотор EF1a, промотор CMV и промотор SV40. Для усиления транскрипции полинуклеотида могут быть выбраны энхансерные последовательности. Селективируемые маркеры могут быть выбраны для обеспечения возможности отбора клеток-хозяев, вставленных в вектор, из тех, например, селективируемых маркеров, которые могут представлять собой гены, которые придают устойчивость к антибиотикам. Сигнальные последовательности могут быть выбраны, чтобы обеспечить транспортировку экспрессируемого полипептида за пределы клетки-хозяина.

Для клонирования полинуклеотида вектор можно ввести в клетку-хозяин (выделенную клетку-хозяин), чтобы обеспечить репликацию самого вектора и тем самым амплифицировать копии содержащегося в нем полинуклеотида. Клонирование векторов могут содержать компоненты последовательности, как правило, включая, но не ограничиваясь ими, точку начала репликации, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности и селективируемые маркеры. Эти элементы могут быть выбраны соответствующим образом специалистом в данной области техники. Например, точка начала репликации может быть выбрана так, чтобы способствовать автономной репликации вектора в клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления в данном раскрытии представлены выделенные клетки-хозяева, содержащие векторы, представленные в данном документе. Клетки-хозяева, содержащие вектор, могут быть пригодны для экспрессии или клонирования полинуклеотида, содержащегося в векторе. Подходящие клетки-хозяева могут включать, но не ограничиваются ими, прокариотические клетки, клетки грибов, дрожжевые клетки или высшие эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих. Подходящие для этой цели прокариотические клетки включают, без ограничения, эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например, Serratia marcescans и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis, Pseudomonas, такие как P. aeruginosa и Streptomyces.

TCR по данному изобретению вводят в клетку-хозяина с использованием методик трансфекции и/или трансдукции, известных в данной области техники. Как используется в данном документе, термины "трансфекция" и "трансдукция" относятся к процессам, посредством которых последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты вводится в клетку-хозяина. Нуклеиновая кислота может быть интегрирована в ДНК клетки-хозяина или может сохраняться внехромосомно. Нуклеиновая кислота может сохраняться временно или может представлять собой стабильное введение. Трансфекция может осуществляться различными способами, известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, соосаждение ДНК фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, трансфекцию, опосредованную полибренном, электропорацию, микроинъекцию, слияние липосом, липофекцию, слияние протопластов, ретровирусную инфекцию и биолистику. Трансдукция относится к доставке гена (генов) с использованием вирусного или ретровирусного вектора посредством вирусной инфекции, а не путем трансфекции. В некоторых вариантах осуществления ретровирусные векторы трансдуцируются путем упаковки векторов в вирионы перед контактом с клеткой. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая TCR NY-ESO-1 по данному изобретению, переносимая ретровирусным вектором, может быть трансдуцирована в клетку посредством инфекции и интеграции провируса.

Как используется в данном документе, термин "генетически инженерный" или "генетически модифицированный" относится к добавлению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал в клетке. Термины "генетически модифицированные клетки", "модифицированные клетки" и "перенаправленные клетки" используются взаимозаменяемо.

В частности, TCR по данному изобретению вводятся и экспрессируются в иммунных эффекторных клетках, чтобы перенаправить их специфичность на целевой антиген, представляющий интерес, например, экспонируемый HLA-A2 пептид NY-ESO-1, например, аминокислотные остатки 157-165.

В данном изобретении предложены способы получения иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют TCR, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает трансфекцию или трансдукцию эффекторных иммунных клеток, например, иммунных эффекторных клеток, выделенных от субъекта, такого как субъект, имеющий заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или несколько TCR, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления эффекторные клетки выделяют от индивидуума и генетически модифицируют без дополнительных манипуляций *in vitro*. Такие клетки можно затем повторно вводить индивидууму. В дополнительных вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки сначала активируются и стимулируются для пролиферации *in vitro* перед

их генетической модификацией для экспрессии TCR. В этом отношении иммунные эффекторныe клетки можно культивировать до или после генетической модификации (т.е., трансдукции или трансфекции для экспрессии TCR, как описано в данном документе).

Перед манипуляцией с иммунными эффекторными клетками, описанными в данном документе, или генетической модификацией с ними *in vitro*, источник клеток может быть получен от субъекта. В частности, иммунные эффекторные клетки для применения с TCR, как описано в данном документе, содержат Т-клетки.

Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, тимус, ткань из очага инфекции, асцита, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В определенных вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта, с использованием любого количества методик, известных специалисту, таких как разделение с использованием FICOLL. В некоторых вариантах осуществления клетки из циркулирующей крови человека получают путем афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В некоторых вариантах осуществления клетки, собранные с помощью афереза, можно промывать для удаления фракции плазмы крови и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующей обработки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки промывают PBS. В альтернативном варианте осуществления в промытом растворе отсутствует кальций и магний, или может отсутствовать многие, если не все, двухвалентные катионы. Специалистам в данной области техники будет понятно, что стадия промывки может выполняться способами, известными специалистам в данной области техники, например, с использованием полуавтоматической проточной центрифуги. После промывания клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах или другом физиологическом растворе с буфером или без него. В определенных вариантах осуществления нежелательные компоненты образца афереза могут быть удалены в культуральной среде, непосредственно ресуспендированной клетками.

В определенных вариантах осуществления Т-клетки выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) путем лизирования красных кровяных телец и истощения моноцитов, например, центрифугированием в градиенте PERCOLL™. Специфические популяции Т-клеток, таких как CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и CD45RO+Т-клетки, можно дополнительно выделять с помощью методик положительного и отрицательного отбора. Например, обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора может быть достигнуто с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных клеток. Одним из способов применения в данном документе является сортировка и/или отбор клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которой используется коктейль моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на отрицательно отобранных клетках. Например, для обогащения клеток CD4+ путем отрицательного отбора коктейль моноклональных антител обычно содержит антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Проточная цитометрия и сортировка клеток также могут быть использованы для выделения популяций клеток, представляющих интерес, для применения в данном изобретении.

PBMC можно использовать непосредственно для генетической модификации с помощью TCR с применением способов, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления после выделения PBMC дополнительно выделяют Т-лимфоциты, и в определенных вариантах осуществления как цитотоксические Т-лимфоциты, так и Т-лимфоциты-хэлперы можно разделить на субпопуляции наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток либо до, либо после генетической модификации и/или экспансии.

Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с применением известных способов, или иммунные эффекторные клетки могут быть активированы и экспандированы (или дифференцированы в случае предшественников) *in vitro* перед генетической модификацией. В другом варианте осуществления иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицируют химерными антигенными рецепторами, описанными в данном документе (например, трансдуцируют вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR), а затем активируют и экспандируют *in vitro*. Способы активации и экспансии Т-клеток известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 6 905 874; патенте США № 6 867 041; патенте США № 6797514; WO2012079000, US 2016/0175358.

В данном изобретении представлена популяция модифицированных иммунных эффекторных клеток для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с NY-ESO-1, например, рака, при этом модифицированные иммунные эффекторные клетки содержат NY-ESO-1 TCR, как раскрыто в данном документе.

TCR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, полученные, как описано в данном документе, могут быть использованы в способах и композициях адаптивной иммунотерапии в соответствии с известными методиками или их вариациями, которые будут очевидны специалистам в данной области техники на основании данного раскрытия. См., например, публикацию патентной заявки США №

2003/0170238, Gruenberg et al; см. также патент США. № 4690915 за авторством Rosenberg.

### III. Фармацевтические композиции.

В данном изобретении представлены терапевтические композиции, содержащие TCR NY-ESO-1 по данному изобретению, или иммунные эффекторный клетки, содержащие TCR NY-ESO-1 по данному изобретению. Терапевтические композиции в соответствии с данным изобретением будут вводиться с подходящими носителями, наполнителями и другими агентами, которые включают в составы, чтобы обеспечить улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество подходящих составов можно обнаружить в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, липидсодержащие (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" и "вода в масле", эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полужидкие гели и полужидкие смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

В зависимости от тяжести состояния частоту и продолжительность лечения можно корректировать.

В определенных вариантах осуществления за начальной дозой может следовать введение второй или множества последующих доз TCR NY-ESO-1 по данному изобретению или иммунных эффекторных клеток, содержащих TCR NY-ESO-1 по данному изобретению в количестве, которое может быть приблизительно таким же или меньшим, чем начальная доза.

В определенных ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В некоторых вариантах осуществления можно использовать насос.

Инъекционные формы могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных, внутричерепных, внутрибрюшинных и внутримышечных инъекций, капельниц и т.п. Эти инъекционные формы можно получать общеизвестными способами. Например, инъекционные формы можно получать, например, растворением, суспендированием или эмульгированием антигенсвязывающего белка или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. Водной средой для инъекций, является, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., например, которые можно использовать в комбинации с подходящим растворителем, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, арахисовое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с растворителем, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленную таким способом инъекцию предпочтительно заполняют в подходящую ампулу.

В некоторых вариантах осуществления получают составы TCR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, вначале собирая их из среды для культивирования, и затем отмывая и концентрируя клетки в среде и системе для хранения для введения ("фармацевтически приемлемом" носителе) в эффективном для лечения количестве. Подходящей средой для инфузии может быть любой состав изотонической среды, как правило, физиологический раствор, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), но также можно использовать и 5% водный раствор декстрозы или лактат Рингера. Среда для инфузии может быть дополнена человеческим сывороточным альбумином.

Эффективное для лечения количество клеток в композиции обычно составляет более  $10^2$  клеток и от  $10^6$  до  $10^8$  или  $10^9$  клеток включительно и может составлять более  $10^{10}$  клеток. Число клеток будет зависеть от окончательного применения, для которого предполагается композиция, а также от типа клеток, включенных в нее.

Клетки могут быть аутологичными или гетерологичными по отношению к пациенту, проходящему терапию. При желании лечение может также включать введение митогенов (например, PHA) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (например, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-18 и TNF- $\beta$ , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 $\alpha$  и т.д.), как описано в данном документе, для усиления индукции иммунного ответа.

Популяции TCR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток по данному изобретению можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в сочетании с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток. Вкратце, фармацевтические композиции по данному изобретению могут содержать популяцию TCR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки, как описано в данном документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или наполнителями. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, фосфатный забуференный солевой раствор и т.д.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; адьюванты (на-

пример, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по данному изобретению предпочтительно составляют для внутривенного введения.

IV. Терапевтические пути применения TCR NY-ESO-1 или иммунных эффекторных клеток, содержащих TCR NY-ESO-1.

Противоопухолевый иммунный ответ, индуцированный у субъекта путем введения TCR-экспрессирующих Т-клеток, описанных в данном документе, с применением способов, описанных в данном документе, или других способов, известных в данной области техники, может включать клеточные иммунные ответы, опосредованные цитотоксическими Т-клетками, способными уничтожить инфицированные клетки, ответами регуляторных Т-клеток и Т-клеток-хэлперов. Также могут быть индуцированы гуморальные иммунные ответы, опосредованные прежде всего Т-клетками-хэлперами, способными активировать В-клетки, что приводит к продуцированию антител. Для анализа типа иммунных ответов, индуцированных композициями по данному изобретению, могут применяться различные методики, которые хорошо описаны в данной области техники; например, Current Protocols in Immunology, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Krusbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

Таким образом, TCR NY-ESO-1 по данному изобретению являются пригодными, среди прочего, для лечения, предупреждения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, ассоциированного с NY-ESO-1 или опосредованного им. Например, в данном изобретении представлены способы лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с NY-ESO-1, такого как рак, ассоциированный с NY-ESO-1 (например, NY-ESO-1-положительный рак) (ингибирование опухолевого роста) путем введения TCR NY-ESO-1 (или фармацевтической композиции, содержащей TCR NY-ESO-1 или множества клеток, содержащих TCR NY-ESO-1), как описано в данном документе, пациенту, нуждающемуся в таком лечении, и NY-ESO-1 TCR (или фармацевтическая композиция, содержащая TCR NY-ESO-1) для применения при лечении рака, ассоциированного с NY-ESO-1. Антигенсвязывающие белки по данному изобретению пригодны для лечения, предупреждения и/или облегчения заболевания, нарушения или состояния, такого как рак, ассоциированный с NY-ESO-1, и/или для облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием. В контексте способов лечения, описанных в данном документе, TCR NY-ESO-1 (или фармацевтическая композиция или множество клеток) можно вводить в виде монотерапии (т.е., в качестве единственного терапевтического агента) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами (примеры которых описаны в других разделах данного документа).

Соответственно, в данном изобретении представлены способы лечения индивидуума, у которого диагностировано заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, или подозревается наличие или риск его развития, например, рак, ассоциированный с NY-ESO-1, включающие введение индивидуу терапевтически эффективного количества TCR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении представлен способ лечения субъекта, диагностированного NY-ESO-1-положительным раком, включающий удаление иммунных эффекторных клеток из субъекта, у которого диагностирован NY-ESO-1-положительный рак, с генетической модификацией указанных иммунных эффекторных клеток вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR по данному изобретению, таким образом получая популяцию модифицированных иммунных эффекторных клеток и вводя популяцию модифицированных иммунных эффекторных клеток одному и тому же субъекту. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки представляют собой Т-клетки.

Способы введения клеточных композиций, описанных в данном документе, включают любой способ, который эффективен для повторного введения *ex vivo* генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые либо непосредственно экспрессируют TCR по данному изобретению у субъекта, либо при повторном введении генетически модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые при введении субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, которые экспрессируют TCR. Один способ включает трансдукцию Т-клеток периферической крови *ex vivo* конструкцией нуклеиновой кислоты в соответствии с данным изобретением и возвращение трансдуцированных клеток субъекту.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиции, описанные в данном документе, пригодны для лечения субъектов, страдающих первичным или рецидивирующим раком, включая, но не ограничиваясь им, рак, ассоциированный с NY-ESO-1, например, рак, ассоциированный с NY-ESO-1, представляет собой липосаркому, нейробластому, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарную опухоль, мультиформную глиобластому, анапластическую астроцитому, опухоль головного мозга, рак маточных труб, рак эпителия яичников, первичный рак брюшной полости, распространенные солидные опухоли, саркому мягких тканей, меланому, саркому, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, болезнь Ходжкина, множественную

миелому, синовиальную саркому, метастатические солидные опухоли, рабдомиосаркому, распространенный миксоид, круглоклеточную липосаркому, метастатическую меланому или рецидивирующий немелкоклеточный рак легких. В некоторых вариантах осуществления рак, ассоциированный с NY-ESO-1, представляет собой липосаркому, нейробластому, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы или рак молочной железы.

TCR могут использоваться для лечения симптомов рака, ассоциированного с NY-ESO-1, ранней или поздней стадии. В некоторых вариантах осуществления TCR по данному изобретению можно применять для лечения запущенного или метастатического рака. TCR пригодны для ослабления, ингибирования или уменьшения опухолевого роста. В определенных вариантах осуществления лечение TCR по данному изобретению приводит к более чем 40% регрессии, более чем 50% регрессии, более чем 60% регрессии, более чем 70% регрессии, более чем 80% регрессии или более чем 90% регрессии опухоли у субъекта. В определенных вариантах осуществления TCR можно применять для предупреждения рецидива опухоли. В определенных вариантах осуществления TCR пригодны для повышения выживаемости без прогрессирования или общей выживаемости у субъекта с раком, ассоциированным с NY-ESO-1. В некоторых вариантах осуществления TCR пригодны для снижения токсичности, вызванной химиотерапией или лучевой терапией, при сохранении долгосрочной выживаемости у пациента, страдающего от рака, ассоциированного с NY-ESO-1.

Один или несколько TCR по данному изобретению можно вводить для облегчения, предупреждения или уменьшения тяжести одного или нескольких симптомов или состояний заболевания или нарушения.

В данном документе также предполагается применение одного или нескольких TCR по данному изобретению профилактически у пациентов с риском развития заболевания или нарушения, такого как заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, например рак, ассоциированный с NY-ESO-1.

В другом варианте осуществления данного изобретения TCR применяют для приготовления фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих заболеванием или нарушением, ассоциированным с NY-ESO-1, таким как рак, ассоциированный с NY-ESO-1. В другом варианте осуществления данного изобретения TCR применяют в качестве дополнительной терапии с любым другим агентом или с любой другой терапией, известной специалистам в данной области техники, пригодной для лечения рака, ассоциированного с NY-ESO-1.

Комбинированная терапия может включать TCR NY-ESO-1 по данному изобретению, такой как иммунная эффекторная клетка, содержащая TCR по данному изобретению, или фармацевтическая композиция по данному изобретению, и любой дополнительный терапевтический агент, который можно предпочтительно комбинировать с TCR по данному изобретению. TCR по данному изобретению можно комбинировать синергетически с одним или несколькими противораковыми лекарственными средствами или терапией, применяемой для лечения или ингибирования заболевания или нарушения, ассоциированного с NY-ESO-1, такого как NY-ESO-1-положительный рак, например, липосаркома, нейробластома, миелома, метастатическая меланома, синовиальная саркома, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарная опухоль, мультиформная глиобластома, анапластическая астроцитома, опухоль головного мозга, рак маточных труб, рак эпителия яичников, первичный рак брюшной полости, распространенные солидные опухоли, саркома мягких тканей, меланома, саркома, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, болезнь Ходжкина, множественная миелома, синовиальная саркома, метастатические солидные опухоли, рабдомиосаркома, распространенный миксоид, круглоклеточная липосаркома, метастатическая меланома или рецидивирующий немелкоклеточный рак легких.

В данном документе предполагается применение TCR по данному изобретению в комбинации с иммуностимулирующими и/или иммуносупрессивными видами терапии для подавления опухолевого роста и/или повышения выживаемости пациентов с раком. Иммуностимулирующая терапия включает прямую иммуностимулирующую терапию для увеличения активности иммунных клеток путем "снятия тормоза" с подавленных иммунных клеток или "нажатия на газ" для активации иммунного ответа. Примеры включают нацеливание на рецепторы других контрольных точек, вакцинацию и адъюванты. Иммунноподдерживающие способы могут повышать антигенность опухоли, способствуя гибели иммуногенных клеток, воспалению или иметь другие косвенные эффекты, которые способствуют противоопухолевому иммунному ответу. Примеры включают облучение, химиотерапию, антиангиогенные средства и хирургическое вмешательство.

В различных вариантах осуществления один или несколько TCR по данному изобретению можно применять в комбинации с ингибитором PD-1 (например, антителом к PD-1, таким как ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, BGB-A317 или REGN2810), ингибитором PD-L1 (например, антителом к PD-L1, таким как авелумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, MDX-1105 или REGN3504), ингибитором CTLA-4 (например, ипилимумабом), ингибитором TIM3, ингибитором BTLA, ингибитором TIGIT, ингибитором CD47, ингибитором GITR, антагонистом другого T-клеточного коингибитора или лиганда (например,

антитела к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонистом фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [например, "ловушкой VEGF", такой как афлиберцепт или другой слитый белок, ингибирующий VEGF, как указано в US 7087411, или антителом к VEGF или его антигенсвязывающим фрагментом (например, бевацизумабом или ранибизумабом) или низкомолекулярным ингибитором киназы рецептора VEGF (например, сунитинибом, сорафенибом или пазопанибом)], ингибитором Ang2 (например, несвакумабом), ингибитором трансформирующего фактора роста бета (TGFβ), ингибитором рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотинибом, цетуксимабом), ингибитором CD20 (например, антителом к CD20, таким как ритуксимаб), антителом к опухолеспецифическому антигену [например, CA9, CA125, ассоциированным с меланомой антигеном 3 (MAGE3), карциноэмбриональным антигеном (CEA), виментином, белком опухоль-М2-РК, простатоспецифическим антигеном (PSA), муцином-1, MART-1 и CA19-9], вакциной (например, бациллой Кальмета-Герена, противораковой вакциной), адьювантом для повышения презентации антигена (например, гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором), биспецифическим антителом (например, биспецифическим антителом CD3хCD20 или биспецифическим антителом PSMAхCD3), цитотоксином, химиотерапевтическим агентом (например, дакарбазином, темозоломидом, циклофосфамидом, доцетакселом, доксорубицином, даунорубицином, цисплатином, карбоплатином, метоксиплтрекситабином), лучевой терапией, хирургическим вмешательством, ингибитором IL-6R (например, сарилумабом), ингибитором IL-4R (например, дупилумабом), ингибитором IL-10, цитокином, таким как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC) (например, ADC антитело к CD19-DM4 и ADC антитело к DS6-DM4), противовоспалительным препаратом (например, кортикостероидными и нестероидными противовоспалительными препаратами), пищевой добавкой, такой как антиоксиданты или любое другое терапевтическое лечение для лечения рака. В определенных вариантах осуществления TCR по данному изобретению можно применять в комбинации с противораковыми вакцинами, включая вакцины дендритных клеток, онколитические вирусы, вакцины опухолевых клеток и т.д., для усиления противоопухолевого ответа.

Примеры противораковых вакцин, которые можно применять в комбинации с TCR по данному изобретению, включают вакцину MAGE3 от меланомы и рака мочевого пузыря, вакцину MUC1 от рака молочной железы, EGFRv3 (например, риндопепимут) от рака головного мозга (включая мультиформную глиобластому) или ALVAC-CEA (от CEA+ видов рака).

В определенных вариантах осуществления TCR NY-ESO-1 по данному изобретению можно вводить в комбинации с лучевой терапией в способах создания долгосрочных устойчивых противоопухолевых ответов и/или повышения выживаемости пациентов с раком. В некоторых вариантах осуществления TCR NY-ESO-1 по данному изобретению можно вводить пациенту с раком до, вместе с или после лучевой терапии. Например, лучевая терапия может применяться в одной или нескольких дозах к опухолевым поражениям с последующим введением одной или нескольких доз TCR NY-ESO-1 по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления лучевая терапия может применяться локально к опухолевому поражению для повышения местной иммуногенности опухоли пациента (адьювантная лучевая терапия) и/или для уничтожения опухолевых клеток (абляционная лучевая терапия) с последующим системным введением TCR NY-ESO-1 по данному изобретению.

Дополнительный (дополнительные) терапевтически активный (активные) агент (агенты)/компонент (компоненты) можно вводить до, одновременно или после введения TCR NY-ESO-1 по данному изобретению. Для целей данного раскрытия такие схемы введения рассматриваются как введение TCR NY-ESO-1 "в комбинации с" вторым терапевтически активным компонентом.

Дополнительный (дополнительные) терапевтически активный (активные) компонент (компоненты) можно вводить субъекту до введения NY-ESO-1 TCR по данному изобретению. В других вариантах осуществления дополнительный (дополнительные) терапевтически активный (активные) компонент (компоненты) можно вводить субъекту после введения NY-ESO-1 TCR по данному изобретению. В еще одних вариантах осуществления дополнительный (дополнительные) терапевтически активный (активные) компонент (компоненты) можно вводить субъекту одновременно с введением NY-ESO-1 TCR по данному изобретению. "Одновременное" введение для целей данного изобретения включает, например, введение TCR NY-ESO-1 и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в одной лекарственной форме (например, в совместном составе) или в отдельных лекарственных формах, вводимых субъекту в течение приблизительно 30 мин или менее друг после друга. При введении в отдельных лекарственных формах каждую лекарственную форму можно вводить одним и тем же путем; в качестве альтернативы каждую лекарственную форму можно вводить другим путем. В любом случае все из введения компонентов в одной лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одним и тем же путем или в отдельных лекарственных формах разными путями считается "одновременным введением" для целей данного раскрытия. Для целей данного раскрытия введение TCR NY-ESO-1 "до", "одновременно с" или "после" (как эти термины определены в данном документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением NY-ESO-1 TCR "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом").

Данное изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые ни коим об-

разом не носят ограничивающего характера. Полное содержание всех источников литературы, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в данной заявке, а также фигуры включены в данный документ посредством ссылки.

### Примеры

Пример 1. Выделение NY-ESO-1-специфических Т-клеточных рецепторов.

Мышей, гуманизированных в отношении компонентов клеточной иммунной системы, мышей VelociT™ (см., например, публикацию РСТ № WO 2016/164492, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки), иммунизировали пептидом NY-ESO-1 (157-165) (SLLMWITQC, SEQ ID NO: 111), специфически презентуемым человеческим HLA-A2, разведенным в PBS и смешанным с адьювантом, например в равном объеме с полным адьювантом Фрейнда (CFA; Chondrex, Inc.). Получали и диссоциировали суспензии селезенки от иммунизированных мышей. Эритроциты лизировали в буфере для лизиса АСК (Life Technologies), а спленоциты суспендировали в полной среде RPMI. Выделенные спленоциты сортировали, и отдельные Т-клетки, которые связывают пептид NY-ESO-1 (157-165) в контексте МНС, выделяли с помощью сортировки флуоресцентно-активируемых клеток (FACS). Выделенные Т-клетки высевали в однолуночный планшет и смешивали с праймерами для ПЦР, специфичными для альфа- и бета-цепей варибельной области TCR. cDNA для каждой отдельной Т-клетки синтезировали с помощью реакции с использованием обратной транскриптазы (RT). Затем каждый полученный с использованием RT продукт разделяли и переносили в две соответствующие лунки для последующей ПЦР бета- и альфа-цепей TCR. Один набор полученных с использованием RT продуктов сначала амплифицировали с помощью ПЦР с использованием 5'-вырожденного праймера, специфичного для лидерной последовательности варибельной области бета-цепи TCR, или 5'-вырожденного праймера, специфичного для лидерной последовательности варибельной области альфа-цепи TCR, и 3'-праймера, специфичного для константной области TCR, с получением ампликона. Затем ампликоны снова амплифицировали с помощью ПЦР с использованием 5'-вырожденного праймера, специфичного для каркаса 1 варибельной области бета-цепи TCR, или 5'-вырожденного праймера, специфичного для каркаса 1 варибельной области альфа-цепи TCR, и 3'-праймера, специфичного для константной области TCR, с получением ампликонов для клонирования. Продукты ПЦР, полученные из бета- и альфа-цепей TCR, клонировали в векторы экспрессии, содержащие бета-цепь константной области и альфа-цепь константной области соответственно. Векторы экспрессии, экспрессирующие пары полноразмерных бета- и альфа-цепей, клонировали в клетки CHO и исследовали в отношении специфичности связывания с коммерческими тетрамерными реагентами NY-ESO-1/HLA (тетрамер HLA-A02:01 NY-ESO-1; MBL International Corporation).

В табл. 1 представлен подробный перечень аминокислотных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 альфа- и бета-цепей выделенных TCR, в табл. 2 представлены соответствующие полинуклеотидные последовательности, а в табл. 3 представлены аминокислотные и нуклеотидные последовательности альфа- и бета-цепей варибельных областей выделенных TCR.

Хотя TCR VelociT™ клонировали из CD8-положительных Т-клеток мыши VelociT™, TCR экспрессировали в клетках CHO в отсутствие какого-либо CD8 и они по-прежнему демонстрировали связывание тетрамера пептида NY-ESO. Не ограничиваясь какой-либо теорией, TCR, полученные из VelociT™, могут связываться с Т-клетками в отсутствие CD8, например с дважды отрицательными (CD4-CD8-) Т-клетками.

Таблица 1

Аминокислотные последовательности CDR

№ TCR	ID TCR	Vβ CDR1	SEQ ID NO	Vβ CDR2	SEQ ID NO	Vβ CDR3	SEQ ID NO	Vα CDR1	SEQ ID NO	Vα CDR2	SEQ ID NO	Vα CDR3	SEQ ID NO
1	001	MNHNH	1	SVGAGI	2	CASSYSGGSPHF	3	TISGTDY	4	GLTSN	5	CILRPDSWGKQF	6
2	018	LGHNA	11	YNFKEQ	12	CASSQAHYTEAFF	13	TSESDYY	14	QEAYKQQN	15	CAVRSANSGYALNF	16
3	050	MNHNH	21	SVGAGI	22	CASSWTDNQPHF	23	TISGTDY	24	GLTSN	25	CILREGNNDMRF	26
4	063	LGHNA	31	YNFKEQ	32	CASSHGTGYNYGYTF	33	DRGSQS	34	IYSNGD	35	CAVNILASGGSYPTF	36
5	071	MNHEY	41	SVGAGI	42	CASSYVGNTEGELFF	43	TISGTDY	44	GLTSN	45	CILRPDSWGKQF	46
6	090	MNHEY	51	SMNVEV	52	CASSLRGPYGYTF	53	DSASNY	54	IRSNVGE	55	CAATGYQNFVF	56
7	108	LGHNA	61	YNFKEQ	62	CASSQPGYTF	63	DSASNY	64	IRSNVGE	65	CAASMKIDSSVKLIF	66
8	167	DFQATT	71	SNEGSKA	72	CSAMTVMNTEAFF	73	TISGTDY	74	GLTSN	75	CILRPDSWGKQF	76
9	184	SGHKS	81	YYEKEE	82	CASSLGSYDYTF	83	NSMFDY	84	ISSIKDK	85	CAARKNYGGSQGNLIF	86
10	188	DFQATT	91	SNEGSKA	92	CSAKEGTEAFF	93	TISGTDY	94	GLTSN	95	CILNTGTASKLTF	96
11	317	LGHNA	101	YNFKEQ	102	CASSQPGYTF	103	DRGSQS	104	IYSNGD	105	CAVNSSPYKLSF	106

## Полинуклеотидные последовательности CDR

№ TCR	ID TCR	Vβ CDR1	SEQ ID NO	Vβ CDR2	SEQ ID NO	Vβ CDR3	SEQ ID NO:	Vα CDR1	SEQ ID NO	Vα CDR2	SEQ ID NO	Vα CDR3	SEQ ID NO:
1	001	ATGAACC ATAACTAC	121	TCAGTT GGT GCTGGT ATC	122	TGTGCCAGCA GTTACTCG GGGGTTTAC CCCTCCACTTT	123	ACAATCA GTGG AACTGATT AC	124	GGTCTTA CAAGCAAT	125	TGCATCCTGCGG CCTGACAGCTGGG G GAAATTCAGTTT	126
2	018	CTGGGGC ATAACGCT	127	TACAAC TTT AAAGA ACAG	128	TGTGCCAGCA GCCAAGCA CACTACACTG AAGCTTCTTT	129	ACCAGTG AGAG TGATTATT AT	130	CAAGAAGCTTATA AGCAACAGAAT	131	TGTGCTTATAGGA GCGCAAATCCGG GTATGCACTCAAC TTC	132
3	050	ATGAACC ATAACTAC	133	TCAGTT GGT GCTGGT ATC	122	TGTGCCAGCA GCTGGACAG ACAATCAGCC CCAGCATTTT	134	ACAATCA GTGG AACTGATT AC	124	GGTCTTAC AAGCAAT	125	TGCATCCTGAGAG A GGGGAACAATGAC A TGCGCTTT	135
4	063	CTGGGGC ATAACGCT	127	TACAAC TTT AAAGA ACAG	128	TGTGCCAGCA GCCATGGGCA A GGTTATAACT ATGGCTACAC CTTC	136	GACCGAG GT TCCAGTCC C	137	ATATACTC CAATGGTGAC	138	TGTGCCGTGAACA TCC TCGCATCAGGAGG AA	139
5	071	ATGAACCA TGAATAC	140	TCAGTT GGT GCTGGT ATC	122	TGTGCCAGCAG TTACGTGGGGA ACACCGGGGAG CTGTTTTT	141	ACAATCAG TGG AACTGATT AC	124	GGTCTTAC AAGCAAT	125	TGCATCCTGCGG CCTGACAGCTGGG GGAAATTCAGTTT	126
6	090	ATGAACCA TGAGTAT	142	TCAATG AAT GTTGAG GTG	143	TGTGCCAGCAG TTTACGGGGG CCTTATGGCTA CACCTTC	144	GACAGTGC C TCAAAC TAC	145	ATTGTTCAAA TGTGGGCGAA	146	TGTGCAGCAACGG GCTATGGTCAGAA TTTTGICITTT	147
7	108	CTGGGGCA TAAACGCT	127	TACAAC TTTA AAGAAG AG	128	TGTGCCAGCAG CCAA GGCCAGGCTA CACCTTC	148	GACAGTGC CTCAAAC TAC	145	ATTGTTCAAA TGTGGGCGAA	146	TGTGCAGCAAGTAT GAAGGATAGCAGCT ATAAAATTGATCTTC	149
8	167	GACTTTCA GGCCACAA CT	150	TCCAAT GAGG GCTCCA AGGCC	151	TGCAGTGTAT GACAGTCA TGAACACTGAA GCTTCTTT	152	ACAATCAG TG GAACTGAT TAC	124	GGTCTTA CAAGCAAT	125	TGCATCCTGCGGC TGACAGCTGGGGG AATTCAGTTT	126
9	184	TCTGGGCA C AAGAGT	153	TATTAT GAGAA AGAAAG G	154	TGTGCCAGCAG CTTGGGCA GCTATGACTAC ACCTTC	155	AACAGCAT GTT TGATTAT	156	ATAAGTCC ATTAAGGATAAA	157	TGTGCAGCAAGGAA GA ATTATGGAGGAAGC CA AGGAAATCTCATCT TT	158
10	188	GACTTTCA GGCCACAA CT	150	TCCAAT GAGG GCTCCA AGGCC	151	TGCAGTGTAA GGAGG GGACTGAAGCT TTCTTT	159	ACAATCAG TG GAACTGAT TAC	124	GGTCTTA CAAGCAAT	125	TGCATCCTGAATAC CG GCACTGCCAGTAA CT CACCTTT	160
11	317	CTGGGGCA T AACGCT	127	TACAAC TTTAA AGAACA G	128	TGTGCCAGCAG CCAAG GCCAGGCTAC ACCTTC	148	GACCGAGG T TCCAGTCC C	137	ATATACTC CAATGGTGAC	138	TGTGCCGTGAAC CT CGCCCTACAAGCTC AG CTTT	161

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности для TCR VelociT™, специфических в отношении NY-ESO-1 (157-165)/HLA-A2

Название домена	Название последовательности	
	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO)	Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO)
TCR001 V $\alpha$	DAKTTQPNSMESNEEPPVHLPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIH GLTSNVNRMASLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILRPDSWGKF QFGAGTQVVVTP (SEQ ID NO:9)	GATGCTAAGACCACACAGCCAAATTCAATGGAGAGTAACGAAGAAG AGCCTGTTCACCTTGCCCTTGTAACCACTCCACAATCAGTGGAACTGAT TACATACATTGGTATCGACAGCTTCCCTCCCAGGGTCCAGAGTACGT GATTCATGGTCTTACAAGCAATGTGAACAACAGAATGGCCTCTCTGG CAATCGCTGAAGACAGAAAGTCCAGTACCTTGATCCTGCACCGTGCT ACCTTGAGAGATGCTGCTGTGTACTACTGCATCCTGCGGCCTGACAG CTGGGGGAAATTCCAGTTTGGAGCAGGGACCCAGGTTGTGGTCACC CCAG (SEQ ID NO: 10)
TCR001 V $\beta$	NAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQCAQDMNHNYMYWYRQDPGMGLKLIY YSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTEYFPLRLELAAPSQTSVYFCASSYS GGSPHFNGTRTLVT (SEQ ID NO: 7)	AATGCTGGTGTCACTCAGACCCAAAATCCGCATCCTGAAGATAGG ACAGAGCATGACACTGCAGTGTGCCAGGATATGAACCATAACTAC ATGTACTGGTATCGACAAGACCCAGGCATGGGGCTGAAGCTGATTT ATTATTCAGTTGGTGTGGTATCACTGATAAAGGAGAAGTCCCGAAT GGCTACAACGTCTCCAGATCAACCACAGAGTATTTCCCGCTCAGGCT GGAGTTGGCTGCTCCCTCCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCA GTTACTCGGGGGTTCACCCCTCCACTTTGGGAACGGGACCAGGCTC ACTGTGACAG (SEQ ID NO: 8)
TCR018 V $\alpha$	AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCYDTSYDSESDYYLFWYKQPPSRQMILVI RQEAYKQQNATENRFSVNFQKA AKSFSCLKISDSQLGDAAMYFCAYRSA NSGYALNFGKGTSLLVTP (SEQ ID NO: 19)	GCTCAGACAGTCACTCAGTCTCAACCAGAGATGTCTGTGCAGGAGG CAGAGACCGTGACCCTGAGCTGCACATATGACACCAGTGAGAGTGA TTATTATTTATTCTGGTACAAGCAGCCTCCCAGCAGGCAGATGATTC TCGTTATTCGCCAAGAAGCTTATAAGCAACAGAATGCAACAGAGAA TCGTTTCTCTGTGAACCTCCAGAAAGCAGCCAAATCCTTCAGTCTCA

	<p>AGATCTCAGACTCACAGCTGGGGGATGCCGCGATGTATTTCTGTGCT TATAGGAGCGCAAATTCGGGTATGCACTCAACTTCGGCAAAGGCA CCTCGCTGTTGGTCACACCC (SEQ ID NO: 20)</p>
TCR018 V $\beta$	<p>ETGVTQTPRHLVGMGMNKKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELM FVYNFKEQTENNSVPSRFSPECNSSLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQA HYTEAFFGQGTRLTVV (SEQ ID NO: 17)</p> <p>GAAACGGGAGTTACGCAGACACCAAGACACCTGGTCATGGGAATGA CAAATAAGAAGTCTTTGAAATGTGAACAACATCTGGGGCATAACGC TATGTATTGGTACAAGCAAAGTGCTAAGAAGCCACTGGAGCTCATGT TTGTCTACAACCTTTAAAGAACAGACTGAAAACAACAGTGTGCCAAG TCGCTTCTCACCTGAATGCCCCAACAGCTCTCACTTATTCCTCACCT ACACACCCTGCAGCCAGAAGACTCGGCCCTGTATCTCTGTGCCAGCA GCCAAGCACACTACACTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCAGACTC ACAGTTGTA (SEQ ID NO: 18)</p>
TCR050 V $\alpha$	<p>DAKTTQPNSMESNEEPPVHLPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIH GLTSNVNRMASLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILREGNNDM RFGAGTRLTVKP (SEQ ID NO: 29)</p> <p>GATGCTAAGACCACACAGCCAAATTCAATGGAGAGTAACGAAGAAG AGCCTGTTCACTTGCCTTGTAACCACTCCACAATCAGTGGAACCTGAT TACATACATTGGTATCGACAGCTTCCCTCCCAGGGTCCAGAGTACGT GATTCATGGTCTTACAAGCAATGTGAACAACAGAATGGCCTCTCTGG CAATCGCTGAAGACAGAAAGTCCAGTACCTTGATCCTGCACCGTGCT ACCTTGAGAGATGCTGCTGTGTACTACTGCATCCTGAGAGAGGGGA ACAATGACATGCGCTTGGAGCAGGGACCAGACTGACAGTAAAACC A (SEQ ID NO: 30)</p>
TCR050 V $\beta$	<p>NAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQCAQDMNHNYMYWYRQDPGMGLKLIY YSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTEYFPLRLELAAPSQTSVYFCASSWT DNQPQHFGDGTRLSIL (SEQ ID NO: 27)</p> <p>AATGCTGGTGTCACCTCAGACCCCAAATTCGCGATCCTGAAGATAGG ACAGAGCATGACACTGCAGTGTGCCAGGATATGAACCATAACTAC ATGTAAGTGGTATCGACAAGACCCAGGCATGGGGCTGAAGCTGATTT ATTATTCAGTTGGTGTGCTGCTGATCACTGATAAAGGAGAAGTCCCGAAT GGCTACAACGTCTCCAGATCAACCACAGAGTATTTCCCGCTCAGGCT GGAGTTGGCTGCTCCCTCCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCA</p>

	GCTGGACAGACAATCAGCCCCAGCATTTTGGTGATGGGACTCGACTC TCCATCCTA (SEQ ID NO: 28)
TCR063 V $\alpha$	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSI YSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCAVNILASGGS YIPTFGRGTSLIVHP (SEQ ID NO: 39) CAGAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGGACCCCTCAGTGTTCCAGAGG GAGCCATTGCCTCTCTCAACTGCACTTACAGTGACCGAGGTTCCAG TCCTTCTTCTGGTACAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTGAGTTGAT AATGTCCATATACTCCAATGGTGACAAAGAAGATGGAAGGTTTACA GCACAGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGAGA CTCCCAGCCCAGTGATTTCAGCCACCTACCTCTGTGCCGTGAACATCC TCGCATCAGGAGGAAGCTACATACCTACATTTGGAAGAGGAACCAG CCTTATTGTTTCATCCG (SEQ ID NO: 40)
TCR063 V $\beta$	ETGVTQTPRHLVGMNTNKKSLKCEQHLGHNAMYWYKQSAKKPLELM FVYNFKEQTENNSVPSRFSPECPNSSHLFLHLHTLQPEDSALYLCASSHG TGYNYGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO: 37) GAAACGGGAGTTACGCAGACACCAAGACACCTGGTCATGGGAATGA CAAATAAGAAGTCTTTGAAATGTGAACAACATCTGGGGCATAACGC TATGTATTGGTACAAGCAAAGTGCTAAGAAGCCACTGGAGCTCATGT TTGTCTACAACITTTAAAGAACAGACTGAAAACAACAGTGTGCCAAG TCGCTTCTCACCTGAATGCCCAACAGCTCTCACTTATTCCTCACCT ACACACCCTGCAGCCAGAAGACTCGGCCCTGTATCTCTGTGCCAGCA GCCATGGGACAGGTTATAACTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACC AGGTTAACCGTTGTAG (SEQ ID NO: 38)
TCR071 V $\alpha$	DAKTTQPNSMESNEEPPVHLPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIH GLTSNVNRMASLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILRPDSWGKF QFGAGTQVVVTP (SEQ ID NO: 49) GATGCTAAGACCACACAGCCAAATTCAATGGAGAGTAACGAAGAAG AGCCTGTTCACTTGCCCTTGTAACTCCACAATCAGTGGAAGTATGAT TACATACATTGGTATCGACAGCTTCCCTCCCAGGGTCCAGAGTACGT GATTCATGGTCTTACAAGCAATGTGAACAACAGAATGGCCTCTCTGG CAATCGCTGAAGACAGAAAGTCCAGTACCTTGATCCTGCACCGTGCT ACCTTGAGAGATGCTGCTGTGTACTACTGCATCCTGCGGCCTGCACG CTGGGGGAAATTCCAGTTTGGAGCAGGGACCCAGGTTGTGGTCACC CCAG (SEQ ID NO: 50)

TCR071 V $\beta$	<p>NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLI  HYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSY  VGNTGELFFGEGSRLTVL (SEQ ID NO: 47)</p> <p>AATGCTGGTGTCACTCAGACCCCAAATTCAGGTCCTGAAGACAG  GACAGAGCATGACTGCAGTGTGCCAGGATATGAACCATGAATA  CATGTCCTGGTATCGACAAGACCCAGGCATGGGGCTGAGGCTGATT  ATTACTCAGTTGGTGTGTTATCACTGACCAAGGAGAAGTCCCAAT  GGCTACAATGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTTCCCGCTCAGGCT  GCTGTCGGCTGCTCCCTCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCA  GTTACGTGGGAACACCGGGGAGCTGTTTTTTGGAGAAGGCTCTAG  GCTGACCGTACTG (SEQ ID NO: 48)</p>
TCR090 V $\alpha$	<p>GENVEQHPSTLSVQEGDSSVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIID  RSNVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAATGYGQNF  VFGPGTRLSVLP (SEQ ID NO: 59)</p> <p>GGAGAGAATGTGGAGCAGCATCCTTCAACCCTGAGTGTCCAGGAGG  GAGACAGCTCTGTTATCAAGTGTACTTATTCAGACAGTGCCTCAAAC  TACTCCCTTGGTATAAGCAAGAAGTGGAAAAAGACCTCAGCTTAT  TATAGACATTCGTTCAAATGTGGGCGAAAAGAAAGACCAACGAATT  GCTGTTACATTGAACAAGACAGCCAAACATTTCTCCCTGCACATCAC  AGAGACCCAACCTGAAGACTCGGCTGTCTACTTCTGTGCAGCAACGG  GCTATGGTCAGAATTTTGTCTTTGGTCCCGGAACCAGATTGTCCGTG  CTGCCA (SEQ ID NO: 60)</p>
TCR090 V $\beta$	<p>EAQVTQNPRYLITVTGKCLTVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIY  YSMNVEVTDKGDVPEGYKVSREKRNFPPLILESPSPNQTSLYFCASSLR  GPYGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO: 57)</p> <p>GAAGCCCAAGTGACCCAGAACCCAAGATACCTCATCACAGTACTG  GAAAGAAGTTAACAGTACTTGTCTCAGAATATGAACCATGAGTAT  ATGTCCTGGTATCGACAAGACCCAGGGCTGGGCTTAAGGCAGATCT  ACTATTCAATGAATGTTGAGGTGACTGATAAGGGAGATGTTCCCTGAA  GGGTACAAAGTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAATTTCCCCTGATCC  TGGAGTCGCCAGCCCAACCAGACCTCTCTGTACTTCTGTGCCAGC  AGTTTACGGGGGCCTTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCAGGTT  AACCGTTGTA (SEQ ID NO: 58)</p>
TCR108 V $\alpha$	<p>GENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIID  RSNVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAASMKDSSY</p>

	<p>KLIFGSGTRLLVVP (SEQ ID NO: 69)</p> <p>GGAGAGAATGTGGAGCAGCATCCTTCAACCCTGAGTGTCCAGGAGG  GAGACAGCGCTGTTATCAAGTGTACTTATTCAGACAGTGCCTCAAAC  TACTTCCCTTGGTATAAGCAAGAAGCTTGGAAAAAGACCTCAGCTTAT  TATAGACATTGTTCAAAATGTGGGCGAAAAGAAAGACCAACGAATT  GCTGTTACATTGAACAAGACAGCCAAACATTTCTCCCTGCACATCAC  AGAGACCCAACCTGAAGACTCGGCTGTCTACTTCTGTGCAGCAAGTA  TGAAGGATAGCAGCTATAAATTGATCTTCGGGAGTGGGACCAGACT  GCTGGTCAGGCCT (SEQ ID NO: 70)</p>
TCR108 V $\beta$	<p>ETGVTQTPRHLVGMGTNKKSLKCEQHLGHNAMEYWKQSAKKPLELM  FVYNFKEQTENNSVPSRFSPECNSSLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQG  PGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO: 67)</p> <p>GAAACGGGAGTTACGCAGACACCAAGACACCTGGTCATGGGAATGA  CAAATAAGAAGTCTTTGAAATGTGAACAACATCTGGGGCATAACGC  TATGTATTGGTACAAGCAAAGTGCTAAGAAGCCACTGGAGCTCATGT  TTGTCTACAACCTTAAAGAACAGACTGAAAACAACAGTGTGCCAAG  TCGCTTCTCACCTGAATGCCCAACAGCTCTCACTTATTCCTCACCT  ACACACCCTGCAGCCAGAAGACTCGGCCCTGTATCTCTGTGCCAGCA  GCCAAGGCCAGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCAGGTTAACCGTT  GTA (SEQ ID NO: 68)</p>
TCR167 V $\alpha$	<p>DAKTTQPNSMESNEEPPVHLPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIH  GLTSNVNRMASLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILRPDSWGKF  QFGAGTQVVVTP (SEQ ID NO: 79)</p> <p>GATGCTAAGACCACACAGCCAAATTCATGGAGAGTAACGAAGAAG  AGCCTGTCACTTGCTTGTAACCACTCCACAATCAGTGGAAGTATGAT  TACATACATTGGTATCGACAGCTTCCCTCCCAGGGTCCAGAGTACGT  GATTCATGGTCTTACAAGCAATGTGAACAACAGAATGGCCTCTCTGG  CAATCGCTGAAGACAGAAAGTCCAGTACCTTGATCCTGCACCGTGCT  ACCTTGAGAGATGCTGCTGTGTACTACTGCATCCTGCGGCCTGACAG  CTGGGGGAAATTCCAGTTTGAGACAGGGACCCAGGTTGTGGTCACC  CCAG (SEQ ID NO: 80)</p>
TCR167 V $\beta$	<p>GAVVSQHPSWVICKSGTCVKIECRSLDFQATTFWYRQFPKQSLMLMA  TSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVAGAHPEPSSFYICSAM  TVMNTEAFFGQGTRLTVV (SEQ ID NO: 77)</p> <p>GGTGCTGTCGTCTCTCAACATCCGAGCTGGGTTATCTGTAAGAGTGG</p>

	<p>AACCTGTGTGAAGATCGAGTGCCGTTCCCTGGACTTTCAGGCCACAA  CTATGTTTTGGTATCGTCAGTTCCCGAAACAGAGTCTCATGTGATG  GCAACTTCCAATGAGGGCTCCAAGGCCACATACGAGCAAGGCGTCG  AGAAGGACAAGTTTCTCATCAACCATGCAAGCCTGACCTTGCCACT  CTGACAGTGGCCGGTGCCCATCCTGAAGACAGCAGCTTCTACATCTG  CAGTGCTATGACAGTCATGAACACTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCA  CCAGACTCACAGTTGTA (SEQ ID NO: 78)</p>
TCR184 V $\alpha$	<p>DQQVKQNSP SLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISI  SSIKDKNEDGRFTVFLNLSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAARKNYGGS  QGNLIFGKGTKLSVKP (SEQ ID NO: 89)</p> <p>GACCAGCAAGTTAAGCAAATTCACCATCCCTGAGCGTCCAGGAAG  GAAGAATTTCTATTCTGAACTGTGACTATACTAACAGCATGTTTGAT  TATTCCTATGGTACAAAAAATACCTGCTGAAGGTCTACATTCCT  GATATCTATAAGTTCCATTAAGGATAAAAAATGAAGATGGAAGATTC  ACTGTTTTCTTAAACAAAAGTGCCAAGCACCTCTCTCTGCACATTGT  GCCCTCCAGCCTGGAGACTCTGCAGTGTACTTCTGTGCAGCAAGGA  AGAATTATGGAGGAAGCCAAGGAAATCTCATCTTTGGAAAAGGCAC  TAAACTCTCTGTAAACCA (SEQ ID NO: 90)</p>
TCR184 V $\beta$	<p>DAGVTQSPHLIKTRGQQVTLRCSPIGHKSVSWYQQVLGQGPQFIFQY  YEKEERGRGNFPDRFSARQFPNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSLGSY  DYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO: 87)</p> <p>GACGCTGGAGTCACCCAAAGTCCCACACACCTGATCAAAACGAGAG  GACAGCAAGTGACTCTGAGATGCTCTCCTATCTCTGGGCACAAGAGT  GTGTCCTGGTACCAACAGGTCTGGGTCAGGGGCCCCAGTTTATCTT  TCAGTATTATGAGAAAGAAGAGAGAGGAAGAGGAAACTTCCCTGAT  CGATTCTCAGCTCGCCAGTTCCTAACTATAGCTCTGAGCTGAATGT  GAACGCCTTGTTGCTGGGGACTCGGCCCTGTATCTCTGTGCCAGCA  GCTTGGGCAGCTATGACTACACCTTCGGTTCGGGGACCAGGTTAACC  GTTGTA (SEQ ID NO: 88)</p>
TCR188 V $\alpha$	<p>DAKTTQPNSMESNEEPPVHLPNHSITSGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIH  GLTSNVNRMASLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILNTGTASKL  TFGTGTRLQVTL (SEQ ID NO: 99)</p> <p>GATGCTAAGACCACACAGCCAAATTCATGGAGAGTAACGAAGAAG  AGCCTGTTCACTTGCCTTGTAACCACTCCACAATCAGTGGAAGTGT  TACATACATTGGTATCGACAGCTTCCCTCCAGGGTCCAGAGTACGT</p>

	GATTCATGGTCTTACAAGCAATGTGAACAACAGAATGGCCTCTCTGG CAATCGCTGAAGACAGAAAGTCCAGTACCTTGATCCTGCACCGTGCT ACCTTGAGAGATGCTGCTGTGTACTACTGCATCCTGAATACCGGCAC TGCCAGTAAACTCACCTTTGGGACTGGAACAAGACTTCAGGTCACGC TC (SEQ ID NO: 100)
TCR188 V $\beta$	GAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMA TSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSAKE GTEAFFGQGTRLTVV (SEQ ID NO: 97) GGTGTGTCGTCTCTCAACATCCGAGCTGGGTTATCTGTAAGAGTGG AACCTCTGTGAAGATCGAGTGCCGTTCCCTGGACTTTCAGGCCACAA CTATGTTTTGGTATCGTCAGTTCGCCGAAACAGAGTCTCATGCTGATG GCAACTTCCAATGAGGGCTCCAAGGCCACATACGAGCAAGGCGTCCG AGAAGGACAAGTTTCTCATCAACCATGCAAGCCTGACCTTGCCACT CTGACAGTGACCAGTGCCCATCCTGAAGACAGCAGCTTCTACATCTG CAGTGCTAAGGAGGGGACTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCAGA CTCACAGTTGTA (SEQ ID NO: 98)
TCR317 V $\alpha$	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSI YSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCVNSSPYKLS FGAGTTTVRA (SEQ ID NO: 109) CAGAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGGACCCCTCAGTGTTCAGAGG GAGCCATTGCCTCTCTCAACTGCATTACAGTGACCGAGGTTCCAG TCCTTCTTCTGGTACAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTGAGTTGAT AATGTCCATATACTCCAATGGTGACAAAGAAGATGGAAGGTTTACA GCACAGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGAGA CTCCCAGCCCAGTGATTCAGCCACCTACCTCTGTGCCGTGAACTCCT CGCCCTACAAGCTCAGCTTTGGAGCCGGAACCACAGTAACTGTAAG AGCA (SEQ ID NO: 110)
TCR317 V $\beta$	ETGVTQTPRHLVGMGMNKKSLKCEQHLGHNAMEWYKQSAKKPLELM FVYNFKEQTENNSVPSRFSPECNSSHFLHLHTLQPEDSALYLCASSQG PGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID NO: 107) GAAACGGGAGTTACGCAGACACCAAGACACCTGGTTCATGGGAATGA CAAATAAGAAGTCTTTGAAATGTGAACAACATCTGGGGCATAACGC TATGTATTGGTACAAGCAAAGTGCTAAGAAGCCACTGGAGCTCATGT TTGTCTACAAC'TTAAAGAACAGACTGAAAACAACAGTGTGCCAAG TCGCTTCTCACCTGAATGCCCAACAGCTCTCACTTATTCTTACCT
	ACACACCCTGCAGCCAGAAGACTCGGCCCTGTATCTCTGTGCCAGCA GCCAAGGCCAGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCAGGTTAACCGTT GTA (SEQ ID NO: 108)

Пример 2. Репортерный люциферазный анализ Т-лимфоцитов/APC для измерения и оценки специфической активности Т-клеточного рецептора.

Активацию Т-клеток достигают за счет стимуляции Т-клеточных рецепторов (TCR), которые распознают специфические пептиды, презентруемые белками I или II класса главного комплекса гистосовместимости на антигенпрезентирующих клетках (APC). Активированные TCR, в свою очередь, иницируют каскад сигнальных событий, которые могут отслеживаться репортерными генами, управляемыми факторами транскрипции, такими как активатор-белок 1 (AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или ядерный фактор энхансер каппа-легкой цепи активированных В-клеток (NF $\kappa$ b).

Разрабатывали биоанализ для измерения опосредованной TCR передачи сигналов Т-лимфоцитами, индуцированной взаимодействием между HLA-A2/NY-ESO-1 (157-165) человека ДТ-специфическим TCR и HLA-A2+ APC, презентрующими пептид NY-ESO-1. Клон Jurkat J.RT3.T3.5 (ATCC № TIB-153), в котором отсутствует собственный эндогенный TCR, трансдуцировали лентивирусами, кодирующими

гены CD8A/B человека, репортер люциферазы Signal Lenti AP-1 (Qiagen - SABiosciences, № CLS-011L ) и NY-ESO-1-специфические TCR, полученные либо в результате иммунизации мышей VelociT™ (WO 2016/164492), либо из опубликованных TCR NY-ESO-1 компаратора (1G4 и клон 113: Li, Y. et al. Nat Biotechnol 2005;23:349-354).

В биоанализе на основе люциферазы RPMI1640 с добавлением 10% FBS и пенициллина/стрептомицина/глутамин использовали в качестве среды для анализа для приготовления клеточных суспензий и разведений. Последовательные разведения HLA-A2+ 293Т клеток проводили в 96-луночных планшетах с круглым дном, начиная с  $3,0 \times 10^5$  клеток с 2-кратными разведениями со снижением. Затем APC переносили в 96-луночный белый планшет с плоским дном (Nunc № 136102) в 40 мкл и вводили 100 мкМ пептида NY-ESO-1 в течение 2 часов. Репортерные Т-клетки готовили в суспензии  $1,25 \times 10^6$  клеток/мл и добавляли 40 мкл на лунку ( $5 \times 10^4$  клеток/лунка). Планшеты, содержащие кокультуру, инкубировали в течение 5 ч при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Затем после добавления реагента ONE-Glo™ (Promega, № E6110) определяли активность люциферазы и измеряли относительные световые единицы (RLU) на микропланшет-ридере SpectraMax M5.

В то время как нерелевантный TCR № 229, происходящий из VelociT™, не проявлял активности в отношении пептида NY-ESO-1, все четыре TCR, рестриктированные по HLA-A2/NY-ESO-1, реагировали с целевыми клетками зависимым от концентрации образом, измеряемой с помощью активности люциферазы AP-1 (фиг. 1). Специфическая активность этих TCR определяли как отношение RLU к введенным к пептиду APC, деленное на RLU к APC без введения. Удельная активность этих четырех TCR, происходящих из VelociT™, была значительно выше, чем TCR компаратора 1G4, происходящего от пациента, а также его созревшего производного *in vitro*, 113. (табл. 4).

Таблица 4

ID TCR	Соотношение сигнала к шуму (S/N)
TCR №229	1
Клон компаратора 113	2,3
TCR №188	5,1
Компаратор 1G4	6,3
TCR №063	11,2
TCR №050	15,5
TCR №001	25,4

Пример 3. Прогнозирование потенциальных нецелевых пептидов.

С учетом комплекса целевого 9-мерного пептида-HLA-A2 ассоциированный потенциальный нецелевой пептид определяли на основании двух критериев: А) пептид представляет собой 9-мер и предположительно связывает HLA-A2, и В) пептид подобен целевому пептиду на основании гомологии последовательностей. Следовательно, для прогнозирования потенциальных нецелевых пептидов, ассоциированных с SLLMWITQC (NY-ESO-1; SEQ ID NO: 111) использовали следующую методику.

В качестве первой стадии канонические последовательности белков человека загружали из базы данных UniprotKB (версия от сентября 2014 г.) (Magrae, Michele, and UniProt Consortium. Database 2011 (2011): bar009) и извлекали все 9-меры. В результате получали 11118076 пептидов из 20014 белковых последовательностей.

Затем рассчитывали аффинность связывания пептидов с HLA-A2 с использованием веб-сервера NetMHCstab (версия 1.0) (Jørgensen, Kasper W., et al. (2014) Immunology 141(1): 18-26). Было предсказано, что пептиды со значением аффинности <500 нМ будут связывать HLA-A2, остальные устраняли, что приводило к тому, что оставались 338452 пептида.

Затем пептидные последовательности оценивали в отношении гомологии последовательности по отношению к целевому пептиду. Для каждого пептида рассчитывали его степень сходства (DoS) по отношению к целевому пептиду. Значение DoS представляет собой количество идентичных аминокислот в идентичных положениях между двумя пептидами. Пептиды со значением DoS  $\geq 5$  считались потенциально нецелевыми. Это привело к получению 1 нецелевого пептида с DoS=6 и 25 нецелевых пептидов с DoS=5.

Пептид с DoS=6, три случайно выбранных пептида из пептидов с DoS=5 и пептид, основанный на данных литературы, отбирали для экспериментальной проверки и они приведены в табл. 5 ниже.

Таблица 5

Предполагаемые нецелевые пептиды, подобные HLA-A2/NY-ESO-1:(157-165)  
(SLLMWITQC; SEQ ID NO: 111)

Пептидная последовательность	Название пептида	Ген	Предполагаемое значение IC50 (нМ)
SLLDIITNC (SEQ ID NO: 114)	EARS2:306-313	EARS2	114,3
SLLMSILAL (SEQ ID NO: 115)	MAGEN1:90-98	MAGEN1	33,7
LLTMHITQL (SEQ ID NO: 116)	FBXL22:4-12	FBXL22	133,8
SLLTWILHI (SEQ ID NO: 117)	URB1:1853-1861	URB1	10,0

Для оценки целевой специфичности TCR в отношении HLA-A2/NY-ESO-1, потенциальные нецелевые пептиды, аналогичные NY-ESO-1 (157-165), вводили в клетки HLA-A2+ 293T и также измеряли нецелевую реактивность в Т-клеточном репортерном анализе, описанном в примере 2 выше. Нерелевантный пептид, муциновый пептид LV9-5, также включали в этот анализ в качестве отрицательного контроля.

Как изображено на фиг. 2A-2E, происходящий от пациента компаратор 1G4 и два TCR, происходящие из VelociT™, не проявляли нецелевой активности. Наоборот, созревший *in vitro* клон компаратора TCR 113 неспецифически реагировал с клетками HLA-A2+ 293T, что указывает на то, что, хотя этот TCR с созревшей аффинностью имеет высокую аффинность связывания с комплексом HLA-A2/NY-ESO-1 (26 пМ, как сообщалось в работе Zhao et al, J Immunol. 2007 November 1; 179(9): 5845-5854), он также неспецифически активировался другими пептидами, связанными с HLA-A2. Неспецифическая активация Т-клеток человека рекомбинантным TCR могла приводить к токсичности при введении человеку в качестве лекарственного препарата.

Пример 4. Цитотоксическая активность.

Т-клеточные рецепторы создавали против пептида NY-ESO-1157-165 (SLLMWITC (SEQ ID NO: 164)), загружаемого в HLA-A2 с помощью платформы VelociT, как описано выше. Для анализа цитотоксической активности TCR001 переформатировали в составную структуру TCR, в которой человеческий константный домен TCR $\alpha$ - или TCR $\beta$ -цепи заменяли мышинным аналогом для повышения стабильности TCR для анализа. Вариабельные домены человека остались интактными. Для TCR $\beta$ -цепи использовали ген TRBC1 мыши. Перед получением VSV-псевдотипированного лентивируса TCR клонировали в бичесетронную конструкцию с использованием лентивирусного вектора pLVX, имеющего промотор EF1a и цепи TCR, связанные пептидным линкером 2A в одной ORF (фиг. 3). Пропуск пептидной связи во время трансляции mRNA на 3'-конце последовательности 2A приводила к образованию двух белков: слияния TCR $\alpha$ -цепи-2A и TCR $\beta$ -цепи. Для протеолитического удаления последовательности белка 2A, элементу 2A предшествовала последовательность, кодирующая сайт расщепления фурином, который представлен черным прямоугольником на фиг. 3.

Для избежания потенциального ошибочного спаривания между экзогенными и эндогенными цепями TCR, эндогенные TRAC и TRBC1/2 редактировали для предупреждения их экспрессии с помощью CRISPR/Cas9. Конструировали модифицированные синтетические направляющие РНК TrueGuide (sgRNA), которые связывались возле 5' конца первого экзона гена TRAC, и оба гена TRBC1/2, и они представлены ниже в табл. 6. Было предсказано, что ни одна из последовательностей sgRNA не связывается с последовательностью TCR001.

Таблица 6

Целевой аллель	Последовательности sgRNA	
	Последовательность sgRNA	SEQ ID NO.
TRAC	TCTCTCAGCTGGTACAC	162
	GGC	
TRBC1/2	CAAACACAGCGACCTCG	163
	GGT	

Первичные Т-клетки человека выделяли из нормальных здоровых донорских РВМС и стимулировали микрогранулами CD3/CD28 плюс 100 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 человека в течение 48 ч в среде CTS OptMizer™. После начального периода активации  $3 \times 10^6$  Т-клеток ресуспендировали при концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в буфере для электропорации P2 (Lonza), дополненном sgRNA и белком TrueCut Cas9v2 (ThermoFisher) в молярном соотношении 3:1. Электропорацию проводили с использованием Lonza Shuttle Nucleofector и программы EH100P3. После электропорации аликвоту Т-клеток культивировали с IL-2 (100 Ед/мл) в течение 72 ч в культуральной среде cRPMI, когда потерю экспрессии эндоген-

ного TCR характеризовали путем оценки снижения экспрессии CD3 на клеточной поверхности (фиг. 4). Вторую аликвоту Т-клеток немедленно ресуспендировали в среде сRPMI и инфицировали путем центрифугирования лентивирусом (MOI=5), кодирующим TCR001, который специфичен для NY-ESO-1 (157-165) при переносе с помощью HLA-A2. Трансдуцированные Т-клетки экспандировали микрогранулами CD3/CD28 и рекомбинантным IL-2 человека (100 МЕ/мл) в течение 9 дней. Экзогенную экспрессию TCR001 затем оценивали с помощью окрашивания декстранером, и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, экспрессирующие составной TCR, значительно обогащали путем сортировки до чистоты >99% (фиг. 5А). Отсортированные клетки затем кокультивировали с облученными несовместимыми по HLA РВМС, выделенными от двух нормальных здоровых доноров и смешанными в соотношении 1:1, и несовместимой по HLA клеточной линией В-LCL. Несовместимые по HLA и облученные РВМС и В-LCL стимулирующие клетки объединяли в соотношении 5:1 соответственно. К культурам добавляли антитело к CD3 (клон ОКТ3) и IL-2 человека (50 МЕ/мл) и экспандировали в среде сRPMI с добавлением 10% сыворотки Ab человека в течение как минимум 12 дней после сортировки. IL-2 человека восполняли каждые 36-48 ч. После экспансии CD8<sup>+</sup> Т-клетки, экспрессирующие экзогенный композит TCR001, оставались значительно обогащенными (фиг. 5В). Контрольный декстранер использовали для определения фонового окрашивания и он неспецифический контрольный пептид.

Через 10 дней после экспансии после сортировки аликвоту экспандированных Т-клеток собирали, промывали и ресуспендировали в среде сRPMI. Для измерения антигензависимого цитолиза с помощью TCR001 использовали две линии целевых клеток: линию целевых клеток IM9, которая экспрессирует эндогенный белок NY-ESO-1, и линию клеток IM9, сконструированную для сверхэкспрессии одноцепочечного HLA-A2, презентующего пептид NY-ESO-1 (157-165) (обозначаемый IM9<sup>+</sup>). Линию целевых клеток IM9<sup>+</sup>, которая максимизировала плотность антигена, включали в качестве меры предосторожности против возможности того, что эндогенные уровни HLA-A2, нагруженного NY-ESO-1 (157-165) в клетках IM9, будут недостаточными для запуска TCR-опосредованной цитолитической активности. Два отрицательных контроля создавали для исследования антигенспецифического TCR-опосредованного уничтожения: клеточная линия K562, которая не экспрессирует белок NY-ESO-1, и нетрансдуцированные Т-клетки, которые экспандировали с использованием гранул с антителом к CD3/CD28 в присутствии 100 МЕ/мл IL-2 человека и использовали в качестве эффекторных Т-клеток. Каждую линию целевых и контрольных клеток собирали и загружали красителем кальцеин-АМ. После мечения кальцеином целевые клетки дважды промывали для удаления остаточного кальцеина. Затем Т-клетки и целевые клетки кокультивировали на 96-луночном круглодонном планшете при различных соотношениях и культивировали при 37°C в течение 2,5 ч, после чего собирали культуральный супернатант. Для определения того, высвобождается ли кальцеин спонтанно из клеточных линий целевых клеток, каждую клеточную линию культивировали в отсутствие эффекторных Т-клеток. Для определения максимально возможного высвобождения кальцеина линии целевых клеток культивировали и лизировали с использованием среды сRPMI, которую дополняли 1% детергентом Triton<sup>TM</sup> X-114. В супернатанте относительные уровни кальцеина измеряли с помощью планшет-ридера Viktor X4, и процент цитотоксичности рассчитывали как ((сигнал кальцеина - спонтанное высвобождение кальцеина)/(максимальное высвобождение кальцеина - спонтанное высвобождение кальцеина)) \* 100.

Как изображено на фиг. 6 и представлено в табл. 7 и 8, обогащенные и экспандированные Т-клетки, экспрессирующие TCR001, индуцировали устойчивый цитолиз как клеток IM9 (серые незаштрихованные кружки), так и клеток IM9<sup>+</sup> (незаштрихованные черные кружки), но не клеток K562 (заштрихованные черные кружки), в которых отсутствует экспрессия NY-ESO-1. Точно так же нетрансдуцированные и экспандированные Т-клетки, у которых отсутствует экспрессия композита TCR001 от того же нормального здорового донора, не могли уничтожить целевые клетки IM9 (черный квадратик), IM9<sup>+</sup> (темно-серый квадратик) и K562 (светло-серый квадратик), что свидетельствует о том, что цитолиз IM9 и целевых клеток IM9<sup>+</sup> зависели от TCR001. В то время как сверхэкспрессия HLA-A2/NY-ESO-1 (157-165) в клетках IM9 (как наблюдалось с клетками IM9<sup>+</sup>) не повышала максимальный уровень цитотоксичности по сравнению с клетками IM9, повышение цитолиза наблюдали, когда количество Т-клеток становилось ограничивающим при более низких соотношениях Т-клеток к целевым клеткам. В совокупности эти данные демонстрируют функциональность и специфичность TCR в отношении презентуемого HLA-A2 NY-ESO-1.

Таблица 7

Измеряемый цитолиз линий NY-ESO-1+ опухолевых клеток с использованием TCR001+ Т-клеток

Соотношение Т-клетка: целевая клетка	IM-9		IM-9++		K562	
	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD
50	72,6	2,1	70,0	2,0	0,7	0,5
25	65,4	1,6	68,7	1,2	н.о.	н.о.
12,5	55,6	0,1	65,9	0,7	н.о.	н.о.
6,25	44,4	0,3	57,3	0,5	н.о.	н.о.
3,125	28,9	1,8	43,6	0,4	н.о.	н.о.
1,56	16,2	0,4	25,6	0,7	н.о.	н.о.
0,78	8,3	0,3	13,3	0,1	н.о.	н.о.
0	0,2	1,3	0,0	0,4	н.о.	н.о.

SD: стандартное отклонение; н.о.: не определялось (соотношение Т-клетка:целевая клетка, равное 50, будет характеризоваться максимальным фоновым уничтожением по сравнению с другими соотношениями).

Таблица 8

Измеряемый цитолиз линий NY-ESO-1+ опухолевых клеток с использованием нетрансдуцированных и экспандированных Т-клеток

Соотношение Т-клетка: целевая клетка	IM-9 по сравнению с нетрансдуцированны ми Т-клетками		IM-9++ по сравнению с нетрансдуцированным и Т-клетками		K562 по сравнению с нетрансдуциров анными Т- клетками	
	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD
50	4,4	1,0	6,4	0,2	0,5	0,3

SD: Стандартное отклонение.

Эквиваленты.

Специалистам в данной области техники будут понятны или они смогут установить, используя не более чем рутинное экспериментирование, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления данного изобретения, описанных в данном документе. Такие эквиваленты охватываются следующей формулой изобретения. Содержание всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, процитированных в этом изобретении, включено в данный документ посредством ссылки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный Т-клеточный рецептор (TCR), который специфически связывается с презентруемым HLA-A2 пептидом плоскоклеточной карциномы 1 типа Нью-Йорк антигена рака яичек (NY-ESO-1), где указанный TCR содержит варибельный домен альфа-цепи TCR, содержащий области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, и варибельный домен бета-цепи TCR, содержащий области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно.

2. Выделенный TCR по п.1, отличающийся тем, что указанный TCR активирует Т-клеточный ответ приблизительно в два раза больший, или приблизительно в три раза больший, или приблизительно в четыре раза больший, чем NY-ESO-1-специфический TCR, происходящий от пациента, определенный с помощью TCR-опосредованного люминесцентного биоанализа передачи сигналов с участием Т-клеток.

3. Выделенный TCR по п.1, содержащий пару аминокислотных последовательностей варибельного домена альфа-цепи/варибельного домена бета-цепи SEQ ID NO: 9/7.

4. Выделенный TCR по любому из пп.1-3, дополнительно содержащий детектируемый фрагмент.

5. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный TCR по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

6. Выделенная клетка, презентрующая TCR по любому из пп.1-4.

7. Полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует вариабельный домен альфа-цепи выделенного TCR по любому из пп.1-4.

8. Полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует вариабельный домен бета-цепи выделенного TCR по любому из пп.1-4.

9. Вектор, содержащий полинуклеотидную молекулу по п.7 или 8.

10. Выделенная клетка, экспрессирующая вектор по п.9.

11. Способ лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества выделенного TCR по любому из пп.1-4, фармацевтической композиции по п.5 или клетки по п.10, тем самым осуществляя лечение субъекта.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанное заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, представляет собой рак, ассоциированный с NY-ESO-1.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что указанный рак, ассоциированный с NY-ESO-1, представляет собой липосаркому, нейробластому, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарную опухоль, мультиформную глиобластому, анапластическую астроцитому, опухоль головного мозга, рак маточных труб, рак эпителия яичников, первичный рак брюшной полости, распространенные солидные опухоли, саркому мягких тканей, меланому, саркому, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, болезнь Ходжкина, множественную миелому, синовиальную саркому, метастатические солидные опухоли, рабдомиосаркому, распространенный миксоид, круглоклеточную липосаркому, метастатическую меланому или рецидивирующий немелкоклеточный рак легких.

14. Способ по любому из пп.11-13, отличающийся тем, что указанный выделенный TCR, фармацевтическую композицию или клетку вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

15. Способ по любому из пп.11-14, отличающийся тем, что указанный выделенный TCR, фармацевтическую композицию или клетку вводят субъекту подкожно, внутривенно, внутривожно, внутривентриально, перорально, внутримышечно или внутривенно.

16. Полинуклеотидная молекула, кодирующая T-клеточный рецептор (TCR), при этом TCR специфически связывается с презентуемым HLA-A2 пептидом плоскоклеточной карциномы 1 типа Нью-Йорк антигена рака яичек (NY-ESO-1),

где указанный полинуклеотид кодирует вариабельный домен альфа-цепи TCR, содержащий области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно, и вариабельный домен бета-цепи TCR, содержащий области, определяющие комплементарность (CDR) 1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно.

17. Полинуклеотидная молекула по п.16, отличающаяся тем, что указанный выделенный TCR содержит пару аминокислотных последовательностей вариабельного домена альфа-цепи/вариабельного домена бета-цепи SEQ ID NO: 9/7.

18. Вектор, содержащий полинуклеотидную молекулу по п.16 или 17.

19. Выделенная клетка, содержащая вектор по п.18.

20. Способ лечения субъекта, имеющего заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, включающий введение субъекту клетку по п.19, тем самым осуществляя лечение субъекта.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что указанное заболевание или нарушение, ассоциированное с NY-ESO-1, представляет собой рак, ассоциированный с NY-ESO.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что указанный рак, ассоциированный с NY-ESO, представляет собой липосаркому, нейробластому, миелому, метастатическую меланому, синовиальную саркому, рак мочевого пузыря, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, астроцитарную опухоль, мультиформную глиобластому, анапластическую астроцитому, опухоль головного мозга, рак маточных труб, рак эпителия яичников, первичный рак брюшной полости, распространенные солидные опухоли, саркому мягких тканей, меланому, саркому, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, болезнь Ходжкина, множественную миелому, синовиальную саркому, метастатические солидные опухоли, рабдомиосаркому, распространенный миксоид, круглоклеточную липосаркому, метастатическую меланому или рецидивирующий немелкоклеточный рак легких.

23. Способ по любому из пп.20-22, отличающийся тем, что клетку вводят субъекту в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

24. TCR по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный выделенный TCR имеет свойство, выбранное из группы, состоящей из:

(а) не связывается специфически с клетками, экспрессирующими предполагаемые нецелевые пептиды, но не с пептидом NY-ESO-1, презентуемым HLA-A2, содержащим аминокислотную последовательность

довательность SEQ ID NO: 111, как определено с помощью люминесцентного анализа;

(b) не связывается с клетками, экспрессирующими предполагаемые нецелевые пептиды, как определено с помощью проточно-цитометрического анализа;

(c) активирует Т-клеточный ответ, имеющий соотношение сигнал/шум, большее или равное NY-ESO-1-специфического TCR, происходящего от пациента, определенное с помощью TCR-опосредованного люминесцентного биоанализа передачи сигнала с участием Т-клеток;

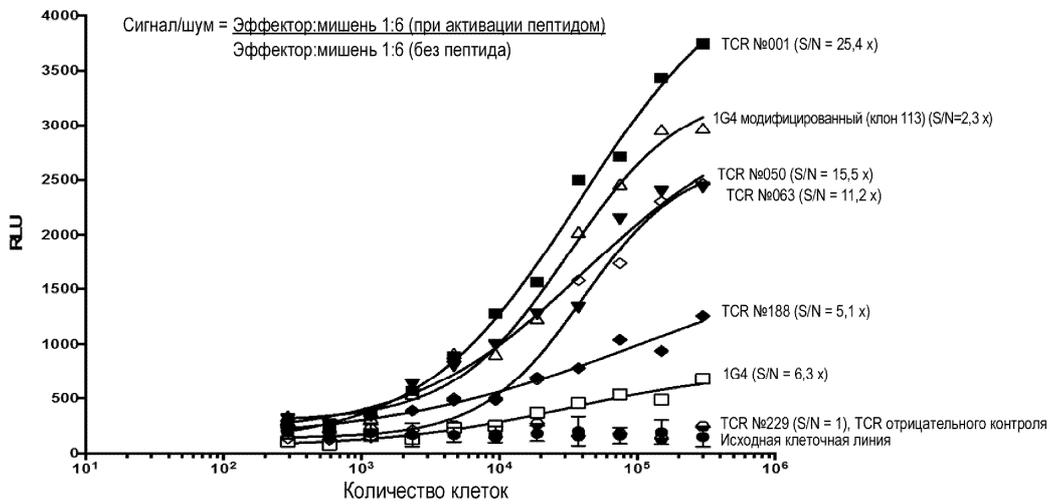
(d) активирует Т-клеточный ответ приблизительно в два раза больший, чем NY-ESO-1-специфического TCR, происходящего от пациента, определенный с помощью TCR-опосредованного люминесцентного биоанализа передачи сигнала с участием Т-клеток; и

(e) значение соотношения целевое связывание/нецелевое связывание, составляющее более 5, более 10, более 15, более 20, более 50, более 100, более 200, более 300, более 400, более 500, более 600, более 700, более 800, более 900 или более 1000.

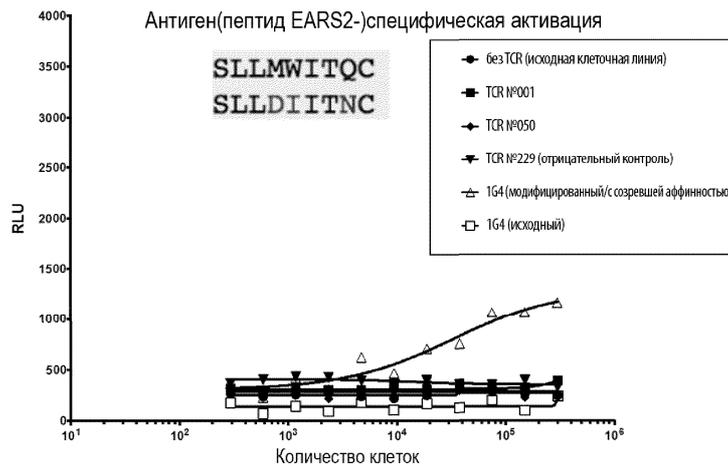
25. Клетка по любому из пп.6, 10 и 19, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой первичную клетку.

26. Клетка по п.25, отличающаяся тем, что указанная первичная клетка представляет собой первичный лимфоцит.

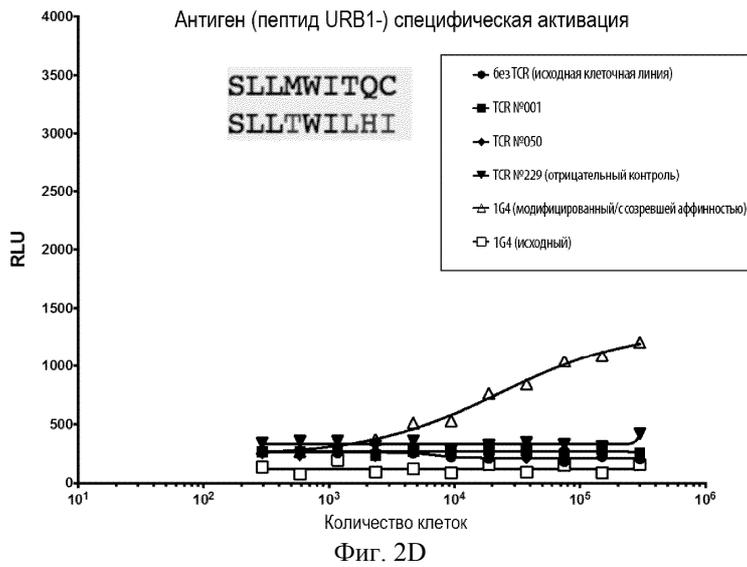
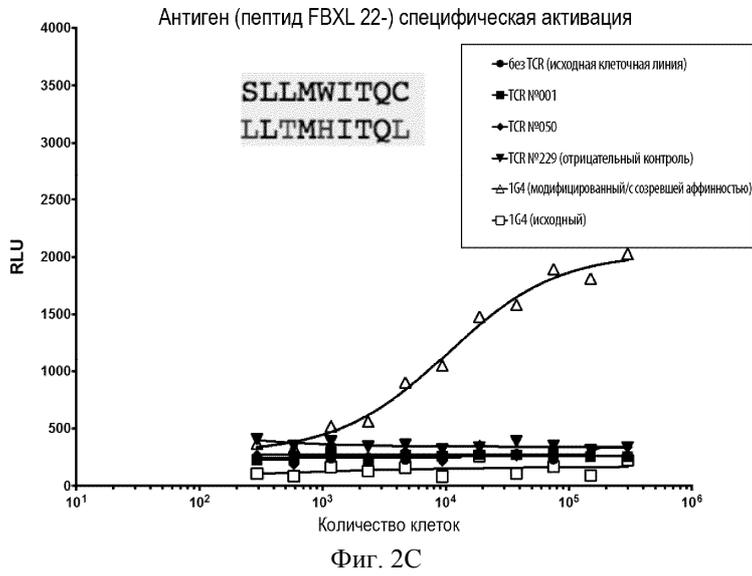
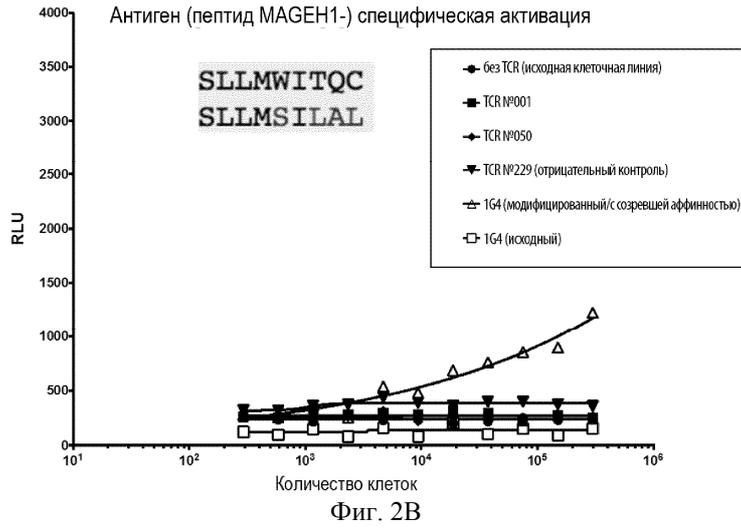
27. Клетка по п.26, отличающаяся тем, что указанный первичный лимфоцит представляет собой первичный Т-лимфоцит.

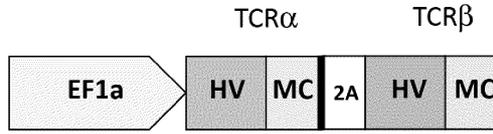
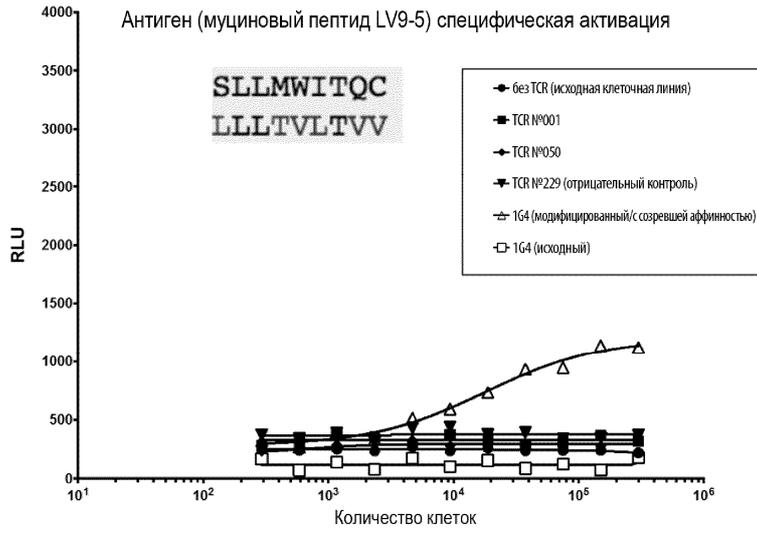


Фиг. 1



Фиг. 2А

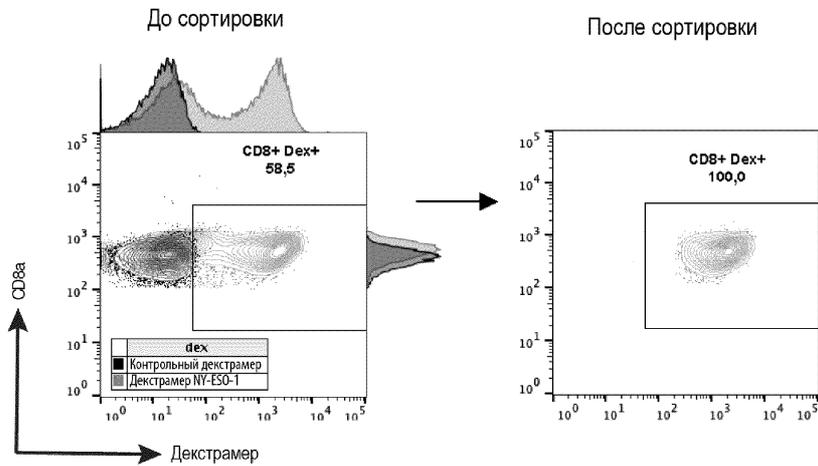
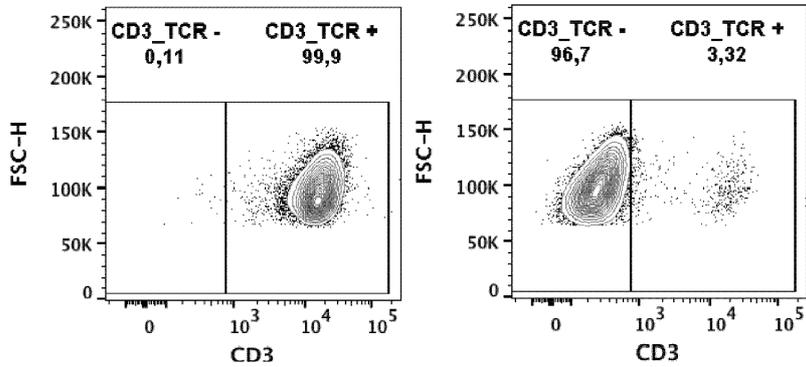


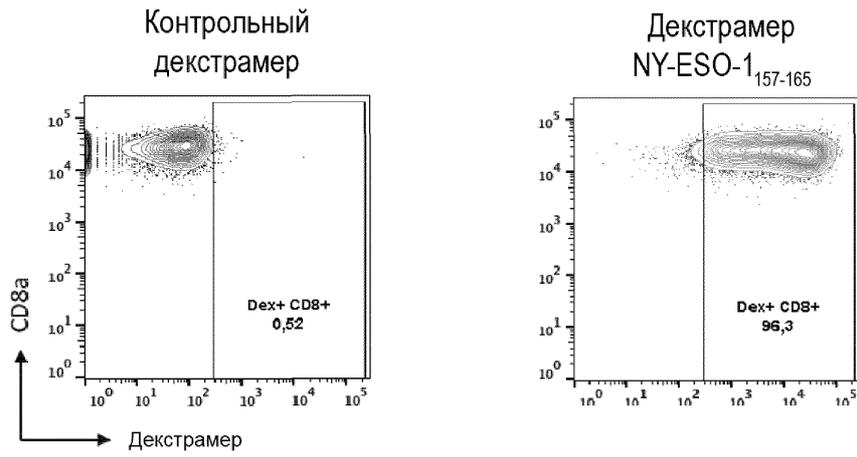


Фиг. 3

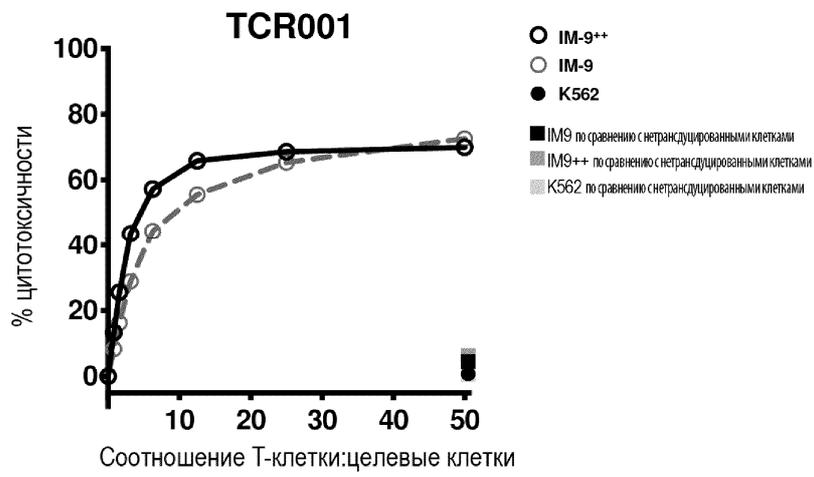
Имитационная  
электропорация

Направляющая РНК  
для TCR $\alpha$  + TCR $\beta$





Фиг. 5B



Фиг. 6