

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393115** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.03.29

(51) Int. Cl. *C07K 14/725* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.12.06

(54) **Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ С УЛУЧШЕННОЙ СПОСОБНОСТЬЮ К
СПАРИВАНИЮ**

(31) 10 2016 123 893.7; 62/497,895

(32) 2016.12.08

(33) DE; US

(62) 201991145; 2017.12.06

(71) Заявитель:

**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Бунк Себастьян, Маурер Доминик,
Фритше Йенс, Вагнер Клаудиа,
Альтен Леони, Хоффгаард
Франциска, Фербер Матиас (DE)**

(74) Представитель:

**Костюшенкова М.Ю., Строкова
О.В., Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.
(RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к модифицированным α - или β -цепям Т-клеточного рецептора (ТКР) или гетеродимерам, включающим их, где в вариабельном домене указанной модифицированной α - или β -цепи аминокислота в положении 44 согласно нумерации IMGT заменена на другую подходящую аминокислоту, чтобы улучшить спаривание желаемых цепей.

A1

202393115

202393115

A1

Т-клеточные рецепторы с улучшенной способностью к спариванию

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к модифицированным α - или β -цепям Т-клеточного рецептора (ТКР) или гетеродимерам, включающим их, где в переменном домене указанной модифицированной α - или β -цепи аминокислота в положении 44 согласно нумерации IMGT (международная иммуногенетическая информационная система) заменена на другую подходящую аминокислоту, чтобы улучшить спаривание желаемых цепей.

Уровень техники

Адаптивная иммунная система состоит из антител, В-клеток и $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток. Они вызывают высокоспецифичный ответ на конкретную иммуногенную мишень. Т-клеточные рецепторы (ТКР) являются гетеродимерными белками с дисульфидной связью, заякоренными на мембране, которые обычно состоят из высокопеременных альфа- (α) и бета- (β) цепей, экспрессирующихся как часть комплекса с молекулами CD3 с инвариантной цепью на поверхности Т-клеток. Важный этап в процессе формирования гетеродимера ТКР называется «спаривание». Т-клетки, экспрессирующие спаренные рецепторы, называются $\alpha:\beta$ (или $\alpha\beta$) Т-клетками, хотя меньшинство Т-клеток экспрессируют альтернативный рецептор, образованный переменными гамма- (γ) и дельта- (δ) цепями, они называются $\gamma\delta$ Т-клетками.

ТКР расположены на поверхности Т-клеток и, являясь молекулами с антигенными рецепторами, они отвечают за распознавание правильно процессированного антигена, презентруемого Т-клеткам молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК), что потенциально приводит к активации Т-клетки и реакции иммунной системы на антиген.

Каждая цепь ТКР состоит из двух внеклеточных доменов: переменной области (V) и константной области (C), обе из которых представляют собой антипараллельные β -складчатые слои, которые формируют домены, принадлежащие к надсемейству иммуноглобулинов (IgSF). Константная область расположена

проксимально к клеточной мембране, затем следует трансмембранная область и короткий цитоплазматический «хвост», тогда как переменная область связывается с комплексом пептид-МНС антигенпрезентирующей клетки.

Каждый из переменных доменов как α -цепи, так и β -цепи ТКР, имеют по три гиперпеременных или определяющих комплементарность участка (CDR), которые образуют антигенсвязывающий сайт. Переменная область β -цепи имеет дополнительный так называемый гиперпеременный участок (HV4), который обычно не контактирует с антигеном и поэтому не рассматривается как участок CDR. Важно отметить, что участки CDR 1 и 2 обеих цепей кодируются генами зародышевой линии, тогда как CDR3 α и β , в основном кодируются нешаблонно, но образуются за счет соматической рекомбинации (Davis & Bjorkman 1988). У человека разнообразие молекул ТКР достигается за счет α β -конъюгации набора, образованного последовательностями 47 V α и 54 V β , которые комбинируются для получения конечного разнообразия длин и последовательностей CDR3.

CDR3 являются главными участками CDR, отвечающими за распознавание указанного процессированного антигена, хотя CDR1 α -цепи, как было продемонстрировано, также взаимодействует с N-терминальной частью антигенного пептида (Cole et al. 2009), тогда как CDR1 β -цепи взаимодействует лишь изредка с C-терминальной частью этого пептида.

CDR2, как считается, в основном, распознает молекулу МНС. Область HV4 β -цепи, как считается, не участвует в распознавании антигена, однако, как было показано, взаимодействует с так называемыми суперантигенами (Li et al. 1998). Несмотря на повсеместно признанную систему понятий о связывании CDR1 и CDR2, в основном, с молекулой МНС, а CDR3 – с антигенным пептидом, в некоторых исследованиях обнаружили действительную сложность системы распознавания антигена ТКР, показав, что все области CDR могут изредка взаимодействовать как с антигеном, так и с МНС (Burrows et al. 2010, Roomp et al. 2011).

Подход адоптивного переноса был разработан для использования механизма в противораковой терапии (Rosenberg et al. 1988), причем Т-клетки, трансдуцированные генами, кодирующими α - и β -цепи опухолеспецифического Т-клеточного

рецептора (ТКР), опосредуют противоопухолевый иммунитет у пациентов. В последние годы этот подход был центром пристального внимания. В качестве стратегии генная терапия на основе ТКР обеспечивает пациентов аутологичными Т-клетками, которые, таким образом, претерпели генетическую модификацию за счет трансгенных цепей ТКР. Данная методика представляет собой многообещающий подход к лечению раковых и опухолевых заболеваний. В этих целях альфа- и бета-цепи ТКР, обнаруживающие/связывающиеся со специфическим комплексом антиген-МНС, клонируют в Т-клетку дикого типа, взятую у пациента. Трансгенная Т-клетка проходит затем стадию пролиферации *in vitro*, и клетки после пролиферации возвращают обратно пациенту, чтобы вызвать иммунный ответ против, к примеру, опухоли.

По сути, трансгенные Т-клетки, полученные таким способом, экспрессируют как ТКР дикого типа, имеющий альфа- и бета цепи дикого типа, так и трансгенный ТКР с альфа- и бета-цепями, специфическими для соответствующего рекомбинантного комплекса антиген-МНС. Альфа- и бета-цепи как дикого типа, так и трансгенные альфа- и бета-цепи, обычно все еще сохраняют способность для перекрестного образования пар друг с другом (Shao et al. 2010). Данная нежелательная реакция называется «ошибочное спаривание ТКР» и является общепризнанной проблемой в области (генной) терапии на основе ТКР.

Ошибочное спаривание и неверное спаривание α - или β -цепи трансгенного ТКР и β - или α -цепи эндогенного ТКР, соответственно, ведет к пониженной экспрессии трансгенного гетеродимера ТКР $\alpha\beta$ на клеточной поверхности, что, в свою очередь, снижает уровень функциональной avidности модифицированных Т-клеток. Кроме того, Т-клетки, экспрессирующие ошибочно спаренные ТКР, и культивированные в условиях высокого уровня ИЛ-2, индуцируют реакцию «трансплантат против хозяина» (GvHD), как было продемонстрировано в доклиническом исследовании (Bendle et al, 2009).

Некоторые стратегии для оптимизации спаривания α и β трансгенных ТКР в целях усиления функциональной avidности терапевтических Т-клеток обсуждались, например, в работе Govers и соавт. (2010).

Среди данных возможностей для предотвращения ошибочного спаривания находятся следующие:

1. Муринизированные ТКР: в данном подходе α - и β -константные домены цепей ТКР человека заменяют на соответствующие мышинные домены. Хотя человеческие и мышинные С-домены TCR-C демонстрируют высокую степень гомологии, небольшие различия влияют на стабильность взаимодействий между ТКР и CD3 и, следовательно, уровни поверхностной экспрессии ТКР.
2. ТКР, модифицированные цистеином: в рамках данного подхода аминокислоту цистеин вводят в благоприятное для структуры положение и, следовательно, делают возможным образование дополнительной дисульфидной связи, способствуя правильному спариванию между двумя цепями ТКР. Сайт-направленные мутации, например, T48C в константой альфа-цепи ТКР и S57C в константной бета-цепи ТКР приводили к образованию гетеродимера ТКР, связанного двумя межцепочечными связями (т. е., введенный дисульфидный мостик и эндогенный трансмембранный дисульфидный мостик (положение № 95 в альфа-константном домене и положение № 131 в бета-константном домене)).
3. Обмен доменами: Производится обмен константными доменами между α - и β -цепями опухолеспецифического Т-клеточного рецептора с получением ТКР с заменой домена (*domain-swapped, ds*). При корректном спаривании такие цепи dsТКР сохраняют все домены, необходимые для привлечения белков CD3, экспрессии на поверхности Т-клетки и опосредования функционального Т-клеточного ответа с участием антигена-мишени. Напротив, ошибочно спаренные ТКР, содержащие одну цепь dsТКР и одну цепь ТКР дикого типа, не имеют ключевых доменов, необходимых для привлечения CD3, экспорта и сигнальных реакций и, таким образом, они не в состоянии опосредовать вредную аутоиммунность.
4. Эксклюзивные гетеродимеры ТКР: в рамках данного подхода пространственные и электростатические силы используются для содействия правильному спариванию альфа- и бета-цепей трансгенных ТКР и, в то же время, ингибированию спаривания альфа- и бета-цепей экзогенных и эндогенных ТКР. В одном примере для введения S85R в константный домен альфа-цепи и R88G в константный домен бета-цепи используются сайт-направленные мутации, чтобы получить требуемые изменения в электростатическом заряде, и, следовательно, создать пространственно комплементарную структуру «выступ-во-впадину», которая, предположительно, минимально искажает вторичные и третичные структуры.

5. Использование цепи химерной конструкции ТКР-CD3 ζ , где каждая цепь ТКР слита с молекулой CD3 ζ .
6. Использование одноцепочечных ТКР, где V α определенного ТКР слит с бета-цепью с использованием гибкого пептидного линкера.
7. Использование последовательностей shPHK или нуклеаз с «цинковыми пальцами» для блокирования экспрессии эндогенного ТКР.

Другой подход был предложен O'Shea и соавт. (1993), которые сконструировали пару пептидов, названных «velcro», способных спариваться друг с другом вследствие благоприятных электростатических взаимодействий в гетеродимерном состоянии. Авторы продемонстрировали, что два пептида находятся преимущественно в несвернутом состоянии в выделенном виде, но склонны предпочтительно образовывать устойчивые гетеродимеры за счет формирования структуры «coiled-coil» с параллельной ориентацией. Этот подход применялся также Chang и соавт. (1994) в целях получения растворимого ТКР, в котором складывались благоприятные условия для образования гетеродимерного комплекса за счет слияния пептидов с усеченными альфа- и бета-цепями, соответственно.

В заявке WO 2014/153470 A2 раскрыты способы и композиции для модификации генов ТКР с применением нуклеаз (нуклеаз с «цинковыми пальцами» или нуклеаз TAL) в целях модификации генов ТКР за счет их направленного разрушения.

Заявка WO 2014/083173 относится к способу получения новых Т-клеточных рецепторов, обеспечивающего снижение риска побочных реакций при иммунной терапии, в особенности, при адоптивном переносе Т-клеток.

Заявка WO 2016/071343 A1 относится к модифицированным Т-клеточным рецепторам (ТКР) и их применению при адоптивной клеточной терапии (АКТ), в частности, для переноса Т-лимфоцитов. ТКР имеют мутации в трансмембранных областях альфа- и бета-цепей, и эти мутации благоприятствуют правильному спариванию цепей ТКР.

Вопреки тому, что выше упомянутые подходы являются многообещающими, некоторые затруднения, в том числе надлежащая экспрессия экзогенного ТКР, снижает их клинический эффект. Недостаточность клинических ответов свидетельствует о наличии многочисленных проблем, требующих решения. Поскольку функциональная avidность Т-клеток диктуется, в основном, как аффинностью ТКР, так и числом экспрессируемых молекул ТКР, было предпринято множество попыток, чтобы улучшить эти физико-биологические характеристики в клетках с модифицированными ТКР при использовании двух важных подходов: (а) улучшение аффинности ТКР и (б) усиление экспрессии ТКР. В целях улучшения аффинности ТКР были предприняты попытки по выбору высокоаффинных рецепторов или по усилению аффинности перенесенных рецепторов за счет точечных мутаций. В качестве альтернативы было разработано множество подходов для увеличения числа ТКР на поверхности трансдуцированных клеток. Сюда входит конструирование векторов экспрессии при использовании кодон-оптимизированных последовательностей ТКР, удаление сайтов гликозилирования и улучшение способности спаривания введенных цепей ТКР.

Поэтому до сих пор имеется потребность в подходах, позволяющих эффективно избегать ошибочного спаривания ТКР. Такие другие подходы должны быть легко применимы и должны эффективно снижать число гетеродимерных ТКР с ошибочным спариванием цепей, при этом повышать встречаемость гетеродимерных ТКР с правильным спариванием, т. е., парами трансгенных альфа- и бета-цепей в модифицированных соответствующим образом Т-клетках. Также желательны методики, требующие минимального количества манипуляций в отношении цепей ТКР и Т-клеток-хозяев.

Данные и другие задачи решены способами и средствами в соответствии с настоящим изобретением.

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предложена модифицированная α - или β -цепь Т-клеточного рецептора (ТКР) или ее фрагмент или производное, которое сохраняет способность связываться с комплексом антиген-МНС, где в переменном домене указанной модифицированной α - или β -цепи Q или любая другая аминокислота в положении 44 согласно нумерации

IMGT заменена на другую подходящую аминокислоту. Подходящие аминокислоты, как это показано также далее в документе, сохраняют специфичность спаривания α - и β -цепей ТКР, которые модифицированы, при этом снижая возможность спаривания с нежелательной α - или β -цепью, например, немодифицированной цепью.

Поскольку оно находится на участке FR2, положение 44, как известно, не имеет непосредственного контакта с мишенью ТКР-связывающего сайта. Таким образом, предполагают, что замена в положении 44 не имела бы решающего значения для и/или не препятствовала бы специфическому распознаванию эпитопа-мишени.

Аминокислоты согласно изобретению могут быть выбраны из 20 α -аминокислот, которые используются в живых организмах (L-аминокислоты). «Подходящие» аминокислоты должны включать как эти аминокислоты (т. е. 20 α -аминокислот, которые используются в живых организмах, и L-аминокислоты), так и «нестандартные» аминокислоты (например, β -аминокислоты или D-аминокислоты) или модифицированные аминокислоты. Предпочтительными являются 20 α -аминокислот, применяемых в живых организмах.

Нумерация аминокислотных остатков в α -цепи и β -цепи ТКР производится согласно номенклатуре IMGT, как это описано в работе Lefranc и соавт. (2001). Номенклатура IMGT – это универсальная система правил присуждения однозначно идентифицируемых номеров аминокислотным остаткам в молекулах иммуноглобулина, включая переменные домены α - и β -цепи ТКР. См. Фигуры 1 А–С для сравнения нумерации согласно IMGT (жирный шрифт) и нумерации согласно Кабат. На Фиг. 1В, Q44 в α -цепи (TRAV) и β -цепи (TRBV) выделены серым цветом. Нумерация согласно номенклатуре IMGT может отличаться от обычной нумерации данной аминокислотной последовательности переменного домена ТКР, в частности, в связи с пробелами в последовательностях CDR, как это видно на Фиг. 1 А–С.

Q44 согласно нумерации IMGT является высоко консервативным остатком в каркасной области 2 (FR2), и является общим практически для всех α -цепей ТКР, за

исключением TRAV2, TRAV24, TRAV29/DV5 и TRAV40, а также является общим для всех генов, кодирующих β -цепь ТКР, за исключением TRBV14 (Lefranc et al, 2001, Strong et al., 1999). Кроме того, Q44 очень часто входит в состав мотива 4 AA, включающего WYXQ, причем X означает, например, R, V, K или Q (Lefranc et al, 2001).

Knies и соавт. (2016) сообщают, что оптимизированный одноцепочечный ТКР (scTCR) ингибирует остаточное ошибочное спаривание ТКР в целях осуществления безопасной адоптивной иммунотерапии для общей массы эндогенных ТКР α/β -положительных Т-клеток. Предупреждение остаточного ошибочного спаривания было достигнуто за счет новой искусственной дисульфидной связи, сконструированной между V α -доменом и 3'-концом линкера рядом с V β в 3-доменном scTCR.

Hoffmann и соавт. (2015) сообщают о систематическом анализе, проводимом методами биоинформатики, структурных характеристик связанных и несвязанных молекул ТКР при фокусе внимания на относительном угле и гибкости V α /V β . Их результаты демонстрируют важность этого угла для сигнальных реакций, поскольку они наблюдали несколько различных структурных кластеров в основе которых лежит определенный угол V α /V β , и большей гибкостью обладают несвязанные ТКР по сравнению со связанными ТКР. Был идентифицирован уникальный центр вращения, и центральный участок вокруг этой точки расположен в центре между доменами V α и V β , очень близко к положениям 44 как V α , так и V β .

Замены в контексте настоящего изобретения могут быть произведены с помощью стандартных инструментов для мутагенеза белков, как, например, сайт-направленный мутагенез или случайный мутагенез кодирующих ДНК или кДНК, или технологий редактирования генома, как CRISPR Cas, TALEN, ZFN, Argonaute (NgAgo) или CRISPR Cpf1. Кроме того, такая замена может быть осуществлена с помощью простого синтеза кодирующего гена, кДНК или мРНК. В настоящее время поставщиками услуг предлагается синтез нуклеиновой кислоты с заданной последовательностью.

Подходы, разработанные для случайного мутагенеза или сайт-направленного мутагенеза, приводящие к сайт-специфическим заменам аминокислот, хорошо известны специалистам, и они раскрыты, например в работах Labrou и соавт. (2010) и Trehan и соавт. (2016)

Технологии редактирования генома в целях модификации имеющейся аминокислотной последовательности хорошо известны специалистам (например, CRISPR Cas, TALEN, ZFN, Argonaute (NgAgo) или CRISPR Cpf1), и они раскрыты, например в работе Maeder & Gersbach (2016). Способы синтеза генов хорошо известны специалистам, и они раскрыты, например в работе Hughes и соавт. (2011). Раскрытие информации из источников должно рассматриваться как включенное в описание во всей полноте путем ссылки.

Как обсуждается выше, некоторые способы из уровня техники предполагают модификацию α - и/или β -цепи ТКР путем введения мышинных константных цепей. Данный подход связан с риском повышения иммуногенности, обусловленной несвойственными человеку последовательностями, чего позволяют избежать способы и продукты настоящего изобретения.

Кроме того, авторы изобретения продемонстрировали, что замена в положении 44 может иметь умеренное воздействие на связывание с пептидом-мишенью (т. е., аффинность комплекса антиген-мишень/МНС), что, вероятно, связано с тем фактом, что в третичной структуре α - и β -вариабельных доменов Q44 находится на максимально дистально от участка, сформированного областью CDR.

В соответствии с одним вариантом осуществления модифицированные α -цепь и β -цепь не имеют замен в их константных доменах и/или их трансмембранных доменах в сравнении с соответствующими немодифицированными рецепторами, которые были идентифицированы и/или выделены. Поскольку константный домен содержит большую и высоко консервативную поверхность взаимодействия между α - и β -цепью ТКР, будет сложно избежать влияния даже незначительных модификаций в отношении особенностей спаривания, стабильности и иммуногенности по сравнению с заменами в положениях вариабельного домена.

В соответствии с одним вариантом осуществления α -цепь с заменой в положении 44, предпочтительно, спаривается с β -цепью Т-клеточного рецептора (ТКР), имеющего в положении 44 вариабельного домена замену на подходящую аминокислоту. В равной степени, в другом варианте осуществления β -цепь с заменой в положении 44, предпочтительно, спаривается с α -цепью Т-клеточного рецептора (ТКР), имеющего в положении 44 вариабельного домена замену на подходящую аминокислоту.

Следовательно, в Т-клетке, которая была модифицирована для экспрессии второго, гетерологичного или трансгенного ТКР, несущего заявленные замены, степень ошибочного спаривания между трансгенной α -цепью и эндогенной β -цепью – и наоборот, снижается, или оно даже исключается.

Таким образом может быть достигнуто повышение уровня правильно спаренных гетеродимеров трансгенных ТКР α/β , что улучшает общую авидность модифицированных Т-клеток и позволяет избежать таких побочных реакций, как «трансплантат против хозяина» (Bendle et al, 2009).

В соответствии с одним вариантом осуществления в указанном гетеродимере рекомбинантного Т-клеточного рецептора (ТКР), по меньшей мере, в α - или β -цепи аминокислота, находящаяся в положении 44 вариабельного домена заменена на одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Q, R, D, E, K, L, W и V.

В соответствии с одним другим вариантом осуществления α -цепь имеет последовательность вариабельного домена, включающую по меньшей мере каркасные области последовательности, которая имеет (общую) идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 95 % по отношению к последовательности с SEQ ID NO 1 или 3, где Q, или любая другая аминокислота, находящаяся в положении 44 ее вариабельного домена, заменена на другую подходящую аминокислоту, как раскрыто в настоящем документе, или β -цепь имеет последовательность вариабельного домена, включающую по меньшей мере каркасные области последовательности, которая имеет (общую) идентичность по-

следовательности, составляющую по меньшей мере 95 % по отношению к последовательности с SEQ ID NO 2 или 4, где Q, или любая другая аминокислота, находящаяся в положении 44 переменного домена, заменена на другую подходящую аминокислоту, как раскрыто в настоящем документе.

Предпочтительно, если указанные α - или β -цепи имеют последовательность переменного домена, включающую по меньшей мере каркасные области последовательности, которая имеет (общую) идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 96%, более предпочтительно, по меньшей мере 97%, еще более предпочтительно, по меньшей мере 98%, еще более предпочтительно, по меньшей мере 99 % или, наиболее предпочтительно 100 % по отношению к последовательности с SEQ ID NO: 1 или 3 или с SEQ ID NO: 2 или 4, соответственно.

SEQ ID NO: 1 описывает аминокислотную последовательность переменного домена α -цепи ТКР, а именно ТКР R7P1D5 (также известного как TRAV5, Lefranc и соавт. 2001). SEQ ID NO: 2 описывает аминокислотную последовательность переменного домена β -цепи ТКР, а именно ТКР R7P1D5 (также известного как TRBV12-4, Lefranc и соавт. 2001). R7P1D5 раскрыт в предварительной заявке США № 62/308 944, содержание которой включено в данное описание путем ссылки. R7P1D5 связывается с пептидом, называемым «MAG-003», когда он связан с молекулой МНС, например, антигенпрезентирующей клетки. MAG-003 включает аминокислотную последовательность в соответствии со следующей общей формулой I:



где X_1 выбран из аминокислот K и Y, X_2 выбран из аминокислот V, L и A, и X_3 выбран из V, L, A и I.

SEQ ID NO: 3 описывает аминокислотную последовательность переменного домена α -цепи ТКР TRAV 8-6 (Lefranc et al. 2001). SEQ ID NO: 4 описывает аминокислотную последовательность переменного домена β -цепи ТКР TRBV 6-5 (Lefranc et al. 2001).

Следует отметить, что на Фигурах 1 и 3 последовательности показаны с нумерацией согласно IMGT, которая отличается от обычной нумерации соответствующих последовательностей в списке последовательностей. Волнообразными линиями в Фигуре 3 обозначены пропуски, которые учтены в нумерации согласно IMGT, хотя они не заняты аминокислотными остатками. Следует понимать, что положение Q44 относится к нумерации согласно IMG, как показано на Фигурах 1 и 3, а не к нумерации, используемой в прилагаемом списке последовательностей.

R7P1D5, имеющий α - и β -цепь (TRAV5 и TRBV12-4), и TRAV 8-6 и TRBV 6-5, являются лишь четырьмя примерами переменных доменов ТКР, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения. Другие подгруппы доменов TRAV и TRBV раскрыты на веб-сайте IGMT. Следует отметить, что TRAV и TRBV могут приобретать специфичность к различным комплексам эпитопа-мишень/МНС за счет надлежащей адаптации последовательностей участка CDR, в частности.

Также следует отметить, что упомянутые выше последовательности представлены без сигнальных последовательностей, и что иногда банки данных последовательностей показывают слегка отличные последовательности. В банке данных Uniprot, например, в TRAV8-6 не хватает N-терминальной А, представленной в последовательности с SEQ ID NO: 3, а также на Фиг. 1, тогда как в TRBV6-5 не хватает N-терминальной N и А, представленной в последовательности с SEQ ID NO: 4, а также на Фиг. 1.

В соответствии с другим вариантом осуществления гетеродимера рекомбинантного Т-клеточного рецептора (ТКР) по изобретению ТКР включает одну из предпочтительных пар замен, выбранных из следующих списков:

α Q44D / β Q44R; α Q44R / β Q44D; α Q44E / β Q44K; α Q44K / β Q44E; α Q44D / β Q44K;
 α Q44K / β Q44D; α Q44E / β Q44R; α Q44R / β Q44E; α Q44L / β Q44W; α Q44W / β Q44L;
 α Q44V / β Q44W; и α Q44W / β Q44V;

α W44D / β Q44R; α W44R / β Q44D; α W44E / β Q44K; α W44K / β Q44E; α W44D / β Q44K;
 α W44K / β Q44D; α W44E / β Q44R; α W44R / β Q44E; α W44L / β Q44W; α W44 / β Q44L;
 α W44V / β Q44W; и α W44 / β Q44V;

α H44D / β Q44R; α H44R / β Q44D; α H44E / β Q44K; α H44K / β Q44E; α H44D / β Q44K;
 α H44K / β Q44D; α H44E / β Q44R; α H44R / β Q44E; α H44L / β Q44W; α H44W / β Q44L;
 α H44V / β Q44W; и α H44W / β Q44V;

α K44D / β Q44R; α K44R / β Q44D; α K44E / β Q44K; α K44 / β Q44E; α K44D / β Q44K;
 α K44 / β Q44D; α K44E / β Q44R; α K44R / β Q44E; α K44L / β Q44W; α K44W / β Q44L;
 α K44V / β Q44W; и α K44W / β Q44V;

α E44D / β Q44R; α E44R / β Q44D; α E44 / β Q44K; α E44K / β Q44E; α E44D / β Q44K;
 α E44K / β Q44D; α E44 / β Q44R; α E44R / β Q44E; α E44L / β Q44W; α E44W / β Q44L;
 α E44V / β Q44W; и α E44W / β Q44V;

α Q44D / β R44; α Q44R / β R44D; α Q44E / β R44K; α Q44K / β R44E; α Q44D / β R44K;
 α Q44K / β R44D; α Q44E / β R44; α Q44R / β R44E; α Q44L / β R44W; α Q44W / β R44L;
 α Q44V / β R44W; и α Q44W / β R44V;

α W44D / β R44; α W44R / β R44D; α W44E / β R44K; α W44K / β R44E; α W44D / β R44K;
 α W44K / β R44D; α W44E / β R44; α W44R / β R44E; α W44L / β R44W; α W44 / β R44L;
 α W44V / β R44W; и α W44 / β R44V;

α H44D / β R44; α H44R / β R44D; α H44E / β R44K; α H44K / β R44E; α H44D / β R44K;
 α H44K / β R44D; α H44E / β R44; α H44R / β R44E; α H44L / β R44W; α H44W / β R44L;
 α H44V / β R44W; и α H44W / β R44V;

α K44D / β R44; α K44R / β R44D; α K44E / β R44K; α K44 / β R44E; α K44D / β R44K;
 α K44 / β R44D; α K44E / β R44; α K44R / β R44E; α K44L / β R44W; α K44W / β R44L;
 α K44V / β R44W; и α K44W / β R44V;

α E44D / β R44; α E44R / β R44D; α E44 / β R44K; α E44K / β R44E; α E44D / β R44K;
 α E44K / β R44D; α E44R / β R44E; α E44L / β R44W; α E44W / β R44L; α E44V / β R44W;

и α E44W / β R44V.

В указанном выше, например, « α Q44R / β Q44D» означает, к примеру, что в переменном домене α -цепи Q44 имеет замену на R, тогда как в переменном домене β -цепи Q44 имеет замену на D.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления указанного гетеродимера рекомбинантного T-клеточного рецептора (ТКР)

а) модифицированная α -цепь предпочтительно спаривается с модифицированной β -цепью по сравнению с немодифицированной β -цепью, имеющей Q или любую другую подходящую аминокислоту в положении 44 в переменном домене, и/или

б) модифицированная β -цепь предпочтительно спаривается с модифицированной α -цепью по сравнению с немодифицированной α -цепью, имеющей Q или любую другую подходящую аминокислоту в положении 44 в переменном домене.

В соответствии с другим аспектом изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая α - или β -цепь модифицированного Т-клеточного рецептора (ТКР) в соответствии с представленным выше описанием и/или гетеродимер рекомбинантного Т-клеточного рецептора (ТКР) в соответствии с представленным выше описанием

. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кроме того, включает по меньшей мере один (одну) из промотора, функционально связанного с указанной одной или несколькими кодирующими молекулами нуклеиновой кислоты, и/или сигнальной последовательности, функционально связанной с указанной одной или несколькими кодирующими молекулами нуклеиновой кислоты.

Сигнальная последовательность кодирует сигнальный пептид, который направляет α - или β -цепь на клеточную поверхность Т-клеток, где происходит его закрепление посредством его трансмембранного домена, при этом α - и β -цепь представлены на внешней поверхности клеток. Сигнальные последовательности для различных подтипов переменных доменов α - и β -цепи известны из уровня техники.

В соответствии с другим аспектом изобретения предложена плаزمиды или векторы, включающий по меньшей мере одну из молекул нуклеиновой кислоты, представленных выше.

В одном варианте осуществления указанный вектор, предпочтительно, является вирусным вектором, предпочтительно, ретровирусным вектором или лентивирусным вектором. Способы трансдукции генов α или β Т-клеточного рецептора

(ТКР) в Т-клетки с помощью вирусных векторов раскрыты, например, в работах Rogulis и Pease (1998) или Zong и соавт. (2010). Применение лентивирусных векторов для переноса генов в Т-клетки раскрыто в работе Verhoeven и соавт. (2009).

В одном другом варианте осуществления указанный вектор включает транспозон, такой как «piggyback» или «спящая красавица», который, в свою очередь, способен переносить соответствующую нуклеиновую кислоту в Т-клетку. Способы применения транспозонов для получения методами генной инженерии Т-клеток раскрыты, например, в работе Huang и соавт. (2008).

В другом варианте осуществления Т-клетка может быть временно трансфицирована, например, с помощью введения одной или нескольких РНК, кодирующих α - и β -цепи, например, с помощью электропорации. Такие способы раскрыты, например, авторами Kim и Eberwine (2010).

В соответствии с другим аспектом изобретения предложен способ получения модифицированной Т-клетки, причем указанный способ включает этапы: получения Т-клетки от субъекта и трансдукции или трансфекции указанной Т-клетки одной или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением или плазмидой или вектором в соответствии с настоящим изобретением.

В предпочтительном варианте осуществления указанная Т-клетка была получена от отрицательного по HLA-аллелям донора. Например, если модифицированная Т-клетка, которая предназначена для обнаружения антигенов, презентруемых АПК серотипа HLA-A*02, источник, который предназначен для модификации, предпочтительно получают от донора, отрицательного по серотипу HLA-A*02. Таким способом снижают степень протекания, или же даже избегают, перекрестных реакций эндогенного ТКР с комплексом антигена-мишени/МНС.

Предпочтительно, если модифицированная Т-клетка, полученная таким способом, подходит для лечения указанного субъекта аутологичными Т-клетками.

В соответствии с другим аспектом изобретения предложена модифицированная Т-клетка, несущая набор нуклеиновых кислот, кодирующих α - и β -цепи гетеродимера рекомбинантного Т-клеточного рецептора (ТКР) в соответствии с представленным выше описанием.

В одном варианте осуществления указанная клетка была получена способом в соответствии с представленным выше описанием.

В соответствии с другим аспектом изобретения предложено применение модифицированной Т-клетки в соответствии с представленным выше описанием для лечения пациента, страдающего от, имеющего риск развития и/или диагноз опухолевого, воспалительного, инфекционного или аутоиммунного заболевания, где применение включает обеспечение или введение пациенту, нуждающемуся в этом, препарата, включающего указанную модифицированную Т-клетку.

Альтернативно предложен способ лечения пациента, страдающего от, имеющего риск развития и/или диагноз опухолевого, воспалительного, инфекционного или аутоиммунного заболевания, с помощью модифицированной Т-клетки в соответствии с представленным выше описанием, где способ включает обеспечение или введение пациенту, нуждающемуся в этом, препарата, включающего указанную модифицированную Т-клетку.

В настоящем контексте важно понимать, что специфичность соответствующего модифицированного ТКР или соответствующей модифицированной Т-клетки зависит от последовательностей CDR в переменных доменах α - и β -цепей, чтобы обнаруживать антигены, презентруемые молекулой МНС антигенпрезентирующих клеток.

Как сообщается в работе Løset и соавт. (2014), Т-клеточные рецепторы для специфического комплекса антиген – МНС могут быть получены с помощью относящегося к Т-клеткам фагового дисплея. В таком подходе замены в положении Q44 в переменных доменах α - и β -цепи могут производиться как во всех членах библиотеки, которая образует основу фагового дисплея, так и могут вводиться

после, т. е., после того как был найден специфический ТКР, который обнаруживает специфический комплекс антиген – МНС .

В соответствии с другими аспектами изобретения предложены применение, способ, Т-клетка или гетеродимер Т-клеточного рецептора (ТКР) в соответствии с представленным выше описанием, где антиген, презентируемый комплексом МНС, обнаруживаемый Т-клеточным рецептором, выбран из пептидных эпитопов опухолеспецифических опухолеассоциированных антигенов (ТАА). Данные пептиды известны из уровня техники и включают, в качестве примера, пептид MAG-003, используемый в примерах. Данные пептиды можно найти в литературе, например в банке данных по эпитопам (Epitope Database, <http://www.iedb.org/>) или, предпочтительно, согласно описанию сущности в любой из заявок WO 2016/177784; WO 2016/170139; WO 2016/156230; WO 2016/156202; WO 2016/146751; WO 2016/102272; WO 2016/107740; WO 2015/193359; WO 2015/169945; WO 2015/063302; WO 2015/018805; WO 2012/069462; WO 2012/079878; WO 2012/038463; WO 2011/151403; WO 2011/128448; WO 2011/113882; WO 2011/113872; WO 2011/113819; WO 2011/073215; WO 2010/037514; WO 2009/138236; WO 2007/028574; WO 2007/028573; WO 2006/114307; WO 2005/116051; WO 2005/076009; WO 2004/085461; WO 03/100432; WO 03/102023; WO 2009/015843; WO 2009/015842; WO 2009/015841; WO 2016/202963; WO 2016/207164; WO 2017/001491; WO 2017/005733; WO 2017/021527; WO 2017/036936; WO 2017/060169; WO 2017/060201; WO 2017/097602; WO 2017/097699; WO 2017/108345; или WO 2017/009400 (которые все включены в данное описание путем ссылки в отношении раскрытых в них пептидов).

Хотя изобретение иллюстрируется и описывается подробно с помощью иллюстраций и предшествующего описания, такие иллюстрации и описание следует рассматривать как служащие в качестве иллюстрации или примера, но не представляющими собой ограничения; изобретение не ограничивается раскрытыми вариантами осуществления. Другие вариации раскрытых вариантов осуществления могут быть поняты и выполнены специалистами данной области при практическом осуществлении заявленного изобретения, и/или при изучении иллюстраций, раскрытия сущности и прилагающейся формулы изобретения.

Далее следует понимать, что данное изобретение не ограничивается определенными составляющими частями или структурными характеристиками средств или описанных композиций или технологических этапов описанных способов, поскольку такие средства и способы могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем контексте, служит только для описания определенных вариантов осуществления и не предназначена быть ограничивающей. Сам факт, что конкретные меры упоминаются во взаиморазличных зависимых пунктах формулы изобретения не указывает на то, что комбинация этих мер не может быть использована с преимуществом. Любые ссылочные позиции в формуле изобретения не должны истолковываться как ограничение объема патентных притязаний. Необходимо принять к сведению, что использованные в настоящем описании изобретения и прилагающихся пунктах формулы изобретения формы единственного числа включают определяемый объект в единственном и/или множественном числе, если в контексте четко не предписано иное. Кроме того, в пунктах формулы изобретения слово «включающий» не исключает другие элементы или этапы. Сам факт, что конкретные меры упоминаются во взаиморазличных зависимых пунктах формулы изобретения не указывает на то, что комбинация этих мер не может быть использована с преимуществом. Более того, следует понимать, что в случае указания диапазона параметров, который ограничивается числовыми величинами, считается, что диапазоны включают данные ограничивающие величины.

Кроме того, следует понимать, что варианты осуществления, раскрытые в данном контексте, не должны пониматься как отдельные варианты осуществления, которые не имеют отношения друг к другу. Предполагается, что признаки, обсуждаемые в одном варианте осуществления, могут быть раскрыты и в связи с другими вариантами осуществления, представленными в настоящем документе. Если в одном случае определенный признак не раскрыт в одном варианте осуществления, а раскрыт в другом, опытный специалист поймет, что это совершенно не означает, что указанный признак не предназначен для раскрытия в указанном другом варианте осуществления. Специалисту будет понятно, что сутью

данной заявки является раскрытие указанного признака также и для другого варианта осуществления, однако это не делается попросту в целях ясности и для сохранения объема описания в разумных рамках.

Все аминокислотные последовательности, раскрытые в настоящем документе, представлены в направлении от N-конца к C-концу; все нуклеиновокислотные последовательности, раскрытые в настоящем документе, представлены в направлении 5'→3'. В соответствии с целями настоящего изобретения все цитируемые источники включены в данное описание во всей полноте путем ссылки. Это относится, в частности, к документам из уровня техники, в которых раскрыты стандартные или рутинные способы. В данном случае источники включены путем ссылки, чтобы обеспечить достаточной информацией и избежать пространных повторов.

На Фигурах и в прилагающемся Списке последовательностей

на Фигурах 1A–C показана нумерация аминокислотных остатков в переменных доменах α -цепи и β -цепи ТКР. Иллюстрации взяты с модифицированием из работы Lefranc и соавт. (2003). Показаны последовательности на примере TRAV8-6 (идент. № гена: 28680) (α -цепь) и TRBV6-5 (идент. № гена: 28602) (β -цепь). Нумерация аминокислотных остатков в α - и β -цепи соответствует номенклатуре IMGT (жирный шрифт) в сравнении с нумерацией согласно Кабату. На фиг. 1B, Q44 в α -цепи (TRAV) и β -цепи (TRBV) выделены серым фоном. Q44 согласно нумерации IMGT является высоко консервативным остатком в каркасной области 2 (FR2) и общим примерно для 80% всех генов ТКР (Strong et al., 1999), включая 1G4 (идент. № белка в базе данных pdb: 2BNR (Chen et al., 2005)); TRAV8-6 (идент. № гена: 28680) (α -цепь) и TRBV6-5 (идент. № гена: 28602), (β -цепь) и R7P1D5 (включая TRAV5 и TRBV12-4, Lefranc et al. 2001). Q44 очень часто является частью мотива 4 AA, включая WYXQ, где X является любой аминокислотой, например, R, V или K. W41 является еще более консервативным (>95 %) в α - и β -цепях ТКР (Strong et al., 1999).

На Фигуре 2A представлен структурный мотив α Q44/ β Q44 из переменного домена ТКР 1G4 (идент. № белка в базе данных pdb: 2BNR (Chen et al., 2005)). На

Фигуре 2В показаны двойные мутанты *in silico* на основе кристаллической структуры ТКР 1G4. Из пары дикого типа α Q44/ β Q44 авторы изобретения вручную выбрали и генетически модифицировали потенциальные пары, которые сохраняют высокий уровень молекулярных контактов (полярных или неполярных) при нарушении пространственной симметрии и/или симметрии зарядов. Мутанты были созданы при использовании программы UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). На всех Фигурах α - и β -цепи ТКР представлены темно-синими и голубыми полосами, соответственно. Интересующие боковые цепи выделены розовым цветом, и представлены все тяжелые атомы.

На Фигуре 3 представлены последовательности α - и β -цепей вариантов ТКР R7P1D5 (TRAV5 и TRBV12-4), обнаруживающего пептид под названием MAG-003 при связывании с МНС; TRAV8-6 (вариабельный домен α - цепи); и TRBV6-5 (вариабельный домен β -цепи). Серым фоном выделены приблизительные положения CDR1, CDR2 и CDR3 с каркасными областями FR1, FR2 и FR3. Как видно, Q44 расположен в FR2. Необходимо принять к сведению, что Q44 является консервативным также и в других вариантах ТКР, как, например, в TRAV8-6 и TRBV6-5. Как в последнем, Q44 в R7P1D5 является частью мотива 4 AA, включающего WYXQ. В зависимости от антигена-мишени последовательности CDR могут, разумеется, варьироваться.

На Фигуре 4А и Фигуре 4В представлены подсчитанные показатели энергии мутации для выбранных и генетически модифицированных *in silico* мутантов. Двойные мутации выбраны для итоговой комплементарности формы и/или заряда на поверхности взаимодействия между TRAV и TRBV. На Фигуре 4А представлены выбранные аминокислоты с зарядом (D, E, K, R), тогда как на Фигуре 4В представлены выбранные нейтральные аминокислоты (W, V, L). Для каждой предлагаемой пары комплементарных мутаций авторы изобретения провели испытания двойного мутанта (зеленый), а также каждого отдельного одиночного мутанта (оранжевый), чтобы симитировать спаривание сконструированной цепи с цепью дикого типа. Энергия мутации свыше 0,5 ккал/моль рассматривалась как дестабилизирующая, энергия мутации ниже -0,5 ккал/моль рассматривалась как стабилизирующая, показатели энергии мутации между -0,5 и 0,5 ккал/моль рассматривались как нейтральные (между красными линиями - программные параметры

по умолчанию). Мутации проводили на вариабельном домене ТКР 1G4 (Chen et al., 2005) с помощью пакета программ Discovery Studio (Dassault Systèmes, BIOVIA, 2017) с применением алгоритма вычисления энергии мутации, описанного в работе Spassov и Yan (2013).

На Фигуре 5 показан MAG-003 (пептид, используемый в качестве примера): тетрамер HLA-A*02 или NYESO1-001 (контрольный пептид): окрашивание тетрамером HLA-A*02, соответственно, CD8+ Т-клеток, электропорированных РНК альфа- и бета-цепей ТКР R7P1D5 дикого типа и вариантов с мутацией. R7P1D5 обнаруживает пептид MAG-003, когда он связан с молекулой МНС, но не обнаруживает пептид NYESO1. CD8+ Т-клетки (без ТКР) после имитации электропорации служили в качестве контроля. Доноры (левая секция: донор А, правая секция: донор В).

На Фигуре 6 представлено высвобождение IFN на примере пептида MAG-003 в контексте HLA-A*02 CD8+ Т-клеток, электропорированных РНК альфа- и бета-цепей ТКР R7P1D5 дикого типа и вариантов с мутацией. Наблюдалось улучшенное распознавание MAG-003 всеми вариантами с мутациями (α Q44R / β Q44D, α Q44E / β Q44K, α Q44K / β Q44E, α Q44D / β Q44K, α Q44K / β Q44D, α Q44E / β Q44R) в сравнении с немодифицированным R7P1D5 дикого типа.

На Фигуре 7, PRAME-004-специфические ТКР R11A и R17A и их соответствующие варианты с мутацией α 44K/ β 44E, соответственно, были трансдуцированы в человеческую Т-клетку с помощью лентивирусного переноса. Активность трансдуцированной с помощью ТКР Т-клетки оценивали с помощью совместной инкубации с клетками Т2, нагруженными пептидом PRAME-004 со снижением концентраций. ТКР с мутацией R11KEA демонстрирует значительно улучшенное распознавание пептида PRAME-004 при сравнении с немодифицированным ТКР R11.

На Фигуре 8, PRAME-004-специфические ТКР R17A и R11A и их соответствующий вариант с мутацией 44K/44E (R11KEA) были трансдуцированы в человеческую Т-клетку двух доноров с помощью лентивирусного переноса. Цитотоксичность трансдуцированных Т-клеток по отношению к линиям опухолевых клеток

A375 и U2OS, экспрессирующих пептид PRAME-004, оценивали с помощью системы визуализации IncuCyte. MAG-003-специфический ТКР использовали в качестве контроля (A375 и U2OS также экспрессируют MAG-003). ТКР с мутацией TCR R11KEA демонстрировал повышение способности к уничтожению PRAME-004-положительных линий клеток по сравнению с немодифицированным ТКР R11A.

ПРИМЕРЫ

Следует принять к сведению, что нумерация согласно номенклатуре IMGT может отличаться от обычной нумерации данной аминокислотной последовательности переменного домена ТКР, в частности, в связи с пробелами в последовательностях CDR, как это видно на Фигурах 1 А–С. Это применимо, например, к TRAV8-6 и TRBV6-5, где волнообразными линиями отмечены пробелы, которые учтены в нумерации согласно IMGT, хотя они не заняты аминокислотными остатками. Данные последовательности представлены исключительно в качестве примеров и – являясь, тем не менее, предпочтительными – не должны ограничивать пункты формулы изобретения конкретными вариантами осуществления. Это означает, что идея настоящего изобретения применима к другим α - и β -цепям ТКР или $\alpha\beta$ -гетеродимерам ТКР, имеющим другие последовательности, в частности, в переменном домене, в частности, в участках CDR.

Кроме того, идеи настоящего изобретения также применимы к другим α - и β -цепям ТКР или $\alpha\beta$ -гетеродимерам ТКР, также связывающимся с другими комплексами антигена-мишени и молекулы МНС, предпочтительно, когда они включают природную аминокислоту Q44, и предпочтительно, когда они включают мотив WYXQ, но не ограничиваясь этими случаями. В зависимости от того, какой антиген является мишенью, последовательности CDR могут варьироваться.

В общем, способы клонирования и экспрессии Т-клеточного рецептора были раскрыты в работе Wälchli и соавт. (2011). Подходы, разработанные для случайного мутагенеза или сайт-направленного мутагенеза, приводящие к сайт-специфическим заменам аминокислот, хорошо известны специалистам, и они раскрыты, например в работах Labrou (2010) и Trehan и соавт. (2016)

Технологии редактирования генома в целях модификации имеющейся аминокислотной последовательности хорошо известны специалистам (например, CRISPR Cas, TALEN, ZFN, Argonaute (NgAgo) или CRISPR Cpf1), и они раскрыты, например в работе Maeder и Gersbach (2016). Способы синтеза генов хорошо известны специалистам, и они раскрыты, например, в работе Hughes и соавт. (2011). Раскрытие информации из этих источников включено в описание во всей полноте путем ссылки.

Способы *in silico*

С помощью визуального контроля вариабельного домена ТКР 1G4 (идент. № белка в базе данных PDB: 2BNR (Chen et al., 2005)) авторы изобретения вручную выбирали пары мутаций для мотива $\alpha 44/\beta 44$, которые потенциально сохраняли бы высокий уровень молекулярных контактов (полярных или неполярных) при нарушении пространственной симметрии и/или симметрии зарядов. Пары мутаций выбирали таким образом, чтобы (i) суммарный заряд пары равнялся нулю, (ii) две аминокислоты демонстрировали хорошую комплементарность формы и/или образовывали водородную связь и/или солевые мостики и (iii) две аминокислоты имели бы различную молекулярную массу (т. е. одна большая и одна малая аминокислота). Программное обеспечение Discovery Studio (Dassault Systèmes, BIOVIA, 2017) использовали для изучения дальнейшего влияния модифицированных позиций на спаривание цепей $\alpha\beta$ ТКР. Уровень энергии мутации подсчитывали с помощью алгоритма, описанного в работе Spassov и соавт. (Spassov and Yan, 2013), чтобы сконструировать антитела *in silico*. Ожидалось, что энергия мутации отражает влияние мутации по сравнению с мотивом дикого типа $\alpha Q44/\beta Q44$. Авторы изобретения провели испытания двойных мутантов, а также каждого одиночного мутанта с наличием спаривания с цепью дикого типа:

- в случае двойных мутантов ожидалось, что энергия мутации будет нейтральной или стабилизирующей
- в случае одиночных мутантов при наличии спаривания с цепью дикого типа ожидалось, что энергия мутации будет дестабилизирующей, по меньшей мере, для одной из сторон.

Первичные CD8⁺ Т-клетки человека электропорировали без РНК (без ТКР) или тем же самым количеством РНК, кодирующей α - и β -цепи пептид-специфического (в качестве примера MAG-003, пептид «р286» как раскрыто, например, в работе Wu и соавт. «Scandinavian journal of immunology» 74:6 дек. 2011 г. стр. 561-7) Т-клеточного рецептора в форме его дикого типа (ТКР R7P1D5 дт) или в мутантной форме (α Q44D/ β Q44R ТКР R7P1D5), включающей мутацию Q44D в альфа-вариабельном домене ТКР и мутацию Q44R в бета-вариабельном домене ТКР. После культивации в течение ночи Т-клетки анализировали на наличие связывания тетрамеров MAG-003:HLA-A*02 (Фигура 5, верхний ряд) и связывания не родственного пептида NYESO1-001 и связывания контрольных тетрамеров неродственного пептида NYESO-001:HLA-A*02 (Фигура 5, нижний ряд)(пептид NYESO-001; идент. № эпитопа 59283 в базе данных эпитопов, как показано выше). Доля тетрамер-положительных Т-клеток показана для двух отдельных доноров (Фигура 5 левая секция: донор А, правая секция: донор В).

ТКР R7P1D5, кодирующий опухолеспецифическую альфа- и бета-цепь ТКР, был выделен и амплифицирован из Т-клеток здорового донора. Клетки здоровых доноров стимулировали *in vitro* в соответствии с ранее описанным способом (Walter et al., 2003) и мишень-специфические клетки сортировали по отдельности при использовании мультимеров HLA-A*02, а затем использовали для последующего выделения ТКР. Последовательности ТКР были выделены с помощью метода 5' RACE при использовании стандартных методик, как это описано, например, в лабораторном руководстве Molecular Cloning, изд. 4-е, Green and Sambrook. Вариабельные области альфа- и бета-цепей ТКР R7P1D5 секвенировали и клонировали для дальнейшей характеристики функциональности. ТКР R7P1D5 были получены у HLA-A*02-положительного донора.

Цитируемая литература:

Davis MM, Bjorkman PJ T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. (1988). 334(6181), 395–402.

Cole DK et al. Germ line-governed recognition of a cancer epitope by an immunodominant human T-cell receptor. (2009). 284(40), 27281–27289.

Li H et al. Structure-function studies of T-cell receptor-superantigen interactions. (1998). 163, 177–186.

Burrows SR Hard wiring of T cell receptor specificity for the major histocompatibility complex is underpinned by TCR adaptability. (2010). *107*(23), 10608–10613.

Roomp K Domingues FS (2011). Predicting interactions between T-cell receptors and MHC-peptide complexes. *Mol Immunol* 48: 553–562.

Rosenberg SA et al. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin- 2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 319: 1676–1680.

Shao H et al. TCR mispairing in genetically modified T cells was detected by fluorescence resonance energy transfer. (2010). *37*(8), 3951–3956.

Lefranc MP et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* (2003) 27, 55-77

Lefranc MP et al. The T cell receptor facts book. (2001)

Bendle GM et al. Preclinical development of T cell receptor gene therapy. *Curr. Opin. Immunol.* (2009). 21, 209–214

Pogulis RJ, Pease LR. A retroviral vector that directs simultaneous expression of α and β T cell receptor genes. *Hum Gene Ther.* (1998) Oct 10;9(15): 2299-304.

Zhong S et al. Retroviral Transduction of T-cell Receptors in Mouse T-cells *J Vis Exp.* (2010); (44): 2307

Wälchli S et al. A Practical Approach to T-Cell Receptor Cloning and Expression. *PLOS ONE* (2011) 6(11): e27930

O’Shea EK et al. Peptide “Velcro”: design of a heterodimeric coiled coil. (1993). *3*(10), 658–667.

Chang HC et al. A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments. (1994). *91*(24), 11408–11412.

Varriale S et al. An evolutionary conserved motif is responsible for immunoglobulin heavy chain packing in the B cell membrane. (2010).

Govers C et al. T cell receptor gene therapy: strategies for optimizing transgenic TCR pairing. *Trends Mol Med.* (2010) Feb;16(2):77-87

Løset GA et al., Phage Display Engineered T Cell Receptors as Tools for the Study of Tumor Peptide–MHC Interactions. *Front Oncol* (2014); 4: 378.

Hughes RA et al. Gene synthesis: methods and applications. *Methods Enzymol.* (2011); 498: 277-309

Labrou NE. Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution. *Curr Protein Pept Sci.* (2010) Feb;11(1):91-100.

Trehan A et al. REPLACR-mutagenesis, a one-step method for site-directed Scientific Reports (2016) 6, Article number: 19121

Maeder ML & Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular Therapy* (2016); 24 3, 430–446.

Verhoeven E et al. Lentiviral vector gene transfer into human T cells. *Methods Mol Biol.* 2009;506:97-114

Huang X et al. Sleeping Beauty Transposon-mediated Engineering of Human Primary T Cells for Therapy of CD19+ Lymphoid Malignancies. *Molecular Therapy* (2008); 16 3, 580–589.

Kim TK & Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Aug; 397(8): 3173–3178.

Chen, JL et al. (2005). Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(8), 1243–1255.

Pettersen EF et al. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.

Spasov VZ & Yan L (2013). pH-selective mutagenesis of protein-protein interfaces: in silico design of therapeutic antibodies with prolonged half-life. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(4), 704–714.

Cohen CJ et al. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res.* 2006 Sep 1;66(17):8878-86.

Cohen CJ et al. Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. *Cancer Res.* 2007 Apr 15;67(8):3898-903.

Voss RH et al. Molecular design of the Calpha-beta interface favors specific pairing of introduced TCRalpha-beta in human T cells. *J Immunol.* 2008 Jan 1;180(1):391-401.
Walter et al. (2003) *J Immunol.*, Nov 15;171(10):4974-8.

Knies et al. An optimized single chain TCR scaffold relying on the assembly with the native CD3-complex prevents residual mispairing with endogenous TCRs in human T-cells. *Oncotarget.* 2016 Apr 19; 7(16): 21199–21221.

Thomas Hoffmann et al. Quantitative Analysis of the Association Angle between T-cell Receptor V α /V β Domains Reveals Important Features for Epitope Recognition. *PLOS*, July 17, 2015, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004244>

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеродимер рекомбинантного Т-клеточного рецептора (ТКР), включающий модифицированную α -цепь или ее фрагмент, содержащую варибельный домен, и модифицированную β -цепь или ее фрагмент, содержащую варибельный домен, где указанный ТКР сохраняет способность связываться с комплексом антиген-МНС, и где указанная модификация α - и β -цепи выбрана из пары замен из группы, состоящей из $\alpha 44D / \beta 44R$; $\alpha 44R / \beta 44D$; $\alpha 44E / \beta 44K$; $\alpha 44K / \beta 44E$; $\alpha 44D / \beta 44K$; $\alpha 44K / \beta 44D$; $\alpha 44E / \beta 44R$; $\alpha 44R / \beta 44E$; $\alpha 44L / \beta 44W$, $\alpha 44W / \beta 44L$, $\alpha 44V / \beta 44W$ и $\alpha 44W / \beta 44V$.
2. Гетеродимер рекомбинантного Т-клеточного рецептора (ТКР) в соответствии с п. 1, где указанная модификация α - и β -цепи выбрана из пары замен из группы, состоящей из $\alpha Q44D / \beta Q44R$; $\alpha Q44R / \beta Q44D$; $\alpha Q44E / \beta Q44K$; $\alpha Q44K / \beta Q44E$; $\alpha Q44D / \beta Q44K$; $\alpha Q44K / \beta Q44D$; $\alpha Q44E / \beta Q44R$; $\alpha Q44R / \beta Q44E$; $\alpha Q44L / \beta Q44W$; $\alpha Q44W / \beta Q44L$; $\alpha Q44V / \beta Q44W$; $\alpha Q44W / \beta Q44V$; $\alpha W44D / \beta Q44R$; $\alpha W44R / \beta Q44D$; $\alpha W44E / \beta Q44K$; $\alpha W44K / \beta Q44E$; $\alpha W44D / \beta Q44K$; $\alpha W44K / \beta Q44D$; $\alpha W44E / \beta Q44R$; $\alpha W44R / \beta Q44E$; $\alpha W44L / \beta Q44W$; $\alpha W44 / \beta Q44L$; $\alpha W44V / \beta Q44W$; $\alpha W44 / \beta Q44V$; $\alpha H44D / \beta Q44R$; $\alpha H44R / \beta Q44D$; $\alpha H44E / \beta Q44K$; $\alpha H44K / \beta Q44E$; $\alpha H44D / \beta Q44K$; $\alpha H44K / \beta Q44D$; $\alpha H44E / \beta Q44R$; $\alpha H44R / \beta Q44E$; $\alpha H44L / \beta Q44W$; $\alpha H44W / \beta Q44L$; $\alpha H44V / \beta Q44W$; $\alpha H44W / \beta Q44V$; $\alpha K44D / \beta Q44R$; $\alpha K44R / \beta Q44D$; $\alpha K44E / \beta Q44K$; $\alpha K44 / \beta Q44E$; $\alpha K44D / \beta Q44K$; $\alpha K44 / \beta Q44D$; $\alpha K44E / \beta Q44R$; $\alpha K44R / \beta Q44E$; $\alpha K44L / \beta Q44W$; $\alpha K44W / \beta Q44L$; $\alpha K44V / \beta Q44W$; $\alpha K44W / \beta Q44V$; $\alpha E44D / \beta Q44R$; $\alpha E44R / \beta Q44D$; $\alpha E44 / \beta Q44K$; $\alpha E44K / \beta Q44E$; $\alpha E44D / \beta Q44K$; $\alpha E44K / \beta Q44D$; $\alpha E44 / \beta Q44R$; $\alpha E44R / \beta Q44E$; $\alpha E44L / \beta Q44W$; $\alpha E44W / \beta Q44L$; $\alpha E44V / \beta Q44W$; $\alpha E44W / \beta Q44V$; $\alpha Q44D / \beta R44$; $\alpha Q44R / \beta R44D$; $\alpha Q44E / \beta R44K$; $\alpha Q44K / \beta R44E$; $\alpha Q44D / \beta R44K$; $\alpha Q44K / \beta R44D$; $\alpha Q44E / \beta R44$; $\alpha Q44R / \beta R44E$; $\alpha Q44L / \beta R44W$; $\alpha Q44W / \beta R44L$; $\alpha Q44V / \beta R44W$; $\alpha Q44W / \beta R44V$; $\alpha W44D / \beta R44$; $\alpha W44R / \beta R44D$; $\alpha W44E / \beta R44K$; $\alpha W44K / \beta R44E$; $\alpha W44D / \beta R44K$; $\alpha W44K / \beta R44D$; $\alpha W44E / \beta R44$; $\alpha W44R / \beta R44E$; $\alpha W44L / \beta R44W$; $\alpha W44 / \beta R44L$; $\alpha W44V / \beta R44W$; $\alpha W44 / \beta R44V$; $\alpha H44D / \beta R44$; $\alpha H44R / \beta R44D$; $\alpha H44E / \beta R44K$; $\alpha H44K / \beta R44E$; $\alpha H44D / \beta R44K$; $\alpha H44K / \beta R44D$; $\alpha H44E / \beta R44$; $\alpha H44R / \beta R44E$; $\alpha H44L / \beta R44W$; $\alpha H44W / \beta R44L$; $\alpha H44V / \beta R44W$; $\alpha H44W / \beta R44V$;

α K44D / β R44 ; α K44R / β R44D; α K44E / β R44K; α K44 / β R44E; α K44D / β R44K;
 α K44 / β R44D; α K44E / β R44 ; α K44R / β R44E; α K44L / β R44W; α K44W / β R44L;
 α K44V / β R44W; α K44W / β R44V; α E44D / β R44 ; α E44R / β R44D; α E44 / β R44K;
 α E44K / β R44E; α E44D / β R44K; α E44K / β R44D; α E44R / β R44E; α E44L / β R44W;
 α E44W / β R44L; α E44V / β R44W; и α E44W / β R44V.

3. Гетеродимер рекомбинантного Т-клеточного рецептора (ТКР) в соответствии с п. 1, где указанная модификация α - и β -цепи выбрана из пары замен из группы, состоящей из α 44D / β 44R; α 44R / β 44D; α 44E / β 44K; α 44K / β 44E; α 44D / β 44K; α 44K / β 44D; α 44R / β 44E; α 44L / β 44W, α 44W / β 44L, α 44V / β 44W и α 44W / β 44V.
4. Гетеродимер рекомбинантного Т-клеточного рецептора (ТКР) в соответствии с п. 1, где указанная модификация α - и β -цепи представляет собой пару замен α 44K / β 44E.
5. Молекула нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот, кодирующая модифицированную α - или β -цепь Т-клеточного рецептора (ТКР) или гетеродимер рекомбинантного Т-клеточного рецептора (ТКР) в соответствии с любым из пп.1-4.
6. Плазмида или вектор экспрессии, включающий по меньшей мере одну из молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с п. 5.
7. Способ получения модифицированной Т-клетки, причем указанный способ включает трансдукцию или трансфекцию Т-клетки, полученной от субъекта с помощью одной или более молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с п. 5 или плазмиды или вектора экспрессии в соответствии с п. 6.
8. Модифицированная Т-клетка, полученная в соответствии с п. 7.
9. Применение модифицированной Т-клетки в соответствии с п. 8 в производстве лекарственного средства для иммунотерапии.

10. Применение модифицированной Т-клетки в соответствии с п. 8 в производстве лекарственного средства для лечения опухолевого, воспалительного, инфекционного или аутоиммунного заболевания.
11. Гетеродимер рекомбинантного Т-клеточного рецептора (ТКР) в соответствии с любым из пп. 1-4, где указанный ТКР специфически связывается с антигеном, презентруемым комплексом с МНС, где указанный антиген выбран из эпитопа опухолеассоциированного антигена (ТАА).
12. Гетеродимер, содержащий модифицированную α -цепь ТКР и модифицированную β -цепь ТКР, где в вариабельном домене указанной модифицированной α -цепи ТКР и указанной модифицированной β -цепи ТКР аминокислота в положении 44 согласно нумерации IMGT замещена другой аминокислотой,
где указанная модификация α - и β -цепи выбрана из пары замен из группы, состоящей из $\alpha 44D / \beta 44R$; $\alpha 44R / \beta 44D$; $\alpha 44E / \beta 44K$; $\alpha 44K / \beta 44E$; $\alpha 44D / \beta 44K$; $\alpha 44K / \beta 44D$; $\alpha 44E / \beta 44R$; $\alpha 44R / \beta 44E$; $\alpha 44L / \beta 44W$, $\alpha 44W / \beta 44L$, $\alpha 44V / \beta 44W$ и $\alpha 44W / \beta 44V$,
где указанная модифицированная α -цепь и указанная модифицированная β -цепь сохраняет способность связываться с комплексом антиген-МНС.

	TRBV: TRBV6-5 человека					TRAV: TRAV8-6 человека				
FRI-IMG1	1	1	aat	ASN	N	1	0	agc	ALA	A
	2	2	gct	ALA	A	2	1	cag	GLN	Q
	3	3	ggt	GLY	G	3	2	tct	SER	S
	4	4	gtc	VAL	V	4	3	gtg	VAL	V
	5	5	act	THR	T	5	4	acc	THR	T
	6	6	cag	GLN	Q	6	5	cag	GLN	Q
	7	7	acc	THR	T	7	6	ctt	LEU	L
	8	8	cca	PRO	P	8	7	gac	ASP	D
	9	9	aaa	LYS	K	9	8	agc	SER	S
	10	10	ttc	PHE	F	10	9	caa	GLN	Q
	11	11	cag	GLN	Q	11	10	gtc	VAL	V
	12	12	gtc	VAL	V	12	11	cct	PRO	P
	13	13	ctg	LEU	L	13	12	gtc	VAL	V
	14	14	aag	LYS	K	14	13	ttt	PHE	F
	15	15	aca	THR	T	15	14	gaa	GLU	E
	16	16	gga	GLY	G	16	15	gaa	GLU	E
	17	17	cag	GLN	Q	17	16	gcc	ALA	A
	18	18	agc	SER	S	18	17	cct	PRO	P
	19	19	atg	MET	M	19	18	gtg	VAL	V
	20	20	aca	THR	T	20	19	gag	GLU	E
	21	21	ctg	LEU	L	21	20	ctg	LEU	L
	22	22	cag	GLN	Q	22	21	agg	ARG	R
	23	23	tgt	CYS	C	23	22	tgc	CYS	C
	24	24	gcc	ALA	A	24	23	aac	ASN	N
	25	25	cag	GLN	Q	25	24	tac	TYR	Y
	26	26	gat	ASP	D	26	25	tca	SER	S
CDR1-IMG1	27	27	atg	MET	M	27	26	teg	SER	S
	28	28	aac	ASN	N	28	27	tct	SER	S
	29	29	cat	HIS	H	29	28	gtt	VAL	V
	30	30	gaa	GLU	E	30	29	tca	SER	S
	31	* 31	tac	TYR	Y	31	30	gtg	VAL	V
	32	*	-	-	-	32	* 31	tat	TYR	Y
	33		-	-	-	33	*	-	-	-
	34		-	-	-	34	*	-	-	-
	35		-	-	-	35		-	-	-
	36		-	-	-	36		-	-	-
	37		-	-	-	37		-	-	-
	38		-	-	-	38		-	-	-

Фиг. 1А

	TRBV: TRBV6-5 человека					TRAV: TRAV8-6 человека				
FR2-IMGT	39	32	atg	MET	M	39	32	ctc	LEU	L
	40	33	tcc	SER	S	40	33	ttc	PHE	F
	41	34	tgg	TRP	W	41	34	tgg	TRP	W
	42	35	tat	TYR	Y	42	35	tat	TYR	Y
	43	36	cga	ARG	R	43	36	gtg	VAL	V
	44	37	caa	GLN	Q	44	37	caa	GLN	Q
	45	38	gac	ASP	D	45	38	tac	TYR	Y
	46	39	cca	PRO	P	46	39	ccc	PRO	P
	47	40	ggc	GLY	G	47	40	aac	ASN	N
	48	41	atg	MET	M	48	41	caa	GLN	Q
	49	42	ggg	GLY	G	49	42	gga	GLY	G
	50	43	ctg	LEU	L	50	43	ctc	LEU	L
	51	44	agg	ARG	R	51	44	cag	GLN	Q
	52	45	ctg	LEU	L	52	45	ctt	LEU	L
	53	46	att	ILE	I	53	46	ctc	LEU	L
54	47	cat	HIS	H	54	47	ctg	LEU	L	
55	48	tac	TYR	Y	55	48	aag	LYS	K	
CDR2-IMGT	56	49	tca	SER	S	56	* 49	tat	TYR	Y
	57	50	gtt	VAL	V	57	* 50	tta	LEU	L
	58	51	ggg	GLY	G	58	* 51	tca	SER	S
	59	52	gct	ALA	A	59	* 52	gga	GLY	G
	60	53	ggg	GLY	G	60		-	-	-
	61	54	atc	ILE	I	61		-	-	-
	62		-	-	-	62		-	-	-
	63		-	-	-	63		-	-	-
	64		-	-	-	64		-	-	-
	65		-	-	-	65		-	-	-
FR3-IMGT	66	55	act	THR	T	66	* 53	tcc	SER	S
	67	56	gac	ASP	D	67	* 54	acc	THR	T
	68	57	caa	GLN	Q	68	* 55	ctg	LEU	L
	69	58	gga	GLY	G	69	* 56	gtt	VAL	V
	70	59	gaa	GLU	E	70	* 57	gaa	GLU	E
	71	60	gtc	VAL	V	71	* 58	agc	SER	S
	72	61	ccc	PRO	P	72	* 59	atc	ILE	I
	73	* 62	-	-	-	73	*	-	-	-
	74	* 63	aat	ASN	N	74	* 60	aac	ASN	N
	75	* 64	ggc	GLY	G	75	61	ggg	GLY	G
	76	65	tac	TYR	Y	76	62	ttt	PHE	F
	77	66	aat	ASN	N	77	63	gag	GLU	E

Фиг. 1В

TRBV: TRBV6-5 человека					TRAV: TRAV8-6 человека					
	78	67	gtc	VAL	V	78	64	gct	ALA	A
	79	68	tcc	SER	S	79	65	gaa	GLU	E
	80	69	aga	ARG	R	80	66	ttt	PHE	F
	81	70	tea	SER	S	81	67	aac	ASN	N
	82		-	-	-	82	68	aag	LYS	K
	83	71	acc	THR	T	83	69	agt	SER	S
	84	72	aca	THR	T	84	70	caa	GLN	Q
	85	73	gag	GLU	E	85	71	act	THR	T
	86	74	gat	ASP	D	86	72	tcc	SER	S
	87	75	ttc	PHE	F	87	73	ttc	PHE	F
	88	76	cgg	PRO	P	88	74	cac	HIS	H
	89	77	ctc	LEU	L	89	75	tig	LEU	L
	90	78	agg	ARG	R	90	76	agg	ARG	R
	91	79	ctg	LEU	L	91	77	aaa	LYS	K
	92	80	ctg	LEU	L	92	78	ccc	PRO	P
	93	81	teg	SER	S	93	79	tea	SER	S
	94	82	gct	ALA	A	94	80	gtc	VAL	V
	95	83	gct	ALA	A	95	81	cat	HIS	H
	96	84	ccc	PRO	P	96	82	ata	ILE	I
	97	85	tcc	SER	S	97	83	agc	SER	S
	98	86	cag	GLN	Q	98	84	gac	ASP	D
	99	87	aca	THR	T	99	85	acg	THR	T
	100	88	tct	SER	S	100	86	gct	ALA	A
	101	89	gtg	VAL	V	101	87	gag	GLU	E
	102	90	tac	TYR	Y	102	88	tac	TYR	Y
	103	91	ttc	PHE	F	103	89	ttc	PHE	F
	104	92	tgt	CYS	C	104	90	tgt	CYS	C
CDR3-IMGT	105	93	gcc	ALA	A	105	91	gct	ALA	A
	106	94	agc	SER	S	106	92	gtg	VAL	V
	107	95	agt	SER	S	107	93	agt	SER	S
	108	96	tat	TYR	Y					
	109	97	-	-	-					

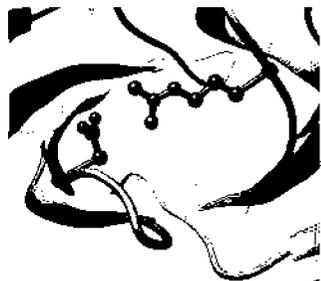
Фиг. 1С

A дикого типа : α Q44- β Q44



B

α Q44D- β Q44R



α Q44R- β Q44D



α Q44E- β Q44K



α Q44K- β Q44E



α Q44D- β Q44K



α Q44K- β Q44D



α Q44E- β Q44R



α Q44R- β Q44E



α Q44L- β Q44W



α Q44W- β Q44L



α Q44V- β Q44W

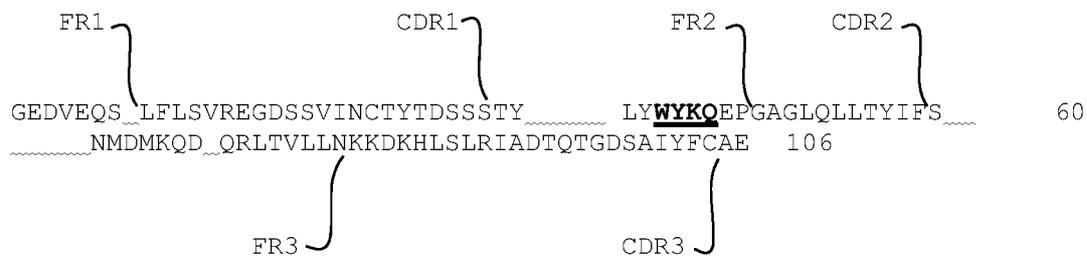


α Q44W- β Q44V



Фиг. 2

SEQ ID NO 1: переменный домен альфа-цепи ТКР R7P1D5 (TRAV5)



SEQ ID NO 2: переменный домен бета-цепи ТКР R7P1D5 (TRBV12-4)



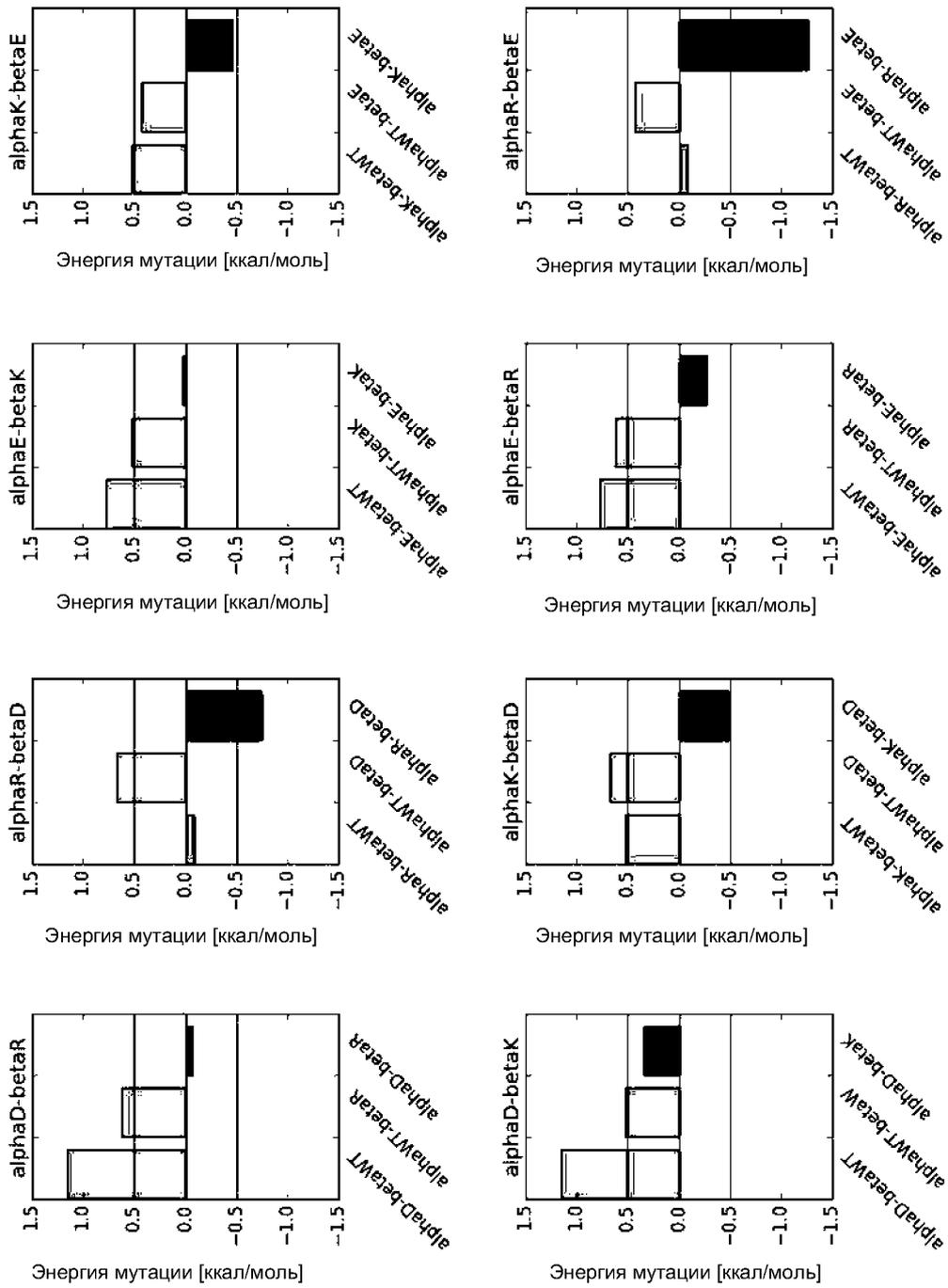
SEQ ID NO 3: переменный домен альфа-цепи ТКР TRAV 8-6



SEQ ID NO 4: переменный домен бета-цепи ТКР TRBV 6-5

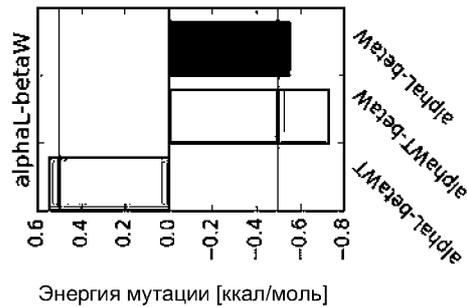
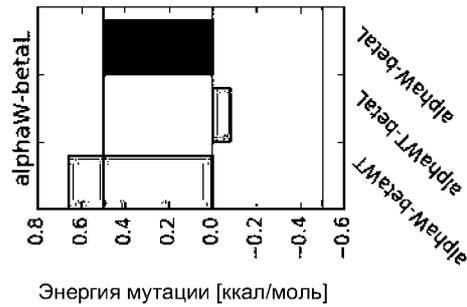
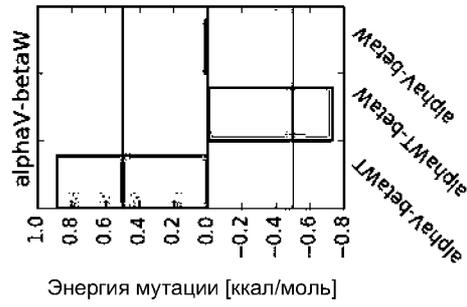
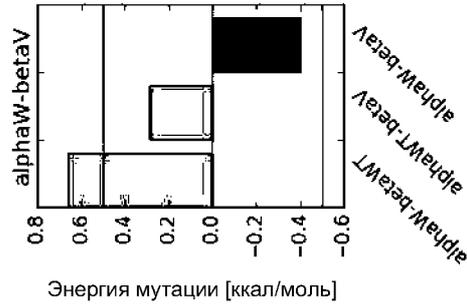


Фиг. 3



alpha - альфа
beta - бета
wt - дикого типа

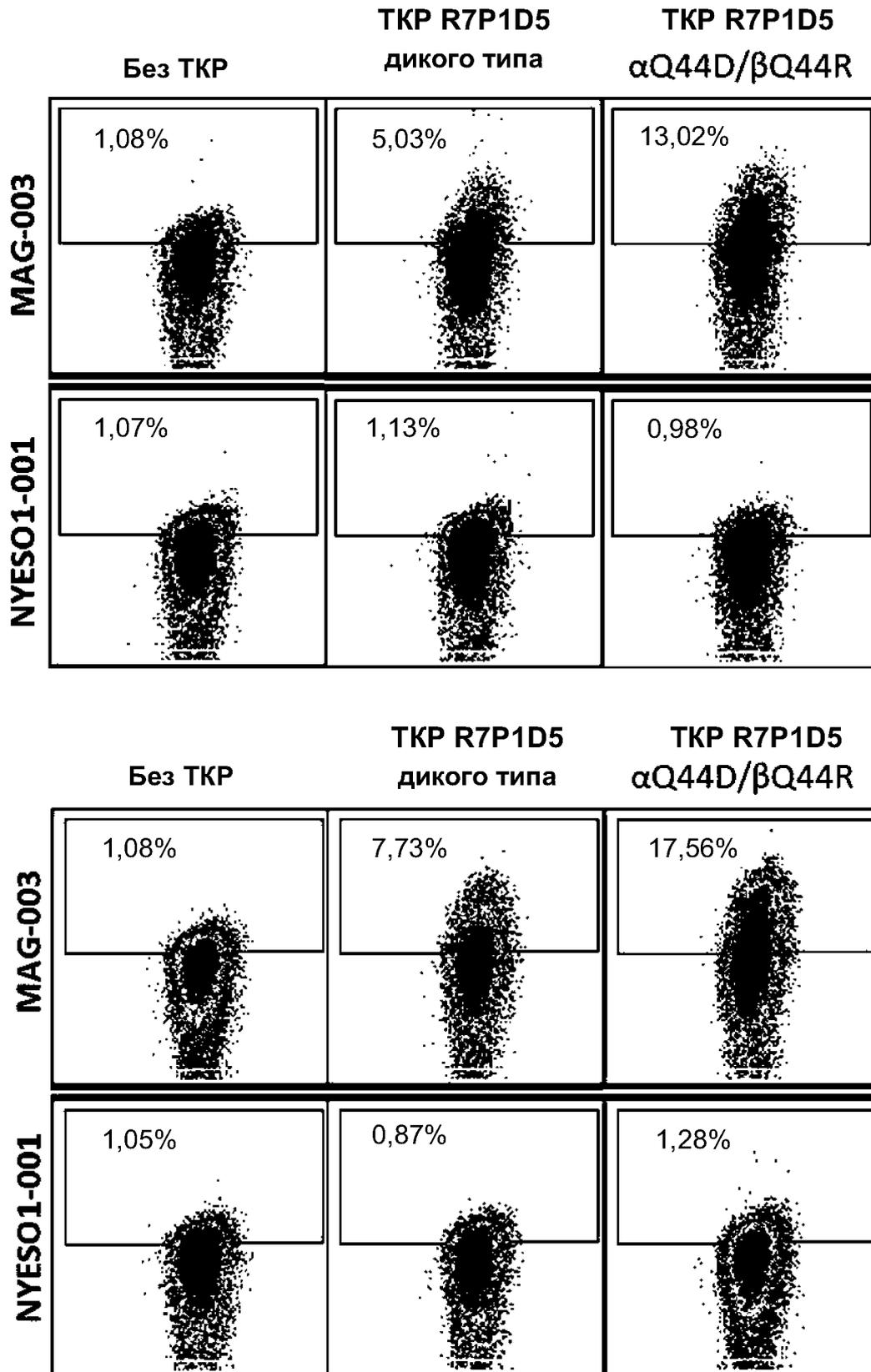
Фиг. 4А



Авторское право принадлежит Immatics (MAF-004-08)

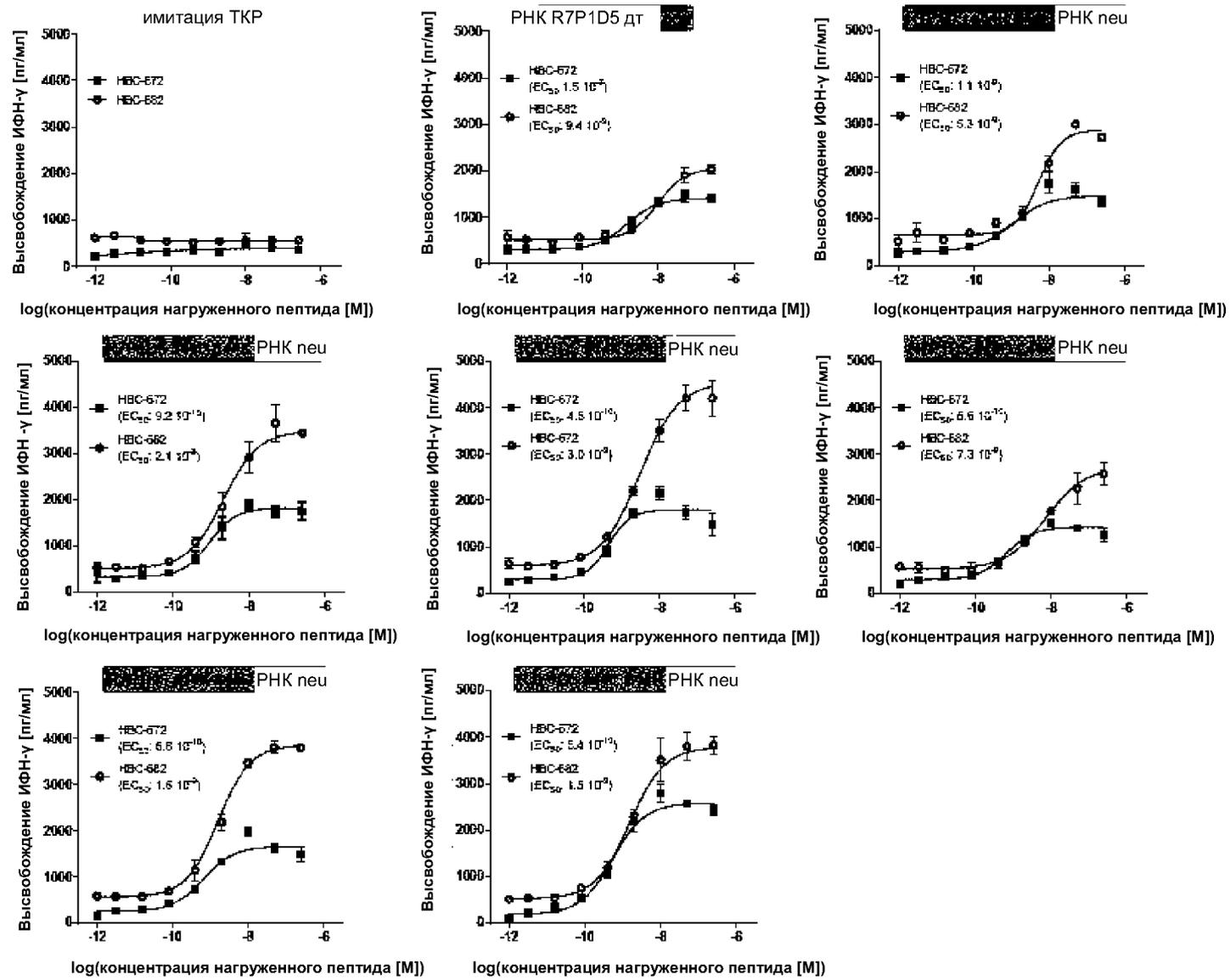
alpha - альфа
beta - бета
wt - дикого типа

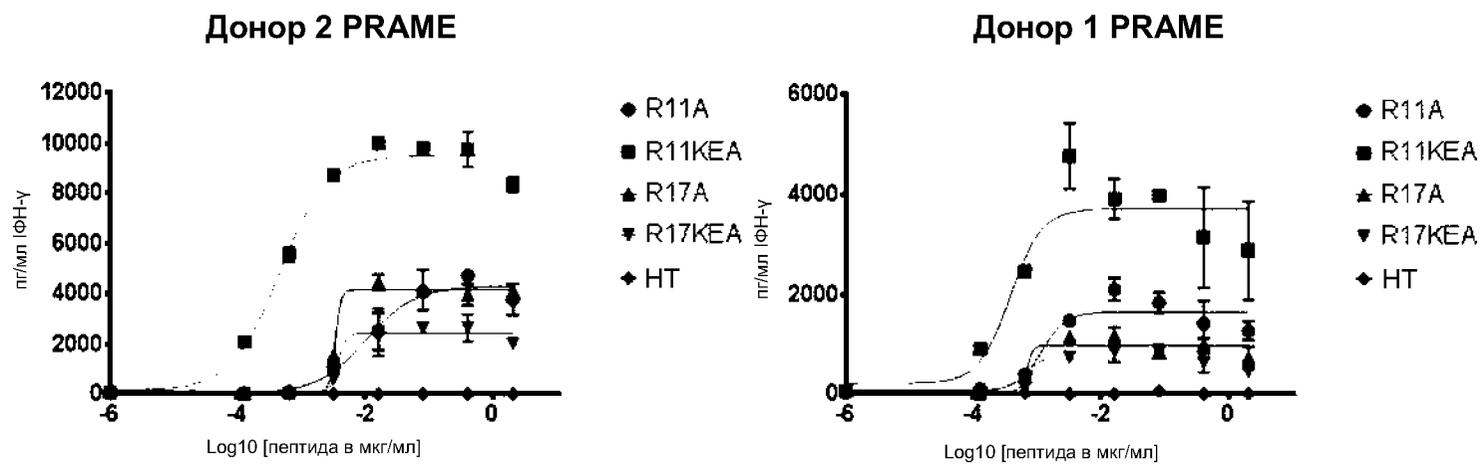
Фиг. 4В



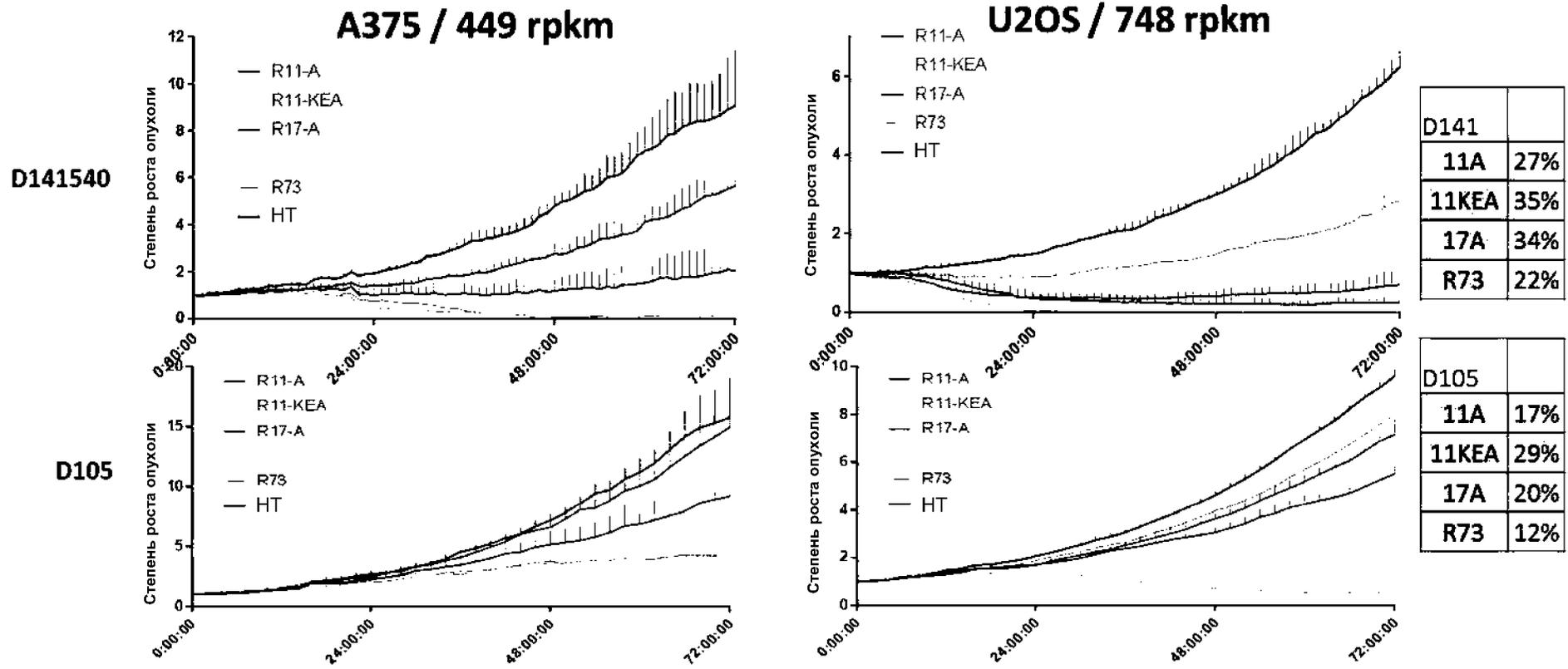
Фиг. 5

Фиг. 6





Фиг. 7



Фиг. 8

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference I33005WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2017/081745	International filing date (<i>day/month/year</i>) 6 December 2017 (06-12-2017)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 8 December 2016 (08-12-2016)
Applicant IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
 a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2017/081745

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/081745

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/725 C12N15/09
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/039507 A1 (UCL BUSINESS PLC [GB]; STAUSS HANS [GB]; XUE DR SHAO-AN [GB]) 7 April 2011 (2011-04-07)	1-3,5-7, 9-13
Y	page 16, paragraph 2 - paragraph 7; claim 6	1-15
X	----- WO 2014/083173 A1 (MAX DELBRÜCK CT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN MDC BERLIN BUCH [DE]) 5 June 2014 (2014-06-05) claims 1-30 ----- -/--	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 March 2018

Date of mailing of the international search report
09/04/2018

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer
Offermann, Stefanie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/081745

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Anonymous: "UNIPROT:H9KWC7 - Ig-like domain", 16 May 2012 (2012-05-16), XP055460088, Retrieved from the Internet: URL:http://ibis/exam/dbfetch.jsp?id=UNIPROT:H9KWC7 [retrieved on 2018-03-16] the whole document</p>	1-3
Y	<p>----- GOVERS C ET AL: "T cell receptor gene therapy: strategies for optimizing transgenic TCR pairing", TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, ELSEVIER CURRENT TRENDS, GB, vol. 16, no. 2, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 77-87, XP026904285, ISSN: 1471-4914, DOI: 10.1016/J.MOLMED.2009.12.004 [retrieved on 2010-02-01] the whole document</p>	1-15
Y	<p>----- THOMAS HOFFMANN ET AL: "Quantitative Analysis of the Association Angle between T-cell Receptor V[alpha]/V[beta] Domains Reveals Important Features for Epitope Recognition", PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY, vol. 11, no. 7, 17 July 2015 (2015-07-17), page e1004244, XP055460096, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004244 the whole document page 9, paragraph 2 - paragraph 3</p>	1-15
T	<p>----- PREETI SHARMA ET AL: "Subtle changes at the variable domain interface of the T-cell receptor can strongly increase affinity", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 293, no. 5, 11 December 2017 (2017-12-11), pages 1820-1834, XP055460242, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M117.814152 ----- -/--</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/081745

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>SPEAR TT ET AL: "TCR modifications that enhance chain pairing in gene-modified T cells can augment cross-reactivity and alleviate CD8 dependence", JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, US, vol. Early View, Version of Record online: 19 JAN 2018, 19 January 2018 (2018-01-19), pages 1-11, XP009504174, ISSN: 0741-5400, DOI: 10.1002/JLB.5A0817-314R -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2017/081745

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011039507 A1	07-04-2011	CA 2775846 A1	07-04-2011
		CN 102656188 A	05-09-2012
		EP 2483303 A1	08-08-2012
		ES 2560602 T3	22-02-2016
		US 2013045221 A1	21-02-2013
		WO 2011039507 A1	07-04-2011

WO 2014083173 A1	05-06-2014	AU 2013351062 A1	04-06-2015
		CA 2891967 A1	05-06-2014
		CN 104853765 A	19-08-2015
		EP 2925349 A1	07-10-2015
		GB 2508414 A	04-06-2014
		HK 1214942 A1	12-08-2016
		JP 2015536665 A	24-12-2015
		US 2015307585 A1	29-10-2015
		WO 2014083173 A1	05-06-2014
