

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393424** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.08

(22) Дата подачи заявки
2022.07.27

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

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕ СТ45

(31) 21188018.2; 63/203,582; 63/335,399

(32) 2021.07.27; 2021.07.27; 2022.04.27

(33) EP; US; US

(86) PCT/EP2022/071104

(87) WO 2023/006828 2023.02.02

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

(72) Изобретатель:

**Юсеф Сара, Брунк Фабиан,
Мориц Андреас, Бунк Себастьян,
Вагнер Клаудия, Маурер Доминик,
Унвердорбен Феликс (DE)**

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV) и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3. Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антигенсвязывающие белки, векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, рекомбинантным клеткам, экспрессирующим антигенсвязывающие белки, и фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие белки. Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающим белкам для применения в медицине и способу получения антигенсвязывающего белка.

A1

202393424

202393424

A1

АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕ СТ45

ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, направленным против антигенов, происходящих из белка СТ45, в частности, к антигенсвязывающим белкам, которые специфически связываются с экспрессируемым опухолью антигенным пептидом СТ45-IP в комплексе с МНС. Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам для применения для диагностики, лечения и профилактики пролиферативных заболеваний, для которых характерна экспрессия СТ45. Кроме того, настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антигенсвязывающие белки, векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, рекомбинантным клеткам, экспрессирующим антигенсвязывающие белки, и фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие белки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Иммунотерапия на основе Т-клеток нацелена на пептидные эпитопы, происходящие из опухолеассоциированных или опухолеспецифичных белков, которые представлены молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Эти опухолеассоциированные антигены (ТАА) могут представлять собой пептиды, происходящие из всех классов белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т.д., которые специфически экспрессируются раковыми клетками и/или активируются в раковых клетках. В отличие от терапии CAR-T и современных подходов на основе антител, которые могут воздействовать только на белки клеточной поверхности, иммунотерапия на основе Т-клеток обеспечивает нацеливание на недоступные иным образом внутриклеточные белки и, таким образом, значительно увеличивает количество и разнообразие мишеней.

«Раково-тестикулярный антиген (СТ45)» представляет собой мультигенное семейство из девяти почти идентичных генов в прямых tandemных повторах (обычно называемых А1, А2, А3, А5, А6, А7, А8, А9 и А10). Все девять генов СТ45 кодируют предполагаемые белки из 189 аминокислот. Было показано, что белок СТ45А1, который обычно экспрессируется только в зародышевых клетках яичек, также экспрессируется при раке легких, раке молочной железы и раке яичников (Chen, Y. T. et al., Int.J Cancer 124 (2009): 2893-2898). Также было показано, что СТ45А1 связан с плохим прогнозом и плохими исходами при множественной миеломе (Andrade, V. C. et al., Exp.Hematol. 37

(2009): 446-449). CT45A1 был описан как ген, усиливающий эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) и метастатические гены, способствующие EMT и диссеминации опухоли. Кроме того, было описано, что CT45A1 участвует в иницировании или поддержании раковых стволоподобных клеток, способствуя онкогенезу и злокачественному прогрессированию (Yang, P. et al., *Curr.Pharm.Des* 21 (2015): 1292-1300). Было показано, что сверхэкспрессия CT45A1 на модели рака молочной железы приводит к усилению регуляции различных онкогенных и метастатических генов, конститутивной активации сигнальных путей ERK и CREB и усилению онкогенеза, инвазии и метастазирования. Было показано, что подавление CT45A1 уменьшает миграцию и инвазию раковых клеток. Было показано, что CT45A2 является новым партнером по слиянию сплайсированного MLL у педиатрического пациента с бифенотипическим острым лейкозом *de novo* и, таким образом, может иметь отношение к лейкемогенезу (Cerveira, N. et al., *BMC.Cancer* 10 (2010): 518). Было показано, что CT45 часто экспрессируется как в линиях раковых клеток, так и в образцах рака легких (Chen, L. et al., *Cancer Res* 65 (2005): 5599-5606). Поскольку CT45 имеет ограниченную экспрессию или вообще не экспрессируется в нормальных тканях взрослого человека, он является привлекательной мишенью для иммунотерапевтического вмешательства.

Разработка новых противораковых агентов, которые специфически распознают внутриклеточные мишени в комплексе с МНС, является одним из наиболее важных ключей к лечению трудноизлечимых видов рака, особенно солидных опухолей. Таким образом, существует необходимость в разработке новых противораковых агентов, которые специфически нацелены на внутриклеточные белки, высокоспецифичные к раковым клеткам. Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этой потребности путем предоставления новых антигенсвязывающих белков, специфически связывающихся с антигенным пептидом CT45, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и способов применения таких молекул для лечения пролиферативных заболеваний, в частности, рака. Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению характеризуются высокой стабильностью, высокой аффинностью, высокой функциональной авидностью, высокой эффективностью и высокой специфичностью. По сравнению с ранее описанными антигенсвязывающими белками, связывающимися с антигенными пептидами CT45, антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению демонстрируют по меньшей мере одно из: повышенной стабильности, повышенной аффинности, повышенной функциональной авидности, повышенной эффективности и/или повышенной специфичности. Таким образом, антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению являются более

эффективными и безопасными, чем антигенсвязывающие белки предшествующего уровня техники.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где

CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 80, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 82, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 85, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 87,

CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 71, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 72, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 75, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 77,

CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 63, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 66, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 68,

CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 90, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 92, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 66, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 96,

CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно

SEQ ID NO: 119, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 58, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 122,

CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 35, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 38, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 40,

CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 26, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 29, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 31, или

CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 43, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 45, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 48, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 50,

где антигенсвязывающий белок содержит указанные последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и CDRb3 с не более чем одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями.

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

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

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

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

приемлемый носитель.

Согласно шестому аспекту настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего белка согласно первому аспекту настоящего изобретения, предусматривающему стадии (a) предоставления клетки-хозяина, (b) предоставления генетической конструкции, содержащей кодирующую последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок согласно первому аспекту настоящего изобретения, (c) введения генетической конструкции в клетку-хозяин и (d) экспрессии генетической конструкции клеткой-хозяином.

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

Согласно девятому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку согласно первому аспекту настоящего изобретения, нуклеиновой кислоте согласно второму аспекту настоящего изобретения, вектору согласно третьему аспекту настоящего изобретения, клетке-хозяину согласно четвертому аспекту настоящего изобретения или фармацевтической композиции согласно четвертому аспекту настоящего изобретения для применения в способе лечения и/или диагностики пролиферативного заболевания.

Согласно девятому аспекту настоящее изобретение относится к способу in-vitro обнаружения рака в биологическом образце, предусматривающему стадии (a) контакта биологического образца с антигенсвязывающим белком согласно первому аспекту настоящего изобретения, и (b) обнаружения связывания антигенсвязывающего белка с биологическим образцом.

Определения

«Антигенный пептид СТ45» содержит или состоит из аминокислотной последовательности KIFEMLEGV (SEQ ID NO: 138), которая соответствует аминокислотам 143-151 в СТ45A1 (SEQ ID NO: 749, как доступно под номером доступа Uniprot Q5HYN5), СТ45A2, СТ45A3, СТ45A5, СТ45A6, СТ45A7, СТ45A8, СТ45A9 и СТ45A10. Этот антигенный пептид СТ45 также упоминается в настоящем документе как «пептидом СТ45» или «СТ45-IP». Антигенный пептид СТ45 представляет собой пептидный эпитоп, происходящий из опухолеассоциированного или опухолеспецифического белка, и

представлен на поверхности клетки молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), предпочтительно МНС I. Более конкретно, антигенный пептид СТ45 представлен на поверхности клетки в комплексе с белком HLA, предпочтительно HLA-A, более предпочтительно HLA-A*02. Согласно наиболее предпочтительным вариантам осуществления антигенный пептид СТ45 состоит из аминокислотной последовательности KIFEMLEGV (SEQ ID NO: 138). В тех случаях, когда антигенный пептид СТ45 содержит дополнительные аминокислоты в дополнение к аминокислотной последовательности KIFEMLEGV (SEQ ID NO: 138), предпочтительно общая длина антигенного пептида СТ45 не превышает 30 или 20 аминокислот, более предпочтительно не превышает 15 аминокислот, еще более предпочтительно не превышает 12 аминокислот. В тех случаях, когда антигенный пептид СТ45 содержит дополнительные аминокислоты в дополнение к SEQ ID NO: 138, аминокислоты SEQ ID NO: 138 предпочтительно расположены внутри пептидсвязывающей бороздки белка МНС, когда антигенный пептид находится в комплексе с белком МНС. Специалистам в данной области известно, что антигенные пептиды, представленные на МНС I, обычно имеют длину не более 12 аминокислот. Однако в случаях, когда пептиды искусственно загружены на белки МНС, вполне вероятно, что антигенный пептид, искусственно загруженный на МНС I, может иметь длину более 12 аминокислот. Термин «антиген» или «антиген-мишень», используемый в настоящем документе, относится к молекуле или части молекулы или комплексу, которые способны связываться с антигенсвязывающим сайтом, причем указанный антигенсвязывающий сайт присутствует в антигенсвязывающем белке, предпочтительно антигенсвязывающем белке согласно настоящему изобретению. Антигеном в контексте настоящего изобретения является антигенный пептид СТ45, более конкретно антигенный пептид СТ45 в комплексе с белком МНС, таким как белок HLA, например, HLA-A*02.

«Клетка, презентирующая комплекс СТ45-IP:МНС» в настоящем документе относится к клетке, которая презентрует на своей поверхности СТ45-IP в комплексе с молекулой МНС. Согласно предпочтительным вариантам осуществления клетка, презентирующая комплекс СТ45-IP:МНС, представляет собой опухолевую клетку, причем опухоль предпочтительно представляет собой рак, как определено в настоящем документе ниже в разделе «Терапевтические способы и применения». В контексте настоящего изобретения комплекс СТ45-IP:МНС избыточно представлен на клеточной поверхности клетки, презентирующей комплекс СТ45-IP:МНС, по сравнению с уровнями указанного комплекса на поверхности клеток в нормальной (здоровой) ткани (также называемых «здоровыми клетками») или на поверхности контрольных клеток, загруженных другим антигенпрезентирующим пептидом или не содержащих пептид. «Избыточно представлен»

означает, что комплекс СТ45-IP:МНС присутствует на уровне, по меньшей мере в 2 раза, предпочтительно в 5-10 раз превышающем уровень, присутствующий в здоровой ткани или контрольных клетках.

Примером «клеток, презентующих комплекс СТ45-IP:МНС» являются клетки Т2, загруженные СТ45-IP, или опухолевые клетки NSH1703 или A375, используемые в примерах настоящей заявки.

«Домен» может представлять собой любую область белка, обычно определяемую на основе гомологии последовательностей и часто относящуюся к конкретной структурной или функциональной единице.

Термин «домен иммуноглобулина (Ig)» в контексте настоящего изобретения относится к белковому домену, который состоит из двухслойного сэндвича из 7-9 антипараллельных β -нитей, организованных в два β -листа с топологией греческого ключа. Домен Ig, вероятно, является наиболее часто используемым «строительным блоком» в белках природного происхождения. Белки, содержащие домены Ig, отнесены к суперсемейству иммуноглобулинов, включая, например, антитела, Т-клеточные рецепторы (TCR) и молекулы клеточной адгезии. Примерами доменов Ig являются переменные и константные домены антител и TCR.

«V_A» в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену TCR, содержащему последовательности CDR, происходящие из TCR, и каркасные последовательности, происходящие из TCR. Последовательности CDR и каркасные последовательности могут происходить из переменного домена α -цепи (V_{α}), β -цепи (V_{β}), γ -цепи (V_{γ}) или δ -цепи (V_{δ}) TCR, предпочтительно из V_{α} . Последовательности CDR и каркасные последовательности домена V_A в контексте настоящего изобретения не обязательно должны происходить из одной и той же цепи TCR. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR, происходящие из переменного домена TCR (донорного TCR), прививают на другой переменный домен TCR (акцепторного TCR). Например, донорный TCR может содержать V_{α} , кодируемый TRAV5 и TRAJ17, и акцепторный TCR может содержать V_A , кодируемый TRAV14 и TRAJ33. Если CDR1, CDR3 и необязательно CDR2 донорного TCR привить на акцепторный TCR, CDR будут присутствовать в контексте различных каркасных областей, но аффинность и специфичность к антигенному пептиду, переносимому CDR, не будут изменены, т.е. после прививки переменный домен акцепторного TCR будет иметь по существу такую же аффинность и специфичность в отношении антигенного пептида, что и переменный домен донорного TCR.

«V_B» в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену, содержащему последовательности CDR, происходящие из TCR, и каркасные

последовательности, происходящие из TCR. Последовательности CDR и каркасные последовательности могут быть получены из переменного домена α -цепи (V_α), β -цепи (V_β), γ -цепи (V_γ) или δ -цепи (V_δ) TCR, предпочтительно из V_β . Последовательности CDR и каркасные последовательности домена V_β в контексте настоящего изобретения не обязательно должны происходить из одной и той же цепи TCR. Согласно некоторым вариантам осуществления CDR, происходящие из переменного домена TCR (донорного TCR), прививают на другой переменный домен TCR (акцепторного TCR). Например, донорный TCR может содержать V_β , кодируемый TRBV2 и TRBJ2-1, и акцепторный TCR может содержать V_α , кодируемый TRBV27 и TRBJ1-5. Если CDR1, CDR3 и необязательно CDR2 донорного TCR привить на акцепторный TCR, CDR будут присутствовать в контексте различных каркасных областей, но аффинность и специфичность к антигенному пептиду, переносимому CDR, не будут изменены, т.е. после прививки переменный домен акцепторного TCR будет иметь по существу такую же аффинность и специфичность в отношении антигенного пептида, что и переменный домен донорного TCR.

CDR можно не только обменивать/прививать между разными альфа-переменными доменами или разными бета-переменными доменами, но также можно прививать от TCR альфа к переменному домену TCR бета, гамма или дельта или от TCR бета к переменному домену TCR альфа, гамма или дельта.

V_α в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену α -цепи TCR.

V_β в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену β -цепи TCR.

V_γ в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену γ -цепи TCR.

V_δ в контексте настоящего изобретения относится к переменному домену δ -цепи TCR.

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

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

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

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

Термин «эпитоп», также известный как антигенная детерминанта, представляет

собой часть антигена, распознаваемую иммунной системой. В настоящем документе термин «эпитоп» включает термины «структурный эпитоп» и «функциональный эпитоп». «Структурный эпитоп» представляет собой те аминокислоты антигена, например, комплекс пептид-МНС, которые покрываются антигенсвязывающим белком при связывании с антигеном. Обычно покрытыми считаются все аминокислоты антигена, находящиеся в пределах 5 Å от любого атома аминокислоты антигенсвязывающего белка. Структурный эпитоп антигена можно определить известными в данной области техники способами, включая рентгеновскую кристаллографию или ЯМР-анализ. Структурный эпитоп антитела обычно содержит от 20 до 30 аминокислот. Структурный эпитоп TCR обычно содержит от 20 до 30 аминокислот. «Функциональный эпитоп», как определено в настоящем документе, представляет собой подмножество тех аминокислот, которые образуют структурный эпитоп, и содержит аминокислоты антигена, которые имеют решающее значение для образования интерфейса с антигенсвязывающим белком согласно настоящему изобретению или его функциональным фрагментом, либо путем непосредственного образования нековалентных взаимодействий, таких как Н-связи, солевые мостики, ароматические стопки или гидрофобные взаимодействия, или путем косвенной стабилизации конформации связывания антигена, и определяется, например, мутационным сканированием. В контексте настоящего изобретения функциональный эпитоп также называют «связывающим мотивом». Обычно функциональный эпитоп антигена, связываемого антителом, содержит от 4 до 6 аминокислот. Обычно функциональный эпитоп комплекса пептид-МНС содержит от 2 до 6 или 7 аминокислот пептида и от 2 до 7 аминокислот молекулы МНС. Поскольку пептиды, представленные МНС I, обычно имеют длину от 8 до 10 аминокислот, только часть аминокислот каждого данного пептида является частью функционального эпитопа комплекса пептид-МНС. Эпитоп, в частности, функциональный эпитоп, связываемый антигенсвязывающими белками согласно настоящего изобретения, содержит или состоит из аминокислот антигена, которые необходимы для образования интерфейса связывания.

«Главный комплекс гистосовместимости» (МНС) представляет собой набор белков клеточной поверхности, необходимых приобретенной иммунной системе для распознавания чужеродных молекул у позвоночных, что, в свою очередь, определяет гистосовместимость. Основная функция молекул МНС состоит в связывании с антигенами, происходящими из патогенов, и отображении их на поверхности клетки для распознавания соответствующими Т-клетками. МНС человека также называют комплексом HLA (человеческий лейкоцитарный антиген) (или просто HLA). Таким образом, согласно предпочтительному варианту осуществления МНС представляет собой HLA. Семейство

генов МНС разделено на три подгруппы: класс I, класс II и класс III. Комплексы пептида и молекул МНС класса I (МНС I) обычно распознаются CD8-положительными Т-клетками (Т-клетками CD8+), несущими соответствующий Т-клеточный рецептор (TCR), тогда как комплексы пептида и молекул МНС класса II (МНС II) обычно распознается CD4-положительными хелперными Т-клетками (Т-клетками CD4+), несущими соответствующий TCR. CD4 и CD8 обычно действуют как корецепторы TCR при связывании с МНС I и МНС II, соответственно. В некоторых исключительных случаях комплексы пептида и МНС I распознаются CD8-отрицательными (в частности, CD8-отрицательными, CD4-отрицательными) Т-клетками (Soto et al., 2013, Cancer Immunol Immunother. 2013 Feb, 62(2): 359–369). Поскольку ответы CD8-положительных и CD4-положительных Т-клеток совместно и синергически способствуют противоопухолевому эффекту, идентификация и характеристика опухолеассоциированных антигенов и соответствующих рецепторов Т-клеток важны при разработке способов иммунотерапии рака, таких как вакцины и клеточная терапия. Ген HLA-A расположен на коротком плече хромосомы 6 и кодирует более крупный компонент α -цепи HLA-A. Вариация α -цепи HLA-A является ключевой для функции HLA. Эта вариация способствует генетическому разнообразию популяции. Поскольку каждый HLA имеет различную аффинность в отношении пептидов определенных структур, большее разнообразие HLA означает большее разнообразие антигенов, которые будут «представлены» на поверхности клетки. Белок HLA МНС класса I в контексте настоящего изобретения может представлять собой белок HLA-A, HLA-B или HLA-C, предпочтительно белок HLA-A, например, HLA-A*02. При иммунной реакции, зависимой от МНС класса I, пептиды не только должны быть способны связываться с определенными молекулами МНС класса I, экспрессируемыми опухолевыми клетками, но впоследствии также должны распознаваться Т-клетками, несущими специфические рецепторы Т-клеток (TCR).

«Антигенный пептид в комплексе с белком МНС» в настоящем документе относится к антигенному пептиду, который нековалентно связан с молекулой МНС. В частности, антигенный пептид располагается в «пептидсвязывающей бороздке», образованной молекулой МНС. Комплекс молекулы МНС и антигенного пептида в настоящем документе также называют «комплексом пептид-МНС» или «комплексом рМНС». В случае антигенного пептида СТ45 комплекс также называют «комплексом антигенный пептид СТ45-МНС» или «комплексом СТ45-IP :МНС».

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

Термин «антигенсвязывающий белок» в настоящем документе относится к

полипептиду или комплексу двух или более полипептидов, содержащих антигенсвязывающий сайт, который способен специфически связываться с антигеном, в частности, с антигенным пептидом в комплексе с МНС. В контексте настоящего изобретения термин «антигенсвязывающий белок» включает антигенсвязывающие белки множества различных форматов, как описано ниже, включая растворимые антигенсвязывающие белки, мембраносвязанные антигенсвязывающие белки, одновалентные, двухвалентные и многовалентные антигенсвязывающие белки, моноспецифические, биспецифические и мультиспецифические антигенсвязывающие белки, одноцепочечные антигенсвязывающие белки и антигенсвязывающие белки, содержащие две или более цепей, слитые белки и химерные белки. Этот термин включает антигенсвязывающие белки, имеющие общую структуру TCR, антитела или химерного антигенного рецептора (CAR). Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению содержит CDR, происходящие из TCR, в частности, переменный домен V_A , содержащий CDRa1, CDRa3 и необязательно CDRa2, происходящие из TCR, и переменный домен V_B , содержащий CDRb1, CDRb3 и необязательно CDRb2, происходящие из TCR. Согласно конкретному варианту осуществления весь домен V_A и/или весь домен V_B происходят из TCR и, таким образом, представляют собой переменные домены TCR альфа, бета, гамма или дельта (V_α , V_β , V_γ или V_δ). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой TCR. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению содержит V_A и V_B , как определено в настоящем документе, и дополнительно дополнительный домен, слитый напрямую или не напрямую с V_A или V_B . Такой антигенсвязывающий белок можно назвать «слитым белком». Примеры дополнительных доменов, содержащихся в антигенсвязывающем белке согласно настоящему изобретению, который представляет собой «слитый белок», перечислены ниже. Если антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифический или мультиспецифический антигенсвязывающий белок, он содержит в дополнение к V_A и V_B , как определено в настоящем документе, по меньшей мере еще один переменный домен, предпочтительно два переменных домена и необязательно константный домен, где переменные и/или константные домены могут быть получены из антитела или TCR. Таким образом, антигенсвязывающий белок содержит два разных антигенсвязывающих сайта (один образован V_A и V_B , а другой образован дополнительными по меньшей мере одним, предпочтительно двумя переменными доменами) и способен специфически связываться с двумя разными антигенами одновременно, т.е. он известен, например, из биспецифических антител. Согласно некоторым вариантам осуществления

антигенсвязывающий белок содержит V_A и V_B , происходящие из TCR, и дополнительно два происходящих из антитела переменных домена, в частности, V_L и V_H . Такие конструкции, содержащие элементы как антител, так и TCR, представляют собой гибридные форматы и могут, например, называться «биспецифический слитый белок TCR-антител». В таких биспецифических слитых белках переменные домены могут быть расположены в различных ориентациях. Способы получения таких биспецифических слитых белков известны специалистам в данной области техники, которые, таким образом, могут легко использовать переменные домены, как определено в настоящем документе, для создания и продукции биспецифических антигенсвязывающих белков в различных форматах. Специалист в данной области техники вполне способен выбрать подходящие линкеры для обеспечения сворачивания в желаемую конформацию.

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

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

Предпочтительно антигенсвязывающий белок представляет собой TCR. В контексте настоящего изобретения термин «TCR» включает как нативные, так и сконструированные TCR.

«Нативный TCR» относится к TCR дикого типа, который можно выделить из природного источника. Нативные TCR представляют собой гетеродимерные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, которые связаны с

инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в опосредовании передачи сигнала. Нативные гетеродимерные TCR существуют в формах $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$, которые структурно подобны, но имеют разные местоположения и, вероятно, функции. Нативные полноразмерные $\alpha\beta$ -гетеродимерные TCR состоят из α -цепи и β -цепи. α -Цепь содержит переменную область (область V), кодируемую геном TRAV, соединительную область (область J), кодируемую геном TRAJ, и константную область (область C), кодируемую геном TRAC. β -Цепь содержит переменную область (область V), кодируемую геном TRBV, соединительную область (область J), кодируемую геном TRBJ, и константную область (область C), кодируемую геном TRBC, и обычно короткую область разнообразия (область D), кодируемую геном TRBD, между областями V и J, хотя эту область D часто рассматривают как часть области J (Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 10). Гены, кодирующие различные переменные, соединительные и константные области α - и β -цепей, обозначают согласно номенклатуре IMGT уникальными номерами (Folch and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(1): 42-54, Scaviner and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 83-96, LeFranc and LeFranc, (2001), "T cell Receptor Factsbook", Academic Press). Дополнительную информацию о генах TCR можно найти в международной информационной системе ImMunoGeneTics[®], Lefranc M-P *et al.*, (Nucleic Acids Res. 2015 Jan, 43(Database issue):D413-22, и <http://www.imgt.org/>).

На уровне белка α -, β -, γ - и δ -цепи TCR включают два домена иммуноглобулина: переменный домен и константный домен. Переменный домен соответствует области V(D)J. Константный домен соответствует области C. Константный домен представляет собой проксимальный к мембране домен и в контексте настоящего изобретения также включает трансмембранный (TM) домен и короткий цитоплазматический хвост. Каждый из константных и переменных доменов включает внутрицепочечную дисульфидную связь. Переменные домены (V_α и V_β в TCR $\alpha\beta$ и V_γ и V_δ в TCR $\gamma\delta$) содержат высокополиморфные петли, содержащие определяющие комплементарности области (CDR).

Каждый переменный домен TCR содержит три «определяющие комплементарности области TCR (CDR)», встроенные в каркасную последовательность, одна из которых представляет собой гиперпеременную область, называемую CDR3. В контексте настоящего изобретения CDRa1, CDRa2 и CDRa3 обозначают CDR α -цепи, а CDRb1, CDRb2 и CDRb3 обозначают CDR β -цепи. Последовательности, кодирующие CDRa1 и CDRa2, содержатся в TRAV, последовательности, кодирующие CDRa3, содержатся в TRAV и TRAJ, последовательности, кодирующие CDRb1 и CDRb2, содержатся в TRBV, а последовательности, кодирующие CDRb3, содержатся в TRBV, TRBD и TRBJ. В TCR аминокислотные остатки CDR1 и CDR3 контактируют с антигенным

пептидом, тогда как аминокислотные остатки CDR2 в основном контактируют с молекулой HLA (Stadinski et al., J Immunol. 2014 June 15, 192(12): 6071–6082, Cole et al., J Biol Chem. 2014 Jan 10, 289(2):628-38). Таким образом, антигенная специфичность TCR определяется последовательностями CDR3 и CDR1. Последовательности CDR2 не требуются для определения специфичности антигена, но могут играть роль в общей аффинности TCR в отношении комплекса пептид-МНС.

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

«Сконструированный TCR» может представлять собой белок, очень напоминающий нативный TCR, но содержащий незначительные модификации в переменных и/или константных доменах, например, гуманизированный TCR или TCR с улучшенным уровнем гетеродимеризации или экспрессии, или может представлять собой одноцепочечный TCR, растворимый TCR, одновалентный, двухвалентный или мультиспецифический TCR, функциональный фрагмент TCR или слитый белок или химерный белок, содержащий функциональный фрагмент TCR.

«Функциональный фрагмент TCR» относится к фрагменту TCR, который сохраняет или по существу сохраняет аффинность, функциональную avidность и/или специфичность родительского TCR, из которого он получен, к целевому антигену. «Родительский TCR» в этом контексте относится к полноразмерному TCR, из которого получен функциональный

фрагмент. Поскольку связывание с целевым антигенным пептидом определяется последовательностями CDR1 и CDR3, а связывание с комплексом МНС целевого антигенного пептида определяется CDR1, CDR2 и CDR3, антигенсвязывающие белки, содержащие последовательности CDR1 и CDR3 и необязательно CDR2 родительского TCR сохраняют аффинность, функциональную avidность и/или специфичность родительского TCR к целевому антигену. Специалистам в данной области техники известно, что CDR должны перемежаться с каркасными областями (FR), однако специфические аминокислотные последовательности каркасных областей не участвуют непосредственно в специфичности целевого антигена. Примеры функциональных фрагментов TCR включают одиночные вариабельные домены, такие как вариабельные домены альфа, бета, гамма или дельта TCR, или фрагменты цепей α , β , δ или γ , таких как цепь α , β , δ или γ без трансмембранного домена, и короткий цитоплазматический хвост. В контексте настоящего изобретения термин «фрагмент» относится к встречающимся в природе фрагментам (например, вариантам сплайсинга или пептидным фрагментам), а также к искусственно сконструированным фрагментам, в частности, к фрагментам, полученным генно-технологическими способами.

Функциональный фрагмент TCR, как рассматривается, сохранил или по существу сохранил аффинность в отношении целевого антигена, если, например, K_D связывания с целевым антигеном, измеренная, как указано ниже, идентична K_D родительского TCR или повышена или уменьшена, предпочтительно уменьшена, не более чем в 10, 5, 3 или 2 раза.

Функциональный фрагмент TCR, как рассматривается, сохранил или по существу сохранил функциональную avidность в отношении целевого антигена, если, например, функциональная avidность в отношении целевого антигена идентична функциональной avidности родительского TCR или повышена или уменьшена, предпочтительно уменьшена, не более чем на 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 3%, 2% или 1%. В частности, считается, что функциональный фрагмент TCR сохранил или по существу сохранил функциональную avidность в отношении целевого антигена, если, например, его цитотоксическая активность в ответ на мишень родительского белка, как измерено посредством анализа цитотоксичности, предпочтительно анализа высвобождения люциферазы, как описано ниже, идентична цитотоксической активности исходного TCR или повышена или уменьшена, предпочтительно уменьшена, не более чем на 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 3%, 2% или 1%, предпочтительно 10%, 8%, 5%, 3%, 2% или 1%.

Функциональный фрагмент TCR, как рассматривается, сохранил или по существу сохранил специфичность в отношении целевого антигена (т.е. способность специфически

связываться с целевым антигеном), если он не связывается в значительной степени с пептидами, отличными от целевого антигенного пептида родительского TCR.

Термины «TCR α/β » или «TCR γ/δ » относятся к TCR, содержащему α -цепь и β -цепь, как описано выше, или γ -цепь и δ -цепь, соответственно. Такой TCR также может быть описан как «полноразмерный TCR» или «обычный TCR». TCR α/β или TCR γ/δ может представлять собой нативный TCR или может представлять собой сконструированный TCR, который сохраняет структуру нативного TCR, т.е. сконструированный TCR, содержащий незначительные модификации в переменных и/или константных доменах, как описано выше, такой как гуманизированный TCR.

«Одноцепочечный TCR (scTCR)» в настоящем документе означает TCR, в котором переменные домены TCR расположены на одном полипептиде. Обычно переменные домены в scTCR разделены линкером, причем указанный линкер обычно содержит от 10 до 30 аминокислот, например, 25 аминокислот.

«Химерный белок» в настоящем документе относится к белку, содержащему последовательности нескольких видов. «Химерный TCR» в контексте настоящего изобретения относится к TCR, содержащему последовательности нескольких видов. Предпочтительно химерный TCR в контексте настоящего изобретения может содержать α -цепь, содержащую по меньшей мере один домен человека и один домен мыши. Более предпочтительно, химерный TCR в контексте настоящего изобретения может содержать α -цепь, содержащую переменный домен α -цепи человека и, например, константный домен α -цепи мышинного TCR.

В контексте настоящего изобретения термин «антитело» включает нативные и сконструированные антитела. Термин «сконструированное антитело» включает функциональные фрагменты антител, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела, биспецифические или мультиспецифические антитела.

Нативное «антитело» содержит две тяжелые и две легкие цепи, причем тяжелые цепи связаны друг с другом дисульфидными связями, и каждая тяжелая цепь связана с легкой цепью дисульфидной связью. Существует два типа легкой цепи: лямбда (λ) и каппа (κ). Существует пять основных классов тяжелых цепей (или изоформ), которые определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепочка содержит отдельные домены (также называемые областями). Легкая цепь включает два домена: переменный домен (V_L) и константный домен (C_L). Тяжелая цепь включает четыре или пять доменов в зависимости от изоформа антитела, переменный домен (V_H) и три или четыре константных домена (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} и необязательно C_{H4} , совместно обозначаемые как C_H). Переменные домены как легкой (V_L), так и тяжелой (V_H)

определяют распознавание связывания и специфичность в отношении антигена. Константные домены легкой (C_L) и тяжелой (C_H) цепей придают важные биологические свойства, такие как ассоциация цепей антител, секреция, трансплацентарная подвижность, связывание комплемента и связывание рецепторами F_c (F_cR).

Специфичность антитела заключается в структурной комплементарности между сайтом связывания антитела и антигенной детерминантой. Сайты связывания антител состоят из остатков, которые в основном происходят из «определяющих комплементарность областей антитела» (CDR) или гипервариабельных областей. Иногда остатки из негипервариабельных или каркасных областей (FR) влияют на общую структуру домена и, следовательно, на сайт связывания. CDR относятся к аминокислотным последовательностям, которые вместе определяют аффинность связывания и специфичность природной области F_v сайта связывания нативного антитела. Каждая легкая и тяжелая цепи антитела имеют по три CDR, обозначенных CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L и CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, соответственно. Таким образом, антигенсвязывающий сайт антитела включает шесть CDR, содержащих набор CDR из каждой области V тяжелой и легкой цепей. «Каркасные области антитела» (FR) относятся к аминокислотным последовательностям, расположенным между CDR, т.е. к тем частям вариабельных областей легкой и тяжелой цепи антитела, которые относительно консервативны среди различных антител одного вида. Каждая легкая и тяжелая цепи антитела содержат по четыре FR, обозначенных FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L, и FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H, соответственно. Соответственно, вариабельный домен легкой цепи может быть описан как (FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L), и вариабельный домен тяжелой цепи может быть описан как (FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H). В контексте настоящего изобретения «каркасная область человека» представляет собой каркасную область, которая по существу идентична (приблизительно на 85% или более, в частности, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) каркасной области встречающегося в природе человеческого антитела. В контексте настоящего изобретения определение CDR/FR в вариабельном домене легкой или тяжелой цепи антитела определяют на основе определения IMGT (Lefranc *et al.*, Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77, www.imgt.org). Соответственно, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 данной вариабельной цепи и аминокислотные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 указаны в соответствии с указанным определением IMGT.

Зная аминокислотную последовательность CDR антитела, TCR или антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению, специалист в данной области техники может легко определить каркасные области, такие как каркасные области

TCR или каркасные области антитела. В случаях, когда CDR не указаны, специалист в данной области техники может сначала определить аминокислотные последовательности CDR на основе определения IMGT для TCR или определения IMGT для антител, а затем определить аминокислотные последовательности каркасных областей.

Форматы сконструированных антител включают функциональные фрагменты антител, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела и химерные, гуманизированные, биспецифические или мультиспецифические антитела. Форматы сконструированных антител дополнительно включают конструкции, в которых переменный домен легкой цепи антитела может быть заменен переменным доменом α -цепи TCR, и переменный домен тяжелой цепи может быть заменен переменным доменом β -цепи TCR, или наоборот. «Функциональный фрагмент антитела» относится к части полноразмерного антитела, которая сохраняет способность связываться со своим целевым антигеном, в частности, аффинность и/или специфичность в отношении целевого антигена. Предпочтительно функциональный фрагмент антитела содержит антигенсвязывающую область или переменную область полноразмерного антитела. Примеры функциональных фрагментов антител включают Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂ и диатела. Функциональный фрагмент антитела также может представлять собой однодоменное антитело, такое как антитело с тяжелой цепью. Термин «Fab» означает фрагмент антитела, имеющий молекулярную массу приблизительно 50000 Дальтон и антигенсвязывающую активность, в котором приблизительно половина N-концевой стороны H-цепи и вся L-цепь, среди фрагментов, полученных обработкой IgG протеазой, например, папаином, связаны между собой дисульфидной связью. Фрагмент Fv представляет собой N-концевую часть Fab-фрагмента антитела и состоит из переменных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи.

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

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, которое полностью или

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

В контексте настоящего изобретения последовательность, которая «по меньшей мере на 85% идентична эталонной последовательности», представляет собой последовательность, имеющую по всей своей длине 85% или более, в частности, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с эталонной последовательностью по всей длине. Белки, состоящие из аминокислотной последовательности, «имеющие по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности» с эталонной последовательностью, могут содержать такие мутации, как делеции, вставки и/или замены, по сравнению с эталонной последовательностью. В случае замен белок, состоящий из аминокислотной последовательности, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной эталонной последовательности, может соответствовать гомологичной последовательности, происходящей из других видов, чем эталонная последовательность.

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

«Аминокислотные мутации» могут представлять собой делеции, вставки или замены.

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

Согласно одному варианту осуществления консервативная аминокислотная замена может включать замену аминокислоты другой аминокислотой того же класса, например, (1) неполярной: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp, (2) незаряженной полярной: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, (3) кислотной: Asp, Glu, и (4) основной: Lys, Arg, His. Другие консервативные аминокислотные замены также могут быть выполнены следующим образом: (1) ароматические: Phe, Tyr, His, (2) донор протонов: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp, и (3) акцептор протонов: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (см., например, патент США № 10106805, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте).

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

Таблица 1. Консервативные аминокислотные замены

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

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

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

«Ковалентная связь» в контексте настоящего изобретения относится, например, к дисульфидной связи, или пептидной связи, или ковалентной связи через линкер или линкерную последовательность, такую как полипептидный линкер.

Термин «линкер» в контексте настоящего изобретения относится к одному или нескольким аминокислотным остаткам, вставленным между доменами или доменом и агентом, обеспечивающим достаточную подвижность доменов или элементов, например, переменных доменов биспецифического связывания антигена для правильного сворачивания с образованием антигенсвязывающих сайтов.

Согласно некоторым вариантам осуществления линкер состоит из 0 аминокислот, что означает, что линкер отсутствует. Линкер вставляется при переходе между переменными доменами или между переменными доменами и константными доменами (или доменами димеризации), соответственно, на уровне аминокислотной последовательности. Переход между доменами можно идентифицировать, поскольку хорошо известен приблизительный размер доменов антител, а также доменов TCR. Точное местоположение доменного перехода можно определить путем обнаружения участков пептида, которые не образуют вторичные структурные элементы, такие как бета-листы или

альфа-спирали, как показано экспериментальными данными или как можно предположить с помощью методов моделирования или предсказания вторичной структуры.

Линкер, если в соответствующем контексте не указано иное, может иметь длину по меньшей мере от 1 до 30 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер может иметь длину 2-25, 2-20 или 3-18 аминокислот. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер может представлять собой пептид с длиной не более 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислот. Согласно другим вариантам осуществления линкер может составлять 5-25, 5-15, 4-11, 10-20, или 20-30 аминокислот в длину. Согласно другим вариантам осуществления линкер может составлять приблизительно, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот в длину. Согласно конкретному варианту осуществления линкер может составлять менее 24, менее 20, менее 16, менее 12, менее 10, например, от 5 до 24, от 10 до 24 или 5-10 аминокислот в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления указанный линкер имеет длину 1 или более аминокислотных остатков, например, более 1, более 2, более 5, более 10, более 20 аминокислотных остатков, более 22 аминокислотных остатков в длину. Согласно предпочтительным вариантам осуществления линкер представляет собой глицин/сериновый линкер, т.е. линкер, состоящий из или по существу состоящий из остатков глицина и серина.

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

«Сконструированный» антигенсвязывающий белок, в частности, сконструированный TCR, в контексте настоящего изобретения относится к белку, который был модифицирован биотехнологическими методами, в частности, путем введения аминокислотных мутаций в нативную белковую последовательность. Такие биотехнологические методы хорошо известны специалистам в данной области техники.

Под «очищенным» подразумевается, при ссылке на полипептид, например, антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, или нуклеотидную последовательность, например, кодирующую антигенсвязывающие белки или их функциональный фрагмент, как описано в настоящем документе, что указанная молекула присутствует по существу в отсутствии других биологических макромолекул того же типа. Термин «очищенный» в контексте настоящего изобретения, в частности, означает, что присутствует по меньшей мере 75 мас.%, 85 мас.%, 95 мас.% или 98 мас.% биологических макромолекул одного и того же типа. Термин «очищенный» в контексте настоящего изобретения может дополнительно указывать на то, что антигенсвязывающий белок свободен от ДНК, РНК, белков, полипептидов или клеток, которые могут мешать его

терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или другому применению.

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

Термин «выделенный» означает измененное или удаленное из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в живом животном, не являются «выделенными», но та же самая нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих веществ в его естественном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в существенно очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин. Выделенный антигенсвязывающий белок практически не содержит другие антигенсвязывающие белки, обладающие различной антигенной специфичностью (например, антигенсвязывающий белок, который специфически связывает СТ45-IP, по существу свободен от антигенсвязывающих белков, которые специфически связывают антигены, отличные от СТ45-IP). Более того, выделенный антигенсвязывающий белок может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

«Рекомбинантная» молекула представляет собой молекулу, полученную, экспрессированную, созданную или выделенную рекомбинантными способами. Рекомбинантные молекулы не существуют в природе.

Термин «ген» означает последовательность ДНК, которая кодирует определенную последовательность аминокислот или соответствует ей, которая содержит все или часть одного или нескольких белков или ферментов и может включать или не включать регуляторные последовательности ДНК, такие как промоторные последовательности, которые определяют, например, условия, при которых экспрессируется ген. Некоторые гены, не являющиеся структурными, могут транскрибироваться с ДНК на РНК, но не транслируются в аминокислотную последовательность. Другие гены могут функционировать как регуляторы структурных генов или регуляторы транскрипции ДНК. В частности, термин «ген» может относиться к геномной последовательности, кодирующей белок, т.е. последовательности, содержащей последовательности регулятора, промотора, интрона и экзона.

«Аффинность» определяется в контексте настоящего изобретения равновесным связыванием между антигенсвязывающим белком и его антигеном, а именно пептидом СТ45-IP в комплексе с белком МНС. Аффинность обычно выражена как равновесная константа диссоциации (K_D).

« K_D » представляет собой равновесную константу диссоциации, соотношение k_{off}/k_{on} между антигенсвязывающим белком и его антигеном. K_D и аффинность находятся в обратной зависимости. Значение K_D относится к концентрации антигенсвязывающего белка, и чем ниже значение K_D , тем выше аффинность антигенсвязывающего белка. Значение K_D можно экспериментально оценить с помощью различных известных методов, таких как измерение скоростей ассоциации и диссоциации с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или интерферометрии биослоя (BLI). Как известно специалистам в данной области техники, экспериментальные условия, используемые для этих экспериментов, такие как используемый буфер, концентрация белка, могут сильно влиять на результаты.

«Функциональная avidность» определяется в контексте настоящего изобретения как параметр, который описывает способность антигенсвязывающего белка, предпочтительно TCR, активировать эффекторную клетку, предпочтительно Т-клетку, при связывании с ее целевым антигенным пептидом в комплексе с МНС. Активацию эффекторной клетки, предпочтительно Т-клетки, можно измерить с помощью функционального анализа, в частности, анализа продукции цитокинов или анализа цитотоксичности, как описано ниже. Согласно некоторым вариантам осуществления функциональная avidность антигенсвязывающего белка считается высокой, если EC_{50} , определенная в функциональном анализе, является низкой, как например, менее приблизительно 60 нМ, менее приблизительно 10 нМ, или менее приблизительно 1 нМ согласно анализу цитотоксичности, как описано ниже, и/или активность, как определено в функциональном анализе, является высокой, как например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% от максимальной активности, определенной в соответствующем функциональном анализе. В зависимости от функционального анализа максимальная активность может представлять собой активность эталонного белка с известной высокой функциональной avidностью или активность «контроля максимального лизиса», как описано ниже.

«Эффективность» определяется в контексте настоящего изобретения как параметр, который описывает способность антигенсвязывающего белка, предпочтительно TCR, активировать эффекторную клетку, предпочтительно Т-клетку, для уничтожения раковой

клетки, презентирующей на ее поверхности целевой антигенный пептид в комплексе с МНС. Эффективность может быть определена с помощью функционального анализа, в частности, анализа цитотоксичности с мониторингом живых клеток, как описано ниже.

В «функциональном анализе» антигенсвязывающий белок экспрессируется, например, в «эффекторной клетке (Е)», и эффекторную клетку культивируют совместно с «клетками-мишенями (Т)», т.е. с антигенпрезентирующими клетками, презентирующими комплекс пептид-МНС. Таким образом, функциональные анализы также можно охарактеризовать как «анализы совместного культивирования». Для всех анализов клеточных культур, описанных в настоящем документе, температура клеточной культуры предпочтительно составляет приблизительно 37°C. Предпочтительно антигенсвязывающий белок представляет собой TCR, а эффекторная клетка представляет собой Т-клетку. Клетки-мишени могут представлять собой клетки, которые искусственно загружены антигенным пептидом (например, клетки Т2), или могут быть клетками, эндогенно презентирующими целевой антигенный пептид на своей поверхности (например, раковые клетки, экспрессирующие СТ45). Связывание антигенсвязывающего белка с комплексом пептид-МНС приводит к активации эффекторной клетки. В зависимости от типа функционального анализа существуют разные показания для измерения степени активации. В анализе продукции цитокинов определяют продукцию цитокинов (например, TNF- α , IFN- γ , CD107a+, IL-2 и/или гранзима В) эффекторными клетками. В анализе цитотоксичности определяют уничтожение клеток-мишеней эффекторными клетками, например, путем измерения снижения пролиферации клеток-мишеней, в частности, раковых клеток (например, в анализе цитотоксичности с мониторингом живых клеток) или путем измерения высвобождения внутриклеточных белки клеток-мишеней. Подходящие внутриклеточные белки для измерения в анализе цитотоксичности могут представлять собой эндогенные белки, например, LDH, или трансгенный белок, экспрессируемый антигенпрезентирующей клеткой, например, люциферазой.

В контексте настоящего изобретения термин «клетка Т2» относится к клетке, которая экспрессирует молекулу МНСI (HLA-A2), лишенную функции TAP. Клетки Т2 можно легко искусственно загрузить различными концентрациями экзогенных антигенных пептидов. Клетки Т2 описаны, например, в (Hosken and Bevan, Science 1990 Apr 20,248(4953):367-70). Клетки Т2 коммерчески доступны, например, от ATCC (Американской коллекции типовых культур). Загрузка клеток Т2 может быть достигнута в стандартных условиях культивирования клеток, известных специалистам в данной области техники, путем инкубации клеток Т2 в течение приблизительно 2 часов с желаемой концентрацией антигенного пептида. В контексте настоящего изобретения клетки Т2,

которые инкубируют с определенной концентрацией антигенного пептида, такой как 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 100 пМ, 10 пМ, 1 пМ, называют клетками Т2, загруженными указанной концентрацией антигенного пептида, например, клетки Т2, инкубированные с 10 мкМ антигенного пептида, называют клетками Т2, загруженными 10 мкМ антигенного пептида.

Термин «соотношение Е:Т» относится к соотношению эффекторных клеток (т.е. иммунных клеток, в частности, Т-клеток, экспрессирующих антигенсвязывающий белок, в частности, TCR) к клеткам-мишеням. Согласно некоторым вариантам осуществления соотношение Е:Т соответствует коэффициенту посева, т.е. соотношению общего количества иммунных клеток, в частности, Т-клеток, к клеткам-мишеням. Согласно некоторым вариантам осуществления соотношение Е:Т ниже, чем соотношение посева. Это применимо к случаям, когда не все иммунные клетки экспрессируют антигенсвязывающий белок, т.е. не все иммунные клетки являются эффекторными клетками, например, из-за низкой эффективности электропорации. Согласно некоторым вариантам осуществления коэффициент посева используют как аппроксимацию соотношения Е:Т. Согласно некоторым вариантам осуществления соотношение Е:Т определяют путем корректировки коэффициента посева с учетом эффективности электропорации.

Иллюстративный анализ высвобождения люциферазы описан в разделе «Методы» и выполнен в примерах 1 и 2. Согласно конкретным вариантам осуществления анализа высвобождения люциферазы эффекторными клетками являются Т-клетки, предпочтительно предварительно стимулированные Т-клетки, временно или стабильно экспрессирующие TCR, такие как Т-клетки, электропорированные с мРНК, кодирующей TCR, или Т-клетки, стабильно трансдуцированные нуклеиновой кислотой, кодирующей TCR, например, Т-клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR. Эти эффекторные клетки совместно культивируют с клетками-мишенями, экспрессирующими люциферазу. Предпочтительно, клетки-мишени представляют собой клетки Т2, загруженные антигенным пептидом. Предпочтительно эффекторные клетки и клетки-мишени высеивают в соотношении от 2:1 до 1:2, предпочтительно 1:1. После определенного времени совместного культивирования, например, 12-38 часов, предпочтительно 18-30 часов, более предпочтительно приблизительно 24 часов, измеряют количество люциферазы в супернатанте, при этом высокая концентрация люциферазы указывает на высокую активность уничтожения и, таким образом, на высокую функциональную avidность антигенсвязывающего белка, предпочтительно TCR, в отношении презентированного пептида. Функциональная avidность антигенсвязывающего белка считается высокой, если в анализе

цитотоксичности, предпочтительно анализе высвобождения люциферазы, как определено выше, цитотоксическая активность эффекторных клеток против клеток-мишеней составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% от цитотоксической активности контрольного токсического реагента. Специалистам в данной области техники известно, что цитотоксическая активность может превышать 100%. Это связано с тем, что 100% цитотоксическая активность определяется «контролем максимального лизиса», который относится к инкубации клеток-мишеней с токсичным реагентом. Согласно некоторым вариантам осуществления токсичный реагент представляет собой детергент, например, Тритон-Х100, Твин-20, Твин-80 или NP-40, который осуществляет лизис клеток-мишеней. В некоторых конкретных примерах контроль максимального лизиса включает добавление 0,2% раствора Тритон-Х100 к культуре клеток-мишени. Цитотоксическая активность токсического реагента, т.е. количество клеток-мишеней, уничтоженных токсичным реагентом, определяется как 100%. Поскольку клетки-мишени все еще могут пролиферировать во время совместного культивирования, эффекторные клетки могут в конечном итоге уничтожить даже большее количество клеток-мишеней во время анализа цитотоксичности, чем токсичный реагент, уничтожающий во время контроля максимального лизиса. В таких случаях вычисленная цитотоксическая активность будет выше 100%.

Иллюстративный анализ продукции цитокинов описан в разделе «Методы» и выполнен в примере 3. Согласно конкретным вариантам осуществления анализа продукции цитокинов эффекторными клетками являются Т-клетки, предпочтительно предварительно стимулированные Т-клетки, экспрессирующие TCR, такие как Т-клетки, временно трансфицированные или стабильно трансдуцированные нуклеиновой кислотой, кодирующей TCR, предпочтительно Т-клетки, электропорированные с мРНК, кодирующей TCR. Эти эффекторные клетки совместно культивируют с клетками-мишенями, которые предпочтительно представляют собой клетки T2, загруженные антигенным пептидом. Предпочтительно эффекторные клетки и клетки-мишени высеивают в соотношении от 2:1 до 1:2, предпочтительно 1:1. Совместное культивирование предпочтительно происходит в присутствии агента, блокирующего секрецию. После определенного времени совместного культивирования, например, 3-7 часов, предпочтительно приблизительно 5 часов, эффекторные клетки окрашивают по меньшей мере на один внутриклеточный цитокин, выбранный, например, из CD107a+, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-2 и гранзима В, чтобы определить количество эффекторных клеток, продуцирующих цитокины. Функциональная avidность антигенсвязывающего белка считается высокой, если антиген способен

активировать эффекторные клетки в анализе продукции цитокинов, как определено выше, в частности, если количество эффекторных клеток, продуцирующих цитокины при совместном культивировании с клетками-мишенями, составляет по меньшей мере 2%, по меньшей мере 2,5%, предпочтительно по меньшей мере 3% на популяцию иммунных клеток, таких как живые $CD4^+$, $CD8^+$ и/или $CD3^+$ клетки. Предпочтительно количество эффекторных клеток, которые продуцируют цитокины при совместном культивировании с клетками-мишенями, составляет по меньшей мере 10%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50% на общее количество эффекторных клеток. Как описано выше, не все иммунные клетки экспрессируют антигенсвязывающий белок, т.е. не все иммунные клетки, высеянные в анализе совместного культивирования, являются эффекторными клетками, например, из-за низкой эффективности электропорации.

Иллюстративный анализ цитотоксичности для мониторинга живых клеток описан в разделе «Методы» и выполнен в примере 5. Согласно конкретным вариантам осуществления анализа цитотоксичности для мониторинга живых клеток эффекторными клетками являются Т-клетки, предпочтительно предварительно стимулированные Т-клетки, временно или стабильно экспрессирующие TCR, такие как Т-клетки, электропорированные с мРНК, кодирующей TCR. Эти эффекторные клетки культивируют совместно с опухолевыми клетками, эндогенно экспрессирующими и презентующими антигенный пептид ST45-IP, и необязательно дополнительно загружают антигенным пептидом ST45-IP. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевые клетки представляют собой клетки A375 или клетки NSH-1703. Опухолевые клетки предпочтительно флуоресцентно-мечены. Согласно некоторым вариантам осуществления анализа цитотоксичности для мониторинга живых клеток коэффициент посева общего количества Т-клеток (включая Т-клетки, экспрессирующие TCR (= эффекторные клетки), и Т-клетки, не экспрессирующие TCR) составляет от 9:1 до 0,5:1, как например, 9:1, 6:1, 3:1, 2:1 или 1:1. Согласно некоторым вариантам осуществления соотношение Е:Т составляет от 6:1 до 0,2:1. Эффективность антигенсвязывающего белка считается высокой, если в анализе цитотоксичности для мониторинга живых клеток, как определено выше, гибель опухолевых клеток (что определяется по снижению пролиферации опухолевых клеток) наблюдается при соотношении Е:Т 6:1 или менее, 5:1 или менее, 4:1 или менее, 3:1 или менее, предпочтительно 2:1 или менее, более предпочтительно 1:1 или менее, еще более предпочтительно 0,5:1 или менее.

«Полумаксимальная эффективная концентрация», также называемая « EC_{50} », обычно относится к концентрации молекулы, которая вызывает реакцию на полпути между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия. Чем ниже

значение EC_{50} , тем выше функциональная avidность молекулы. Значения EC_{50} можно экспериментально оценить с помощью множества известных методов, например, с использованием функциональных анализов, описанных выше, или других анализов уничтожения на основе ELISA или проточной цитометрии.

Для определения EC_{50} в функциональном анализе, как описано выше, в «эксперименте по титрованию пептида» необходимо использовать различные концентрации антигенного пептида, загруженного на антигенпрезентирующие клетки, такие как клетки T2. Иллюстративный анализ высвобождения люциферазы с титрованием пептида описан в разделе «Методы» и выполнен в примере 1. Согласно конкретным вариантам осуществления « EC_{50} » относится к концентрации антигенного пептида, загруженного на клетки-мишени, в частности, на клетки T2, загруженные антигенным пептидом ST45, который индуцирует ответ на полпути между исходным и максимальным уровнем, когда указанные клетки-мишени совместно культивируют с эффекторными клетками при высвобождении люциферазы, как определено выше. Функциональная avidность антигенсвязывающего белка считается высокой, если EC_{50} , определенная посредством анализа цитотоксичности, предпочтительно посредством анализа высвобождения люциферазы, как определено выше, составляет менее приблизительно 60 нМ, менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 25 нМ, предпочтительно менее приблизительно 20 нМ, менее приблизительно 15 нМ, менее приблизительно 10 нМ, более предпочтительно менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2,5 нМ, менее приблизительно 1,5 нМ или менее приблизительно 1 нМ.

«Окрашивание декстрамера» включает контактирование клеток, экспрессирующих антигенсвязывающий белок, с флуоресцентно мечеными мультимерами, содержащими десять комплексов ST45-IP:MHC.

Термин «специфичность» в контексте настоящего изобретения обозначает способность антигенсвязывающего белка отличать свой пептид-мишень от пептидов, имеющих другую аминокислотную последовательность, например, подобных пептидов, как определено ниже. Антигенсвязывающий белок считается специфичным в отношении целевого пептида, если связывание с целевым пептидом происходит со значительно более высокой аффинностью и/или более высокой функциональной avidностью, чем связывание с подобными пептидами. Специфичность антигенсвязывающего белка определяется аминокислотными последовательностями CDRa1, CDRa3, CDRb1 и CDRb3. Аминокислотные последовательности CDRa2 и CDRb2 контактируют с молекулой MHC и не требуются для антигенной специфичности.

В контексте настоящего изобретения «подобные пептиды» относятся к

потенциальным нецелевым пептидам, т.е. пептидам, которые потенциально могут связываться антигенсвязывающими белками согласно настоящему изобретению на основании их биохимических/биофизических характеристик, включая без ограничения гомологичную последовательность или подобный мотив. Подобные пептиды обычно содержат в длину от 8 до 12 аминокислот. Подобные пептиды в контексте настоящего изобретения обычно представляют собой МНС, в частности, МНСI. Кроме того, подобные пептиды в контексте настоящего изобретения включают пептиды, которые содержат или состоят из аминокислотной последовательности, сходной с аминокислотной последовательностью антигенного пептида СТ45, более конкретно, пептиды, которые по сравнению с эпитопом антигенного пептида СТ45 содержат эпитоп, в котором некоторые или все аминокислоты имеют идентичные и/или сходные биохимические/биофизические характеристики с аминокислотами, которые составляют эпитоп антигенного пептида СТ45. В некоторых примерах подобные пептиды, исследованные в контексте настоящего изобретения, были выбраны из базы данных пептидов, презентированных в опухолевых и нормальных тканях, связанных с HLA-A*02 (база данных (XPRESIDENT[®]), с использованием оценки сходства в релевантных для связывания положениях СТ45-IP и требования по меньшей мере одного обнаружения на нормальных тканях. Связывание антигенсвязывающего белка с подобным пептидом, презентированным белком МНС, может привести к побочным реакциям. Такие побочные реакции могут быть «внеопухолевыми» побочными эффектами, такими как перекрестная реактивность специфического TCR с подобными пептидом в здоровых тканях, как сообщалось в Lowdell *et al.*, Cytotherapy, published on December 4, 2018).

В частности, следующие пептиды являются подобными пептидами в контексте настоящего изобретения: SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010).

Специалисту известно, что среди подобных пептидов есть некоторые, которые не связываются антигенсвязывающими белками согласно настоящему изобретению в обнаруживаемой степени, например, пептиды, для которых не обнаруживается сигнал связывания или ответ в функциональном анализе, выходящий за пределы фонового уровня. «Фоновый уровень» в этом контексте относится к сигналу связывания или ответу в функциональном анализе, наблюдаемому для негомологичного, «неподобного» пептида, например, контрольного пептида NYESO1-001, или в отсутствие пептида.

Для других подобных пептидов можно обнаружить низкое, но незначительное

связывание. Эти последние подобные пептиды также могут быть описаны как «потенциально релевантные» подобные пептиды. Считается, что антигенсвязывающий белок незначительно связывается с подобными пептидом и является специфичным в отношении своего целевого антигенного пептида, если при связывании с подобным пептидом применимо хотя бы одно из следующих условий, и целевой антигенный пептид сравнивают в аналогичных, предпочтительно идентичных экспериментальных условиях:

- функциональная авидность в ответ на подобный пептид, определенная в функциональном анализе, как описано выше, составляет 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее функциональной авидности в ответ на целевой антигенный пептид СТ45-IP.

- цитотоксическая активность в ответ на подобный пептид, определенная в анализе цитотоксичности, как описано выше, составляет 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее цитотоксической активности в ответ на целевой антигенный пептид СТ45-IP.

- EC_{50} подобного пептида, определенная с помощью функционального анализа, предпочтительно анализа цитотоксичности, как описано выше, увеличена по меньшей мере в 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200 или по меньшей мере 500 раз по сравнению с EC_{50} целевого антигенного пептида СТ45-IP.

- K_D для подобного пептида увеличена в по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75, или по меньшей мере 100, по сравнению с K_D целевого антигенного пептида СТ45-IP.

В контексте настоящего описания термин «приблизительно», относящийся к конкретному значению, означает, что значение может отклоняться на $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ или $\pm 1\%$.

Антигенсвязывающие белки

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A , содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B , содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где

согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 502, предпочтительно SEQ ID NO: 525, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 29, и CDRb3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 517, предпочтительно SEQ ID NO: 537, или

15) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 43, CDRa3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 503, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 48, и CDRb3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 518, предпочтительно SEQ ID NO: 538,

где антигенсвязывающий белок содержит указанные последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и CDRb3 с не более чем одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями.

Вышеупомянутые аминокислотные последовательности, содержащиеся в CDRa3 и CDRb3, представляют собой центральные аминокислоты CDRa3 и CDRb3 (также называемые в настоящем документе «центр CDR3»). Авторы настоящего изобретения обнаружили, что внутри последовательностей CDR3 можно определить центральную последовательность, которая включает аминокислоты, которые наиболее релевантны для специфического связывания с антигенным пептидом, в то время как аминокислоты вне центра CDR3 менее релевантны для специфического связывания с антигенным пептидом (данные не показаны). Центр CDR3 содержит 8 центральных аминокислот CDR3. Согласно некоторым вариантам осуществления центр CDR3 состоит из 8 центральных аминокислот CDR3, в частности, в случаях, когда последовательность CDR3 не превышает 12 аминокислот. В случае последовательностей CDR3, длина которых превышает 12 аминокислот, центр CDR3 может содержать дополнительные аминокислоты, в частности, центральные 9-13 аминокислот.

Все варианты осуществления, описанные в настоящем документе, как вариант осуществления 1 (из 15), предпочтительно комбинируются с другими вариантами осуществления 1 (из 15). Таким же образом, все варианты осуществления, описанные в настоящем документе как варианты осуществления 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 (из 15), соответственно, предпочтительно комбинируются с другими варианты осуществления 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 (из 15), соответственно. Например, последовательности CDR1 и CDR3 согласно варианту осуществления 1 (из 15) предпочтительно комбинируются с последовательностями CDR2 варианта осуществления 1 (из 15).

согласно SEQ ID NO: 119, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 122,

13) CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 35, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 40,

14) CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 26, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 31, или

15) CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 45, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 50,

где антигенсвязывающий белок содержит указанные последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и CDRb3 с не более чем одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями.

Антигенсвязывающий белок, содержащий последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и CDRb3 с не более чем одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, согласно настоящему изобретению относится к антигенсвязывающему белку, который может содержать одну, две или три аминокислотные мутации в каждой из CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка

1) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 15, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 20,

2) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 76,

3) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 67,

4) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 91, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 95,

5) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 9,

6) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 54, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 59,

7) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 15, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 76,

8) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 100, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 76,

9) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 81, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 86,

10) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 108, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 113,

11) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 126, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 113,

12) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 118, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 59

13) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 39,

14) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 30, или

15) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 44, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 49,

где антигенсвязывающий белок содержит указанные последовательности CDRa2 и CDRb2 с не более чем одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными мутациями.

Антигенсвязывающий белок, содержащий CDRa2 и CDRb2 sequences с не более чем одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными мутациями, согласно настоящему изобретению относится к антигенсвязывающему белку, который может содержать одну,

две, три или четыре аминокислотные мутации в каждой из CDRa2 и/или CDRb2.

Во всех вариантах осуществления антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению аминокислотные мутации в последовательностях CDRa1, CDRa2, CDRa3, CDRb1, CDRb2 и CDRb3, если они присутствуют, предпочтительно представляют собой аминокислотные замены, более предпочтительно консервативные аминокислотные замены (см. Таблицу 1). Предпочтительно последовательности CDR содержат не более двух, предпочтительно не более одной аминокислотной мутации. Кроме того, предпочтительно аминокислотные мутации, если они присутствуют, находятся в первом или последнем положении соответствующей последовательности CDR. Согласно наиболее предпочтительным вариантам осуществления последовательности CDR не содержат какие-либо аминокислотные мутации.

Введение мутации в известную аминокислотную последовательность представляет собой стандартную процедуру, хорошо известную в данной области техники, и рутинную работу для специалиста в данной области техники. Соответствующие методы известны в данной области техники (например, Stratagene's QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit since 2007). Таким образом, специалист в данной области техники вполне способен вводить специфические мутации, такие как замены, в аминокислотную последовательность в целом и в последовательность CDR в частности.

Скрининг вариантов CDR на предмет связывания с мишенью также является стандартной процедурой, применяемой специалистом. В настоящей заявке упоминаются функциональные анализы, включая анализы продукции цитокинов и высвобождения люциферазы, для определения связывания антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению с пептидом СТ45-IP. Связывание антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению с пептидом СТ45-IP также можно определить путем окрашивания декстрамером.

Хотя результат аминокислотной мутации в CDR не может быть легко предсказуем, специалист в данной области техники вполне способен генерировать и проверить множество мутантов без неподходящей загрузки. Таким образом, специалист в данной области техники сможет генерировать антигенсвязывающий белок, несущий одну, две или три аминокислотные мутации в своих CDR, и впоследствии идентифицировать антигенсвязывающие белки, имеющие те же характеристики связывания, что и антигенсвязывающий белок, содержащий последовательности CDR из Таблицы 3.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления не более 1 или 2 аминокислотных мутаций, предпочтительно не более 1 аминокислотной мутации, более предпочтительно не более 1 аминокислотной замены, наиболее предпочтительно не более

1 консервативной аминокислотной замены содержится в центральных 8 аминокислотах CDRa3 и/или CDRb3, т.е. в центре CDR3. В случаях, когда CDR3 содержит более 12 аминокислот, еще более предпочтительно не более 1 или 2 аминокислотных мутаций, предпочтительно не более 1 аминокислотной мутации, более предпочтительно не более 1 аминокислотной замены, наиболее предпочтительно не более консервативной аминокислотной замены содержится в центральных 9-13 аминокислотах CDRa3 и/или CDRb3, т.е. в максимальном центре CDR3 (Таблица 3).

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок индуцирует иммунный ответ, например, в клетке, экспрессирующей антигенсвязывающий белок (если антигенсвязывающий белок является мембраносвязанным), предпочтительно в лимфоците, более предпочтительно в Т-клетке или НК-клетке, более предпочтительно Т-клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления иммунный ответ также может быть индуцирован в клетке, рекрутированной антигенсвязывающим белком согласно настоящему изобретению (если антигенсвязывающий белок представляет собой растворимый биспецифический антигенсвязывающий белок, способный связываться с, и тем самым рекрутировать, например, Т-клеткой или НК-клеткой). Предпочтительно иммунный ответ характеризуется увеличением продукции интерферона (IFN) γ и/или фактора некроза опухоли (TNF) α . Иммунный ответ предпочтительно направлен против опухолевой клетки, презентующей на своей поверхности комплекс антигенного пептида СТ45 и белка МНС.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с комплексом антигенного пептида СТ45 и белка МНС. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенный пептид СТ45 состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 138. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 138 в комплексе с белком МНС.

Согласно всем аспектам настоящего изобретения предпочтительно антигенный пептид СТ45 находится в комплексе с белком HLA МНС класса I, таким как HLA-A, HLA-B или HLA-C, предпочтительно HLA-A, более предпочтительно HLA -A*02.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению характеризуются высокой стабильностью, высокой аффинностью в отношении антигенного пептида СТ45-IP, высокой функциональной авидностью к антигенному пептиду СТ45-IP, высокой эффективностью уничтожения опухолевых клеток, презентующих антигенный пептид СТ45-IP, и/или высокой специфичностью к антигенному пептиду СТ45-IP.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению обладают

повышенной стабильностью, повышенной аффинностью связывания, повышенной функциональной avidностью, повышенной эффективностью и/или повышенной специфичностью, предпочтительно повышенной аффинностью связывания, повышенной функциональной avidностью, повышенной эффективностью и/или повышенной специфичностью по сравнению с эталонным белком при измерении в аналогичных, предпочтительно идентичных экспериментальных условиях.

«Эталонный белок» в контексте настоящего изобретения относится к белку, с которым сравнивают антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению. Сравнение антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению и эталонного белка проводят в сходных, предпочтительно идентичных экспериментальных условиях, предпочтительно параллельно. В зависимости от сравниваемого параметра таким эталонным белком может быть, например, TCR, связывающийся с антигенным пептидом ST45, который не содержит последовательности CDR, как определено в контексте настоящего изобретения, TCR, связывающийся с другим антигенным пептидом, происходящим из ST45, или TCR, связывающийся с неродственным антигенным пептидом, например, с антигенным пептидом NYESO1-001 (SEQ ID NO: 188). Эталонный белок предпочтительно имеет тот же формат, что и антигенсвязывающий белок, с которым его сравнивают. В тех случаях, когда антигенсвязывающий белок представляет собой TCR, подходящим эталонным белком также является TCR.

«Повышенная стабильность» в настоящем документе относится, например, к повышенному уровню экспрессии антигенсвязывающего белка по сравнению с эталонным белком в тех же экспериментальных условиях. Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению имеют высокий уровень экспрессии, в частности, повышенный уровень экспрессии по сравнению с эталонным белком при измерении в аналогичных, предпочтительно идентичных экспериментальных условиях. Авторы настоящего изобретения показали в примере 4, что антигенсвязывающие белки демонстрируют высокие уровни экспрессии в Т-клетках. Уровни экспрессии антигенсвязывающих белков можно измерить, например, путем окрашивания декстрамером.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению обладают высокой аффинностью в отношении антигенного пептида ST45-IP, в частности, повышенной аффинностью по сравнению с эталонным белком при измерении в аналогичных, предпочтительно идентичных экспериментальных условиях.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению обладают высокой функциональной avidностью в отношении антигенного пептида ST45-IP, в частности, повышенной функциональной avidностью по сравнению с эталонным белком при

измерении в аналогичных, предпочтительно идентичных экспериментальных условиях. Авторы изобретения показали в примере 1, что антигенсвязывающие белки проявляют высокую функциональную avidность в отношении антигенного пептида СТ45-IP. Функциональную avidность можно определить с помощью функционального анализа, в частности, анализа цитотоксичности, как описано выше. Измерение функциональной активности может включать определение EC_{50} в эксперименте по титрованию пептидов.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению обладают высокой эффективностью в уничтожении опухолевых клеток, презентующих антигенный пептид СТ45-IP, в частности, повышенной эффективностью по сравнению с эталонным белком при измерении в аналогичных, предпочтительно идентичных экспериментальных условиях. Авторы настоящего изобретения показали в примере 5, что антигенсвязывающие белки проявляют высокую эффективность в уничтожении опухолевых клеток, презентующих антигенный пептид СТ45-IP. Эффективность можно определить с помощью функционального анализа, в частности, анализа цитотоксичности с мониторингом живых клеток, как описано выше.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается со структурным эпитопом СТ45-IP. Согласно более предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом СТ45-IP. Авторы настоящего изобретения провели эксперименты с целью идентификации остатков СТ45-IP, которые имеют отношение к связыванию антигенсвязывающими белками согласно настоящему изобретению (пример 2, таблица 4). Авторы настоящего изобретения определили, что положения аминокислот 3, 4, 5, 6 и 7 SEQ ID NO: 138 имеют отношение к связыванию. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 2, 3 или 4 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 4, 5, 6 и 7 SEQ ID NO: 138. Остатки, необходимые для связывания антигенсвязывающими белками, также можно назвать «мотивом связывания» СТ45-IP. Специалистам в данной области техники известно, что определение точного эпитопа или функционального эпитопа может незначительно варьироваться в зависимости от используемого метода и выбранных пороговых значений. В контексте настоящего изобретения эпитоп определяли с помощью анализа цитотоксичности (высвобождение люциферазы), как описано выше. Условия эксперимента дополнительно определены в примере 2.

Аминокислотная последовательность согласно SEQ ID NO: 138, в которой по меньшей мере одно положение заменено, в контексте настоящего описания называется

«вариантной последовательностью СТ45-IP». В частности, одно положение заменено на аланин (SEQ ID NO: 139-145). Пептиды, имеющие вариантную последовательность СТ45-IP, также упоминаются в настоящем документе как варианты пептиды СТ45-IP. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению демонстрирует пониженную функциональную avidность, в частности, пониженную цитотоксическую активность в анализе цитотоксичности, более конкретно в анализе высвобождения люциферазы, как описано выше, к вариантным пептидам СТ45-IP, в которых по меньшей мере одно из положений 3, 4, 5, 6 и 7 SEQ ID NO: 138 заменено на аланин, в частности, функциональная avidность снижается более чем на 70%, более чем на 80%, более чем на 90% или более чем на 95% по сравнению с функциональной avidностью в отношении СТ45-IP.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению обладают высокой специфичностью в отношении антигенного пептида СТ45-IP, в частности, повышенной специфичностью по сравнению с эталонным белком при измерении в аналогичных, предпочтительно идентичных экспериментальных условиях. Авторы настоящего изобретения демонстрируют в примере 2, что антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению связывают целевой антиген, т.е. антигенный пептид СТ45 в комплексе с белком МНС, с высокой специфичностью.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали потенциальные нецелевые пептиды, которые, например, подобны последовательности и/или мотиву СТ45-IP и, таким образом, имеют повышенный риск связывания антигенсвязывающим белком, связывающимся с СТ45-IP.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно некоторым

вариантам осуществления антигенсвязывающий белок незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010).

Согласно предпочтительным вариантам осуществления V_A и V_B представляют собой переменные домены TCR, в частности, переменные домены TCR альфа, бета, гамма или дельта. Согласно некоторым вариантам осуществления V_A представляет собой переменные домены TCR альфа, гамма или дельта, и V_B представляет собой переменные домены TCR бета, гамма или дельта. Предпочтительно, V_A представляет собой переменный домен TCR альфа, и V_B представляет собой переменный домен TCR бета, или V_A представляет собой переменный домен TCR гамма, и V_B представляет собой переменный домен TCR дельта, или V_A представляет собой переменный домен TCR альфа, и V_B представляет собой переменный домен TCR гамма, или V_A представляет собой переменный домен TCR дельта, и V_B представляет собой переменный домен TCR бета. Согласно предпочтительным вариантам осуществления V_A представляет собой переменный домен TCR альфа, и V_B представляет собой переменный домен TCR бета. Согласно некоторым вариантам осуществления V_A представляет собой переменный домен TCR гамма, содержащий CDR1 и CDR3 и необязательно CDR2, происходящие из переменного домена TCR альфа, и/или V_B представляет собой переменный домен TCR дельта, содержащий CDR1 и CDR3 и необязательно CDR2, происходящие из переменного домена TCR бета.

Предпочтительно в V_A

1) FR1-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 539, 554 или 569,

FR2-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 584,

FR3-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 599 или 614, и/или

FR4-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 629, или

2) FR1-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 540, 555 или 570,

FR2-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 585,

FR3-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 600 или 615, и/или

FR4-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 630, или

627, и/или

FR4-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 642, или

15) FR1-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 553, 568 или 583,

FR2-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 598,

FR3-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 613 или 628, и/или

FR4-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 643, и

в V_B

1) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 644 или 659,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 674 или 689,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 704 или 719, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 734, или

2) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 645 или 660,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 675 или 690,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 705 или 720, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 735, или

3) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 646 или 661,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 676 или 691,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 706 или 721, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 736, или

4) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 647 или 662,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 677 или 692,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 707 или

722, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 737, или

5) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 648 или 663,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 678 или 693,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 708 или 723, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 738, или

6) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 649 или 664,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 679 или 694,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 709 или 724, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 739, или

7) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 650 или 665,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 680 или 695,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 710 или 725, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 740, или

8) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 651 или 666,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 681 или 696,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 711 или 726, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 741, или

9) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 652 или 667,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 682 или 697,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 712 или

727, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 742, или

10) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 653 или 668,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 683 или 698,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 713 или 728, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 743, или

11) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 654 или 669,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 684 или 699,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 714 или 729, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 744, или

12) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 655 или 670,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 685 или 700,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 715 или 730, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 745, или

13) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 656 или 671,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 686 или 701,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 716 или 731, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 746, или

14) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 657 или 672,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 687 или 702,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 717 или

732, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 747, или

15) FR1-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 658 или 673,

FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 688 или 703,

FR3-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 718 или 733, и/или

FR4-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 748,

где каждая из FR1-a, FR2-a, FR3-a, FR4-a, FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b могут необязательно содержать 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций.

Согласно некоторым вариантам осуществления предпочтительно

- 1) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 539,
- 2) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 540,
- 3) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 541,
- 4) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 542,
- 5) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 543,
- 6) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 544,
- 7) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 545,
- 8) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 546,
- 9) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 547,
- 10) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 548,
- 11) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 549,
- 12) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 550,
- 13) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 551,
- 14) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 552,

или

15) FR1-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 553,

где каждая из FR1-a, FR2-a, FR3-a и FR4-a могут необязательно содержать 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций.

Согласно некоторым вариантам осуществления предпочтительно

1) FR3-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 599, необязательно содержащей 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 10 последовательности согласно SEQ ID NO: 599,

2) FR3-a содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 600,

14) FR3-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 612, необязательно содержащей 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 19 последовательности согласно SEQ ID NO: 612, или

15) FR3-а содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 613, необязательно содержащей 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 23 последовательности согласно SEQ ID NO: 613.

Согласно некоторым вариантам осуществления предпочтительно

1) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 674,

2) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 675,

3) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 676,

4) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 677,

5) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 678,

6) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 679,

7) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 680,

8) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 681,

9) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 682,

10) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 683,

11) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 684,

12) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 685,

13) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 686,

14) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 687, или

15) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 688,

где каждая из FR1-b, FR2-b, FR3-b и FR4-b могут необязательно содержать 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций.

Согласно некоторым вариантам осуществления предпочтительно

1) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 689, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 16 последовательности согласно SEQ ID NO: 689, или

2) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 690, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 17 последовательности согласно SEQ ID NO: 690,

3) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 691, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 5 последовательности согласно SEQ ID NO: 691,

4) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 692, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 15 последовательности согласно SEQ ID NO: 692,

5) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 693, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 693,

6) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 694, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 13 последовательности согласно SEQ ID NO: 694,

7) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 695, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 11 последовательности согласно SEQ ID NO: 695,

8) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 696, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 11 последовательности согласно SEQ ID NO: 696,

9) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 697, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 1 последовательности согласно SEQ ID NO: 697,

10) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 698, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 1 последовательности согласно SEQ ID NO: 698,

11) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 699, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 16 последовательности согласно SEQ ID NO: 699,

12) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 700, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 700,

13) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 701, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 11 последовательности согласно SEQ ID NO: 701,

14) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 702, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 1 последовательности согласно SEQ ID NO: 702, или

15) FR2-b содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 703, необязательно содержащей 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных мутаций вне положения 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 703.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления

1) V_A содержит SEQ ID NO: 189 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 189 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 14, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 489, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 15, и V_B содержит SEQ ID NO: 339 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 339 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 19, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 504 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 20, или

2) V_A содержит SEQ ID NO: 190 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 190 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 24, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 490, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 25, и V_B содержит SEQ ID NO: 340 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 340 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 75, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 505 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 76, или

3) V_A содержит SEQ ID NO: 191 или аминокислотную последовательность,

имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 191 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 24, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 491, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 25, и V_B содержит SEQ ID NO: 341 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 341 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 66, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 506 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 67, или

4) V_A содержит SEQ ID NO: 192 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 192 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 90 CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 492, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 91, и V_B содержит SEQ ID NO: 342 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 342 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 66, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 507 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 95, или

5) V_A содержит SEQ ID NO: 193 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 193 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 2, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 493, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 3, и V_B содержит SEQ ID NO: 343 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 343 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 8, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 508 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 9, или

6) V_A содержит SEQ ID NO: 194 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 194 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 53, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 494, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 54, и V_B содержит SEQ ID NO: 344 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 344 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 58, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 509 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 59, или

7) V_A содержит SEQ ID NO: 195 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 195 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 71, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 495, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 15, и V_B содержит SEQ ID NO: 345 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 345 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 75, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 510 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 76, или

8) V_A содержит SEQ ID NO: 196 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 196 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 99, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 496, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 100, и V_B содержит SEQ ID NO: 346 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 346 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 75, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 511 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 76, или

9) V_A содержит SEQ ID NO: 197 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 197 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 80, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 497, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 81, и V_B содержит SEQ ID NO: 347 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 347 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 85, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 512 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 86, или

10) V_A содержит SEQ ID NO: 198 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 198 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 107, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 498, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 108, и V_B содержит SEQ ID NO: 348 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 348 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 112, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 513 и необязательно CDRb2, содержащую

SEQ ID NO: 113, или

11) V_A содержит SEQ ID NO: 199 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 199 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 125, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 499, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 126, и V_B содержит SEQ ID NO: 349 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 349 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 112, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 514 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 113, или

12) V_A содержит SEQ ID NO: 200 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 200 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 117, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 500, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 118, и V_B содержит SEQ ID NO: 350 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 350 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 58, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 515 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 59, или

13) V_A содержит SEQ ID NO: 201 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 201 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 24, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 501, и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 25, и V_B содержит SEQ ID NO: 351 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 351 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 38, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 516 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 39, или

14) V_A содержит SEQ ID NO: 202 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 202 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 24, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 502 и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 25, и V_B содержит SEQ ID NO: 352 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 352 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ

ID NO: 29, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 517 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 30, или

15) V_A содержит SEQ ID NO: 203 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 203 и содержащую CDRa1, содержащую SEQ ID NO: 43, CDRa3, содержащую SEQ ID NO: 503 и необязательно CDRa2, содержащую SEQ ID NO: 44, и V_B содержит SEQ ID NO: 353 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 353 и содержащую CDRb1, содержащую SEQ ID NO: 48, CDRb3, содержащую SEQ ID NO: 518 и необязательно CDRb2, содержащую SEQ ID NO: 49.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления

1) V_A содержит SEQ ID NO: 189, 249, 264 или 279, и V_B содержит SEQ ID NO: 339, 399, 414 или 429, или

2) V_A содержит SEQ ID NO: 190, 250, 265 или 280, и V_B содержит SEQ ID NO: 340, 400, 415 или 430, или

3) V_A содержит SEQ ID NO: 191, 251, 266 или 281, и V_B содержит SEQ ID NO: 341, 401, 416 или 431, или

4) V_A содержит SEQ ID NO: 192, 252, 267 или 282, и V_B содержит SEQ ID NO: 342, 402, 417 или 432, или

5) V_A содержит SEQ ID NO: 193, 253, 268 или 283, и V_B содержит SEQ ID NO: 343, 403, 418 или 433, или

6) V_A содержит SEQ ID NO: 194, 254, 269 или 284, и V_B содержит SEQ ID NO: 344, 404, 419 или 434, или

7) V_A содержит SEQ ID NO: 195, 255, 270 или 285, и V_B содержит SEQ ID NO: 345, 405, 420 или 435, или

8) V_A содержит SEQ ID NO: 196, 256, 271 или 286, и V_B содержит SEQ ID NO: 346, 406, 421 или 436, или

9) V_A содержит SEQ ID NO: 197, 257, 272 или 287, и V_B содержит SEQ ID NO: 347, 407, 422, или 437, или

10) V_A содержит SEQ ID NO: 198, 258, 273 или 288, и V_B содержит SEQ ID NO: 348, 408, 423 или 438, или

11) V_A содержит SEQ ID NO: 199, 259, 274 или 289, и V_B содержит SEQ ID NO: 349, 409, 424 или 439, или

12) V_A содержит SEQ ID NO: 200, 260, 275 или 290, и V_B содержит SEQ ID NO:

350, 410, 425 или 440, или

13) V_A содержит SEQ ID NO: 201, 261, 276 или 291, и V_B содержит SEQ ID NO: 351, 411, 426 или 441, или

14) V_A содержит SEQ ID NO: 202, 262, 277 или 292, и V_B содержит SEQ ID NO: 352, 412, 427 или 442, или

15) V_A содержит SEQ ID NO: 203, 263, 278 или 293, и V_B содержит SEQ ID NO: 353, 413, 428 или 443.

Согласно некоторым вариантам осуществления

1) V_A содержит SEQ ID NO: 189, и V_B содержит SEQ ID NO: 414, или

2) V_A содержит SEQ ID NO: 190, и V_B содержит SEQ ID NO: 415, или

3) V_A содержит SEQ ID NO: 191, и V_B содержит SEQ ID NO: 416, или

4) V_A содержит SEQ ID NO: 192, и V_B содержит SEQ ID NO: 417, или

5) V_A содержит SEQ ID NO: 193, и V_B содержит SEQ ID NO: 418, или

6) V_A содержит SEQ ID NO: 194, и V_B содержит SEQ ID NO: 419, или

7) V_A содержит SEQ ID NO: 195, и V_B содержит SEQ ID NO: 420, или

8) V_A содержит SEQ ID NO: 196, и V_B содержит SEQ ID NO: 421, или

9) V_A содержит SEQ ID NO: 197, и V_B содержит SEQ ID NO: 422, или

10) V_A содержит SEQ ID NO: 198, и V_B содержит SEQ ID NO: 423, или

11) V_A содержит SEQ ID NO: 199, и V_B содержит SEQ ID NO: 424, или

12) V_A содержит SEQ ID NO: 200, и V_B содержит SEQ ID NO: 425, или

13) V_A содержит SEQ ID NO: 201, и V_B содержит SEQ ID NO: 426, или

14) V_A содержит SEQ ID NO: 202, и V_B содержит SEQ ID NO: 427, или

15) V_A содержит SEQ ID NO: 203, и V_B содержит SEQ ID NO: 428.

V_A предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 132, 62, 89, 1, 52, 70, 98, 79, 106, 124, 116, 34, 23 и 42, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 13, 132, 62, 89, 1, 52, 70, 98, 79, 106, 124, 116, 34, 23 и 42 и содержащей CDRa1, CDRa2 и CDRa3, как определено в контексте антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, где последовательности CDRa1, CDRa2 и CDRa3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. V_B предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 135, 65, 94, 7, 57, 74, 103, 84, 111, 129, 121, 37, 28 и 47, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 18, 135, 65, 94, 7, 57, 74,

103, 84, 111, 129, 121, 37, 28 и 47 и содержащей CDRa1, CDRa2 и CDRa3, как определено в контексте антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, последовательности CDRb1, CDRb2 и CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации.

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

Согласно предпочтительным вариантам осуществления

1) V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 13 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 13, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 18 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 18,

2) V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 132, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 135 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 135,

3) V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 62 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 62, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 65 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 65,

4) V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 89 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 89, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности

согласно SEQ ID NO: 28 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 28, или

15) V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 42 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 42, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 47 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 47,

где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как определено в контексте антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления

1) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 13, 204, 219 или 234, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 18, 354, 369 или 384, или

2) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 132, 205, 220 или 235, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 135, 355, 370 или 385, или

3) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 62, 206, 221 или 236, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 65, 356, 371 или 386, или

4) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 89, 207, 222 или 237, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 94, 357, 372 или 387, или

5) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 1, 208, 223 или 238, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 7, 358, 373 или 388, или

6) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 52, 209, 224 или 239, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 57, 359, 374 или 389, или

7) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 70, 210, 225 или 240, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO:

74, 360, 375 или 390, или

8) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 198, 211, 226 или 241, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 103, 361, 376 или 391, или

9) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 79, 212, 227 или 242, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 84, 362, 377, или 392, или

10) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 106, 213, 228 или 243, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 111, 363, 378 или 393, или

11) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 124, 214, 229 или 244, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 129, 364, 379 или 394, или

12) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 116, 215, 230 или 245, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 121, 365, 380 или 395, или

13) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 34, 216, 231 или 246, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 37, 366, 381 или 396, или

14) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 23, 217, 232 или 247, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 28, 367, 382 или 397, или

15) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 42, 218, 233 или 248, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 47, 368, 383 или 398.

Более предпочтительно

1) V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 13, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 18,

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

3) V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 62, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 65,

согласно SEQ ID NO: 47.

Согласно другому варианту осуществления

- 1) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 13, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 369, или
- 2) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 132, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 370, или
- 3) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 62, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 371, или
- 4) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 89, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 372, или
- 5) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 1, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 373, или
- 6) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 52, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 374, или
- 7) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 70, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 375, или
- 8) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 198, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 376, или
- 9) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 79, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 377, или
- 10) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 106, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 378, или
- 11) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 124, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 379, или
- 12) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 116, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 380, или
- 13) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 34, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 381, или
- 14) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 23, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 382, или
- 15) V_A содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 42, и V_B содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 383.

Антигенсвязывающий белок может быть одновалентным или многовалентным, например, тетра-, три- или двухвалентным.

Антигенсвязывающий белок является моноспецифическим или

мультиспецифическим, например, тетра-, три- или биспецифическим.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой растворимый белок.

В антигенсвязывающих белках согласно настоящему изобретению первый и второй полипептид могут содержаться в одной полипептидной цепи. Такая одноцепочечная конструкция может, например, представлять собой одноцепочечный TCR (scTCR) или одноцепочечный биспецифический антигенсвязывающий белок, в частности, одноцепочечный биспецифический TCR, или молекулу одноцепочечный биспецифический TCR-антитело.

Предпочтительно первый и второй полипептид содержатся в двух полипептидных цепях, т.е. V_A содержится на первой полипептидной цепи, и V_B содержится на второй полипептидной цепи.

Предпочтительно антигенсвязывающий белок представляет собой TCR. TCR может быть выбран из группы, состоящей из TCR α/β , TCR γ/δ , одноцепочечного TCR, мембраносвязанного TCR, растворимого TCR, одновалентного, двухвалентного или мновалентного TCR, моноспецифического, биспецифического или мультиспецифического TCR, функционального фрагмента TCR, слитого белка, содержащего функциональный фрагмент TCR, или химерного белка, содержащего функциональный фрагмент TCR. Согласно предпочтительным вариантам осуществления TCR представляет собой TCR α/β или TCR γ/δ , предпочтительно TCR α/β . В контексте настоящего изобретения, если указано, что антигенсвязывающий белок предпочтительно представляет собой TCR, это дополнительно подразумевает, что наиболее предпочтительно антигенсвязывающий белок представляет собой TCR α/β или TCR γ/δ , предпочтительно TCR α/β . Согласно одному варианту осуществления последовательности константного домена TCR могут быть получены из любого подходящего вида, такого как любое млекопитающее, например, человек, крыса, обезьяна, кролик, осел или мышь, предпочтительно человек или мышь, более предпочтительно человек. Согласно одному варианту осуществления TCR представляет собой $\alpha\beta$ TCR и содержит последовательность константного домена α -цепи (TRAC) согласно SEQ ID NO: 5, 750, 751 или 156, предпочтительно SEQ ID NO: 5, 750 или 751, и последовательность константного домена β -цепи (TRBC1 или TRBC2) согласно SEQ ID NO: 11, 32 или 157, предпочтительно SEQ ID NO: 11 или 32.

Предпочтительно, первый полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120, 36, 27, 46 и 158-172, предпочтительно выбранной из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120, 36, 27 и 46, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120, 36, 27, 46 или 158-172, и содержащей CDRa1, CDRa2 и CDRa3, как определено в контексте антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, где последовательности CDRa1, CDRa2 и CDRa3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, и второй полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78, 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33, 51 и 173-187, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78, 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33 и 51, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78, 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33, 51 или 173-187, и содержащей CDRa1, CDRa2 и CDRa3, как определено в контексте антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, последовательности CDRb1, CDRb2 и CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации.

Более предпочтительно, первый полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120, 36, 27, 46 и 158-172, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120, 36, 27 и 46, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120, 36, 27, 46, или 158-172, и содержащей CDRa1, CDRa2 и CDRa3, как определено в контексте антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению без аминокислотной мутации, и второй полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33, 51 и 173-187, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33 и 51, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33, 51 или 173-187, и содержащей CDRa1, CDRa2 и CDRa3, как определено в контексте антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению без аминокислотных мутаций.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления

1) первый полипептид содержит или состоит из аминокислотной

в контексте антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления

1) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 17, 294, 309 или 324, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 22, 444, 459 или 474,

2) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 134, 295, 310 или 325, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 137, 445, 460 или 475,

3) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 64, 296, 311 или 326, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 69, 446, 461 или 476,

4) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 93, 297, 312 или 327, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 97, 447, 462 или 477,

5) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 6, 298, 313 или 328, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 12, 448, 463 или 478,

6) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 56, 299, 314 или 329, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 61, 449, 464 или 479,

7) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 73, 300, 315 или 330, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 78, 450, 465 или 480,

8) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 102, 301, 316 или 331, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 105, 451, 466 или 481,

9) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 83, 302, 317 или 332, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 88, 452, 467 или 482,

10) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 110, 303, 318 или 333, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 115, 453, 468 или 483,

11) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно

SEQ ID NO: 128, 304, 319 или 334, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 131, 454, 469 или 484,

12) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 120, 305, 320 или 335, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 123, 455, 470 или 485,

13) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 36, 306, 321 или 336, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 41, 456, 471 или 486,

14) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 27, 307, 322 или 337, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 33, 457, 472 или 487, или

15) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 46, 308, 323 или 338, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 51, 458, 473 или 488.

Более предпочтительно

1) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 17, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 22,

2) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 134, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 137,

3) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 64, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 69,

4) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 93, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 97,

5) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 6, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 12,

6) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 56, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 61,

7) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 73, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности

согласно SEQ ID NO: 78,

8) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 102, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 105,

9) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 83, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 88,

10) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 110, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 115,

11) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 128, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 131,

12) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 120, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 123,

13) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 36, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 41,

14) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 27, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 33, или

15) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 46, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 51.

Согласно другим вариантам осуществления

1) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 17, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 459,

2) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 134, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 460,

3) первый полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 64, и второй полипептид содержит или состоит из последовательности согласно SEQ ID NO: 461,

согласно SEQ ID NO: 473.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению может быть сконструирован, например, путем введения гетерологичных последовательностей, предпочтительно последовательностей мыши, которые могут повысить экспрессию и стабильность. Кроме того, могут быть введены дополнительные стабилизирующие мутации, известные из уровня техники (например, WO2018/104407, PCT/EP2018/069151, WO 2011/044186, WO 2014/018863), такие как замена неблагоприятных аминокислот в переменных доменах и/или введение дисульфидных связей, например, между константными доменами TCR и удаление неспаренного цистеина.

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

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок является одновалентным или мновалентным, например, тетра-, три- или двухвалентным.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок является биспецифическим, в частности, биспецифический TCR, биспецифическое антитело или биспецифическая молекула TCR-антитело. Специалисту известно, что в случаях, когда антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое «антитело», один из сайтов связывания антигена содержит происходящие из TCR последовательности CDR1, CDR3 и необязательно CDR2, как определено в контексте антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, тогда как другой антигенсвязывающий сайт может быть полностью происходить из антитела.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой растворимый белок. Согласно некоторым вариантам осуществления

антигенсвязывающий белок представляет собой растворимый TCR. В контексте настоящего изобретения термин «растворимый TCR» относится к гетеродимерным укороченным вариантам нативных TCR, которые содержат внеклеточные части α -цепи и β -цепи TCR, например, связанные дисульфидной связью, но у которых отсутствуют трансмембранный и цитозольный домены нативного белка.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок имеет человеческое происхождение, что понимается как происходящий из локуса человеческого гена и, следовательно, содержит человеческие последовательности.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок является гуманизированным, химеризированным и/или мураинизированным.

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

- (i) один или несколько дополнительных антигенсвязывающих сайтов,
- (ii) трансмембранная область, необязательно включающая цитоплазматическую область передачи сигналов,
- (iii) диагностическое средство,
- (iv) терапевтическое средство.

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

Дополнительный антигенсвязывающий сайт, если он присутствует, предпочтительно происходит из антитела.

Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие белки, в частности, TCR, имеющие альтернативные домены, такие как мембранный якорный домен вместо эндогенной трансмембранной области. Также охватываются антигенсвязывающие белки, в частности, TCR, имеющие точечные мутации в варибельном домене или константном домене TCR с целью улучшения экспрессии или стабильности TCR и/или спаривания цепей.

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

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

«Диагностическое средство» в контексте настоящего изобретения относится к поддающейся обнаружению молекуле или веществу, такому как флуоресцентная молекула, радиоактивная молекула или любые другие метки, известные в данной области техники,

которые обеспечивают (прямо или косвенно) сигнал.

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

«Радиоактивные молекулы» включают без ограничения радиоактивные атомы для скинтиграфических исследований, такие как I^{123} , I^{124} , In^{111} , Re^{186} , Re^{188} , Tc^{99} . Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению также могут содержать спин-метку для визуализации ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известного как магнитно-резонансная томография, МРТ), такую как йод-123, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Такие диагностические средства могут быть либо непосредственно связаны (т.е. физически связаны) с антигенсвязывающим белком, либо могут быть связаны косвенно.

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

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

Термин «цитотоксический агент» в контексте настоящего изобретения относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает разрушение клеток. Термин «цитотоксический агент» включает химиотерапевтические агенты, ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты, а также различные противоопухолевые или противораковые агенты, раскрытые ниже. Согласно некоторым вариантам осуществления цитотоксический агент представляет собой таксоид, барвинок, таксаны, майтанзиноиды или аналоги майтанзиноида, такие как DM1 или DM4, низкомолекулярное лекарственное средство, производное томаймицина или пирролобензодиазепина, производное криптофицина, производное лептомицина, аналог ауристатины или доластатины, пролекарство, ингибиторы топоизомеразы II, агент,

алкилирующий ДНК, антитубулиновый агент, СС-1065 или аналог СС-1065.

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

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению ковалентно присоединены непосредственно или через расщепляемый или нерасщепляемый линкер по меньшей мере к одному ингибитору роста. Антигенсвязывающий белок, к которому присоединен по меньшей мере один ингибитор роста, также может называться конъюгатом. Расщепляемый линкер облегчает высвобождение цитотоксического агента или агента, ингибирующего рост, из антигенсвязывающего белка в клетке. Например, можно использовать кислотолабильный линкер, чувствительный к пептидазе линкер, лабильный к эстеразе линкер, фотоллабильный линкер или дисульфидсодержащий линкер (см., например, патент США № 5208020). Линкер также может быть «нерасщепляемым линкером» (например, линкером SMCC), что в некоторых случаях может привести к лучшей переносимости.

Получение таких конъюгатов, например, иммуноконъюгатов, описано в заявке WO 2004/091668 или Hudecz, F., *Methods Mol. Biol.* 298: 209-223 (2005) и Kirin et al., *Inorg Chem.* 44(15): 5405-5415 (2005), содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте и может быть перенесено специалистами в данной области техники на получение антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, к которым присоединен такой по меньшей мере один агент, ингибирующий рост.

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

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению также можно использовать в терапии пролекарствами, опосредованной зависимыми ферментами, путем конъюгирования полипептида с ферментом, активирующим пролекарство, который превращает пролекарство (например, пептидил-химиотерапевтический агент, см. WO

81/01145) в активное противораковое лекарственное средство (см., например, WO 88/07378 и патент США № 4975278).

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислотных положений 1, 3 и 4 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления эти антигенсвязывающие белки специфически связываются с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислотных положений 1, 3, 4 и 5, или 1, 3, 4 и 6 или 1, 3, 4, 5 и 6 или 1, 3, 4, 5, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислотных положений 4, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления эти антигенсвязывающие белки специфически связываются с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислотных положений 1, 4, 6 и 7, или 3, 4, 6 и 7 или 1, 3, 4, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислотных положений 5 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. Согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления эти антигенсвязывающие белки специфически связываются с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислотных положений 5, 6 и 7, или 3, 4, 5, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок незначительно связывается с подобными пептидами группы, состоящей из последовательности согласно SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010).

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок незначительно связывается с подобными пептидами группы, состоящей из последовательности согласно SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010).

Гены, кодирующие области V и области J, содержащиеся в V_A и V_B антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, перечислены в Таблице 2. Аннотация выполнена с помощью GeneData 11.0.1 с использованием IMGT/GENE-DB (Версия: 28.11.2019) в качестве эталонной базы данных.

Согласно некоторым вариантам осуществления V_A содержит область V, кодируемую TRAV14, в частности, TRAV14/DV4, и CDRa1 согласно SEQ ID NO: 24 и CDRa2 согласно SEQ ID NO: 25.

Согласно некоторым вариантам осуществления V_B содержит область V, кодируемую TRBV13, и CDRb1 согласно SEQ ID NO: 75 и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 76.

Согласно некоторым вариантам осуществления V_B содержит область V, кодируемую TRBV4-1, и CDRb1 согласно SEQ ID NO: 58 и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 59.

Согласно некоторым вариантам осуществления V_B содержит область V, кодируемую TRBV6-1, и CDRb1 согласно SEQ ID NO: 112 и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 113.

Авторы настоящего изобретения показали, что антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению, если они экспрессируются в Т-клетках CD8⁺, способны активировать указанные Т-клетки CD8⁺ при связывании с СТ45-IP, презентированными на МНС антигенпрезентирующей клеткой.

Помимо Т-клеток CD8⁺, Т-клетки CD4⁺, называемые хелперными Т-клетками, также имеют решающее значение для организованного иммунного ответа, в котором участвуют все виды различных иммунных клеток. Для полной активации Т-клетки после встречи с родственным ей комплексом пептид-МНС обычно необходимо дополнительное связывание соответствующего корцептора. В случае Т-клеток CD8⁺ эту помощь обеспечивает корцептор CD8, а в случае Т-клеток CD4⁺ эту помощь обеспечивает корцептор CD4. Лишь в редких случаях TCR, происходящий из Т-клетки CD8⁺, при переносе в Т-клетку CD4⁺, способен вызывать внутриклеточную передачу сигналов, которая достаточно сильна, чтобы привести к активации Т-клетки CD4⁺.

Авторы настоящего изобретения показали, что некоторые из антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, если они экспрессируются в Т-клетках CD4⁺, в частности, Т-клетках CD4⁺CD8⁻, способны активировать указанные Т-клетки CD4⁺CD8⁻ при связывании с СТ45-IP, презентированными на МНС антигенпрезентирующей клеткой (пример 3, данные не показаны).

В контексте настоящего изобретения антигенсвязывающий белок считается «способным активировать Т-клетку», если в анализе продукции цитокинов, как определено выше, Т-клетка, экспрессирующая антигенсвязывающий белок (т.е. эффекторная клетка), продуцирует по меньшей мере один внутриклеточный цитокин при совместном

культивировании с клетками-мишенями, презентующими антигенный пептид СТ45-IP, в частности, если количество Т-клеток, экспрессирующих антигенсвязывающий белок и продуцирующих по меньшей мере один внутриклеточный цитокин, составляет по меньшей мере 2%, по меньшей мере 2,5%, предпочтительно по меньшей мере 3% на анализируемую популяцию Т-клеток, таких как Т-клетки CD4⁺ или CD8⁺.

Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок способен активировать Т-клетку CD8⁺, в частности, Т-клетку CD8⁺ CD4⁻, и/или Т-клетку CD4⁺, в частности, Т-клетку CD4⁺ CD8⁻. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок способен активировать Т-клетку CD4⁺, в частности, Т-клетку CD4⁺ CD8⁻. Другими словами, антигенсвязывающий белок, предпочтительно TCR, способен активировать Т-клетку CD4⁺ независимо от CD8. Другими словами, антигенсвязывающий белок, предпочтительно TCR, способен связывать комплекс антигенного пептида СТ45 и молекулы МНС в отсутствие CD8. Согласно наиболее предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок способен активировать как Т-клетку CD4⁺, в частности, Т-клетку CD4⁺ CD8⁻, так и Т-клетку CD8⁺, в частности, Т-клетку CD8⁺ CD4⁻. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой TCR.

В контексте настоящего изобретения антигенсвязывающий белок считается способным активировать популяцию Т-клеток, если в функциональном анализе продукции цитокинов, как описано выше, выработка цитокинов обнаруживается по меньшей мере в 2%, по меньшей мере в 2,5%, предпочтительно по меньшей мере в 3% указанной популяции Т-клеток CD4⁺ или CD4⁻CD8⁺. Секретируемые цитокины могут представлять собой, например, IFN-гамма и/или TNF-альфа.

Активацию Т-клеток CD4⁺ посредством TCR, происходящего из Т-клетки CD8⁺, можно усилить путем переноса корцептора CD8 вместе с TCR в клетку CD4⁺. Авторы настоящего изобретения показали, что совместная трансфекция Т-клеток CD4⁺ описанными в настоящем документе СТ45-IP-специфическими TCR и CD8 значительно усиливает уничтожение опухолевых клеток, презентующих СТ45-IP (пример 8, данные не показаны). Вовлечение Т-клеток CD4⁺ вместе с Т-клетками CD8⁺ дает много преимуществ клеточной иммунотерапии. Т-клетки CD4⁺ не только могут вызывать прямую цитотоксичность против опухолевых клеток, но также могут вовлекать другие иммунные клетки, способствуя длительному противоопухолевому эффекту. Эта вспомогательная функция осуществляется путем предоставления цитокинов, хемокинов и костимулирующих молекул и включает поддержку цитотоксических Т-клеток CD8⁺,

образование эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти, активацию и созревание макрофагов/дендритных клеток, разрешение дендритных клеток, что в свою очередь эффективно стимулирует Т-клетки CD8⁺ и управляет образованием эффекторных Т-клеток CD8⁺ и клеток памяти, активацию врожденных иммунных клеток, таких как НК-клетки, образование В-клеток памяти и многие другие эффекты.

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок имеет среднюю экспрессию по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 40%, в частности, после транзientной экспрессии. Средняя экспрессия TCR может быть определена путем окрашивания поверхности TCR, как описано в примерах. Окрашивание может быть выполнено способами, известными в данной области техники. Например, окрашивание можно проводить с использованием специфического антитела V_B (в случае человеческого TCR), или анти-mTCRB антител (в случае химерных TCR) или меченных мультимеров ST45-IP:МНС (например, тетрамеров или декстримеров). Такое окрашивание можно дополнительно комбинировать с окрашиванием для идентификации конкретных популяций клеток.

Антигенсвязывающий белок 1

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом ST45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид ST45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 14, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 16, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 19, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 21, где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 1». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 1, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 15, и CDRb2 содержит или

состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 20, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 1 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 4, 5 или 6 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 3, 4, 5, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 1, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 25 нМ, менее приблизительно 20 нМ, менее приблизительно 15 нМ или менее приблизительно 10 нМ. Антигенсвязывающий белок 1 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 1, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 13 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 13, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 18 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 18, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 1, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно переменная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 1 кодируется TRAV38-1 и/или переменная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 1 кодируется TRBV7-9. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 1 способен активировать Т-клетку CD8+, в частности, Т-клетку CD8+ CD4-, и/или Т-клетку CD4+, в частности, Т-клетку CD4+ CD8-.

Антигенсвязывающий белок 2

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом

CT45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид CT45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A , содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B , содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 133, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 75, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 136, где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 2». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 2, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 76, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 2 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 3, 4 или 5 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 4, 5, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC_{50} для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс CT45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные CT45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 2, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 25 нМ, менее приблизительно 20 нМ, менее приблизительно 15 нМ, менее приблизительно 10 нМ или менее приблизительно 5 нМ. Антигенсвязывающий белок 2 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 2, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 132 или

аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 132, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 135 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 135, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 2, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно вариабельная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 2 кодируется TRAV14/DV4 и/или вариабельная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 2 кодируется TRBV13. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 2 способен активировать Т-клетку CD8⁺, в частности, Т-клетку CD8⁺ CD4⁻, и/или Т-клетку CD4⁺, в частности, Т-клетку CD4⁺ CD8⁻.

Антигенсвязывающий белок 3

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарности области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 63, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 66, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 68, где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 3». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 3, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 67, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 3 специфически связывается с

функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 3, 4 или 5 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 4, 5, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 3, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 15 нМ, менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2,5 нМ или менее приблизительно 1,5 нМ. Антигенсвязывающий белок 3 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), предпочтительно выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 3, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 62 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 62, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 65 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 65, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 3, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно переменная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 3 кодируется TRAV14/DV4 и/или переменная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 3 кодируется TRBV27. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 3 способен активировать Т-клетку CD8⁺, в частности, Т-клетку CD8⁺ CD4⁻, и/или Т-клетку CD4⁺, в частности, Т-клетку CD4⁺ CD8⁻.

Антигенсвязывающий белок 4

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом

CT45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид CT45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A , содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B , содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 90, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 92, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 66, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 96), где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 4». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 4, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 91, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 95, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 4 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 3, 4 или 5 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 4, 6, 7 и 8 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC_{50} для индукции уничтожения клеток, презентирующих комплекс CT45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные CT45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 4, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 25 нМ, менее приблизительно 20 нМ, менее приблизительно 15 нМ, менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2,5 нМ или менее приблизительно 1,5 нМ. Антигенсвязывающий белок 1 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), предпочтительно выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-

0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 4, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 89 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 89, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 94 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 94, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 4, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно переменная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 4 кодируется TRAV3 и/или переменная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 4 кодируется TRBV6-2. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 4 способен активировать Т-клетку CD8+, в частности, Т-клетку CD8+ CD4-, и/или Т-клетку CD4+, в частности, Т-клетку CD4+ CD8-.

Антигенсвязывающий белок 5

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий переменный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий переменный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 4, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 8, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 10, где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 5». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 5, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной

последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 9, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 5 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 2, 3 или 4 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 6, 7 и 8 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 5, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 25 нМ, менее приблизительно 15 нМ, менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2,5 нМ, менее приблизительно 1,5 нМ или менее приблизительно 1 нМ. Антигенсвязывающий белок 5 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 5, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 1 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 7 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 7, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 5, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно переменная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 5 кодируется TRAV35 и/или переменная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 5 кодируется TRBV9. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 5 способен активировать Т-клетку CD8⁺, в частности, Т-клетку CD8⁺ CD4⁻, и/или Т-клетку CD4⁺, в частности, Т-клетку CD4⁺ CD8⁻.

Антигенсвязывающий белок 6

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к

антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 53, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 55, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 58, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 60, где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 6». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 6, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 54, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 59, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 6 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 2, 3 или 4 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 3, 4 и 6 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 6, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 25 нМ, менее приблизительно 20 нМ, менее приблизительно 15 нМ, менее приблизительно 10 нМ или менее приблизительно 5 нМ. Антигенсвязывающий белок 6 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), предпочтительно выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID

NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), более предпочтительно выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 6, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 52 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 52, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 57 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 57, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 6, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно вариабельная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 6 кодируется TRAV12-3 и/или вариабельная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 6 кодируется TRBV4-1. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 6 способен активировать Т-клетку CD8+, в частности, Т-клетку CD8+ CD4-, и/или Т-клетку CD4+, в частности, Т-клетку CD4+ CD8-.

Антигенсвязывающий белок 7

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A , содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B , содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 71, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 72, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 75, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 77, где последовательности CDRa1, CDRa3,

CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 7». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 7, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 15, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 76, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 7 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 3 или 4 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 4, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 7, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2,5 нМ, менее приблизительно 1,5 нМ или менее приблизительно 1 нМ. Антигенсвязывающий белок 7 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 7, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 70 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 70, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 74 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 74, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 7, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно переменная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 7 кодируется TRAV38-2/DV8 и/или переменная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 7 кодируется TRBV13. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 7 способен активировать Т-клетку CD8⁺, в частности, Т-клетку CD8⁺ CD4⁻, и/или Т-

клетку CD4+, в частности, Т-клетку CD4+ CD8-.

Антигенсвязывающий белок 8

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 99), CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 101, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 75, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 104), где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 8». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 8, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 100, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 76, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 8 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 1 или 2 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 5 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентирующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 8, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 25 нМ, менее приблизительно 20 нМ, менее приблизительно 15 нМ, или менее приблизительно 10 нМ. Антигенсвязывающий белок 8 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO:

152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), предпочтительно выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 8, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 98 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 98, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 103 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 103, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 8, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно вариабельная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 8 кодируется TRAV19 и/или вариабельная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 8 кодируется TRBV13. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 8 способен активировать Т-клетку CD8⁺, в частности, Т-клетку CD8⁺ CD4⁻, и/или Т-клетку CD4⁺, в частности, Т-клетку CD4⁺ CD8⁻.

Антигенсвязывающий белок 9

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 80, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 82, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 85, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 87), где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации.

Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 9». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 9, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 81, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 86, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 9 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 5, 6 или 7 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 9, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2,5 нМ, менее приблизительно 1,5 нМ или менее приблизительно 1 нМ. Антигенсвязывающий белок 9 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), предпочтительно выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 9, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 79 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 79, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 84 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 84, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 9, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно переменная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 9 кодируется TRAV5 и/или

вариабельная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 9 кодируется TRBV2. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 9 способен активировать Т-клетку CD8+, в частности, Т-клетку CD8+ CD4-, и/или Т-клетку CD4+, в частности, Т-клетку CD4+ CD8-.

Антигенсвязывающий белок 10

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 107, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 109, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 112, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 114, где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 10». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 10, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 108, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 113, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 10 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 2 или 3 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 5, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентирующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 10, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 25 нМ, менее приблизительно 20 нМ, менее приблизительно 15 нМ или менее приблизительно 10 нМ. Антигенсвязывающий белок 10 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей

мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 10, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 106 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 106, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 111 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 111, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 10, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно вариабельная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 10 кодируется TRAV1-2 и/или вариабельная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 10 кодируется TRBV6-1. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 10 способен активировать Т-клетку CD8⁺, в частности, Т-клетку CD8⁺ CD4⁻, и/или Т-клетку CD4⁺, в частности, Т-клетку CD4⁺ CD8⁻.

Антигенсвязывающий белок 11

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 125, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 127, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 112, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 130, где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации.

Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 11». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 11, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 126, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 113, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 11 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 4, 5 или 6 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 3, 4, 5, 6 и 8 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 11, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 60 нМ. Антигенсвязывающий белок 11 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 11, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 124 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 124, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 129 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 129, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 11, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно переменная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 11 кодируется TRAV22 и/или переменная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 11 кодируется TRBV6-1. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 11 способен активировать Т-клетку CD8⁺, в частности, Т-клетку CD8⁺ CD4⁻, и/или Т-клетку CD4⁺, в частности, Т-клетку CD4⁺ CD8⁻.

Антигенсвязывающий белок 12

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 117, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 119, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 58, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 122, где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 12». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 12, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 118, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 59, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 12 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 2, 3 или 4 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 4, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентирующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 12, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 60 нМ, или менее приблизительно 50 нМ. Антигенсвязывающий белок 12 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления

антигенсвязывающего белка 12, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 116 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 116, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 121 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 121, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 12, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно вариабельная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 12 кодируется TRAV27 и/или вариабельная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 12 кодируется TRBV4-1. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 12 способен активировать Т-клетку CD8+, в частности, Т-клетку CD8+ CD4-, и/или Т-клетку CD4+, в частности, Т-клетку CD4+ CD8-.

Антигенсвязывающий белок 13

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом CT45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид CT45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A , содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B , содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 35, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 38, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 40, где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 13». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 13, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 39, где

последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 13 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 3, 4 или 5 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 3, 4, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 13, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 25 нМ, менее приблизительно 20 нМ или менее приблизительно 15 нМ. Антигенсвязывающий белок 13 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 13, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 34 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 34, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 37 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 37, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 13, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно переменная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 13 кодируется TRAV14/DV4 и/или переменная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 13 кодируется TRBV19. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 13 способен активировать Т-клетку CD8⁺, в частности, Т-клетку CD8⁺ CD4⁻, и/или Т-клетку CD4⁺, в частности, Т-клетку CD4⁺ CD8⁻.

Антигенсвязывающий белок 14

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости

(MHC), где антигенный пептид CT45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий вариабельный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий вариабельный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 26, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 29, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 31, где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 14». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 14, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 30, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 14 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 2, 3 или 4 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 3, 4 и 5 последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC₅₀ для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс CT45-IP:MHC, таких как клетки T2, загруженные CT45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 14, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 25 нМ или менее приблизительно 20 нМ. Антигенсвязывающий белок 14 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 14, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 23 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID

NO: 23, и VB содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 28 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 28, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 14, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно переменная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 14 кодируется TRAV14/DV4 и/или переменная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 14 кодируется TRBV11-2. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 14 способен активировать Т-клетку CD8⁺, в частности, Т-клетку CD8⁺ CD4⁻, и/или Т-клетку CD4⁺, в частности, Т-клетку CD4⁺ CD8⁻.

Антигенсвязывающий белок 15

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку, специфически связывающемуся с антигенным пептидом CT45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид CT45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий переменный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий переменный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 43, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 45, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 48, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 50, где последовательности CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок, содержащий указанные последовательности CDR, далее также упоминается как «антигенсвязывающий белок 15». Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 15, CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 44, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 49, где последовательности CDRa2 и/или CDRb2 могут содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации. Антигенсвязывающий белок 15 специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 4, 5 или 6 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 1, 3, 4, 5, 6 и 7

последовательности согласно SEQ ID NO: 138. EC_{50} для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс СТ45-IP:МНС, таких как клетки Т2, загруженные СТ45-IP, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок 15, как измерено, например, посредством анализа высвобождения люциферазы, составляет менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 25 нМ или менее приблизительно 20 нМ. Антигенсвязывающий белок 15 незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), предпочтительно выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего белка 15, V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 42 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 42, и V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 27 или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 27, где V_A и V_B содержат последовательности CDR, как описано выше для антигенсвязывающего белка 15, где последовательности CDR могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно не содержат аминокислотную мутацию. Предпочтительно переменная область альфа-цепи антигенсвязывающего белка 15 кодируется TRAV21 и/или переменная область бета-цепи антигенсвязывающего белка 15 кодируется TRBV5-1. Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок 15 способен активировать Т-клетку CD8+, в частности, Т-клетку CD8+ CD4-, и/или Т-клетку CD4+, в частности, Т-клетку CD4+ CD8-.

Настоящее изобретение также охватывает частицы, отображающие антигенсвязывающие белки, в частности, TCR, и включение указанных частиц в библиотеку частиц. Такие частицы включают без ограничения фаг, дрожжи, рибосомы или клетки млекопитающих. Способы получения таких частиц и библиотек известны в данной области техники (например, см. WO2004/044004, WO01/48145, Chervin et al. (2008) J. Immuno. Methods 339.2: 175-184).

Нуклеиновые кислоты, векторы и рекомбинантные клетки-хозяева

Полипептиды антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению могут кодироваться нуклеиновыми кислотами и экспрессироваться *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Таким образом, согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте или нуклеиновым кислотам, содержащим или состоящим из одной или нескольких последовательностей, кодирующих антигенсвязывающий белок согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Нуклеиновая кислота может содержаться в одной молекуле нуклеиновой кислоты или может быть разделена на две или более молекул нуклеиновой кислоты, при этом каждая молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну из одной или нескольких последовательностей, кодирующих антигенсвязывающий белок согласно первому аспекту настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам осуществления одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует одну часть или мономер антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению (например, одну из двух цепей TCR согласно настоящему изобретению), а другая молекула нуклеиновой кислоты кодирует другую часть или мономер антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению (например, другую из двух цепей TCR). Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновая кислота кодирует две или более полипептидные цепи антигенсвязывающего белка, например, по меньшей мере две цепи TCR. Нуклеиновые кислоты, кодирующие множество полипептидных цепей антигенсвязывающего белка, могут включать сайт расщепления нуклеиновой кислоты между по меньшей мере двумя последовательностями цепей, могут кодировать сайт начала транскрипции или трансляции, такой как внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) между двумя или более последовательностями цепей, и/или могут кодировать протеолитический сайт-мишень между двумя или более цепями антигенсвязывающего белка. Если две или более полипептидные цепи антигенсвязывающего белка кодируются на одной молекуле нуклеиновой кислоты, две или более полипептидные цепи антигенсвязывающего белка могут находиться под контролем одного и того же промотора или под контролем отдельных промоторов.

Термин «нуклеиновая кислота» относится в контексте настоящего изобретения к одно- или двухцепочечным олиго- или полимерам дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных оснований или того и другого. Нуклеотидные мономеры состоят из нуклеинового основания, пятиуглеродного сахара (такого как, без ограничения рибозы или 2'-дезоксирибозы) и от одной до трех фосфатных групп. Обычно нуклеиновая кислота образуется посредством сложных фосфодиэфирных связей между отдельными нуклеотидными мономерами. В контексте настоящего изобретения термин «нуклеиновая

кислота» включает без ограничения молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), но также включает синтетические формы нуклеиновых кислот, содержащие другие связи (например, пептидные нуклеиновые кислоты, как описано у Nielsen et al. (Science 254:1497-1500, 1991). Как правило, нуклеиновые кислоты представляют собой одно- или двухцепочечные молекулы и состоят из встречающихся в природе нуклеотидов. Изображение одноцепочечной нуклеиновой кислоты также определяет (по меньшей мере частично) последовательность комплементарной цепи. Нуклеиновая кислота может быть одно- или двухцепочечной или может содержать части как двухцепочечных, так и одноцепочечных последовательностей. Иллюстративно, молекулы двухцепочечных нуклеиновых кислот могут иметь 3'- или 5'-выступы, и поэтому не требуется или не предполагается, что они являются полностью двухцепочечными по всей своей длине. Термин нуклеиновая кислота включает хромосомы или хромосомные сегменты, векторы (например, экспрессионные векторы), экспрессионные кассеты, голый полимер ДНК или РНК, праймеры, зонды, кДНК, геномную ДНК, рекомбинантную ДНК, кРНК, мРНК, тРНК, микроРНК (миРНК) или малую интерферирующую РНК (siРНК). Нуклеиновая кислота может быть, например, одноцепочечной, двухцепочечной или трехцепочечной и не ограничена какой-либо конкретной длиной. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты содержит или кодирует комплементарные последовательности в дополнение к любой явно указанной последовательности.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления нуклеиновая кислота представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту. Согласно предпочтительным вариантам осуществления нуклеиновая кислота представляет собой рекомбинантную нуклеиновую кислоту.

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

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению можно получить с использованием стандартных методов молекулярной биологии, включая без ограничения методы амплификации и обратной транскрипции РНК. После получения фрагментов ДНК, кодирующих, например, переменные цепи, этими фрагментами ДНК можно дополнительно манипулировать с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК, например, для преобразования генов переменной области в гены полноразмерной

цепи. В этих манипуляциях фрагмент ДНК, кодирующий вариант, функционально связывают с другой молекулой ДНК или с фрагментом, кодирующим другой белок, как например, с константной областью или гибким линкером. Термин «функционально связанный», используемый в этом контексте, предназначен для обозначения того, что два фрагмента ДНК соединены функциональным образом, например, так, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются в рамке считывания, или так, что белок экспрессируется под контролем желаемого промотора. Выделенная ДНК, кодирующая переменную область, например, переменную альфа-область и/или переменную бета-область, может быть преобразована в ген с полноразмерной цепью путем функционального связывания ДНК, кодирующей переменную область, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области. Последовательности генов константных областей человека, например, TCR или антител, известны в данной области техники, и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

Как правило, указанная нуклеиновая кислота содержит одну или несколько молекул ДНК или РНК, которые могут быть включены в один или несколько подходящих векторов.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к вектору или набору векторов, содержащим нуклеиновую кислоту (нуклеиновые кислоты) согласно второму аспекту настоящего изобретения. Предпочтительно последовательность, кодирующая антигенсвязывающий белок, функционально связана с последовательностью промотора. «Набор векторов» согласно настоящему изобретению относится к двум или более векторам. Если две или более полипептидные цепи антигенсвязывающего белка кодируются одним вектором, две или более полипептидные цепи антигенсвязывающего белка могут находиться под контролем одного и того же промотора или под контролем отдельных промоторов.

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

Для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих антигенсвязывающие белки или их функциональные фрагменты, можно использовать различные экспрессионные векторы. Как вирусные, так и невирусные экспрессионные векторы можно использовать для продукции антигенсвязывающих белков или их функциональных фрагментов, описанных в настоящем документе, в клетке-хозяине млекопитающего. Невирусные векторы и системы включают

плазмиды, плазмиду, космиду, эписому, искусственную хромосому, фаг или вирусный вектор.

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

Например, невирусные векторы, полезные для экспрессии полинуклеотидов и полипептидов, описанных в настоящем документе, в клетках млекопитающих (например, человека или млекопитающего, отличного от человека) включают все подходящие векторы, известные в данной области техники для экспрессии белков. Другие примеры плазмид включают реплицирующиеся плазмиды, содержащие точку начала репликации, или интегративные плазмиды, такие как, например, pUC, pcDNA, pBR и тому подобное.

Термин «вирусный вектор» относится к конструкции вектора нуклеиновой кислоты, которая включает по меньшей мере один элемент вирусного происхождения, и обладает способностью упаковываться в частицу вирусного вектора, и кодирует по меньшей мере экзогенную нуклеиновую кислоту. Вектор и/или частицу можно использовать с целью переноса представляющей интерес нуклеиновой кислоты в клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*. В данной области техники известны многочисленные формы вирусных векторов. Полезные вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, на основе вируса папилломы, вируса Эпштейна-Барра, векторы на основе вируса коровьей оспы и вируса леса Семлики (SFV). Рекомбинантные вирусы могут быть получены методами, известными в данной области техники, например, путем трансфекции упаковывающих клеток или временной трансфекции хелперными плазмидами или вирусами. Иллюстративные примеры клеток, упаковывающих вирус, включают клетки PA317, клетки PsiCRIP, клетки GPenv+, клетки 293 и т.д. Подробные протоколы получения таких рекомбинантных вирусов с дефектами по репликации можно найти, например, в WO 95/14785, WO 96/22378, US 5882877, US 6013516, US 4861719, US 5278056 и WO 94/19478.

Первый полипептид и второй полипептид, описанные в настоящем документе, могут присутствовать в одном и том же векторе или в отдельных векторах, т.е. в наборе векторов.

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей антигенсвязывающий белок согласно первому аспекту настоящего

изобретения, нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту настоящего изобретения или вектор согласно третьему аспекту настоящего изобретения. Клетка-хозяин может быть трансфецирована, инфицирована или трансдуцирована или трансформирована, в частности, нуклеиновой кислотой и/или вектором согласно настоящему изобретению.

Клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой, например, растения, животного, гриба или водоросли, или прокариотической клеткой, например, бактерия или простейших. Клетка-хозяин может представлять собой культивируемую клетку или первичную клетку, т.е. выделенную непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может быть прикрепленной клеткой или суспендированной клеткой, т.е. клеткой, которая растет в суспензии. Для целей продукции рекомбинантного антигенсвязывающего белка, например, TCR, полипептида или белка, клеткой-хозяином предпочтительно является клетка млекопитающего. Наиболее предпочтительно клетка-хозяин представляет собой человеческую клетку. Хотя клетка-хозяин может относиться к любому типу клеток, может происходить из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития, клеткой-хозяином предпочтительно является лейкоцит периферической крови (PBL) или мононуклеарная клетка периферической крови (PBMC). Более предпочтительно, клетка-хозяин представляет собой лимфоцит, такой как Т-клетка, Т-клетка-предшественник или NK-клетка. NK-клетки представляют собой встречающиеся в природе лимфоидные не-Т-клетки, которые могут быстро уничтожать инфицированные вирусом клетки и опухолевые клетки. NK-клетки можно сконструировать так, чтобы они экспрессировали опухолеспецифический TCR для использования в качестве продукта клеточной терапии при лечении рака (Shimasaki et al., Nat Rev Drug Discov. 2020 Mar,19(3):200-218). Согласно предпочтительным вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой Т-клетку, например, CD4- или CD8-положительную Т-клетку или Т-клетку $\gamma\delta$. Т-клетка может представлять собой любую Т-клетку, такую как культивируемая Т-клетка, например, первичная Т-клетка, или Т-клетку из культивируемой линии Т-клеток, например, Jurkat, SupT1, etc., или Т-клетку, получаемую у млекопитающего, предпочтительно Т-клетку или Т-клетку-предшественник из пациента-человека. В случае получения у млекопитающего Т-клетку можно получить из многочисленных источников, включая без ограничения кровь, костный мозг, лимфатический узел, тимус или другие ткани или жидкости. Т-клетки также можно обогатить или очистить. Предпочтительно Т-клетка представляет собой Т-клетку человека. Более предпочтительно Т-клетка представляет собой Т-клетку, выделенную у человека. Т-клетка может представлять собой Т-клетку любого типа и может находиться на любой стадии развития, включая без ограничения CD4-положительные хелперные Т-клетки, например, клетки Th1 и Th2, CD8-

положительные Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), инфильтрирующие опухоль клетки (ТIL), Т-клетки памяти, нативные Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки и т.п.

Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления клетка-хозяин представляет собой либо клетку для рекомбинантной экспрессии, такую как клетка яичника китайского хомячка (СНО), либо дрожжевую клетку.

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

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

Общие системы экспрессии включают клетки-хозяева *E.coli* и плазмидные векторы, клетки-хозяева насекомых и векторы бакуловируса, а также клетки-хозяева и векторы млекопитающих. Другие примеры клеток-хозяев включают без ограничения прокариотические клетки (такие как бактерии) и эукариотические клетки (такие как дрожжевые клетки, клетки млекопитающих, клетки насекомых, растительные клетки и т.д.). Конкретные примеры включают *E. coli*, *Kluyveromyces* или *Saccharomyces* дрожжи, клеточные линии млекопитающих (например, клетки Vero, клетки СНО, клетки 3Т3, клетки COS, клетки НЕК и т.д.), а также первичные или устоявшиеся культуры клеток млекопитающих (например, полученные из лимфобластов, фибробластов, эмбриональных клеток, эпителиальных клеток, нервных клеток, адипоцитов и т.д.). Примеры также включают клетку SP2/0-Ag14 мыши (ATCC CRL1581), клетку P3X63-Ag8.653 мыши (ATCC CRL1580), клетку СНО, в которой дефектен ген дигидрофолатредуктазы (Urlaub G *et al*, 1980), клетку YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 крысы (ATCC CRL1662) и т.п. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка YB2/0 может быть предпочтительной, поскольку активность ADCC химерных или гуманизированных антител усиливается при экспрессии в этой клетке. Согласно предпочтительным вариантам осуществления клетки-хозяева, описанные выше, используются в качестве системы экспрессии.

В частности, для экспрессии некоторых антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению, в частности, антигенсвязывающих белков, содержащих два

несвязанных полипептида, вектор экспрессии может быть любого типа, в котором ген, кодирующий первый полипептид, такой как альфа-цепь TCR, и ген, кодирующий второй полипептид, такой как бета-цепь TCR, существуют в отдельных векторах, или относится к типу, в котором оба гена существуют в одном и том же векторе (тандемный тип). С точки зрения простоты конструирования экспрессионного вектора антигенсвязывающего белка, простоты введения в клетки животных и баланса между уровнями экспрессии двух полипептидов, таких как альфа- и бета-цепи TCR, в клетках животных, экспрессионный вектор тандемного типа является предпочтительным, как описано в контексте гуманизированных антител (Shitara K *et al.* J Immunol Methods. 1994 Jan. 3, 167(1-2):271-8). Примеры экспрессионных векторов тандемного типа, описанных в контексте гуманизированных антител, включают pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 и т.п.

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

Фармацевтические композиции

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

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению, как было показано, способны оказывать цитотоксическое действие против клеток, презентующих антигенный пептид ST45-IP. Поскольку этот пептид специфически презентуется опухолевыми клетками, антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению полезны для разрушения опухолевых клеток у пациента. Иммунный ответ у пациента можно индуцировать путем прямого введения пациенту описанных антигенсвязывающих белков, в идеале в комбинации с агентом, повышающим иммуногенность (т.е. адъювантом). Можно ожидать, что иммунный ответ, возникающий в результате такой терапевтической вакцинации, будет высокоспецифичным в отношении опухолевых клеток, поскольку пептид KIFEMLEGV (SEQ ID NO: 138) не представлен или представлен в избытке в нормальных тканях в сопоставимых количествах копий, что предотвращает риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток тканей пациента.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающему белку согласно

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

Термины «фармацевтическая композиция» или «терапевтическая композиция» в контексте настоящего изобретения относятся к соединению или композиции, способной вызывать желаемый терапевтический эффект при правильном введении субъекту.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект может также упоминаться как пациент.

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

Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению будет представлен как часть стерильной фармацевтической композиции, которая обычно включает фармацевтически приемлемый носитель.

«Фармацевтически» или «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным соединениям и композициям, которые не вызывают неблагоприятных, аллергических или других нежелательных реакций при введении млекопитающему, особенно человеку, в зависимости от обстоятельств. Фармацевтически приемлемый носитель относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу или вспомогательному веществу любого типа.

«Фармацевтически приемлемый носитель» может включать растворители, наполнители, стабилизаторы, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т. п., которые физиологически совместимы. Согласно одному варианту осуществления носитель может представлять собой водный носитель. Согласно некоторым вариантам осуществления водный носитель способен придавать улучшенные свойства при объединении с антигенсвязывающим белком, описанным в настоящем документе, например, улучшенную растворимость, эффективность и/или улучшенную иммунотерапию.

Другие примеры фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей, полезных согласно настоящему изобретению, включают стабилизаторы, такие как SPGA, углеводы (например, сорбит, маннит, крахмал, сахароза, глюкоза, декстран), белки, такие

как альбумин или казеин, агенты, содержащие белок, такие как бычья сыворотка или обезжиренное молоко и буферы (например, фосфатный буфер).

Форма фармацевтических композиций, путь введения, доза и схема лечения, естественно зависят от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, возраста, веса и пола пациента и т.д. Эта фармацевтическая композиция может быть в любой подходящей форме (в зависимости от желаемого способа введения пациенту). Она также может быть представлена в виде стандартной дозированной формы, обычно поставляемой в запечатанном контейнере, и может быть представлена как часть набора. Такой набор обычно (хотя и необязательно) включает инструкции по применению. Он может включать множество указанных стандартных дозированных форм.

Предпочтительно фармацевтическую композицию вводят путем инъекции, например, внутривенно. Когда фармацевтическая композиция содержит клетку-хозяин, экспрессирующую антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, предпочтительно TCR, фармацевтически приемлемый носитель для клеток для инъекции может включать любой изотонический носитель, такой как, например, физиологический раствор (приблизительно 0,90 % мас./об. NaCl в воде, приблизительно 300 мОсм/л NaCl в воде или приблизительно 9,0 г NaCl на литр воды), раствор электролита NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMALYTE A (Baxter, Deerfield, IL), приблизительно 5% декстрозы в воде или лактат Рингера. В одном из вариантов фармацевтически приемлемый носитель дополнен человеческим сывороточным белком.

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

Согласно одному варианту осуществления дозы антигенсвязывающих белков могут быть определены эмпирически у индивидуумов, которым было сделано одно или несколько введений. Индивидуумам вводят возрастающие дозы антигенсвязывающего белка. Для того, чтобы оценить эффективность антигенсвязывающего белка, можно следить за маркером состояния раковых клеток. К ним относятся прямые измерения пролиферации и гибели раковых клеток с помощью FACS и других методов визуализации, улучшение здоровья, оцениваемое такими измерениями, или повышение качества жизни, измеряемое

принятыми тестами, или увеличение продолжительности жизни. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что доза будет варьироваться в зависимости от индивидуума, стадии заболевания, а также от применявшихся в прошлом и сопутствующих методов лечения.

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

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

Способы получения антигенсвязывающих белков

Согласно шестому аспекту настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего белка согласно первому аспекту настоящего изобретения, предусматривающему стадии (a) предоставления клетки-хозяина, (b) предоставления генетической конструкции, содержащей кодирующую последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок согласно первому аспекту настоящего изобретения, (c) введения генетической конструкции в клетку-хозяин и (d) экспрессии генетической конструкции клеткой-хозяином.

Согласно одному варианту осуществления способ дополнительно предусматривает выделение и очистку антигенсвязывающего белка из клетки-хозяина и необязательно восстановление антигенсвязывающего белка в клетке-хозяине, предпочтительно лимфоците, более предпочтительно Т-клетке или НК-клетке, наиболее предпочтительно Т-клетке. Специалист в данной области техники вполне способен выбрать подходящие клетки-хозяева для экспрессии антигенсвязывающего белка.

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

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению подходящим образом выделяют из культуральной среды с помощью процедур очистки антител, таких как, например, белок А-сефарозная хроматография, гидроксилапатитная хроматография,

гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Согласно одному варианту осуществления выделение экспрессированных антигенсвязывающих белков или полипептидов согласно настоящему изобретению относится к проведению хроматографии на белке А, селективной каппа-хроматографии и/или эксклюзионной хроматографии по размеру, предпочтительно хроматографии на белке А и/или эксклюзионной хроматографии по размеру, более предпочтительно хроматография на белке А и эксклюзионной хроматографии по размеру.

Зная аминокислотную последовательность желаемой последовательности, специалист в данной области техники может получить антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению стандартными методами получения полипептидов. Например, их можно синтезировать, используя хорошо известный твердофазный метод, в частности, используя коммерчески доступное устройство для синтеза пептидов (например, произведенное Applied Biosystems, Foster City, California) и следуя инструкциям производителя. Альтернативно, антитела и антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению могут быть получены с помощью методов рекомбинантной ДНК и трансфекции генов, хорошо известных в данной области техники (см. Morrison SL. *et al.* (1984) и патентные документы US5202238, и US5204244). Например, фрагменты могут быть получены как продукты экспрессии ДНК после включения последовательностей ДНК, кодирующих желаемый (поли)пептид, в экспрессионные векторы и введения таких векторов в подходящие эукариотические или прокариотические хозяева, которые будут экспрессировать желаемый полипептид, из которого они могут быть позже выделены с использованием хорошо известных методов.

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

В одном примере векторы для экспрессии рекомбинантных антигенсвязывающих белков согласно настоящему изобретению были разработаны как моноцистронные, например, контролируемые промоторными элементами, происходящими из HCMV, производными pUC19. Плазмидную ДНК амплифицировали, например, в *E.coli*, стандартными методами культивирования и затем очищали с использованием коммерчески доступных наборов (Macherey & Nagel). Очищенную плазмидную ДНК использовали для транзientной трансфекции, например, клеток CHO-S согласно инструкциям производителя (система ExpiCHO™, Thermo Fisher Scientific). Трансфицированные клетки CHO

культивировали, например, в течение 6-14 дней, например, при температуре от 32°C до 37°C и получали одну-две подачи раствора ExpiCHO™ Feed.

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

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

Терапевтические способы и применения

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

Согласно восьмому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку согласно первому аспекту настоящего изобретения, нуклеиновой кислоте согласно второму аспекту настоящего изобретения, вектору согласно третьему аспекту настоящего изобретения, клетке-хозяину согласно четвертому аспекту настоящего изобретения или фармацевтической композиции согласно четвертому аспекту

настоящего изобретения для применения в способе лечения и/или диагностики пролиферативного заболевания.

Антигенсвязывающие белки согласно настоящему изобретению, в частности, предназначены для применения в иммунной терапии, предпочтительно адоптивной клеточной терапии, более предпочтительно адоптивной Т-клеточной терапии, для профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания. Введение соединений согласно настоящему изобретению может, например, включать инфузию лимфоцитов, предпочтительно НК-клеток или Т-клеток, более предпочтительно Т-клеток согласно настоящему изобретению, указанному пациенту. Предпочтительно, такие лимфоциты представляют собой аутологичные лимфоциты пациента и трансдуцированы *in vitro* нуклеиновой кислотой или антигенсвязывающим белком согласно настоящему изобретению.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления пролиферативное заболевание представляет собой рак, в частности, рак, для которого характерна экспрессия СТ45.

В контексте настоящего изобретения рак рассматривают как «рак, для которого характерна экспрессия СТ45» (также упоминаемый как СТ45 «положительный» рак), если родственный пептид, такой как, например, пептид СТ45-IP, представлен в >98% случаев всех видов рака согласно рекомендациям NCI. При всех других показаниях, указанных в настоящем документе, можно провести биопсию, как это принято при лечении этих видов рака, и пептид можно идентифицировать с помощью XPresident® и родственных методов (согласно WO 03/100432, WO 2005/076009, WO 2011/128448, WO 2016/107740, US 7811828, US 9791444, и US 2016/0187351, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Согласно одному варианту осуществления рак легко исследовать (т.е. диагностировать), например, с использованием антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению. Способы идентификации рака, для которого характерна экспрессия антигена, с использованием антигенсвязывающего белка известны специалистам в данной области техники. Следует понимать, что термины «рак» и «карцинома» не используются в настоящем документе взаимозаменяемо, поскольку карцинома представляет собой особый тип рака, возникающий в коже или в тканях, которые выстилают или покрывают органы тела.

Согласно одному варианту осуществления рак, для которого характерна экспрессия СТ45, выбран из группы, состоящей из рака легкого, NSCLC, рака желчного пузыря, рака желчных протоков, рака лимфатического узла, рак яичника, рака пищевода, рака печени, рака матки и меланомы.

Согласно одному варианту осуществления рак представляет собой рак, при котором антиген СТ45 сверхэкспрессируется, мутирует и/или презентируется антигенным пептидом СТ45. Такой рак легко исследовать (т.е. диагностировать), например, с использованием антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению. Способы идентификации рака, для которого характерна экспрессия антигена, с использованием антигенсвязывающего белка известны специалистам в данной области техники.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения пролиферативного заболевания, предусматривающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка, нуклеиновой кислоты или вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, как определено в настоящем документе выше.

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

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

В контексте настоящего изобретения термины «лечить» или «лечение» включают как терапевтическое лечение (т.е. субъекта, страдающего данным заболеванием), так и/или превентивное или профилактическое лечение (т.е. субъекта, предрасположенного к развитию данного заболевания). Терапевтическое лечение означает обращение вспять, облегчение и/или ингибирование прогрессирования одного или нескольких симптомов нарушения или состояния. Профилактическое лечение означает предотвращение возникновения одного или нескольких симптомов нарушения или состояния. Таким образом, лечение относится не только к лечению, которое приводит к полному излечению заболевания, но также к лечению, которое замедляет прогрессирование заболевания, предотвращает или отсрочивает возникновение заболевания и/или продлевает выживаемость субъекта.

Согласно одному варианту осуществления «заболевание» или «нарушение» представляет собой любое состояние, при котором может быть полезно лечение антигенсвязывающим белком согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту осуществления это включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые предрасполагают субъекта к

рассматриваемому нарушению. Термин «нуждающийся в лечении» относится к субъекту, у которого уже имеется нарушение, а также к субъекту, у которого нарушение необходимо предотвратить.

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

Согласно одному варианту осуществления способ лечения предусматривает иммунную терапию, в частности, адоптивную терапию аутологичными или гетерологичными клетками, предпочтительно терапию Т-клетками.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой или содержит TCR или его функциональный фрагмент.

Предпочтительно антигенсвязывающий белок экспрессируется на поверхности клетки-хозяина.

Согласно одному варианту осуществления способ лечения предусматривает введение клетки-хозяина, экспрессирующей антигенсвязывающий белок, где клетка-хозяин представляет собой Т-клетку, Т-клетка-предшественник или НК-клетку, предпочтительно Т-клетку.

Согласно одному варианту осуществления клетка-хозяин, предпочтительно Т-клетку, Т-клетка-предшественник или НК-клетку, более предпочтительно Т-клетку, является аутологичной.

Согласно одному варианту осуществления клетка-хозяин, предпочтительно Т-клетка, Т-клетка-предшественник или НК-клетка, более предпочтительно Т-клетка, является аллогенной.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок конъюгирован с терапевтически активным агентом, предпочтительно терапевтически активным агентом, выбранным из группы, состоящей из радионуклида, химиотерапевтического средства и токсина.

Согласно одному варианту осуществления способ лечения дополнительно предусматривает введение по меньшей мере одного химиотерапевтического средства субъекту, нуждающемуся в этом.

Согласно одному варианту осуществления способ лечения дополнительно предусматривает введение лучевой терапии субъекту, нуждающемуся в этом.

Согласно родственному аспекту настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа у пациента, страдающего пролиферативным заболеванием, в частности, раком, для которого характерна презентация пептида, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности KIFEMLEGV (SEQ ID NO: 138), в

комплексе с белком МНС, предусматривающему введение пациенту антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению, где указанный рак выбран из группы видов рака, состоящей из рака легкого, NSCLC, рака желчного пузыря, рака желчных протоков, рака лимфатического узла, рак яичника, рака пищевода, рака печени, рака матки и меланомы. Согласно одному варианту осуществления иммунный ответ, упомянутый в указанном способе, представляет собой ответ цитотоксических Т-клеток.

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

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к применению антигенсвязывающего белка, нуклеиновой кислоты или вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для лечения заболевания у субъекта.

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

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

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

Под «терапевтически эффективным количеством» антигенсвязывающего белка или его фармацевтической композиции понимают достаточное количество антигенсвязывающего белка для лечения указанного пролиферативного заболевания при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому медицинскому лечению. Однако следует понимать, что общее ежедневное использование антигенсвязывающих

белков, нуклеиновой кислоты или вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению будет определяться лечащим врачом в пределах здравого медицинского суждения. Конкретный терапевтически эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая заболевание, подлежащее лечению, и тяжесть нарушения, активность используемого специфического антигенсвязывающего белка, конкретную используемую композицию, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента, время введения, путь введения и скорость выведения используемого конкретного полипептида, продолжительность лечения, лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с используемым конкретным полипептидом, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины. Например, специалистам в данной области техники хорошо известно, что дозы соединения начинают с уровней, более низких, чем те, которые необходимы для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивают дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект.

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

Антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению или вектор согласно настоящему изобретению, клетку-хозяин согласно настоящему изобретению или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить любым возможным способом.

Как раскрыто в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, как определено в настоящем документе выше, используют в описанных в настоящем документе медицинских целях или способах лечения. Согласно таким вариантам осуществления клетка-хозяин предпочтительно представляет собой лимфоцит, такой как NK-клетка, Т-клетка или Т-клетка-предшественник, предпочтительно CD4 и/или CD8-положительная Т-клетка или Т-клетка $\gamma\delta$, наиболее предпочтительно CD4 и/или CD8-положительная Т-клетка, наиболее предпочтительно CD4 и/или CD8-положительная Т-клетка.

Соответственно, клетку-хозяин согласно настоящему изобретению, предпочтительно Т-клетки, можно применять в качестве активных ингредиентов терапевтической композиции. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени aberrantly экспрессируют полипептид, содержащий пептид KIFEMLEGV (SEQ ID NO: 138), причем

способ предусматривает введение пациенту эффективного количества клеток-хозяев, предпочтительно Т-клеток. В контексте этого способа клетки-хозяева, однажды введенные субъекту, предпочтительно вызывают иммунный ответ.

Согласно аспекту иммунный ответ, вызванный TCR, или ответ Т-клеток может относиться к пролиферации и активации эффекторных функций, индуцированных пептидом, таким как KIFEMLEGV (SEQ ID NO: 138), *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Например, для цитотоксических Т-клеток с ограничением МНС класса I эффекторными функциями могут быть лизис клеток-мишеней, импульсно презентующих пептид, импульсно презентующих пептид-предшественник или естественным образом презентующих пептид, секреция цитокинов, предпочтительно интерферона-гамма, TNF-альфа или IL-2, индуцированная пептидом, секреция эффекторных молекул, например, гранзимов или перфоринов, индуцированная пептидом, или дегрануляция.

В контексте настоящего изобретения, когда Т-клетку применяют в качестве лекарственного средства, Т-клетки обычно собирают у субъекта путем афереза. Затем Т-клетки подвергают генетической инженерии для экспрессии антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению на их поверхности клеток, затем генетически сконструированные Т-клетки размножают и затем повторно вводят субъекту. В этом примере антигенсвязывающий белок предпочтительно представляет собой мембраносвязанный антигенсвязывающий белок, более предпочтительно TCR.

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

Когда клетку-хозяина трансфицируют для экспрессии антигенсвязывающего белка согласно настоящему изобретению, предпочтительно клетка содержит экспрессионный вектор, способный экспрессировать антигенсвязывающий белок. Клетка-хозяин может тогда называться активированной клеткой-хозяином.

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

Для целей настоящего изобретения вводимые количество или доза антигенсвязывающего белка согласно первому аспекту настоящего изобретения, нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту настоящего изобретения, вектора согласно третьему аспекту настоящего изобретения, клетки-хозяина согласно четвертому аспекту

настоящего изобретения или фармацевтической композиции согласно пятому аспекту настоящего изобретения могут быть достаточными для достижения эффекта, например, например, терапевтического или профилактического ответа у субъекта или животного в течение разумного периода времени. Например, доза антигенсвязывающего белка, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению должна быть достаточной для связывания с раковым антигеном или обнаружения, лечения или предотвращения рака в течение определенного периода времени, от приблизительно 2 часов или более, например, от 12 до 24 или более часов с момента введения. Согласно определенным вариантам осуществления период времени может быть еще больше. Доза будет определяться эффективностью антигенсвязывающего белка, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению и состоянием животного (например, человека), а также массой тела животного (например, человека), подлежащего лечению.

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

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

Клетки-хозяева, экспрессирующие антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, направленный против пептидов KIFEMLEGV (SEQ ID NO: 138), полезны в терапии. Таким образом, согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к активированным клеткам-хозяевам, получаемым вышеуказанными способами согласно настоящему изобретению.

Активированные клетки-хозяева, полученные указанным выше способом, могут специфически распознавать клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, содержащий пептид KIFEMLEGV (SEQ ID NO: 138).

Под «аберрантной экспрессией» авторы настоящего изобретения также подразумевают, что полипептид сверхэкспрессируется по сравнению с уровнями экспрессии в нормальных (здоровых) тканях, или что ген «молчит» в ткани, из которой произошла опухоль, но в опухоли он экспрессируется. Под «сверхэкспрессией» авторы настоящего изобретения подразумевают, что полипептид присутствует на уровне, по

меньшей мере в 1,2 раза превышающем уровень, присутствующий в нормальной ткани, предпочтительно по меньшей мере в 2 раза и более предпочтительно по меньшей мере в 5 или 10 раз выше уровня, присутствующего в нормальной ткани.

Согласно аспекту клетка-хозяин, в частности, Т-клетка, распознает клетку путем взаимодействия через ее антигенсвязывающий белок, в частности, ее TCR, с комплексом СТ45-IP:МНС (например, связывание). Клетки-хозяева применимы в способе уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени аберрантно экспрессируют полипептид, содержащий пептид KIFEMLEGV (SEQ ID NO: 138), при этом пациенту вводят эффективное количество активированных клеток-хозяев. Т-клетки, которые вводят пациенту, могут быть получены от пациента и активированы, как описано выше (т.е. они являются аутологичными Т-клетками). Альтернативно, Т-клетки происходят не от пациента, а от другого индивидуума (т.е. они являются гетерологичными Т-клетками). В таких случаях предпочтительно индивидуум является здоровым. Под «здоровым индивидуумом» авторы настоящего изобретения подразумевают, что человек в целом имеет хорошее здоровье, предпочтительно имеет компетентную иммунную систему и более предпочтительно не страдает каким-либо заболеванием, которое можно легко проверить и обнаружить.

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

Диагностическое применение

СТ45 экспрессируется на поверхности раковых клеток, определенных в настоящем документе выше. Антигенный пептид СТ45 представляет собой маркер рака и, следовательно, имеет потенциал для применения для определения эффективности противораковой терапии или выявления рецидива заболевания.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку согласно первому аспекту, нуклеиновой кислоте согласно второму аспекту, вектору согласно третьему аспекту, клетке-хозяину согласно четвертому аспекту или фармацевтической композиции согласно пятому аспекту для применения в качестве диагностического средства, в частности, для применения в качестве диагностического средства *in vivo*. Согласно предпочтительным вариантам осуществления диагностическое средство предназначено для диагностики пролиферативного заболевания. Согласно более предпочтительным вариантам осуществления диагностическое средство

предназначено для диагностики рака, для которого характерна презентация пептида, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности KIFEMLEGV (SEQ ID NO: 138) в комплексе с белком МНС, предпочтительно, где указанный рак выбран из группы раковых заболеваний, состоящей из рака легкого, NSCLC, рака желчного пузыря, рака желчных протоков, рака лимфатического узла, рак яичника, рака пищевода, рака печени, рака матки и меланомы.

Согласно варианту осуществления антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению применяют в качестве компонента анализа в контексте терапии, нацеленной на опухоли, для которых характерна экспрессия СТ45, для определения чувствительности пациента к терапевтическому средству, мониторинга эффективности противораковой терапии или выявления рецидива заболевания после лечения.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему белку согласно настоящему изобретению для применения для *in vivo* обнаружения экспрессии СТ45 у субъекта, или для применения для *ex vivo* или *in vitro* обнаружения экспрессии СТ45 в биологическом образце субъекта. Указанное обнаружение может быть предназначено в частности, для

- a) диагностирования наличия рака у субъекта или
- b) определения восприимчивости пациента, страдающего раком, к терапевтическому средству, нацеленному на СТ45, или
- c) контроля эффективности анти-СТ45 противораковой терапии или выявления рецидива рака после анти-СТ45 противораковой терапии, в частности, для терапии антигенсвязывающим белком согласно настоящему изобретению, путем обнаружения презентации антигенного пептида СТ45 на опухолевых клетках.

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

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу *in-vitro* обнаружения рака в биологическом образце, предусматривающему стадии (a) контакта биологического образца с антигенсвязывающим белком согласно первому аспекту настоящего изобретения, и (b) обнаружения связывания антигенсвязывающего белка с биологическим образцом.

Наборы

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

Согласно одному варианту осуществления набор содержит

а) по меньшей мере один антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, как определено в настоящем документе выше в части «антигенсвязывающие белки», нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный антигенсвязывающий белок, вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту, или клетку-хозяин, содержащую указанный антигенсвязывающий белок, нуклеиновую кислоту и/или вектор,

б) необязательно упаковочный материал и

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

Согласно предпочтительным вариантам осуществления набор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, или вектор, содержащий эту нуклеиновую кислоту. Набор может дополнительно содержать инструкции для регулируемой экспрессии антигенсвязывающего белка на поверхности клетки, предпочтительно Т-клетки, Т-клетка-предшественника или НК-клетки, более предпочтительно Т-клетки.

Наборы согласно настоящему изобретению могут дополнительно включать любые другие реагенты, полезные для регулируемой экспрессии антигенсвязывающего белка на поверхности клетки, предпочтительно Т-клетки, Т-клетка-предшественника или НК-клетки, более предпочтительно Т-клетки, такие как реагенты трансфекции/трансдукции, полезные для введения нуклеиновой кислоты или экспрессионного вектора в клетку.

Также может быть предпочтительно, чтобы набор содержал клетку-хозяин, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий белок согласно изобретению, или вектор, содержащий эту нуклеиновую кислоту, т.е. клетку-хозяин, которая способна экспрессировать антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению.

Компоненты наборов могут присутствовать в отдельных контейнерах или несколько компонентов могут присутствовать в одном контейнере. Подходящий контейнер включает одну пробирку, одну или несколько лунок планшета (например, 96-луночного планшета, 384-луночного планшета и т.д.) или тому подобное.

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

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

Соответственно, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, как упоминается а) набора согласно настоящему изобретению, представляет собой высушенный антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, содержащийся в первом контейнере. Затем набор дополнительно содержит второй контейнер, имеющий водный состав.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления набор содержит

- a) первый контейнер, содержащий по меньшей мере один высушенный антигенсвязывающий белок согласно настоящему изобретению, как определено в настоящем документе выше в части «антигенсвязывающие белки»,
- b) второй контейнер, содержащий водный состав,
- c) необязательно упаковочный материал и
- d) необязательно этикетку или вкладыш в упаковку, содержащийся в указанном упаковочном материале, указывающий, что указанный антигенсвязывающий белок эффективен для лечения рака или для применения для лечения рака.

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

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

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

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

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

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на следующие фигуры и примеры. Вся литература и патентные документы, процитированные в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки. Хотя настоящее изобретение было проиллюстрировано и подробно описано в предшествующем описании, примеры следует рассматривать как иллюстративные или примерные, а не ограничивающие.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Функциональная avidность (EC_{50}), измеренная по эффективности уничтожения загруженных пептидом ST45-IP T2-клеток TCR-трансфицированными T-клетками. T2-клетки, конститутивно экспрессирующие люциферазу, загружали титрованными количествами пептида ST45-IP и затем совместно культивировали с T-клетками CD8⁺, трансфицированными специфическими TCR. Уничтожение анализировали путем измерения активности люциферазы в супернатанте, который высвобождается уничтожаемыми T2-клетками. Анализ повторяли дважды с клетками двух разных доноров (обозначены закрашенными кружками и ромбовидными символами). Функциональную avidность оценивали путем расчета полумаксимальной эффективности уничтожения тестируемых TCR.

Фиг. 2. Проверка перекрестной реактивности для пептидов со сходной последовательностью. T2-клетки, конститутивно экспрессирующие люциферазу, загружали пептидом ST45-IP, 10 различными пептидами со сходной последовательностью, нерелевантным пептидным контролем NYESO1-001 в концентрации 10 мкМ на пептид или не загружали, соответственно. Эти T2-клетки затем совместно культивировали с T-клетками CD8⁺, трансфицированными специфическими TCR. Уничтожение анализировали путем измерения активности люциферазы в супернатанте, который высвобождается уничтожаемыми T2-клетками. Анализ повторяли дважды с клетками двух разных доноров (черные столбцы = анализ 1, донор 1; красные столбцы = анализ 2, донор 2).

Фиг. 3. Окрашивание поверхности TCR. Проточная цитометрическая оценка экспрессии TCR, измеренная по связыванию pHLA-декстрамера. На гистограммах показаны T-клетки, подвергшиеся электропорации TCR-мРНК (черная линия) и контролем Mock-TCR (светло-серая пунктирная линия) после окрашивания декстрамерами ST45-IP-HLA-A2*02. На графиках указан процент положительных событий. Контроль Mock-TCR

применяли в качестве эталона для области, отрицательной по декстрамеру.

Фиг. 4. Эффективность в отношении опухолевой клеточной линии. Мониторинг живых клеток линий опухолевых клеток, экспрессирующих RFP, которые совместно культивируют с Т-клетками, экспрессирующими представляющие интерес TCR, или без них. Красные отсчеты, представляющие опухолевые клетки, количественно оценивали в течение 48 часов и нормализовали к моменту времени 0 часов. Графики слева показывают линию опухолевых клеток NSH1703, а графики справа показывают пролиферацию клеточной линии A375. Показаны Т-клетки CD8+, электропорированные с Mock-TCR (отрицательный контроль, вверху), TCR-9 (в центре) и TCR-7 (внизу). Использовали клетки-мишени, дополнительно загруженные 10 мкМ пептида ST45-IP в качестве положительного контроля (круг с пятном в середине), а также клетки-мишени без эффекторных клеток (звездочка) и различные соотношения Е:Т эффекторных клеток, экспрессирующих представляющих интерес TCR (круги разных оттенков серого).

Примеры

Материалы и способы

Идентификация TCR

Последовательности альфа- и бета-цепей TCR выделяли из Т-клеток здоровых доноров. Для того, чтобы гарантировать обогащение пептид-специфических Т-клеток, клетки либо неоднократно стимулировали искусственными антигенпрезентирующими клетками, покрытыми ST45-IP-MHC и CD28 (прайминг), как описано в Walter et al., 2003 J Immunol., Nov 15,171(10):4974-8, и затем отдельные клетки сортировали с применением тетрамеров ST45-IP-HLA-A*02, либо альтернативно стимулировали ST45-IP-загруженными Т2-клетками. После достаточного размножения клетки сортировали с использованием тетрамеров ST45-IP-HLA-A*02.

Нуклеотидные последовательности TCR получали с помощью стандартных методов, таких как 5'-RACE и секвенирование по Сэнгеру, как описано, например, в Molecular Cloning, Laboratory Manual, Fourth Edition by Green and Sambrook. Гены, кодирующие области V и области J TCR, перечислены в таблице 2. Аннотация была выполнена с помощью GeneData 11.0.1 с использованием IMGT/GENE-DB (версия: 28.11.2019) в качестве эталонной базы данных. Аминокислотные последовательности TCR перечислены в Таблице 3.

Таблица 2. Идентифицированные TCR

ID	Вальфа	Жальфа	Вбета	Жбета
TCR-1	TRAV38-1	TRAJ22	TRBV7-9	TRBJ2-7
TCR-2	TRAV14/DV4	TRAJ52	TRBV13	TRBJ1-1
TCR-3	TRAV14/DV4	TRAJ33	TRBV27	TRBJ1-5
TCR-4	TRAV3	TRAJ30	TRBV6-2	TRBJ2-1
TCR-5	TRAV35	TRAJ26	TRBV9	TRBJ2-7
TCR-6	TRAV12-3	TRAJ7	TRBV4-1	TRBJ2-1
TCR-7	TRAV38-2/DV8	TRAJ32	TRBV13	TRBJ2-1
TCR-8	TRAV19	TRAJ40	TRBV13	TRBJ2-1
TCR-9	TRAV5	TRAJ17	TRBV2	TRBJ2-1
TCR-10	TRAV1-2	TRAJ44	TRBV6-1	TRBJ2-1
TCR-11	TRAV22	TRAJ44	TRBV6-1	TRBJ2-7
TCR-12	TRAV27	TRAJ50	TRBV4-1	TRBJ1-2
TCR-13	TRAV14/DV4	TRAJ5	TRBV19	TRBJ2-1
TCR-14	TRAV14/DV4	TRAJ22	TRBV11-2	TRBJ1-6
TCR-15	TRAV21	TRAJ37	TRBV5-1	TRBJ2-7

Таблица 3. Аминокислотные последовательности TCR

SEQ ID NO:	TCR	Цепь	Область/ домен	Последовательность
1	TCR-5	альфа	вариабельный домен	QQLNQSPQSMFIQEGEDVSMNCTSSSIFNTWLWY KQDPGEGPVLLIALYKAGELTSNGRLTAQFGITRK DSFLNISASIPSDVGIYFCAGGYNYGQNFVFGPGTR LSVLP
2	TCR-5	альфа	CDR1	SIFNT
3	TCR-5	альфа	CDR2	LYKAGEL
4	TCR-5	альфа	CDR3	AGGYNYGQNF V
5	TCR-5	альфа	константный домен	YIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRWSS

6	TCR-5	альфа	полнора змерный	<p> QQLNQSPQSMFIQEGEDVSMNCTSSSIFNTWLWY KQDPGEGPVLLIALYKAGELTSNGRLTAQFGITRK DSFLNISASIPSDVGIYFCAGGYNYGQNFVFGPGTR LSVLPYIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVA WSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTL RLWSS </p>
7	TCR-5	бета	вариабе льный домен	<p> GVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWYQ QSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPD LHSELNLSSLELGDSALYFCASSAGLAGGYEQYFG PGTRLTVT </p>
8	TCR-5	бета	CDR1	SGDLS
9	TCR-5	бета	CDR2	YYNGEE
10	TCR-5	бета	CDR3	ASSAGLAGGYEQY
11	TCR-5	бета	констан тный домен	<p> EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG </p>
12	TCR-5	бета	полнора змерный	<p> GVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWYQ QSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPD LHSELNLSSLELGDSALYFCASSAGLAGGYEQYFG PGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQ VQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRA DCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKRKDSRG </p>
13	TCR-1	альфа	вариабе льный домен	<p> QTVTQSQPEM SVQEAETVTL SCTYDTSENN YYLFWYKQPP SRQMILVIRQ EAYKQQNATE NRFSVNFQKA AKSFSLKISD SQLGDTAMYF CAPLGLVAGS ARQLTFGSGT QLTVLP </p>

14	TCR-1	альфа	CDR1	TSENNYY
15	TCR-1	альфа	CDR2	QEAYKQQN
16	TCR-1	альфа	CDR3	APLGLVAGSA RQLT
750	TCR-1	альфа	констан тный домен	DIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
17	TCR-1	альфа	полнора змерный	QTVTQSQPEM SVQEAETVTL SCTYDTSENN YYLFWYKQPP SRQMILVIRQ EAYKQQNATE NRFSVNFQKA AKSFSLKISD SQLGDTAMYF CAPLGLVAGS ARQLTFGSGT QLTVLP DIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
18	TCR-1	бета	вариаб ельный домен	GVSQDPRHKI TKRGQNVTFR CDPISEHNRL YWYRQTLGQG PEFLTYFQNE AQLEKSRLLS DRFSAERPKG SFSTLEIQRT EQGDSAMYLC ASSTDITSYE QYFGPGTRLT VT
19	TCR-1	бета	CDR1	SEHNR
20	TCR-1	бета	CDR2	FQNEAQ
21	TCR-1	бета	CDR3	ASSTDITSYE QY
11	TCR-1	бета	констан тный домен	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG
22	TCR-1	бета	полнора змерный	GVSQDPRHKI TKRGQNVTFR CDPISEHNRL YWYRQTLGQG PEFLTYFQNE AQLEKSRLLS DRFSAERPKG SFSTLEIQRT EQGDSAMYLC ASSTDITSYE QYFGPGTRLT VT EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF

				YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHRCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG
23	TCR-14	альфа	вариабельный домен	QKITQTQPGM FVQEKEAVTL DCTYDTSQDS YGLFWYKQPS SGEMIFLIYQ GSYDEQNATE GRYSLNFQKA RKSANLVISA SQLGDSAMYF CAINGLPGSA RQLTFGSGTQ LTVLP
24	TCR-14	альфа	CDR1	TSDQSYG
25	TCR-14	альфа	CDR2	QGSYDEQN
26	TCR-14	альфа	CDR3	AINGLPGSAR QLT
750	TCR-14	альфа	константный домен	DIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
27	TCR-14	альфа	полноразмерный	QKITQTQPGM FVQEKEAVTL DCTYDTSQDS YGLFWYKQPS SGEMIFLIYQ GSYDEQNATE GRYSLNFQKA RKSANLVISA SQLGDSAMYF CAINGLPGSA RQLTFGSGTQ LTVLP DIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
28	TCR-14	бета	вариабельный домен	GVAQSPRYKI IEKRQSVAFW CNPISGHATL YWYQQILGQG PKLLIQFQNN GVVDDSQLPK DRFSAERLKG VDSTLKIQPA KLEDSAVYLC ASSRFVATGT SPLHFGNGTR LTVT
29	TCR-14	бета	CDR1	SGHAT
30	TCR-14	бета	CDR2	FQNNGV
31	TCR-14	бета	CDR3	ASSRFVATGT SPLH
32	TCR-14	бета	константный	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN

			домен	DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF
33	TCR-14	бета	полнора змерный	GVAQSPRYKI I EKRQSVAFW CNPISGHATL YWYQQILGQG P KLLIQFQNN GVVDDSQLPK DRFSAERLKG V DSTLKIQPA KLEDSAVYLC ASSRFVATGT SPLHFGNGTR LTVT EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF
34	TCR-13	альфа	вариабе льный домен	QKITQTQPGM FVQEKEAVTL DCTYDTSQDS YGLFWYKQPS SGEMIFLIYQ GSYDEQNATE GRYSLNFQKA RKSANLVISA SQLGDSAMYF CAMSDPIMDT GRRALTFGSG TRLQVQP
24	TCR-13	альфа	CDR1	TSDQSYG
25	TCR-13	альфа	CDR2	QGSYDEQN
35	TCR-13	альфа	CDR3	AMSDPIMDTG RRALT
751	TCR-13	альфа	констан тный домен	NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
36	TCR-13	альфа	полнора змерный	QKITQTQPGM FVQEKEAVTL DCTYDTSQDS YGLFWYKQPS SGEMIFLIYQ GSYDEQNATE GRYSLNFQKA RKSANLVISA SQLGDSAMYF CAMSDPIMDT GRRALTFGSG TRLQVQP NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS

37	TCR-13	бета	вариабельный домен	GITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAM YWYRQDPGQGLRLIYYSQIV NDFQKGDIAE GYSVSREKKE SFPLTVTSAQ KNPTAFYLCA SKSRGPNLAD TQYFGPGTRL TVL
38	TCR-13	бета	CDR1	LNHDA
39	TCR-13	бета	CDR2	SQIVND
40	TCR-13	бета	CDR3	ASKSRGPNLA DTQY
11	TCR-13	бета	константный домен	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG
41	TCR-13	бета	полноразмерный	GITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAM YWYRQDPGQGLRLIYYSQIV NDFQKGDIAE GYSVSREKKE SFPLTVTSAQ KNPTAFYLCA SKSRGPNLAD TQYFGPGTRL TVL EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG
42	TCR-15	альфа	вариабельный домен	KQEV TQIPAA LSVPEGENLV LNCSFTDSAI YNLQWFRQDP GKGLTSLLLI QSSQREQTSG RLNASLDKSS GRSTLYIAAS QPGDSATYLC AVLLTGKLIF GQGTTLQVKP
43	TCR-15	альфа	CDR1	DSAIYN
44	TCR-15	альфа	CDR2	IQSSQRE
45	TCR-15	альфа	CDR3	AVLLTGKLI
750	TCR-15	альфа	константный домен	DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFET

				DTNLNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
46	TCR-15	альфа	полнора змерный	KQEVTPQIPAA LSVPEGENLV LNCSFTDSAI YNLQWFRQDP GKGLTSLLLI QSSQREQTSG RLNASLDKSS GRSTLYIAAS QPGDSATYLC AVLLTGKLIF GQGTTLQVKP DIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
47	TCR-15	бета	вариабел ный домен	GVTQTPRYLI KTRGQQVTLSPISGHRSV SWYQQTPGQG LQFLFEYFSE TQRNKGNFPG RFSGRQFSNS RSEMNVSTLE LGDSALYLCA SSGGPGPSGE QYFGPGTRLT VT
48	TCR-15	бета	CDR1	SGHRS
49	TCR-15	бета	CDR2	YFSETQ
50	TCR-15	бета	CDR3	ASSGGPGPSG EQY
11	TCR-15	бета	констан тный домен	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG
51	TCR-15	бета	полнора змерный	GVTQTPRYLI KTRGQQVTLSPISGHRSV SWYQQTPGQG LQFLFEYFSE TQRNKGNFPG RFSGRQFSNS RSEMNVSTLE LGDSALYLCA SSGGPGPSGE QYFGPGTRLT VT EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG
52	TCR-6	альфа	вариабел	QQKEVEQDPG PLSVPEGAIV SLNCTYSNSA

			льный домен	FQYFMWYRQY SRKGPELLMY TYSSGNKEDG RFTAQVDKSS KYISLFIRDS QPSDSATYLC AMSGNSGARD YGNNRLAFGK GNQVVVIP
53	TCR-6	альфа	CDR1	NSAFQY
54	TCR-6	альфа	CDR2	TYSSGN
55	TCR-6	альфа	CDR3	AMSGNSGARD YGNNRLA
751	TCR-6	альфа	констан тный домен	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLSVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
56	TCR-6	альфа	полнора змерный	QQKEVEQDPG PLSVPEGAIV SLNCTYSNSA FQYFMWYRQY SRKGPELLMY TYSSGNKEDG RFTAQVDKSS KYISLFIRDS QPSDSATYLC AMSGNSGARD YGNNRLAFGK GNQVVVIP NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLSVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
57	TCR-6	бета	вариабел ный домен	EVTQTPKHLV MGMTNKKSLK CEQHMGHRAM YWYKQKAKKP PELMFVYSYE KLSINESVPS RFSPECPNSS LLNLHLHALQ PEDSALYLCA SATWEEAGPY NEQFFGPGTR LTVL
58	TCR-6	бета	CDR1	MGHRA
59	TCR-6	бета	CDR2	YSYEKL
60	TCR-6	бета	CDR3	ASATWEEAGP YNEQF
11	TCR-6	бета	констан тный домен	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVVTQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG

61	TCR-6	бета	полнора змерный	EVTQTPKHLV MGMTNKKSLK CEQHMGHRAM YWKQKAKKP PELMFVYSYE KLSINESVPS RFSPECPNSS LLNLHLHALQ PEDSALYLCA SATWEEAGPY NEQFFGPGTR LTVL EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG
62	TCR-3	альфа	вариабел ный домен	QKITQTQPGM FVQEKEAVTL DCTYDTSQDS YGLFWYKQPS SGEMIFLIYQ GSYDEQNATE GRYSLNFQKA RKSANLVISA SQLGDSAMYF CGYSNYQLIW GAGTKLIKP
24	TCR-3	альфа	CDR1	TSDQSYG
25	TCR-3	альфа	CDR2	QGSYDEQN
63	TCR-3	альфа	CDR3	GYSNYQLI
750	TCR-3	альфа	констан тный домен	DIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSD DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
64	TCR-3	альфа	полнора змерный	QKITQTQPGM FVQEKEAVTL DCTYDTSQDS YGLFWYKQPS SGEMIFLIYQ GSYDEQNATE GRYSLNFQKA RKSANLVISA SQLGDSAMYF CGYSNYQLIW GAGTKLIKP DIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSD DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
65	TCR-3	бета	вариабел ный домен	QVTQNPRYLI TVTGKCLTVT CSQNMNHEYM SWYRQDPGLG LRQIYYSMNV EVTDKGDVPE GYKVS RKEKR NFPLILESPS PNQTSLYFCA SREGTGGYQP QHFGDGTRLS IL
66	TCR-3	бета	CDR1	MNHEY

67	TCR-3	бета	CDR2	SMNVEV
68	TCR-3	бета	CDR3	ASREGTGGYQ PQH
32	TCR-3	бета	констан тный домен	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF
69	TCR-3	бета	полнора змерный	QVTQNPRYLI TVTGKKLTVT CSQNMNHEYM SWYRQDPGLG LRQIYYSMNV EVTDKGDVPE GYKVSRRKEKR NFPLILESPS PNQTSLYFCA SREGTGGYQP QHFGDGTRLS IL EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF
70	TCR-7	альфа	вариабел ный домен	QTVTQSQPEM SVQEAETVTL SCTYDTSESD YYLFWYKQPP SRQMILVIRQ EAYKQQNATE NRFSVNFQKA AKSFSLKISD SQLGDAAMYF CTFRYGGATN KLIFGTGTL AVQP
71	TCR-7	альфа	CDR1	TSESDYY
15	TCR-7	альфа	CDR2	QEAYKQQN
72	TCR-7	альфа	CDR3	TFRYGGATNK LI
751	TCR-7	альфа	констан тный домен	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
73	TCR-7	альфа	полнора змерный	QTVTQSQPEM SVQEAETVTL SCTYDTSESD YYLFWYKQPP SRQMILVIRQ EAYKQQNATE NRFSVNFQKA AKSFSLKISD SQLGDAAMYF CTFRYGGATN KLIFGTGTL AVQP

				NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
74	TCR-7	бета	вариабельный домен	GVIQSPRHLI KEKRETATLK CYPIPRHDTV YWYQQGPGQD PQFLISFYEK MQSDKGSIPD RFSAQQFSDY HSELNMSSLE LGDSALYFCA SRGGWAETPD TQYFGPGTRL TVL
75	TCR-7	бета	CDR1	PRHDT
76	TCR-7	бета	CDR2	FYEKMQ
77	TCR-7	бета	CDR3	ASRGGWAETP DTQY
11	TCR-7	бета	константный домен	EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYPDH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
78	TCR-7	бета	полноразмерный	GVIQSPRHLI KEKRETATLK CYPIPRHDTV YWYQQGPGQD PQFLISFYEK MQSDKGSIPD RFSAQQFSDY HSELNMSSLE LGDSALYFCA SRGGWAETPD TQYFGPGTRL TVL EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYPDH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
79	TCR-9	альфа	вариабельный домен	EDVEQSLFLS VREGDSSVIN CTYTDSSSTY LYWYKQEPGA GLQLLYIFS NMDMKQDQRL TVLLNKDKH LSLRIADTQT GDSAIYFCAE KETAGNKLTF GGGTRVLVKP
80	TCR-9	альфа	CDR1	DSSSTY
81	TCR-9	альфа	CDR2	IFSNMDM

82	TCR-9	альфа	CDR3	AEKETAGNKL T
751	TCR-9	альфа	констан тный домен	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
83	TCR-9	альфа	полнора змерный	EDVEQSLFLS VREGDSSVIN CTYTDSSTY LYWYKQEPGA GLQLLYIFS NMDMKQDQRL TVLLNKKDKH LSLRIADTQT GDSAIYFCAE KETAGNKLTF GGGTRVLVKP NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
84	TCR-9	бета	вариаб ельный домен	EPEVTQTPSH QVTQMGQEVI LRCVPISNHL YFYWYRQILG QKVEFLVSFY NNEISEKSEI FDDQFSVERP DGSNFTLKIR STKLEDSAMY FCASTVQSPR TNEQFFGPGT RLTVL
85	TCR-9	бета	CDR1	SNHLY
86	TCR-9	бета	CDR2	FYNNEI
87	TCR-9	бета	CDR3	ASTVQSPRTN EQF
11	TCR-9	бета	констан тный домен	EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYPDH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
88	TCR-9	бета	полнора змерный	EPEVTQTPSH QVTQMGQEVI LRCVPISNHL YFYWYRQILG QKVEFLVSFY NNEISEKSEI FDDQFSVERP DGSNFTLKIR STKLEDSAMY FCASTVQSPR TNEQFFGPGT RLTVL EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYPDH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI VSAEAWGRAD

				CGFTSESYQQ GVLSTILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
89	TCR-4	альфа	вариабельный домен	QSVAQPEDQV NVAEGNPLTV KCTYSVSGNP YLFWYVQYPN RGLQFLKYYI TGDNLVKGSY GFEAEFNKSQ TSFHLKKPSA LVSDSALYFC AAPRDDKIIF GKGTRLHILP
90	TCR-4	альфа	CDR1	VSGNPY
91	TCR-4	альфа	CDR2	YITGDNLV
92	TCR-4	альфа	CDR3	AAPRDDKII
751	TCR-4	альфа	константный домен	NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSD DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
93	TCR-4	альфа	полноразмерный	QSVAQPEDQV NVAEGNPLTV KCTYSVSGNP YLFWYVQYPN RGLQFLKYYI TGDNLVKGSY GFEAEFNKSQ TSFHLKKPSA LVSDSALYFC AAPRDDKIIF GKGTRLHILP NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSD DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
94	TCR-4	бета	вариабельный домен	GVTQTPKFRV LKTGQSM TLL CAQDMNHEYM YWYRQDPGMG LRLIHYSVGE GTTAKGEVPD GYNVSRLLKQ NFLLGLESAA PSQTSVYFCA SSYLRTGGNE QFFGPGTRLT VL
66	TCR-4	бета	CDR1	MNHEY
95	TCR-4	бета	CDR2	SVGEGT
96	TCR-4	бета	CDR3	ASSYLRTGGN EQF
11	TCR-4	бета	константный домен	EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYPDH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI

				VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
97	TCR-4	бета	полнора змерный	GVTQTPKFRV LKTGQSM TLL CAQDMNHEYM YWYRQDPGMG LRLIHYSVGE GTTAKGEVPD GYNVSRLKKQ NFLLGLESAA PSQTSVYFCA SSYLRTGGNE QFFGPGTRLT VL EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYDPH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
98	TCR-8	альфа	вариаб ельный домен	QKVTQAQTEI SVVEKEDVTL DCVYETRDTT YYLFWYKQPP SGELVFLIRR NSFDEQNEIS GRYSWNFQKS TSSFNFTITA SQVVDSAVYF CALSGRGS GT YKYIFGTGTR LKVLA
99	TCR-8	альфа	CDR1	TRDTTYY
100	TCR-8	альфа	CDR2	RNSFDEQN
101	TCR-8	альфа	CDR3	ALSGRGS GTY KYI
751	TCR-8	альфа	констан тный домен	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNK S DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLSVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
102	TCR-8	альфа	полнора змерный	QKVTQAQTEI SVVEKEDVTL DCVYETRDTT YYLFWYKQPP SGELVFLIRR NSFDEQNEIS GRYSWNFQKS TSSFNFTITA SQVVDSAVYF CALSGRGS GT YKYIFGTGTR LKVLA NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNK S DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLSVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
103	TCR-8	бета	вариаб ельный	GVIQSPRHLI KEKRETATLK CYPIPRHDTV YWYQQGPGQD PQFLISFYEK MQSDKGSIPD

			домен	RFLAQQFSDY HSELNMSSE LGDSALYFCA SSAGTSYNEQ FFGPGTRLTV L
75	TCR-8	бета	CDR1	PRHDT
76	TCR-8	бета	CDR2	FYEKMQ
104	TCR-8	бета	CDR3	ASSAGTSYNE QF
11	TCR-8	бета	констан тный домен	EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYPDH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
105	TCR-8	бета	полнора змерный	GVIQSPRHLLI KEKRETATLK CYPIPRHDTV YWYQQGPGQD PQFLISFYEK MQSDKGSIPD RFLAQQFSDY HSELNMSSE LGDSALYFCA SSAGTSYNEQ FFGPGTRLTV L EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYPDH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
106	TCR-10	альфа	вариабел ный домен	QNIDQPTEMT ATEGAIQIN CTYQTSGFNG LFWYQQHAGE APTFLSYNVL DGLEEKGRFS SFLSRKGY S YLLKELQMK DSASYLCAVP APYTGTASKL TFGTGTRLQV TL
107	TCR-10	альфа	CDR1	TSGFNG
108	TCR-10	альфа	CDR2	NVLDGL
109	TCR-10	альфа	CDR3	AVPAPYTGTA SKLT
750	TCR-10	альфа	констан тный домен	DIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRWSS

110	TCR-10	альфа	полнора змерный	QNIDQPTEMT ATEGAIVQIN CTYQTSGFNG LFWYQQHAGE APTFLSYNVL DGLEEKGRFS SFLSRSKGYS YLLKELQMK DSASYLCAVP APYTGTASKL TFGTGTRLQV TL DIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
111	TCR-10	бета	вариабе льный домен	GVTQTPKFQV LKTGQSMTLQ CAQDMNHNSM YWYRQDPGMG LRLIYYSASE GTTDKGEVFN GYNVSRNLKR EFSRLRESAA PSQTSVYFCA SSEGYSTYNE QFFGPGTRLT VL
112	TCR-10	бета	CDR1	MNHNS
113	TCR-10	бета	CDR2	SASEGT
114	TCR-10	бета	CDR3	ASSEGYSTYN EQF
11	TCR-10	бета	констан тный домен	EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYPDH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
115	TCR-10	бета	полнора змерный	GVTQTPKFQV LKTGQSMTLQ CAQDMNHNSM YWYRQDPGMG LRLIYYSASE GTTDKGEVFN GYNVSRNLKR EFSRLRESAA PSQTSVYFCA SSEGYSTYNE QFFGPGTRLT VL EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYPDH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
116	TCR-12	альфа	вариабе льный домен	QLLEQSPQFL SIQEGENLTV YCNSSSVFSS LQWYRQEPGE GPVLLVTVVT GGEVKKLKRL TFQFGDARKD SSLHITAAQP GDTGLYLCAG

				GLSDSYDKVI FGPGTSLSVI P
117	TCR-12	альфа	CDR1	SVFSS
118	TCR-12	альфа	CDR2	VVTGGEV
119	TCR-12	альфа	CDR3	AGGLSDSYDK VI
751	TCR-12	альфа	констан тный домен	NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
120	TCR-12	альфа	полнора змерный	QLLEQSPQFL SIQEGENLTV YCNSSSVFSS LQWYRQEPGE GPVLLVTVVT GGEVKKLRRL TFQFGDARKD SSLHITAAQP GDTGLYLCAG GLSDSYDKVI FGPGTSLSVI P NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
121	TCR-12	бета	вариаб ельный домен	EVTQTPKHLV MGMTNKKSLK CEQHMGHRAM YWKQKAKKP PELMFVYSYE KLSINESVPS RFSPECNNS LLNLHLHALQ PEDSALYLCA SSQGVGQEYG YTFGSGTRLT VV
58	TCR-12	бета	CDR1	MGHRA
59	TCR-12	бета	CDR2	YSYEKL
122	TCR-12	бета	CDR3	ASSQGVGQEY GYT
32	TCR-12	бета	констан тный домен	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF
123	TCR-12	бета	полнора змерный	EVTQTPKHLV MGMTNKKSLK CEQHMGHRAM YWKQKAKKP PELMFVYSYE KLSINESVPS RFSPECNNS LLNLHLHALQ PEDSALYLCA SSQGVGQEYG YTFGSGTRLT VV

				EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF
124	TCR-11	альфа	вариабельный домен	IQVEQSPPDL ILQEGANSTL RCNFSDSVNN LQWFHQNPWG QLINLFYIPS GTKQNGRLSA TTVATERYSL LYISSSQTTD SGVYFCAVNT GTASKLTFGT GTRLQVTL
125	TCR-11	альфа	CDR1	DSVNN
126	TCR-11	альфа	CDR2	IPSGT
127	TCR-11	альфа	CDR3	AVNTGTASKL T
750	TCR-11	альфа	константный домен	DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNK DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
128	TCR-11	альфа	полноразмерный	IQVEQSPPDL ILQEGANSTL RCNFSDSVNN LQWFHQNPWG QLINLFYIPS GTKQNGRLSA TTVATERYSL LYISSSQTTD SGVYFCAVNT GTASKLTFGT GTRLQVTL DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNK DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
129	TCR-11	бета	вариабельный домен	GVTQTPKFQV LKTGQSMTLQ CAQDMNHNSM YWYRQDPGMG LRLIYYSASE GTTDKGEVNP GYNVSRNKR EFSLRLESAA PSQTSVYFCA SSPRGQGRSY EQYFGPGTRL TVT
112	TCR-11	бета	CDR1	MNHNS
113	TCR-11	бета	CDR2	SASEGT
130	TCR-11	бета	CDR3	ASSPRGQGRS YEQY

11	TCR-11	бета	констан тный домен	EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYPDH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
131	TCR-11	бета	полнора змерный	GVTQTPKFQV LKTGQSMTLQ CAQDMNHNSM YWYRQDPGMG LRLIYYSASE GTTDKGEVNP GYNVSRLNKR EFSLRLESAA PSQTSVYFCA SSPRGQGRSY EQYFGPGTRL TVT EDLKNVFPPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFYPDH VELSWWVNGK EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRYCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWT QDRAKPVTQI VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE ILLGKATLYA VLVSALVLMA MVKRKDSRG
132	TCR-2	альфа	вариаб ельный домен	QKITQTQPGM FVQEKEAVTL DCTYDTSQDS YGLFWYKQPS SGEMIFLIYQ GSYDEQNATE GRYSLNFQKA RKSANLVISA SQLGDSAMYF CAMREGSDAG GTSYGKLTFG QGTILTVHP
24	TCR-2	альфа	CDR1	TSDQSYG
25	TCR-2	альфа	CDR2	QGSYDEQN
133	TCR-2	альфа	CDR3	AMREGSDAGG TSYGKLT
751	TCR-2	альфа	констан тный домен	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLNFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
134	TCR-2	альфа	полнора змерный	QKITQTQPGM FVQEKEAVTL DCTYDTSQDS YGLFWYKQPS SGEMIFLIYQ GSYDEQNATE GRYSLNFQKA RKSANLVISA SQLGDSAMYF CAMREGSDAG GTSYGKLTFG QGTILTVHP NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET

				DTNLNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
135	TCR-2	бета	вариабельный домен	GVIQSPRHLI KEKRETATLK CYPIPRHDTV YWYQQGPGQD PQFLISFYEK MQSDKGSIPD RFSAQQFSDY HSELNMSSLE LGDSALYFCA SSPSTGRLNT EAFFGQGTRL TVV
75	TCR-2	бета	CDR1	PRHDT
76	TCR-2	бета	CDR2	FYEKMQ
136	TCR-2	бета	CDR3	ASSPSTGRLN TEAF
32	TCR-2	бета	константный домен	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF
137	TCR-2	бета	полноразмерный	GVIQSPRHLI KEKRETATLK CYPIPRHDTV YWYQQGPGQD PQFLISFYEK MQSDKGSIPD RFSAQQFSDY HSELNMSSLE LGDSALYFCA SSPSTGRLNT EAFFGQGTRL TVV EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF

Повторная экспрессия TCR

Домены константной цепи человека заменяли их мышинными аналогами с дополнительными мутациями в трансмембранном домене для повышения гидрофобности. Обе модификации описаны Jin et al., JCI Insight. 2018,3(8):e99488.

Для оценки их функциональных характеристик идентифицированные TCR повторно экспрессировали в первичных Т-клетках здоровых доноров с использованием метода электропорации мРНК TCR. Кратко, транскрипцию T7 осуществляли на матрицах ДНК

нуклеотидной последовательности альфа- и бета-цепи TCR. Полученную мРНК TCR использовали для электропорации предварительно активированных Т-клеток для транзientной экспрессии экзогенного TCR, что было подтверждено в экспериментах по совместному культивированию.

Анализы совместного культивирования (оценка функциональной avidности, специфичности и TCR-мотива)

Функциональные характеристики TCR оценивали в экспериментах по совместному культивированию клеток T2. Т-клетки CD8⁺ предварительно стимулировали и подвергали электропорации мРНК TCR. В день совместного культивирования клетки T2, трансдуцированные люциферазой, загружали либо пептидом CT45-IP (SEQ ID NO: 138) в различных концентрациях (оценка функциональной avidности, EC₅₀), либо пептидами со схожей последовательностью (SEQ ID NO: 146-155) в концентрации 10 мкМ или с вариантами аланиновой замены пептида CT45-IP (SEQ ID NO: 139-145) в диапазоне концентраций, в 10-30 раз превышающих среднюю EC₅₀ соответствующего TCR (определение TCR-мотива). В качестве контроля использовали нерелевантный пептид NYESO1-001 (SEQ ID NO: 188) в концентрации 10 мкМ и ненагруженные клетки T2. Кратко, клетки T2 инкубировали в течение 2 часов с соответствующим количеством пептида, а затем промывали и собирали.

Контролем служили клетки, подвергшиеся электропорации с использованием модели TCR 1G4-a95Ly, а также Т-клетки, подвергшиеся имитации электропорации без экзогенного TCR. Т-клетки и загруженные пептидом T2-клетки высевали в соотношении 1:1 и инкубировали в течение 24 часов до сбора супернатанта. Супернатанты подвергали анализу на наличие люциферазы, высвобождаемой апоптотическими/некротическими клетками T2, уничтожаемыми пептид-специфическими Т-клетками. При добавлении специфического субстрата количество люциферазы, присутствующей в супернатанте, определяли путем измерения хемилюминесцентного сигнала в микропланшетном ридере.

Тест на функциональность Т-клеток CD4⁺

Т-клетки CD3⁺ стимулировали и подвергали электропорации мРНК TCR. После инкубации в течение ночи TCR-трансфицированные Т-клетки совместно культивировали в соотношении 1:1 с клетками T2, загруженными либо 10 мкМ CT45-IP (SEQ ID NO: 138), либо 10 мкМ нерелевантного пептида NYESO1-001 (SEQ ID NO: 188). Сразу после начала совместного культивирования добавляли реагент, блокирующий секрецию цитокинов, и инкубировали в течение 5 часов при 37°C. После этого Т-клетки окрашивали

флуоресцентно меченными антителами на различные поверхностные маркеры, такие как CD4 и CD8. После фиксации и пермеабиллизации клетки окрашивали на внутриклеточные цитокины (TNF- α и IFN- γ) и анализировали на проточном цитометре (данные не показаны).

Лентивирусная котрансдукция костимулирующей молекулы CD8

Для того, чтобы вовлечь Т-клетки CD4 в иммунный ответ после трансдукции TCR, ограниченными МНС класса I, проводили совместную трансдукцию с костимулирующей молекулой CD8. С этой целью для трансдукции предварительно стимулированных Т-клеток CD3⁺ использовали лентивирусный вектор, кодирующий цепи TCR, а также молекулу CD8. Т-клетки активировали с использованием покрытых на планшете CD3 и анти-CD28 вместе с добавлением ИЛ-2 в течение 24 часов. Предварительно титрованный концентрированный лентивирусный супернатант добавляли к клеткам вместе с адьювантом для усиления трансдукции лентивирусных частиц, например, реагент Lentiboost[®] (Sirion Biotech). Т-клетки размножали в течение 10 дней с использованием увеличивающихся объемов среды и снижения концентрации ИЛ-2 при последовательном переносе клеток в более крупные флаконы для клеточных культур. Эффективность трансдукции и состояние покоя Т-клеток проверяли перед замораживанием клеток с помощью проточной цитометрии. Впоследствии влияние совместной трансфекции CD8 на эффективность уничтожения опухолевых клеток, презентующих СТ45-IP, анализировали с помощью анализа уничтожения живых клеток (данные не показаны).

Поверхностное окрашивание TCR

Окрашивание поверхностных маркеров проводили с подвергнутыми электропорации и предварительно активированными Т-клетками CD8⁺. С этой целью использовали антитела против CD8, CD3 и/или mTCRB, а также окрашивание TCR флуоресцентно меченными декстрамерами (остов декстрамера с конъюгированным СТ45-IP-HLA-A*02 или нерелевантным NYESO1-001-HLA-A*02). Через 30 минут клетки промывали, фиксировали и затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Ворота для определения декстрамер-положительных клеток устанавливали в соответствии с сигналом клеток, окрашенных декстрамером нерелевантный пептид- МНС.

Анализы контроля уничтожения живых клеток

Пролиферацию линий опухолевых клеток, экспрессирующих красный флуоресцентный белок (RFP), контролировали с помощью системы визуализации живых клеток путем количественного определения количества красных объектов с течением

времени. Клеточные линии NSH1703 и A375 совместно культивировали с Т-клетками, экспрессирующими TCR согласно настоящему изобретению, при соотношении Е:Т 9:1, 3:1 или 1:1 или без Т-клеток, и контролировали в течение 48 часов. В качестве положительного контроля клетки-мишени загружали 10 мкМ пептида СТ45-IP. Снижение пролиферации линий опухолевых клеток с течением времени является индикатором уничтожения опухолевых клеток.

Пример 1. Функциональная avidность

Все пятнадцать идентифицированных СТ45-IP-специфических TCR демонстрируют высокую функциональную avidность, измеренную в экспериментах по титрованию пептидов, которая выражается как полумаксимальная способность уничтожения EC_{50} , как показано на фиг. 1. Измеренные значения EC_{50} находятся в диапазоне от 0,15 нМ до 59,5 нМ. В частности, значения EC_{50} составляют 7,78 нМ (TCR-1), 4,69 нМ (TCR-2), 1,02 нМ (TCR-3), 1,31 нМ (TCR-4), 1,32 нМ (TCR-5), 3,25 нМ (TCR-6), 0,48 нМ (TCR-7), 6,52 нМ (TCR-8), 0,15 нМ (TCR-9), 8,75 нМ (TCR-10), 59,50 нМ (TCR-11), 47,47 нМ (TCR-12), 11,38 нМ (TCR-13), 17,69 нМ (TCR-14), 18,60 нМ (TCR-15).

Пример 2. Специфичность и TCR-мотив

Описанные в настоящем документе TCR тестировали на предмет их профилей специфичности путем тестирования их способности распознавать 10 пептидов, сходных по последовательностям СТ45-IP (SEQ ID NO: 146-155). Загрузку СТ45-IP и пептидами, сходными по последовательностям с СТ45-IP, проводили при очень высокой концентрации 10 мкМ для обнаружения слабых сигналов. TCR не показали связывания с другим пептидом, кроме СТ45-IP. Незначительные сигналы связывания TCR-9 и TCR-6 были обнаружены с пептидом SP-05-0004 (SEQ ID NO: 149), как показано на фиг. 2. Характеристика TCR также включала определение мотива связывания TCR с пептидом СТ45-IP, как указано в таблице 4. С этой целью варианты аланиновой замены пептида СТ45-IP (SEQ ID NO: 139-145) тестировали в экспериментах по совместному культивированию со всеми пятнадцатью TCR. Пептиды аланиновой замены тестировали в диапазоне концентраций, в 10-30 раз превышающих среднюю EC_{50} соответствующего TCR. Соответствующее положение обозначается числом (относится к положению аминокислоты в пептиде), нерелевантное положение обозначается дефисом, а положение, которое не тестировалось, отмечается знаком x.

Таблица 4. Консенсусный мотив

ID	Консенсусный мотив
TCR-1	1x34567-x
TCR-2	-x3(4)567-x
TCR-3	-x34567-x
TCR-4	-x34-678x
TCR-5	-x3--67(8)x
TCR-6	1x34-6—x
TCR-7	1x-4-67-x
TCR-8	-x---5-7-x
TCR-9	1x34567(8)x
TCR-10	-x--567-x
TCR-11	1x3456-8x
TCR-12	-x34-67-x
TCR-13	1x34-67-x
TCR-14	1x345---x
TCR-15	1x34567-x

Пример 3. CD4-функциональность

Тест на функциональность Т-клеток CD4⁺ проводили, как описано выше. Среди пятнадцати протестированных TCR авторы настоящего изобретения выделили TCR, которые проявляют функциональность в Т-клетках CD8⁺, а также в Т-клетках CD4⁺ (данные не показаны).

Пример 4. Экспрессия на поверхности

Экспрессию на поверхности описанных в настоящем документе TCR измеряли с помощью окрашивания декстрамером ST45-IP-HLA-A2*02 и показали на фиг. 3. Поверхностная экспрессия варьировала от 0,53% (TCR-11) до 55,5% (TCR-5) положительных событий после гейтирования Т-клеток CD3⁺ после электропорации мРНК TCR. В частности, поверхностная экспрессия составила 8,9% (TCR-1), 39,1% (TCR-2), 27,2% (TCR-3), 39,1% (TCR-4), 61,1%(TCR-5), 2,9%(TCR-6), 53,3% (TCR-7), 60,7% (TCR-8), 44,0% (TCR-9), 52,8% (TCR-10), 6,6% (TCR-11), 20,1% (TCR-12), 53,1% (TCR-13), 11,6% (TCR-14), 22,6% (TCR-15).

Пример 5. Эффективность против линий опухолевых клеток

Две линии опухолевых клеток, A375 с ~30 копиями на клетку и NS1H1703 с ~150 копиями на клетку, экспрессирующих СТ45-IP, совместно культивировали с Т-клетками CD8+, экспрессирующими TCR-9, TCR-7 или Mock-TCR (фиг. 4). Эффективность этих TCR для уничтожения двух клеточных линий оценивали в эксперименте по мониторингу живых клеток. Хотя Mock-TCR не приводит к значительному снижению пролиферации опухолевых клеток, TCR-9 и TCR-7 эффективно убивают линии опухолевых клеток, загруженные пептидом СТ45-IP при соотношении Е:Т 6:1 (TCR-9) или 1,8:1 (TCR-7) (NS1H1703 и A375), без дополнительной загрузки пептидов при соотношении Е:Т 6:1 (TCR-9) или 1,8:1 (TCR-7) (NS1H1703 и A375), и при соотношении Е:Т 2:1 (TCR-9) или 0,6:1 (TCR-7) и 0,6:1 (TCR-9) или 0,2:1 (TCR-7) (NS1H1703), как измерено с помощью нормализованного количества красных объектов <2.

Пример 6. Окно безопасности

Анализы совместного культивирования проводили с использованием клеток T2, загруженных серией титрования пептида СТ45-IP и SP-05-0004, соответственно. Окно безопасности было определено как EC₅₀ SP-05-0004, разделенное на EC₅₀ СТ45-IP (данные не показаны).

Пример 7. Презентация СТ45-IP

Частоту обнаружения антигенного пептида СТ45-IP анализировали в первичных и культивируемых образцах опухолей. Обобщение результатов представлено в таблице 5. В таблице выражение > 0% обозначено как +, выражение ≥ 10% обозначено как ++, и выражение ≥ 30% обозначено как +++. Опухолевые образования, при которых была обнаружена презентация, включают рак желчных протоков (CCC), рак печени (HCC), рак кожи (MEL, в связи с идентификацией клеточных линий), рак лимфатических узлов (NHL), немелкоклеточный рак легких (NSCLC), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR) и рак матки (UEC).

Таблица 5. Презентация мишени

Вещество	Частота обнаружения мишени (%)
CCC	+
HCC	+
MEL	+++
NHL	+

NSCLC	+
OC	++
OSCAR	++
UEC	+

Пример 8. Эффективность Т-клеток CD4+, котрансдуцированных ST45-IP-специфическим TCR и CD8, против опухолевых клеток

Опухолевые клетки, презентующие ST45-IP, совместно культивировали с CD4+ Т-клетками или CD3+ Т-клетками, котрансдуцированными с описанными в настоящем документе ST45-IP-специфичными TCR и CD8. Эффективность уничтожения Т-клеток оценивали в эксперименте по мониторингу живых клеток. При совместной трансдукции с ST45-IP-специфическими TCR и CD8 наблюдали эффективное уничтожение линий опухолевых клеток, что измеряли по нормализованному количеству красных объектов <2 (данные не показаны).

Пункты

1. Антигенсвязывающий белок, специфически связывающийся с антигенным пептидом ST45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид ST45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий переменный домен V_A, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий переменный домен V_B, содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где

1) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 14, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 16, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 19, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 21,

2) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 133, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 75, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 136,

3) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности

согласно SEQ ID NO: 107, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 109, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 112, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 114,

11) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 125, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 127, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 112, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 130, или

12) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 117, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 119, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 58, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 122,

13) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 35, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 38, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 40,

14) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 26, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 29, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 31, или

15) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 43, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 45, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 48, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 50,

где антигенсвязывающий белок содержит указанную (указанные) последовательность (последовательности) CDRa1, CDRa3, CDRb1 и CDRb3 с не более чем одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, где каждая из CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 может содержать одну, две или три аминокислотные мутации.

2. Антигенсвязывающий белок согласно пункту 1, где

1) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности

13) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 39,

14) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 30, или

15) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 44, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 49,

где антигенсвязывающий белок содержит указанную (указанные) последовательность (последовательности) CDRa2 и CDRb2 с не более чем одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными мутациями, где каждая из CDRa2 и/или CDRb2 может содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации.

3. Антигенсвязывающий белок согласно пункту 1 или 2, где антигенсвязывающий белок специфически связывается с комплексом антигенного пептида СТ45 и белка МНС.

4. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 3, где белок МНС представляет собой белок HLA, более конкретно HLA-A, даже более конкретно HLA-A*02.

5. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 4, где EC₅₀ пептида СТ45-IP для индукции уничтожения клеток, презентующих комплекс СТ45-IP:МНС, Т-клетками, экспрессирующими антигенсвязывающий белок, составляет менее приблизительно 60 нМ, менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 25 нМ, менее приблизительно 20 нМ, менее приблизительно 15 нМ, менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 2,5 нМ, менее приблизительно 1,5 нМ или менее приблизительно 1 нМ.

6. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 5, где антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из 2, 3 или 4 аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 3, 4, 5, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138.

7. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 6, где антигенсвязывающий белок незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID

NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), предпочтительно из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), более предпочтительно из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010).

8. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 7, где первый и второй полипептид содержатся на двух полипептидных цепях, где предпочтительно V_A содержится на первой полипептидной цепи, и V_B содержится на второй полипептидной цепи.

9. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 7, где антигенсвязывающий белок представляет собой одноцепочечный антигенсвязывающий белок, предпочтительно одноцепочечный TCR, или одноцепочечный биспецифический антигенсвязывающий белок, предпочтительно одноцепочечный биспецифический TCR.

10. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 9, где антигенсвязывающий белок является одновалентным или мультиспецифическим, например, тетра-, три- или двухвалентным.

11. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 10, где антигенсвязывающий белок является моноспецифическим или мультиспецифическим, например, тетра-, три- или биспецифическим.

12. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 11, где антигенсвязывающий белок представляет собой растворимый белок.

13. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 12, где антигенсвязывающий белок представляет собой TCR.

14. Антигенсвязывающий белок согласно пункту 13, где TCR выбран из группы, состоящей из TCR α/β , TCR γ/δ , одноцепочечного TCR, мембраносвязанного TCR, растворимого TCR, одновалентного, двухвалентного или мультиспецифического TCR, моноспецифического, биспецифического или мультиспецифического TCR, функционального фрагмента TCR и слитого белка или химерного белка, содержащего функциональный фрагмент TCR.

15. Антигенсвязывающий белок согласно пункту 13, где TCR представляет собой TCR α/β или TCR γ/δ , предпочтительно TCR α/β .

16. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 15, дополнительно содержащий одно или несколько из следующего:

- (i) один или несколько дополнительных антигенсвязывающих сайтов,
- (ii) трансмембранный домен, необязательно включающий цитоплазматическую область передачи сигналов,
- (iii) диагностическое средство,
- (iv) терапевтическое средство.

17. Антигенсвязывающий белок согласно пункту 16, где один или несколько дополнительных антигенсвязывающих сайтов содержат антигенсвязывающий сайт, происходящий из антитела, предпочтительно, содержащий или состоящий из V_L и V_H .

18. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 17, где V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 132, 62, 89, 1, 52, 70, 98, 79, 106, 124, 116, 34, 23, и 42, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 13, 132, 62, 89, 1, 52, 70, 98, 79, 106, 124, 116, 34, 23, или 42 и содержащей CDRa1, CDRa2 и CDRa3 согласно пункту 1 или 2, и где V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 135, 65, 94, 7, 57, 74, 103, 84, 111, 129, 121, 37, 28 и 47, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 18, 135, 65, 94, 7, 57, 74, 103, 84, 111, 129, 121, 37, 28 или 47 и содержащей CDRb1, CDRb2 и CDRb3 согласно пункту 1 или 2, где последовательности CDRa1, CDRa2, CDRa3, CDRb1, CDRb2 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно аминокислотные замены.

19. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 18, где V_A и V_B представляют собой переменные домены TCR, предпочтительно переменные домены TCR альфа, бета, гамма или дельта, где более предпочтительно V_A представляет собой переменный домен TCR альфа или гамма, предпочтительно альфа, и V_B представляет собой переменный домен TCR бета или дельта, предпочтительно бета.

20. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 19, дополнительно содержащий константный домен, где константный домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 750, 751, 156, 11, 32, и 157, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 750, 751, 11 и 32, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с

последовательностью согласно SEQ ID NO: 5, 750, 751, 156, 11, 32 или 157.

21. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 20, где первый полипептид представляет собой альфа-цепь TCR, и второй полипептид представляет собой бета-цепь TCR, или первый полипептид представляет собой гамма-цепь TCR, и второй полипептид представляет собой дельта-цепь TCR, где предпочтительно первый полипептид представляет собой альфа-цепь TCR, и второй полипептид представляет собой бета-цепь TCR.

22. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 21, где первый полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120, 36, 27, 46 и 158-172, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120, 36, 27, 46, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120, 36, 27, 46 или 158-172, и второй полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78, 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33, 51 и 173-187, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78, 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33, 51, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78, 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33, 51 или 173-187.

23. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 22, где антигенсвязывающий белок специфически связывается с функциональным эпитопом, содержащим или состоящим из

i. аминокислотных положений 1, 3 и 4 последовательности согласно SEQ ID NO: 138, предпочтительно аминокислотных положений 1, 3, 4 и 5, или 1, 3, 4 и 6 или 1, 3, 4, 5 и 6 или 1, 3, 4, 5, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138,

ii. аминокислотных положений 4, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138, предпочтительно аминокислотных положений 1, 4, 6 и 7, или 3, 4, 6 и 7 или 1, 3, 4, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138, или

iii. аминокислотных положений 5 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138, предпочтительно аминокислотных положений 5, 6 и 7, или 3, 4, 5, 6 и 7 последовательности согласно SEQ ID NO: 138.

24. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 23, где антигенсвязывающий белок незначительно связывается с подобными пептидами группы,

состоящей из

i. SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), или

ii. SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010).

25. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 24, где антигенсвязывающий белок имеет среднюю экспрессию по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30% или по меньшей мере 40%.

26. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 25, где V_A содержит сегмент V, кодируемый TRAV14, в частности, TRAV14/DV4, и CDRa1 согласно SEQ ID NO: 24 и CDRa2 согласно SEQ ID NO: 25.

27. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 26, где V_B содержит

i. сегмент V, кодируемую TRBV13, и CDRb1 согласно SEQ ID NO: 75 и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 76,

ii. область V, кодируемую TRBV4-1, и CDRb1 согласно SEQ ID NO: 58 и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 59, или

iii. область V, кодируемую TRBV6-1, и CDRb1 согласно SEQ ID NO: 112 и CDRb2 согласно SEQ ID NO: 113.

28. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 27, где антигенсвязывающий белок способен активировать

- Т-клетку CD4+, в частности, Т-клетку CD4+ CD8-, и/или

- Т-клетку CD8+, в частности, Т-клетку CD8+ CD4-,

и где антигенсвязывающий белок предпочтительно представляет собой TCR, более предпочтительно TCR α/β или TCR γ/δ .

29. Нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, содержащие одну или несколько последовательностей, кодирующих антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 28.

30. Вектор или набор векторов, содержащие нуклеиновую кислоту (нуклеиновые кислоты) согласно пункту 29.

31. Клетка-хозяин, содержащая антигенсвязывающий белок согласно любому из

пунктов 1 - 28, или нуклеиновую кислоту (нуклеиновые кислоты) согласно пункту 29, или вектор или набор векторов согласно пункту 30.

32. Клетка-хозяин согласно пункту 31, где клетка-хозяин представляет собой
- лимфоцит, предпочтительно Т-клетку, Т-клетка-предшественник или НК-клетку, более предпочтительно CD4- или CD8-положительную Т-клетку, или
- клетку для рекомбинантной экспрессии, такую как клетка яичника китайского хомячка (СНО) или дрожжевая клетка.

33. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 28, нуклеиновую кислоту (нуклеиновые кислоты) согласно пункту 29, вектор или набор векторов согласно пункту 30 или клетку-хозяин согласно пункту 31 или 32 и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

34. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 28, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты) согласно пункту 29, вектор или набор векторов согласно пункту 30, клетка-хозяин согласно пункту 31 или 32 или фармацевтическая композиция согласно пункту 33 для применения в медицине.

35. Антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 28, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты) согласно пункту 29, вектор или набор векторов согласно пункту 30, клетка-хозяин согласно пункту 31 или 32 или фармацевтическая композиция согласно пункту 33 для применения в способе лечения и/или диагностики пролиферативного заболевания, в частности, рака.

36. Способ лечения пролиферативного заболевания, в частности, рака, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка согласно любому из пунктов 1 - 28, нуклеиновой кислоты (нуклеиновых кислот) согласно пункту 29, вектора или набора векторов согласно пункту 30, клетки-хозяина согласно пункту 31 или 32 или фармацевтической композиции согласно пункту 33.

37. Антигенсвязывающий белок, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты), вектор или набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения согласно пункту 35 или способ лечения согласно пункту 36, где рак представляет собой рак, для которого характерна экспрессия СТ45, более конкретно выбранный из группы видов рака, состоящей из рака легкого, NSCLC, рака желчного пузыря, рака желчных протоков, рака лимфатического узла, рак яичника, рака пищевода, рака печени, рака матки и меланомы.

38. Антигенсвязывающий белок, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты), вектор или набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для

применения согласно пункту 35 или 37 или способ лечения согласно пункту 36 или 37, где способ лечения предусматривает иммунную терапию, в частности, адоптивную терапию аутологичными или гетерологичными Т-клетками.

39. Антигенсвязывающий белок, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты), вектор или набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения согласно любому из пунктов 35, 37 или 38 или способ лечения согласно любому из пунктов 36 - 38, где антигенсвязывающий белок представляет собой TCR.

40. Антигенсвязывающий белок, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты), вектор или набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения согласно любому из пунктов 35 или 37 - 39 или способ лечения согласно любому из пунктов 36 - 39, где антигенсвязывающий белок экспрессируется на поверхности клетки-хозяина.

41. Антигенсвязывающий белок, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты), вектор или набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения согласно любому из пунктов 35 или 37 - 40 или способ лечения согласно любому из пунктов 36 - 40, где способ лечения предусматривает введение клетки-хозяина, экспрессирующей антигенсвязывающий белок, где клетка-хозяин представляет собой Т-клетку, Т-клетка-предшественник или НК-клетку, предпочтительно Т-клетку.

42. Антигенсвязывающий белок, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты), вектор или набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения согласно пункту 40 или способ лечения согласно пункту 40, где клетка-хозяин, предпочтительно Т-клетка, Т-клетка-предшественник или НК-клетка, более предпочтительно Т-клетка, является аутологичной.

43. Антигенсвязывающий белок, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты), вектор или набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения согласно пункту 40 или способ лечения согласно пункту 40, где клетка-хозяин, предпочтительно Т-клетка, Т-клетка-предшественник или НК-клетка, более предпочтительно Т-клетка, является аллогенной.

44. Антигенсвязывающий белок, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты), вектор или набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения согласно любому из пунктов 35 или 37 - 43 или способ лечения согласно любому из пунктов 36 - 43, где антигенсвязывающий белок конъюгирован с терапевтически активным агентом.

45. Антигенсвязывающий белок, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты), вектор или набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для

применения согласно любому из пунктов 44 или способ лечения согласно любому из пунктов 44, где терапевтически активный агент выбран из группы, состоящей из радионуклида, химиотерапевтического средства и токсина.

46. Антигенсвязывающий белок, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты), вектор или набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения согласно любому из пунктов 35 или 37 - 45 или способ лечения согласно любому из пунктов 36 - 45, где способ лечения дополнительно предусматривает введение по меньшей мере одного химиотерапевтического средства субъекту, нуждающемуся в этом.

47. Антигенсвязывающий белок, нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты), вектор или набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения согласно любому из пунктов 35 или 37 - 46 или способ лечения согласно любому из пунктов 36 - 46, где способ лечения дополнительно предусматривает введение лучевой терапии субъекту, нуждающемуся в этом.

48. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий:

- a) выделение клетки у указанного субъекта,
- b) трансформацию клетки вектором или набором векторов, кодирующих антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 – 28, с получением трансформированной клетки,
- c) размножение трансформированной клетки с получением множества трансформированных клеток, и
- d) введение множества трансформированных клеток указанному субъекту.

49. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий:

- a) выделение клетки у здорового донора,
- b) трансформацию клетки вектором или набором векторов, кодирующих антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 – 28, с получением трансформированной клетки,
- c) размножение трансформированной клетки с получением множества трансформированных клеток, и
- d) введение множества трансформированных клеток указанному субъекту.

50. Способ согласно пункту 48 или 49, где трансформированная клетка представляет собой лимфоцит, предпочтительно НК-клетку или Т-клетку, или Т-клетка-предшественник, более предпочтительно Т-клетку.

51. Применение антигенсвязывающего белка согласно любому из пунктов 1 - 28 для получения лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания.

52. Способ *in-vitro* обнаружения рака, в частности, рака, для которого характерна

экспрессия СТ45, в биологическом образце, предусматривающий:

а) контакт биологического образца с антигенсвязывающим белком согласно любому из пунктов 1 - 28, и

б) обнаружение связывания антигенсвязывающего белка с биологическим образцом.

53. Способ получения антигенсвязывающего белка согласно любому из пунктов 1 - 28, предусматривающий

а) предоставление клетки-хозяина,

б) предоставление генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенсвязывающий белок согласно любому из пунктов 1 - 28,

с) введение генетической конструкции в клетку-хозяин и

д) экспрессию генетической конструкции клеткой-хозяином.

54. Способ согласно пункту 53, дополнительно предусматривающий выделение и очистку антигенсвязывающего белка из клетки-хозяина и необязательно восстановление антигенсвязывающего белка в Т-клетке.

55. Способ согласно пункту 53 или 54, дополнительно содержащий презентацию на поверхности клетки указанного антигенсвязывающего белка.

56. Способ согласно любому из пунктов 53 - 55, где генетическая конструкция представляет собой экспрессионную конструкцию, содержащую последовательность промотора, функционально связанную с нуклеиновой кислотой, кодирующей антигенсвязывающий белок.

57. Способ согласно любому из пунктов 53 - 56, где генетическую конструкцию вводят в клетку-хозяин посредством ретровирусной трансфекции.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий белок, специфически связывающийся с антигенным пептидом СТ45, который находится в комплексе с белком главного комплекса гистосовместимости (МНС), где антигенный пептид СТ45 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 138 (KIFEMLEGV), и где антигенсвязывающий белок содержит первый полипептид, содержащий переменный домен V_A , содержащий определяющие комплементарности области (CDR) CDRa1, CDRa2 и CDRa3, и второй полипептид, содержащий переменный домен V_B , содержащий CDRb1, CDRb2 и CDRb3, где

1) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 14, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 16, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 19, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 21,

2) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 133, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 75, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 136,

3) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 63, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 66, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 68,

4) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 90, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 92, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 66, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 96,

5) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 4, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 8, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 10,

13) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 35, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 38, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 40,

14) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 24, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 26, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 29, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 31, или

15) CDRa1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 43, CDRa3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 45, CDRb1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 48, и CDRb3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 50,

где антигенсвязывающий белок содержит указанную (указанные) последовательность (последовательности) CDRa1, CDRa3, CDRb1 и CDRb3 с не более чем одной, двумя или тремя аминокислотными мутациями, где каждая из CDRa1, CDRa3, CDRb1 и/или CDRb3 может содержать одну, две или три аминокислотные мутации.

2. Антигенсвязывающий белок по п. 1, где

1) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 15, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 20,

2) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 76,

3) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 67,

4) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 91, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 95,

5) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 3, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 9,

6) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 54, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 59,

7) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 15, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 76,

8) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 100, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 76,

9) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 81, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 86,

10) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 108, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 113,

11) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 126, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 113,

12) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 118, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 59,

13) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 39,

14) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 25, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 30, или

15) CDRa2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 44, и CDRb2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 49,

где антигенсвязывающий белок содержит указанную (указанные) последовательность (последовательности) CDRa2 и CDRb2 с не более чем одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными мутациями, где каждая из CDRa2 и/или CDRb2 может содержать одну, две, три или четыре аминокислотные мутации.

3. Антигенсвязывающий белок по п. 1 или 2, где антигенсвязывающий белок

представляет собой TCR, где предпочтительно TCR выбран из группы, состоящей из TCR α/β , TCR γ/δ , одноцепочечного TCR, мембраносвязанного TCR, растворимого TCR, одновалентного, двухвалентного или мнововалентного TCR, моноспецифического, биспецифического или мультиспецифического TCR, функционального фрагмента TCR и слитого белка или химерного белка, содержащего функциональный фрагмент TCR, где более предпочтительно TCR представляет собой TCR α/β или TCR γ/δ , наиболее предпочтительно TCR α/β .

4. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 3, где V_A содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 132, 62, 89, 1, 52, 70, 98, 79, 106, 124, 116, 34, 23 и 42, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 13, 132, 62, 89, 1, 52, 70, 98, 79, 106, 124, 116, 34, 23 и 42 и содержащей CDRa1, CDRa2 и CDRa3 по п. 1 или 2, и где V_B содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 135, 65, 94, 7, 57, 74, 103, 84, 111, 129, 121, 37, 28 и 47, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 18, 135, 65, 94, 7, 57, 74, 103, 84, 111, 129, 121, 37, 28 и 47 и содержащей CDRb1, CDRb2 и CDRb3 по п. 1 или 2, где последовательности CDRa1, CDRa2, CDRa3, CDRb1, CDRb2 и/или CDRb3 могут содержать одну, две или три аминокислотные мутации, предпочтительно аминокислотные замены.

5. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 4, дополнительно содержащий константный домен, где константный домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 750, 751, 156, 11, 32 и 157, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 750, 751, 11 и 32, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 5, 750, 751, 156, 11, 32 или 157.

6. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 5, где первый полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120, 36, 27, 46 и 158-172, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120, 36, 27 и 46, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 17, 134, 64, 93, 6, 56, 73, 102, 83, 110, 128, 120,

36, 27, 46 или 158-172, и второй полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33, 51 и 173-187, предпочтительно выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33 и 51, или аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 22, 137, 69, 97, 12, 61, 78 105, 88, 115, 131, 123, 41, 33, 51 или 173-187.

7. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 6, где антигенсвязывающий белок незначительно связывается с по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или всеми подобными пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 149 (SP-05-0004), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), предпочтительно из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 (SP-05-0001), SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 148 (SP-05-0003), SEQ ID NO: 150 (SP-05-0005), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007), SEQ ID NO: 153 (SP-05-0008), SEQ ID NO: 154 (SP-05-0009) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010), более предпочтительно из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147 (SP-05-0002), SEQ ID NO: 151 (SP-05-0006), SEQ ID NO: 152 (SP-05-0007) и SEQ ID NO: 155 (SP-05-0010).

8. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 7, где антигенсвязывающий белок способен активировать

- Т-клетку CD4+, в частности, Т-клетку CD4+ CD8-, и/или

- Т-клетку CD8+, в частности, Т-клетку CD8+ CD4-,

и где антигенсвязывающий белок предпочтительно представляет собой TCR, более предпочтительно TCR α/β или TCR γ/δ .

9. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 8.

10. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 9.

11. Клетка-хозяин, содержащая антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 8, или нуклеиновую кислоту по п. 9, или вектор по п. 10.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 8, нуклеиновую кислоту по п. 9, вектор по п. 10 или клетку-хозяин по п. 11 и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

13. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 8, нуклеиновая кислота по

п. 9, вектор по п. 10, клетка-хозяин по п. 11 или фармацевтическая композиция по п. 12 для применения в медицине, предпочтительно для применения в способе лечения и/или диагностики пролиферативного заболевания, в частности, рака.

14. Способ *in-vitro* обнаружения рака, в частности, рака, для которого характерна экспрессия СТ45, в биологическом образце, предусматривающий:

а) контакт биологического образца с антигенсвязывающим белком по любому из пп. 1 - 8, и

б) обнаружение связывания антигенсвязывающего белка с биологическим образцом.

15. Способ получения антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1 - 8, предусматривающий

а) предоставление клетки-хозяина,

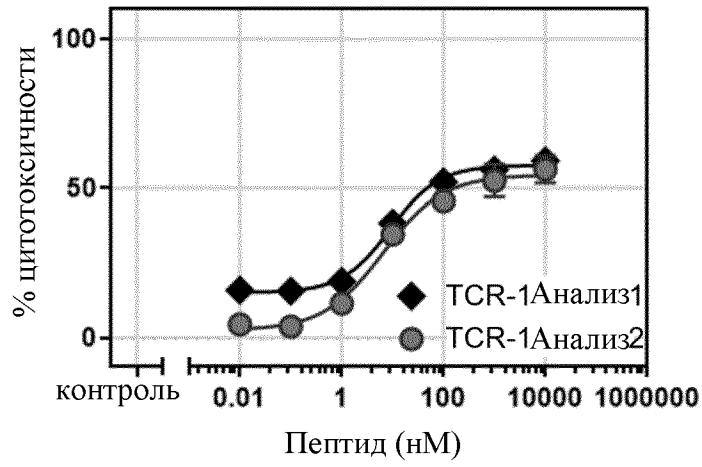
б) предоставление генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1 - 8,

с) введение генетической конструкции в клетку-хозяин и

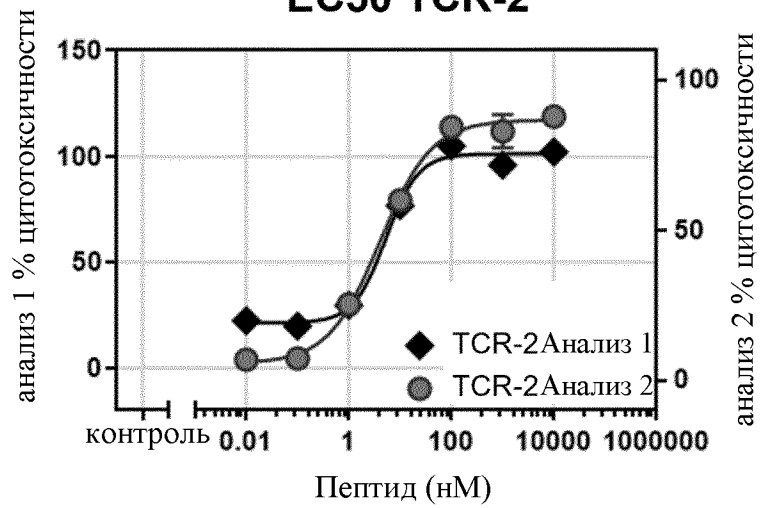
д) экспрессию генетической конструкции клеткой-хозяином.

Фиг. 1

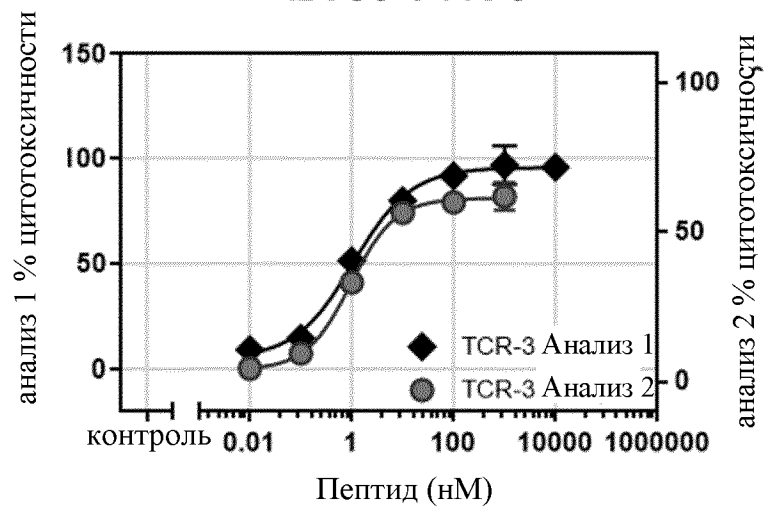
EC50 TCR-1



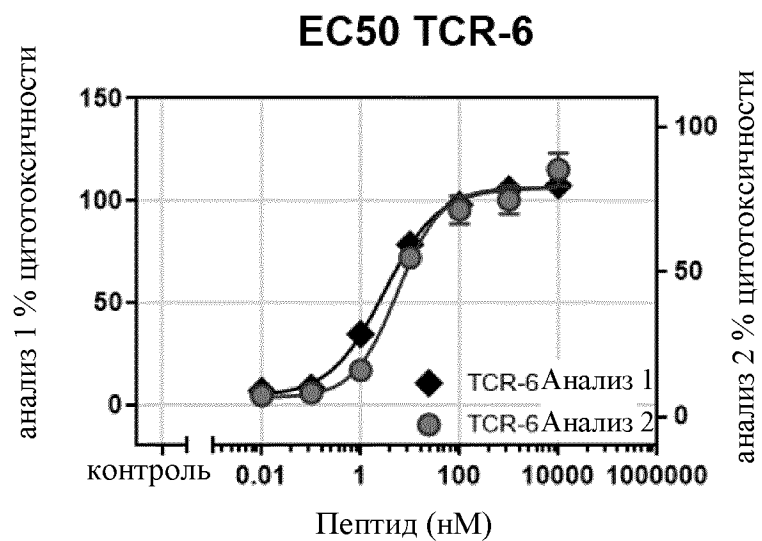
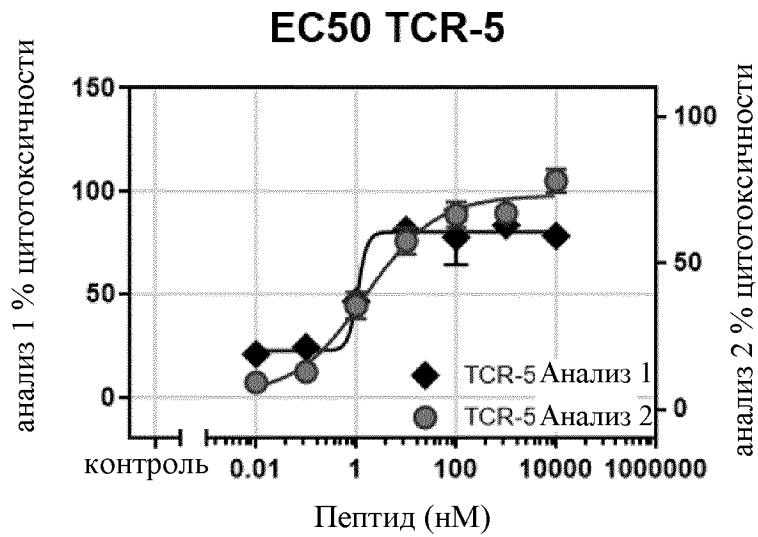
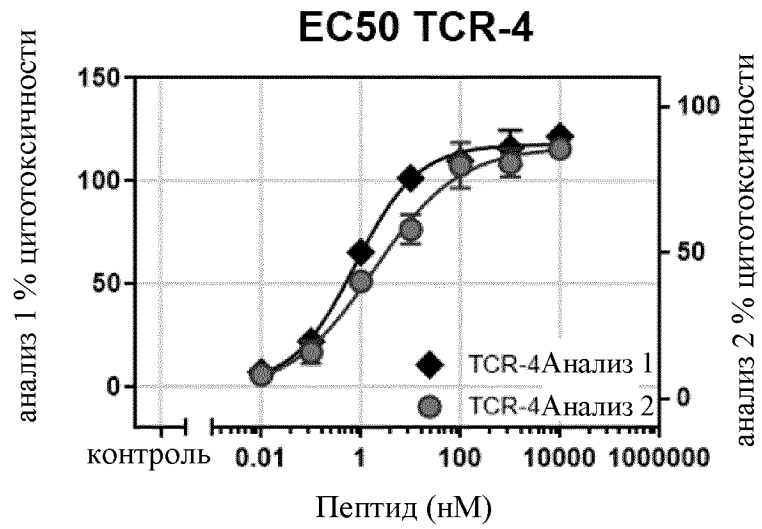
EC50 TCR-2



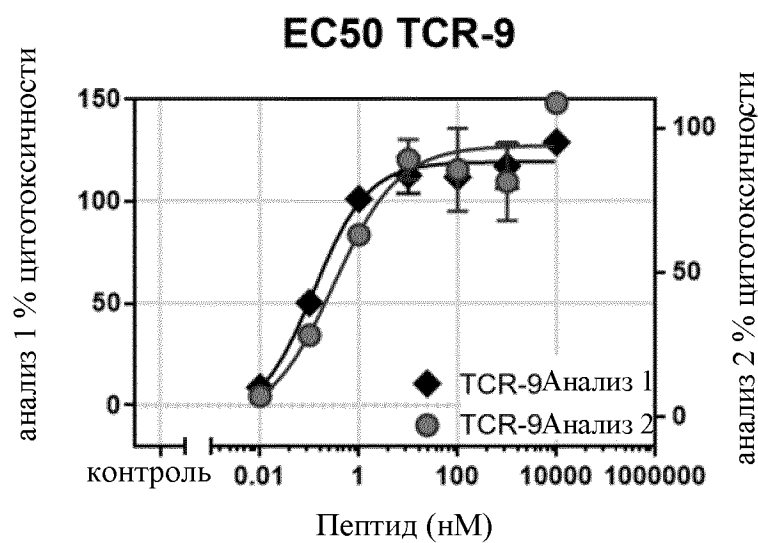
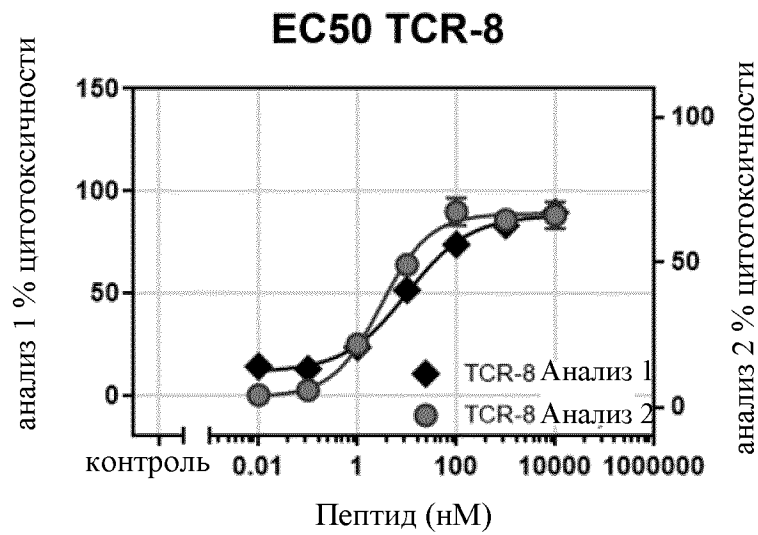
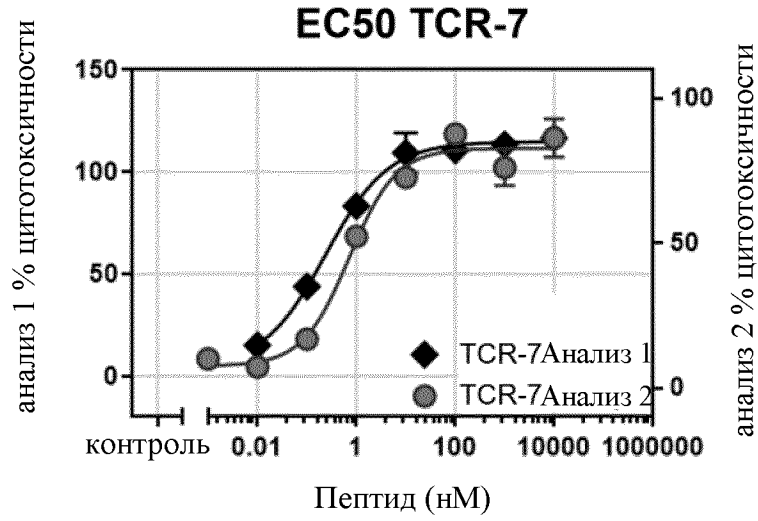
EC50 TCR-3



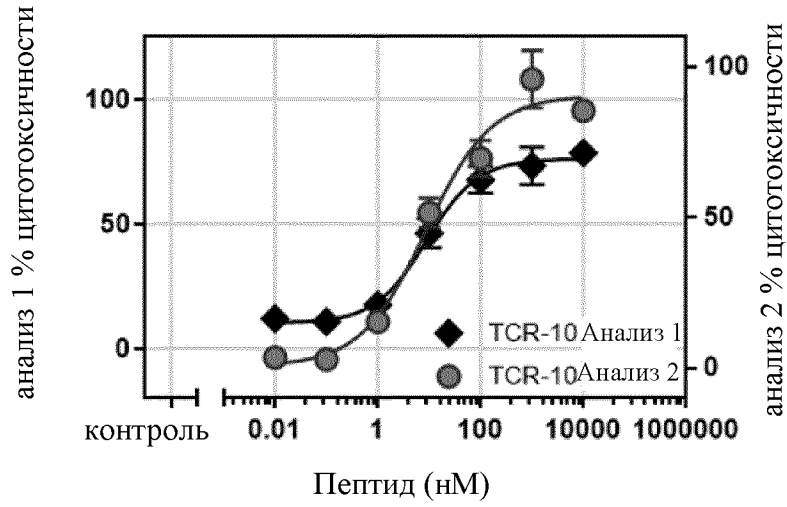
Фиг. 1 (продолжение)



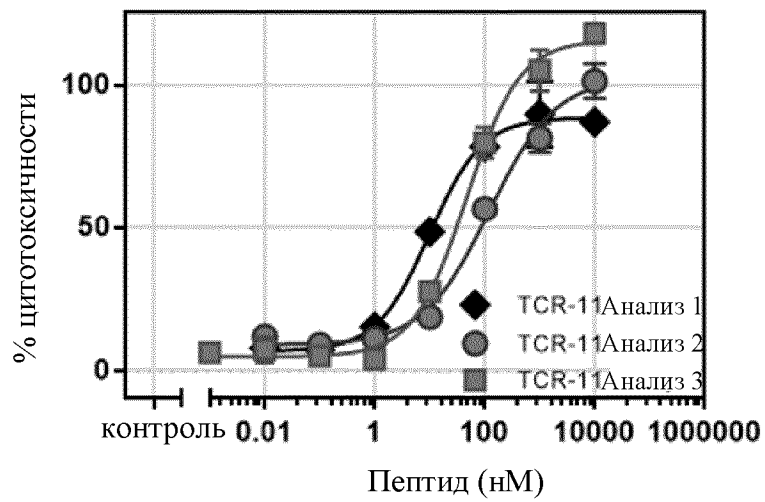
Фиг. 1 (продолжение)



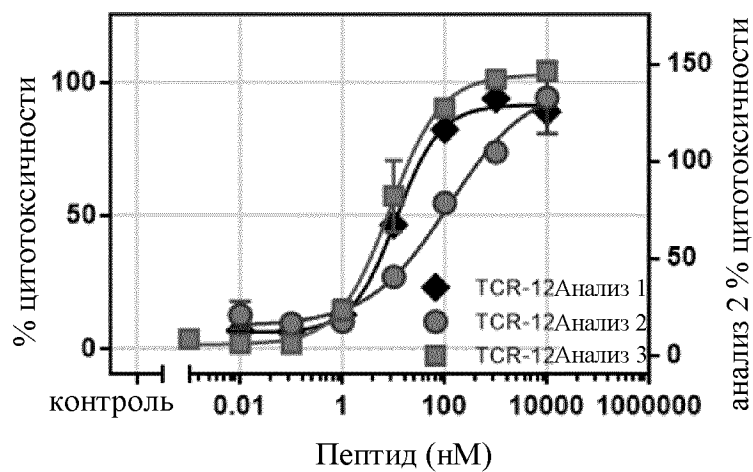
Фиг. 1 (продолжение)
EC50 TCR-10



EC50 TCR-11

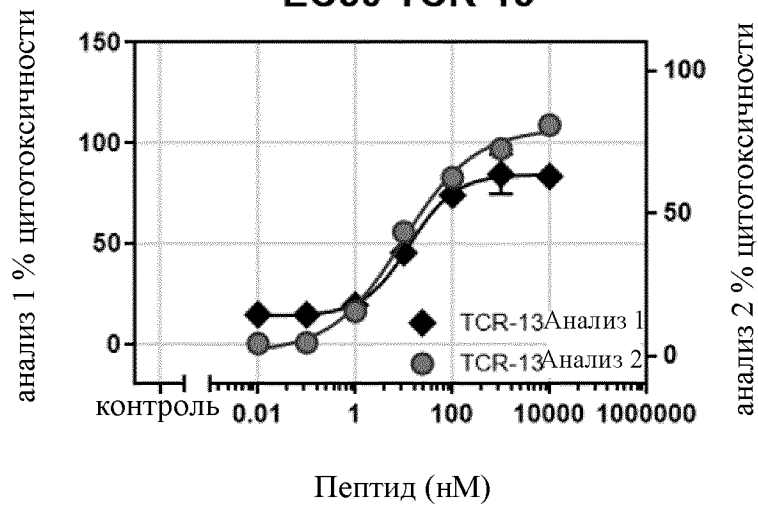


EC50 TCR-12

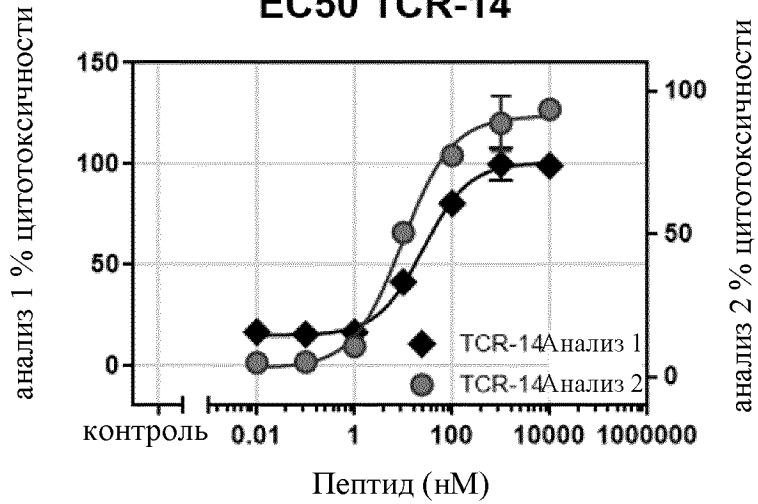


Фиг. 1 (продолжение)

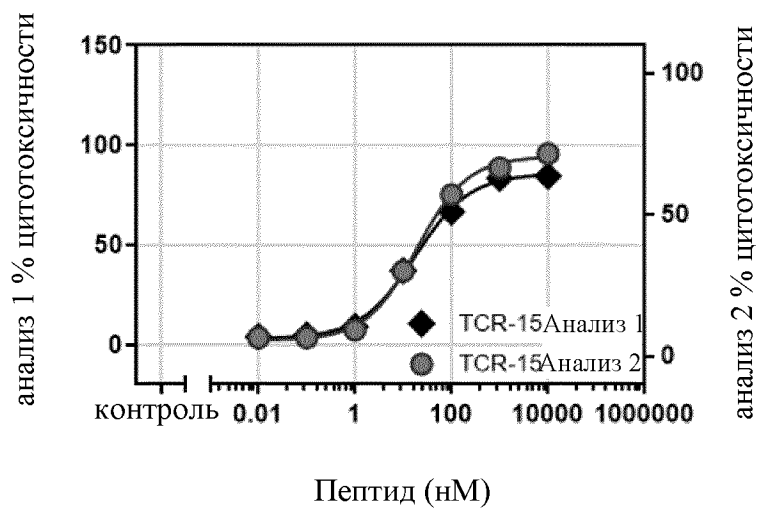
EC50 TCR-13



EC50 TCR-14

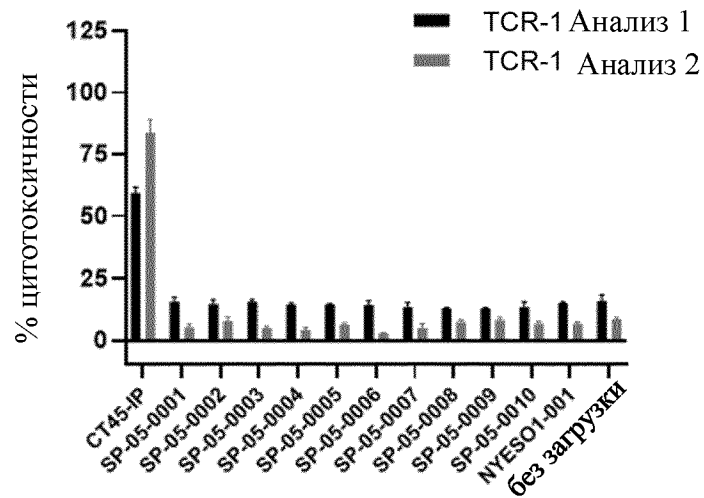


EC50 TCR-15

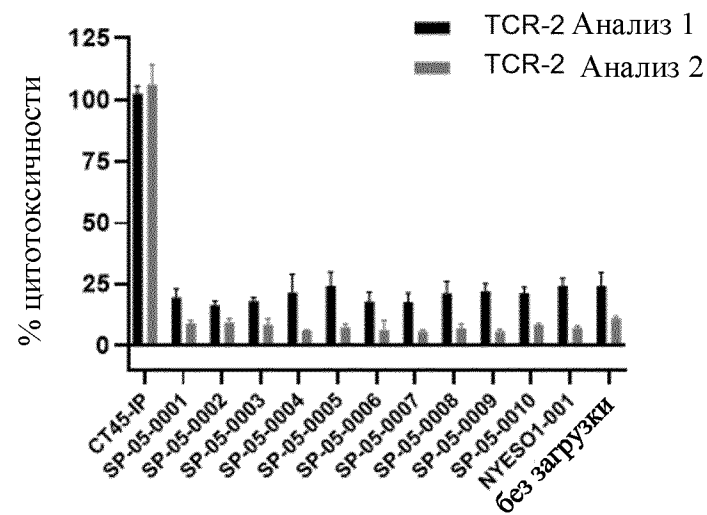


Фиг. 2

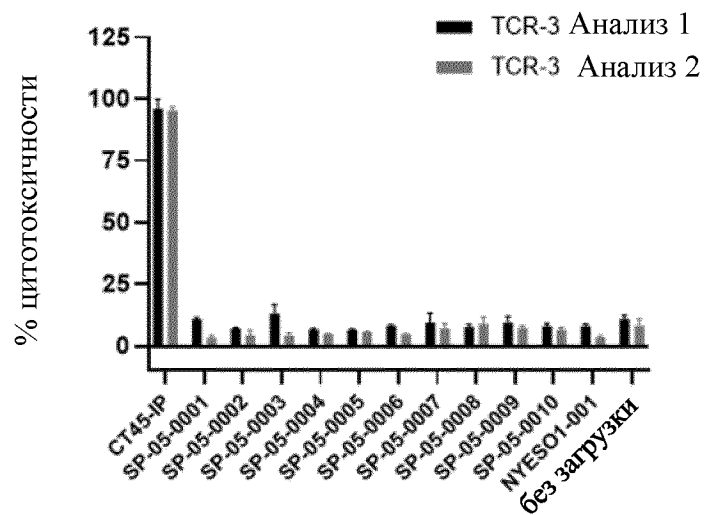
SIM TCR-1



SIM TCR-2

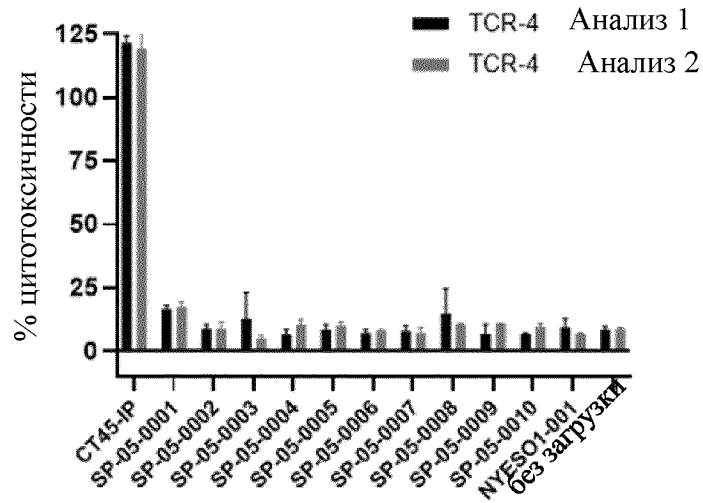


SIM TCR-3

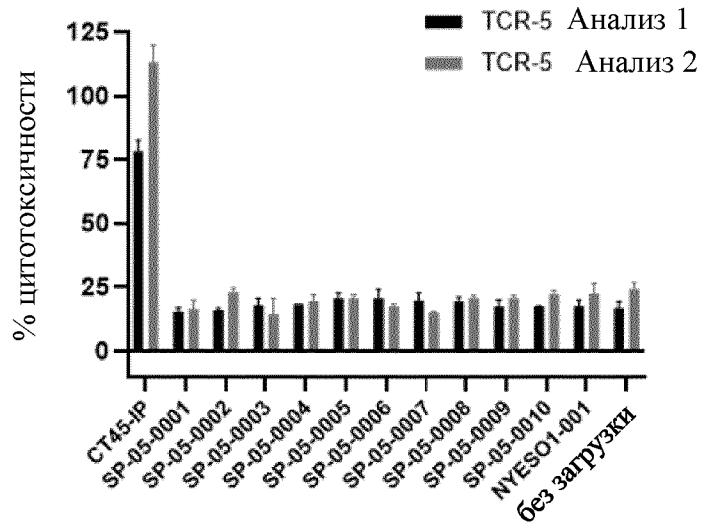


Фиг. 2 (продолжение)

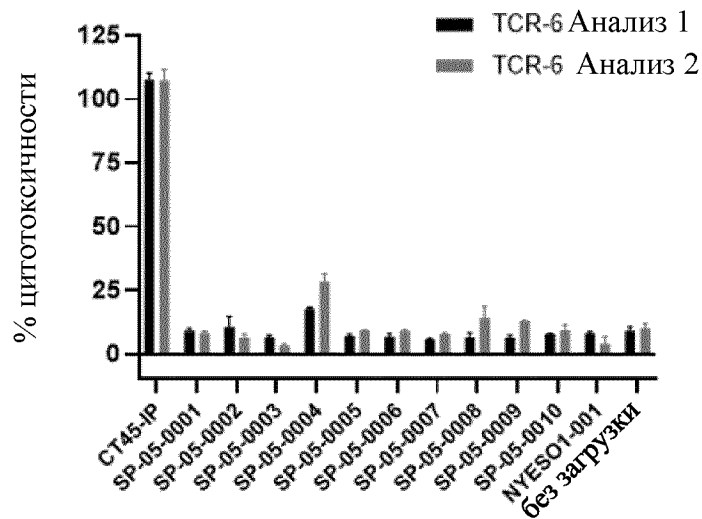
SIM TCR-4



SIM TCR-5

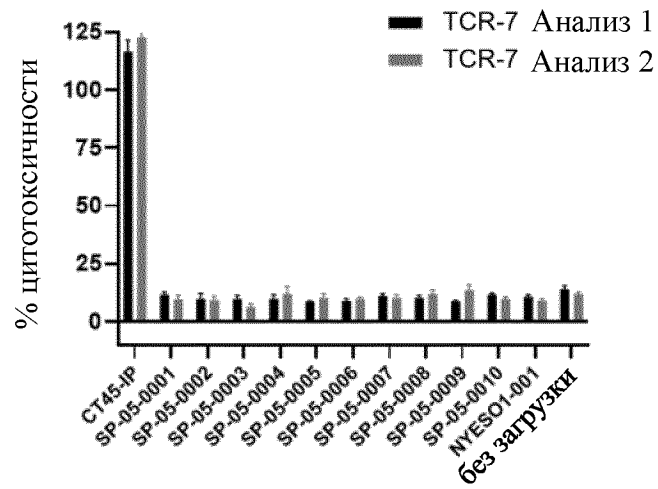


SIM TCR-6

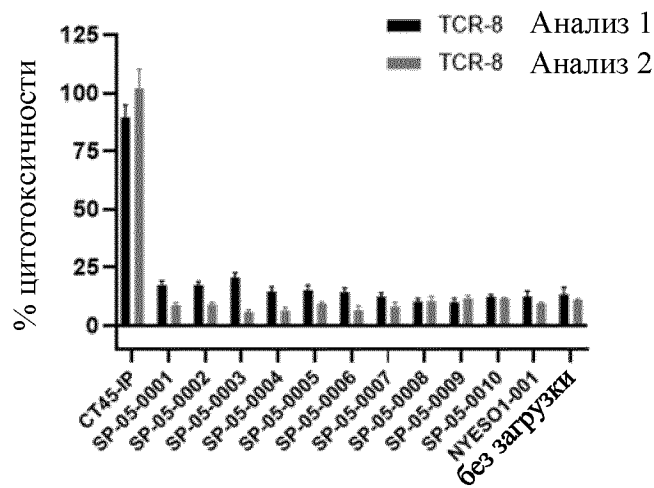


Фиг. 2 (продолжение)

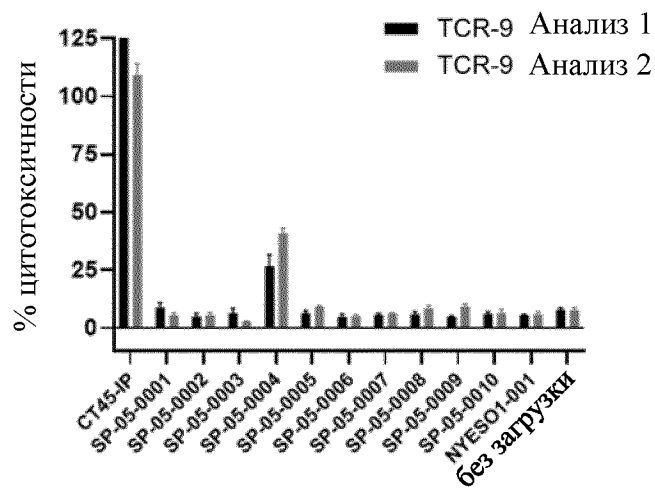
SIM TCR-7



SIM TCR-8

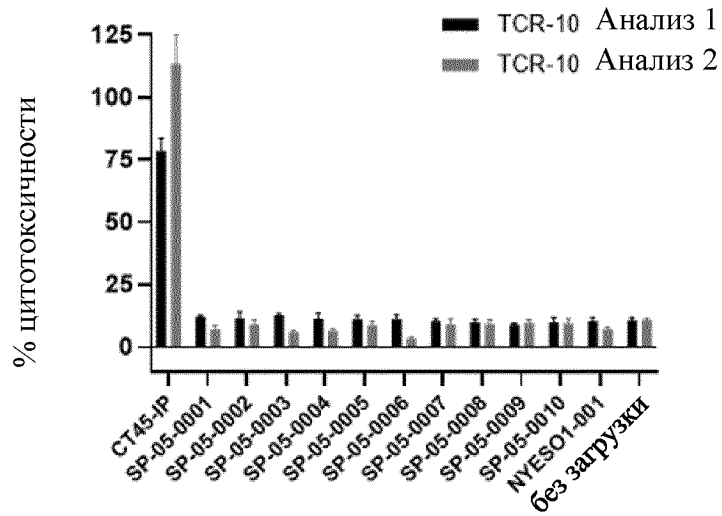


SIM TCR-9

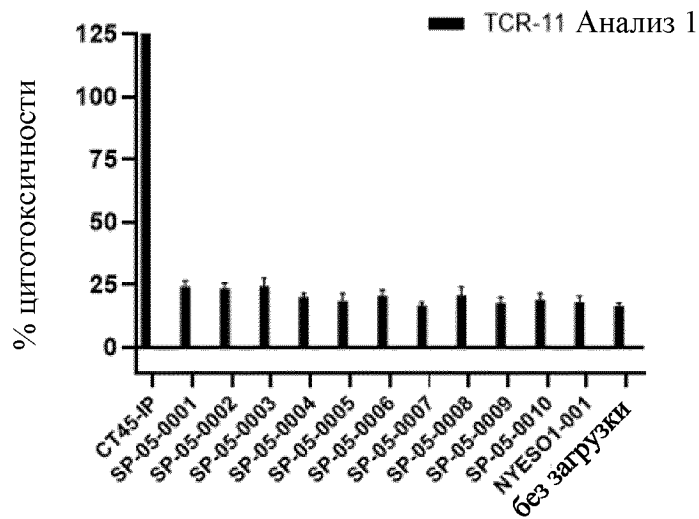


Фиг. 2 (продолжение)

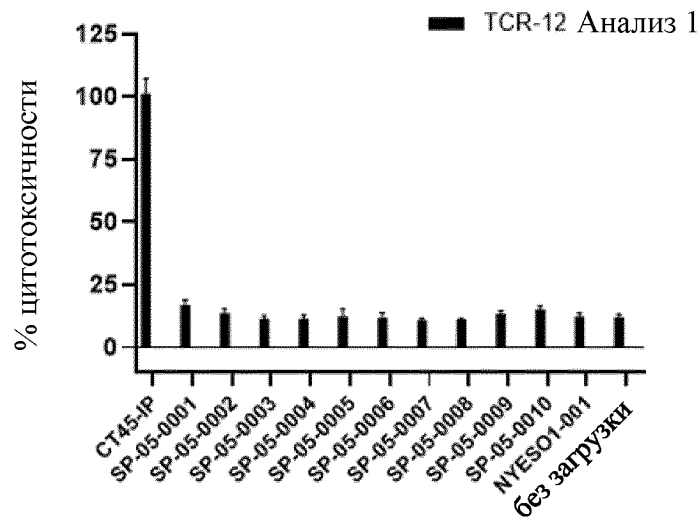
SIM TCR-10



SIM TCR-11

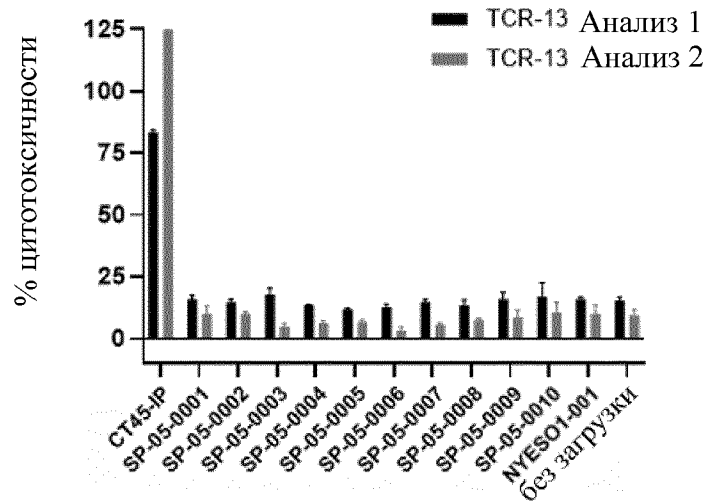


SIM TCR-12

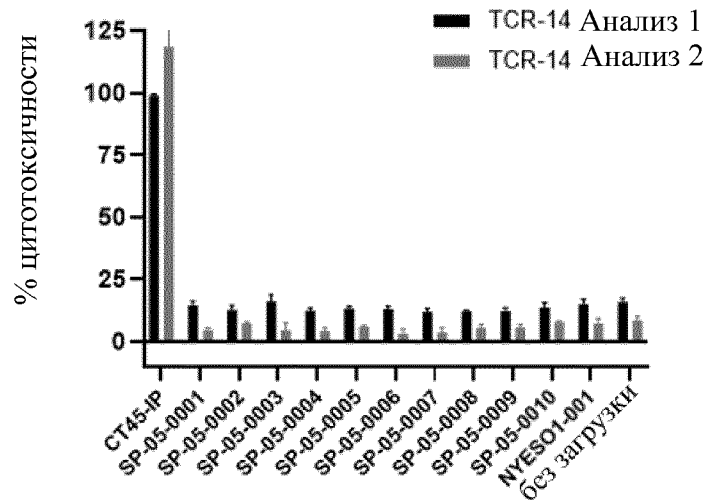


Фиг. 2 (продолжение)

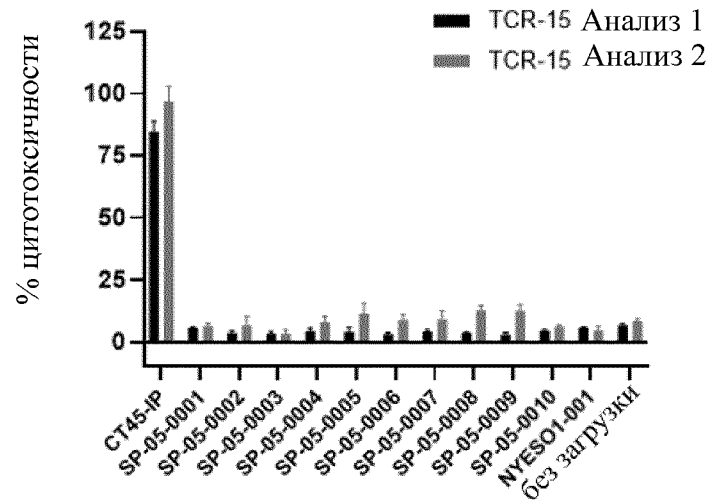
SIM TCR-13



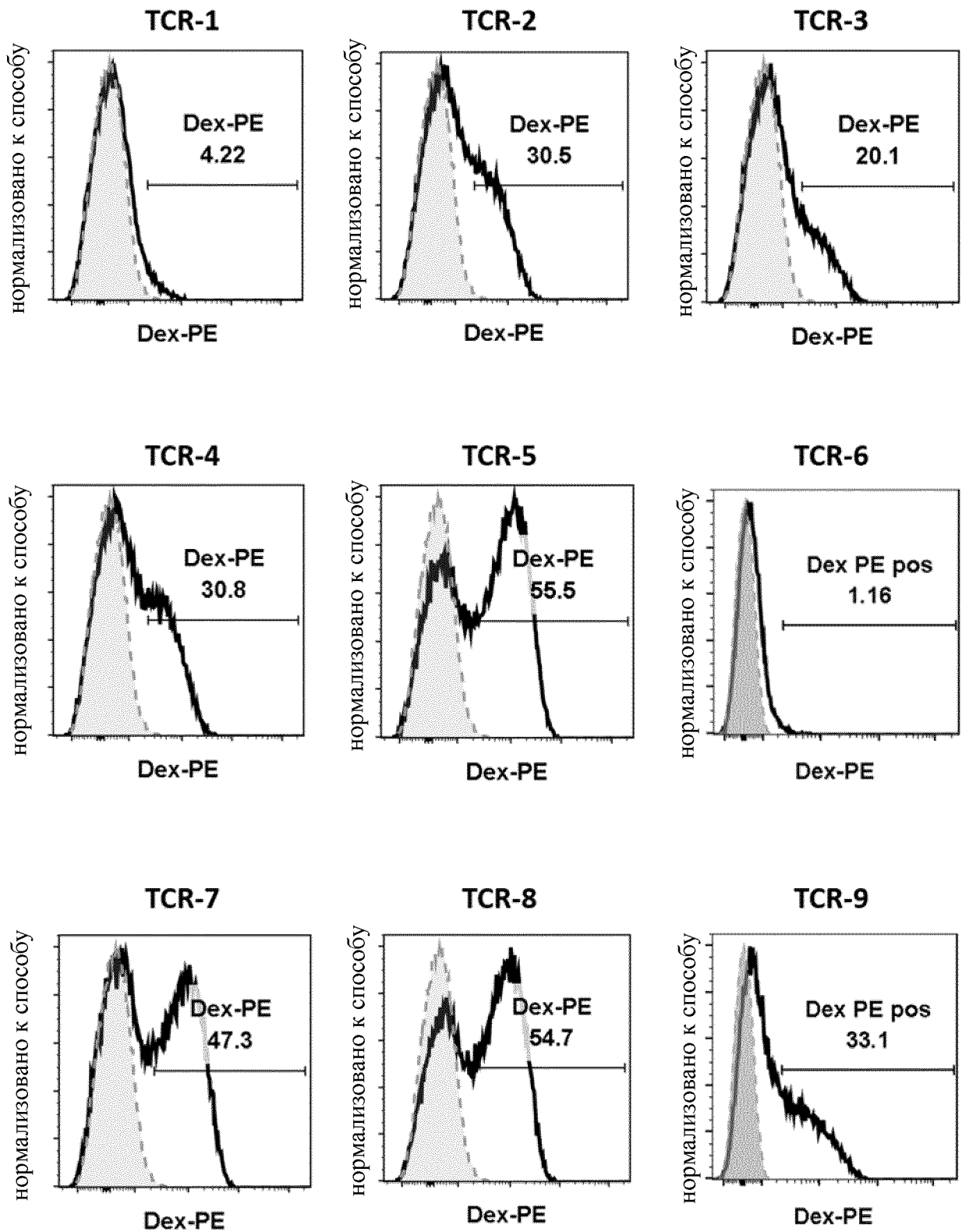
SIM TCR-14



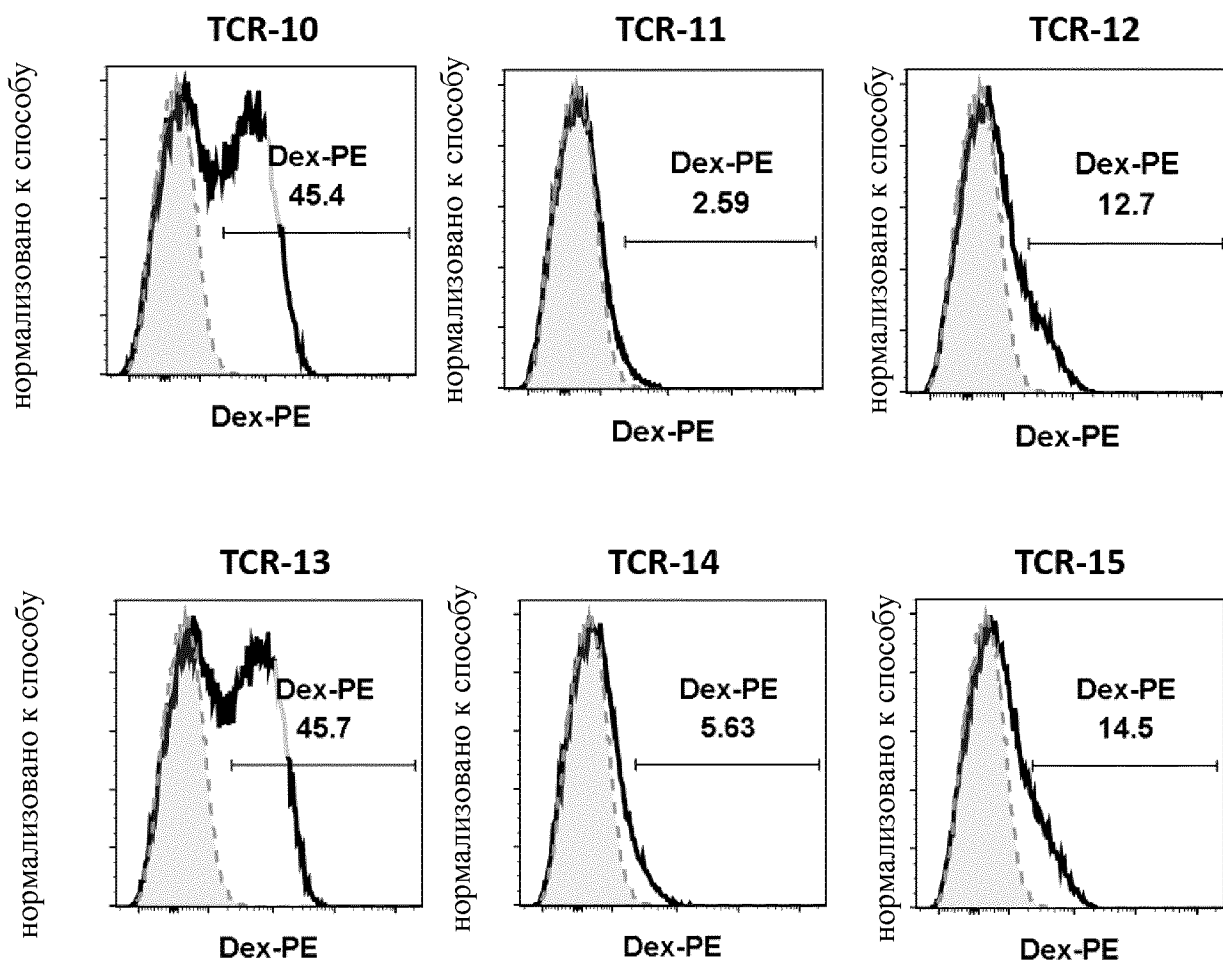
SIM TCR-15



Фиг. 3



Фиг. 3 (продолжение)



Фиг. 4

