



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124532** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)**C07K 14/725** (2006.01)**C12N 5/0783** (2010.01)**A61K 38/17** (2006.01)

A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2018 09121	(72) Винахідник(и):	Маурер Домінік (DE), Альтен Леоні (DE), Бунк Себастьян (DE)
(22) Дата подання заявки:	16.03.2017	(73) Володілець (володільці):	ІММАТІКС БІОТЕХНОЛОДЖІС ГМБХ, Paul-Ehrlich-Straße 15, 72076 Tübingen, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	06.10.2021	(74) Представник:	Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	1604494.3, 62/308,970	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2012308590 A1, 06.12.12 WO 2015063302 A2, 07.05.2015 US 2015246959 A1, 03.09.2015 Yusue Tomita et al. Peptides derived from human insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 3 can induce human leukocyte antigen-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive to cancer cells. Cancer science, 2011, vol. 102, no. 1, p. 71 - 78 Suda Takako et al. Identification of human leukocyte antigen-A24-restricted epitope peptides derived from gene products upregulated in lung and esophageal cancers as novel targets for immunotherapy. Cancer science, vol. 98, no. 11, 2007 p. 1803 - 1808 Masatoshi Hirayama et al. An oncofetal antigen, IMP-3-derived long peptides induce immune responses of both helper T cells and CTLs. Oncoimmunology, 2016, vol. 5, no. 6, p. e1123368 Mateusz Legut et al. The promise of [gamma][delta] T cells and the [gamma][delta] T cell receptor for cancer immunotherapy. Cellular & molecular immunology, 2015, vol. 12, no. 6, p. 656 - 668
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	16.03.2016, 16.03.2016		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	GB, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.12.2018, Бюл.№ 23		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	05.10.2021, Бюл.№ 40		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2017/056289, 16.03.2017		

(54) Т-КЛІТИННИЙ РЕЦЕПТОР ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ**(57) Реферат:**

Винахід стосується Т-клітинного рецептора (ТКР), який специфічно зв'язується з комплексом пептид IGF2BP3-001-молекула МНС, нуклеїнової кислоти, що його кодує, вектора експресії, клітини-хазяїна, способу отримання данного рецептора. Винахід також стосується

UA 124532 C2

фармацевтичної композиції, способу лікування раку, способу знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого аберантно експресують IGF2BP3, способу виявлення раку у біологічному зразку.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Мішенями імунотерапії з використанням Т-клітин є пептидні епітопи, отримані з пухлино-асоційованих або пухлино-специфічних білків, які презентуються молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС). Цими пухлино-асоційованими антигенами (ТАА) можуть бути пептиди, отримані з усіх класів білків, таких як ферменти, рецептори, фактори транскрипції тощо, які експресуються і активність яких, у порівнянні з незміненими клітинами того ж походження, підвищена у клітинах відповідної пухлини.

Специфічні елементи клітинної імунної відповіді здатні специфічно розпізнавати та знищувати пухлинні клітини. Виділення Т-клітин із популяції пухлино-інфільтруючих клітин або з периферичної крові говорить про те, що такі клітини відіграють важливу роль у природному імунному захисті проти раку. Важливу роль у цій відповіді відіграють зокрема CD8-позитивні Т-клітини, які розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності I класу (МНС). Ці пептиди зазвичай складаються з 8–10 амінокислотних залишків, що отримані з білків або дефектних рибосомальних продуктів (DRIP), які містяться у цитозолі. Молекули МНС людини також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA).

IGF2BP3 є членом сімейства РНК-зв'язувальних білків іРНК інсуліноподібного фактору росту II, що бере участь у локалізації, обороті і контролі трансляції іРНК. Наявність високих рівнів транскриптів гена IGF2BP3 у численних ракових тканинах у порівнянні з контрольними тканинами свідчить про те, що білок IGF2BP3 може відігравати функціональну роль у трансформованих клітинах, що проліферують. Про експресію IGF2BP3 повідомлялося для різних видів раку, включаючи світлоклітинну нирково-клітинну карциному (НKK), злоякісну меланому, пласкоклітинну карциному стравоходу, карциному підшлункової залози та уротеліальні пухлини. Отже, епітопи, одержані з IGF2BP3, можуть виявитися корисними для націлювання протиракових терапевтичних засобів на ракові пухлини, які експресують IGF2BP3.

Існує два класи молекул МНС, МНС I класу і МНС II класу. Комплекси пептидів і молекул МНС I класу розпізнаються CD8-позитивними Т-клітинами, що несуть відповідний Т-клітинний рецептор (ТКР), в той час як комплекси пептиду і молекул МНС II класу розпізнаються CD4-позитивними Т-хелперами, що несуть відповідний ТКР. Оскільки обидва типи відповіді, залежні від CD8 та CD4, спільно та синергічно роблять свій внесок у протипухлинну дію, для розробки засобів імунотерапії раку, таких як вакцини та засоби клітинної терапії, важливими є ідентифікація та визначення характеристик пухлино-асоційованих антигенів і відповідних Т-клітинних рецепторів.

В імунній реакції, залежній від молекул МНС I класу, пептиди не тільки мають бути здатними зв'язатися з певними молекулами МНС I класу, що експресуються клітинами пухлини, але вони також мають розпізнаватися Т-клітинами, що несуть специфічний Т-клітинний рецептор (ТКР). Таким чином, ТАА є стартовою точкою для розробки Т-клітинної терапії, включаючи, але не обмежуючись ними, протипухлинні вакцини та засоби клітинної терапії.

Незважаючи на те, що був досягнутий прогрес у розробці молекулярно спрямованих препаратів для терапії раку, все ще існує потреба у цій сфері в розробці нових протиракових препаратів, які специфічно націлюються на молекули, високоспецифічні для ракових клітин. Цей опис відповідає на цю потребу, пропонуючи нові ТКР, нуклеїнові кислоти, вектори та клітинні-хазяї, які специфічно зв'язують епітопи IGF2BP3, такі як пептид KIQEILTQV (IGF2BP3-001; SEQ ID NO: 1) і його варіанти, і способи використання цих молекул при лікуванні раку.

СТИСЛИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Цей опис стосується Т-клітинних рецепторів (ТКР), що містять альфа-ланцюг і бета-ланцюг ("альфа/бета ТКР"). В іншому втіленні цей винахід стосується ТКР, що містять гамма-ланцюг і дельта-ланцюг ("гамма/дельта ТКР").

Цей опис також стосується ТКР, індивідуальних субодиниць ТКР (поодиноці або в комбінації) та їх субдоменів, розчинних ТКР (рТКР), наприклад, розчинних альфа/бета димерних ТКР, які мають принаймні один дисульфідний міжланцюговий зв'язок між залишками константного домена, які не є присутніми у природних ТКР, і клонованих ТКР, де згадані ТКР вбудовані в аутологічні або алогенні Т-клітини або їхні клітини-попередники, та способів їх отримання, а також інших клітин, що несуть згаданий ТКР.

Цей опис також стосується ТКР, який специфічно зв'язується з комплексом пептид IGF2BP3-001-молекула HLA, де пептид IGF2BP3-001 містить KIQEILTQV (SEQ ID NO: 1) або, як альтернатива, складається з нього. В одному втіленні молекулою HLA є HLA-A*02.

Цей опис також стосується ТКР, який специфічно зв'язується з IGF2BP3-001, комплексом пептид-молекула HLA, де пептид IGF2BP3-001 містить або, як альтернатива, складається з варіанта IGF2BP3-001, який принаймні на 66 %, переважно принаймні на 77 % і більш переважно принаймні на 88 % гомологічний (переважно принаймні на 77 % або принаймні на

88 % ідентичний) послідовності відповідно до SEQ ID NO: 1, де згаданий варіант зв'язується з молекулою HLA I класу або II класу і (або) викликає перехресну реакцію Т-клітин із згаданим пептидом або його фармацевтично прийнятною сіллю, де згаданий пептид не є базовим повнорозмірним поліпептидом.

5 Цей опис також стосується пептиду за цим описом, що містить послідовність, вибрану з групи, що містить SEQ ID NO: 1, або її варіант, який принаймні на 66 %, переважно принаймні на 77 % і більш переважно принаймні на 88 % гомологічний (переважно принаймні на 77 % або принаймні на 88 % ідентичний) послідовності відповідно до SEQ ID NO: 1, де згаданий пептид або його варіант має загальну довжину між 8 і 100, переважно між 8 і 30 і найбільш переважно між 8 і 14 амінокислот.

10 Цей опис також стосується ТКР, які містять альфа-варіабельний домен ТКР, який має ідентичність послідовностей, що становить принаймні 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %, переважно ідентичність послідовностей 90 % до альфа-варіабельного домена ТКР, наведеного у Таблиці 1, і бета-варіабельний домен ТКР, який має ідентичність послідовностей, що становить принаймні 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %, переважно ідентичність послідовностей 90 % до бета-варіабельного домена ТКР, наведеного у Таблиці 1

В одному втіленні альфа-варіабельний домен ТКР має принаймні одну мутацію відносно альфа-домону ТКР, наведеного у Таблиці 1, і (або) бета-варіабельний домен ТКР має принаймні одну мутацію відносно альфа-домону ТКР, наведеного у Таблиці 1. У одному втіленні ТКР, що містить принаймні одну мутацію у альфа-варіабельному домені ТКР і (або) у бета-варіабельному домені ТКР, має спорідненість до і (або) напівперіод зв'язування з комплексом пептид IGF2BP3-001-молекула HLA, які принаймні вдвічі вище таких для ТКР, що містить немутований альфа-домен ТКР і (або) немутований бета-домен ТКР.

20 Альфа-ланцюги ТКР за цим описом можуть додатково містити альфа-константний домен ТКР, який має ідентичність послідовностей, що становить принаймні 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % до альфа-константного домена ТКР, наведеного у Таблиці 1. Бета-ланцюги ТКР за цим описом можуть додатково містити бета-константний домен ТКР, який має ідентичність послідовностей, що становить принаймні 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % до бета-константного домена ТКР, наведеного у Таблиці 1.

30 Альфа-ланцюги ТКР за цим описом можуть додатково містити трансмембранний домен альфа-ланцюга ТКР і (або) внутрішньоклітинний домен альфа-ланцюга ТКР. Бета-ланцюги ТКР за цим описом можуть додатково містити трансмембранний домен бета-ланцюга ТКР і (або) внутрішньоклітинний домен бета-ланцюга ТКР.

Цей опис також стосується альфа-ланцюгів ТКР, що містять одну або більше ділянок альфа-ланцюга, що визначають комплементарність (CDR), розкритих у Таблиці 1, та їх варіантів, які містять одну, дві, три або чотири заміни відносно CDR, показаних у Таблиці 1. Також описуються альфа-ланцюги ТКР, що містять принаймні одну CDR, вибрану з CDR1, CDR2 і CDR3, показаних у Таблиці 1. Також описуються альфа-ланцюги ТКР, що містять CDR3 альфа-ланцюга, показану в Таблиці 1.

40 Цей опис також стосується бета-ланцюгів ТКР, що містять одну або більше ділянок бета-ланцюга, що визначають комплементарність (CDR), розкритих у Таблиці 1, та їх варіантів, які містять одну, дві, три або чотири заміни відносно CDR, показаних у Таблиці 1. Також описуються бета-ланцюги ТКР, що містять принаймні одну CDR, вибрану з CDR1, CDR2 і CDR3 бета-ланцюга, показаних у Таблиці 1. Також описуються бета-ланцюги ТКР, що містять бета-ланцюг CDR3, показаний у Таблиці 1.

Цей опис також стосується виділеної або рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує ТКР за цим описом. В одному втіленні нуклеїнові кислоти за винаходом кодують альфа-ланцюг ТКР і (або) бета-ланцюг ТКР, як показано у Таблиці 1.

Цей опис також стосується рекомбінантного вектора експресії, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує альфа-ланцюг ТКР, бета-ланцюг ТКР або обидва з них, як описано тут.

Цей опис також стосується виділеної клітини-хазяїна, що містить рекомбінантний вектор експресії, який експресує нуклеїнову кислоту, що кодує альфа-ланцюг ТКР, бета-ланцюг ТКР або обидва з них, як описано тут.

Цей опис також стосується виділеної клітини-хазяїна, що містить рекомбінантний вектор експресії за цим описом, переважно якщо клітина є клітиною людини, переважно лімфоцитом периферичної крові (ЛПК), більш переважно CD4- або CD8-позитивним Т-лімфоцитом.

Цей опис також стосується виділеного ЛПК, що містить рекомбінантний вектор експресії за цим описом, де ЛПК є CD8+Т-клітиною або CD4+Т-клітиною.

Цей опис також стосується популяції клітин, що містить принаймні одну клітину-хазяїна, описану тут.

Цей опис також стосується ТКР і клітин-хазяїв за цим описом для застосування при лікуванні проліферативних захворювань, таких як недрібноклітинний рак легенів, дрібноклітинний рак легенів, нирковоклітинний рак, рак головного мозку (наприклад, гліобластома, нейробластома), рак шлунка, колоректальний рак, гепатоцелюлярний рак, рак голови та шиї, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, лейкоз, рак молочної залози, карцинома з клітин Меркеля, меланома, рак яєчника, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура і жовчних протоків і рак стравоходу.

В одному аспекті клітина-хазяїн є CD8+Т-клітиною або CD4+Т-клітиною, трансфорованою нуклеїновою кислотою, яка кодує принаймні один ТКР за цим описом, де ТКР містить принаймні одну амінокислотну послідовність, розкрити у Таблиці 1. В іншому аспекті такі клітини-хазяї використовуються при імунотерапії дрібноклітинного раку легенів, недрібноклітинного раку легенів, дрібноклітинного раку легенів, нирковоклітинного раку, раку головного мозку (наприклад, гліобластоми, нейробластоми), раку шлунка, колоректального раку, гепатоцелюлярного раку, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози, лейкозу, рак молочної залози, карциноми з клітин Меркеля, меланоми, раку яєчника, раку сечового міхура, раку матки, раку жовчного міхура і жовчних протоків і раку стравоходу.

Цей опис також стосується способів знищення або зменшення кількості ракових клітин, які включають контактування ракових клітин із ТКР, нуклеїновою кислотою, вектором або клітиною-хазяїном як описано тут. Предметом цього винаходу також є способи лікування раку, що включають введення суб'єкту, який цього потребує, ТКР, нуклеїнової кислоти, вектора або клітини-хазяїна як описано тут.

Цей опис також стосується нуклеїнової кислоти, що кодує ТКР за цим описом, і вектора експресії, що здатний експресувати нуклеїнову кислоту за цим описом.

Цей опис також стосується ТКР за цим описом, нуклеїнової кислоти за цим описом або вектора експресії за цим описом для застосування для лікування захворювань і в медицині, зокрема в лікуванні раку.

Цей опис також стосується клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту за цим описом або вектор експресії, як зазначено вище.

Цей опис також стосується клітини-хазяїна за цим описом, яка є антиген-презентуючою клітиною, і переважно дендритною клітиною.

Цей опис також стосується способу отримання пептиду за цим описом, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна за цим описом і виділення пептиду зі згаданої клітини-хазяїна або її культурального середовища.

Цей опис також стосується способів за цим описом, де антиген навантажують на молекули МНС I або II класу, що експресуються на поверхні відповідної антиген-презентуючої клітини або штучної антиген-презентуючої клітини шляхом контакту достатньої кількості антигену з антиген-презентуючою клітиною або антиген навантажують на тетрамери МНС I або II класу шляхом тетрамеризації мономерних комплексів антиген/МНС I або II класу.

Цей опис також стосується способу за цим описом, де антиген-презентуюча клітина містить вектор експресії, що здатний експресувати або експресує згаданий пептид, що містить послідовність від SEQ ID NO: 1, або його варіант.

Цей опис також стосується активованих Т-клітин, отриманих згідно способу за цим описом, де згадана Т-клітина селективно розпізнає клітину, яка експресує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність за цим описом.

Цей опис також стосується способу знищення ракових клітин і (або) пригнічення клітин в організмі пацієнта, ракові клітини якого аберадно експресують поліпептид, що містить будь-яку амінокислотну послідовність за цим описом, причому способи включають введення пацієнту ефективної кількості Т-клітин, отриманих за цим описом.

Цей опис також стосується застосування будь-якого пептиду, що описаний тут, нуклеїнових кислот відповідно до описаного тут, векторів експресії, що описані тут, клітин, що описані тут, активованого Т-лімфоцита, що описаний тут, Т-клітинних рецепторів, антитіл або інших молекул, що зв'язують пептид і (або) комплекс пептид-МНС, за цим описом як лікарського засобу або в процесі виробництва лікарського засобу. В одному аспекті лікарський засіб виявляє протиракову активність.

Переважно, якщо згаданий лікарський засіб є засобом клітинної терапії, ТКР, розчинним ТКР або антитілом.

Цей опис також стосується застосування за цим описом, де ракові клітини є клітинами недрібноклітинного раку легенів, дрібноклітинного раку легенів, нирковоклітинного раку, раку головного мозку (наприклад, гліобластоми, нейробластоми), раку шлунка, колоректального раку, гепатоцелюлярного раку, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози, лейкозу,

раку молочної залози, карциноми з клітин Меркеля, меланоми, раку яєчника, раку сечового міхура, раку матки, раку жовчного міхура і жовчних протоків і раку стравоходу і переважно клітинами недрібноклітинного раку легенів.

Цей опис також стосується біомаркерів на основі пептидів за цим описом, які у цьому документі іменуватимуться як "мішені", які можуть використовуватися в діагностиці раку, переважно недрібноклітинного раку легенів. Маркером може бути надмірна презентація самого(-их) пептиду(-ів) або надмірна експресія відповідного(-их) гена(-ів). Маркери також можуть використовуватися для передбачення вірогідності успіху лікування, переважно імунотерапії і найбільш переважно імунотерапії, націленої на ту ж мішень, що ідентифікується біомаркером. Наприклад, антитіло або розчинний ТКР може використовуватися для барвлення зрізів пухлини з метою виявлення присутності досліджуваного пептиду у комплексі з МНС. Необов'язково, антитіло або розчинний ТКР має додаткову ефекторну функцію, наприклад несе імуностимулюючий домен або токсин.

Цей опис також стосується застосування цих нових мішеней для ідентифікації ТКР, які розпізнають принаймні одну зі згаданих мішеней, і переважно ідентифікації згаданих ТКР, які активують Т-клітини.

Цей опис також стосується застосування цих нових мішеней у контексті лікування раку.

КОРОТКИЙ ОПИС ІЛЮСТРАЦІЙ

На Фіг. 1 показана презентація пептиду IGF2BP3-001 у нормальних тканинах і ракових зразках.

На Фіг. 2–4 показана експресія IGF2BP3-001 у ракових і здорових тканинах.

На Фіг. 5 показане забарвлювання тетрамером МНС/IGF2BP3-001 або тетрамером МНС/NYESO1-001 CD8+Т-клітин, у які методом електропорації введена РНК альфа- і бета-ланцюгів такого ТКР як R10P1A7 (Таблиця 1). Як контролі використовувалися CD8+Т-клітини, трансформовані під дією РНК ТКР 1G4, який специфічно зв'язується з комплексом МНС/NYESO1-001, і CD8+Т-клітини після імітації трансформації.

На Фіг. 6 показане вивільнення ІФН-гамма з CD8+Т-клітин, у які методом електропорації введена РНК альфа- і бета-ланцюгів такого ТКР як R10P1A7 (Таблиця 1) відповідно після сумісної інкубації з клітинами-мішенями, навантаженими пептидом IGF2BP3-001 (SEQ ID NO: 1) або гомологічним, але не спорідненим пептидом CLUA-001 (SEQ ID NO: 26), CHCHD6-001 (SEQ ID NO: 27), CDC42BPG-001 (SEQ ID NO: 28), PARP14-002 (SEQ ID NO: 29), SYNE2-001 (SEQ ID NO: 30), IFT7-001 (SEQ ID NO: 31), DHRS12-001 (SEQ ID NO: 32), STX12-001 (SEQ ID NO: 33), EEA-001 (SEQ ID NO: 34), SENP7-001 (SEQ ID NO: 35) або контрольним пептидом NYESO1-001 (SEQ ID NO: 36). Дані щодо вивільнення ІФН-гамма були отримані з CD8+Т-клітинами, одержаними від двох різних донорів. Як контролі використовувалися CD8+Т-клітини, у які методом електропорації введена РНК, самостійно або за сумісної інкубації з ненавантаженими клітинами-мішенями.

На Фіг. 7 показане вивільнення ІФН-гамма з CD8+Т-клітин, у які методом електропорації введена РНК альфа- і бета-ланцюгів ТКР R10P1A7 після сумісної інкубації з клітинами-мішенями, навантаженими пептидом IGF2BP3-001 (SEQ ID NO: 1) або різними варіантами IGF2BP3-001, у яких проведена заміна аланіну у позиціях 1–9 послідовності SEQ ID NO: 1. Як контролі використовувалися CD8+Т-клітини, у які методом електропорації введена РНК, самостійно або за сумісної інкубації з клітинами мішенями, навантаженими контрольним пептидом NYESO1-001, або ненавантажені клітини-мішені. Дані щодо вивільнення ІФН-гамма були отримані з CD8+Т-клітинами, одержаними від двох різних донорів.

На Фіг. 8 ІФН-гамма вивільняється з CD8+Т-клітин, у які методом електропорації введена РНК альфа- і бета-ланцюгів ТКР R10P1A7 (Таблиця 1) після сумісної інкубації з лінією клітин меланоми А-375, лінією клітин гліобластоми Т98G і лінією клітин раку молочної залози SK-BR-3 відповідно. Як контроль використовувалися самі лише CD8+Т-клітини, у які методом електропорації введена РНК.

ПОВНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Цей опис стосується Т-клітинних рецепторів (ТКР), що містять альфа-ланцюг і бета-ланцюг ("альфа/бета ТКР"). Предметом цього винаходу також є пептиди IGF2BP3-001, здатні зв'язуватися з ТКР і антитілами, якщо вони презентуються молекулою МНС. Цей опис стосується також нуклеїнових кислот, векторів і клітин-хазяїв для експресії ТКР і пептидів за цим описом і способів їх використання.

ВИЗНАЧЕННЯ

Якщо не зазначено інше, під нижче наведеними термінами, що використовуються у цьому описі, розуміються наступні поняття.

Термін "Т-клітинний рецептор" (скорочено ТКР) означає гетеродимерну молекулу, що містить альфа-поліпептидний ланцюг (альфа-ланцюг) і бета-поліпептидний ланцюг (бета-ланцюг), де гетеродимерний рецептор здатний зв'язуватися з пептидним антигеном, що презентується молекулою HLA.

Термін "Т-клітинна відповідь" означає специфічну проліферацію та активацію ефекторних функцій, індукованих пептидом *in vitro* чи *in vivo*. Для цитотоксичних Т-клітин, обмежених МНС I класу, ефекторними функціями можуть бути лізис клітин-мішеней, оброблених пептидом чи пептидним прекурсором чи клітин-мішеней, природно презентуючих пептид, секреція цитокінів, переважно гамма-інтерферону, TNF-альфа або IL-2, індукована пептидом, секреція ефекторних молекул, переважно гранзимів чи перфоринів, індукована пептидом, або дегрануляція.

Термін "пептид" використовується в цьому описі для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидним зв'язком між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Бажано, щоб пептиди були довжиною у 9 амінокислот, але можуть бути такими короткими, як довжиною у 8 амінокислот, і такими довгими, як довжиною у 10, 11 або 12 амінокислот або більшими по довжині, а у випадку пептидів, що зв'язані з молекулами МНС II класу (довші варіанти пептидів за цим винаходом), вони можуть досягати такої довжини, як 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 або більше амінокислот.

Термін "пептид" використовується також для позначення солей серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидним зв'язком між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Переважно, щоб ці солі були фармацевтично прийнятними солями пептидів, наприклад, такими як хлорид або ацетат (трифторацетат). Треба зазначити, що солі пептидів за цим описом суттєво відрізняються від пептидів у їхньому стані(-ах) *in vivo*, оскільки пептиди не є солями *in vivo*.

Термін "пептид" повинен також включати "олігопептид". Термін "олігопептид" використовується в цьому описі для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидними зв'язками між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Довжина олігопептиду не є критичною для цього опису за умови, що він містить правильний епітоп чи епітопи. Олігопептиди зазвичай коротші, ніж довжиною близько 30 амінокислотних залишків, і довші, ніж довжиною близько 15 амінокислотних залишків.

Термін "поліпептид" використовується для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидними зв'язками між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Довжина поліпептиду не є критичною для цього опису за умови, що він містить правильні епітопи. На відміну до термінів "пептид" і "олігопептид", під терміном "поліпептид" маються на увазі молекули, що містять більш ніж приблизно 30 амінокислотних залишків.

Пептид, олігопептид, білок або полінуклеотид, що кодує таку молекулу, має назву "імуногенного" (і, отже, є "імуногеном" в межах цього опису), якщо він здатний індукувати імунну відповідь. У межах цього опису імуногенність точніше визначається як здатність викликати відповідь Т-клітин. Отже, "імуногеном" може бути молекула, яка здатна індукувати імунну відповідь, і, що стосується цього опису, молекула, що здатна індукувати відповідь Т-клітин. В іншому аспекті імуноген може бути пептидом, комплексом пептиду з МНС, олігопептидом і (або) білком, який використовується для продукції специфічних антитіл або ТКР проти нього.

"Епітоп" I класу Т-клітини потребує короткого пептиду, який зв'язаний із рецептором молекули МНС I класу, утворюючи потрійний комплекс (альфа-ланцюг молекули МНС I класу, бета-2-мікроглобулін і пептид), який може розпізнаватися Т-клітиною, що несе відповідний Т-клітинний рецептор, який зв'язується із комплексом МНС/пептид із належної афінністю. Пептиди, які зв'язані з молекулами МНС I класу, зазвичай мають довжину в 8–14 амінокислот, і, найбільш типово, довжину в 9 амінокислот.

Нуклеотидна послідовність, що кодує конкретний пептид, олігопептид або поліпептид, може зустрічатися в природі або може бути сконструйована синтетично. Загалом, сегменти ДНК, які кодують пептиди, поліпептиди та білки за цим описом, зібрані з фрагментів кДНК і коротких олігонуклеотидних лінкерів або з серії олігонуклеотидів з утворенням синтетичного гена, що здатний експресуватися в рекомбінантній транскрипційній одиниці, що містить регуляторні елементи, отримані з оперона мікроорганізму або вірусу.

Термін "нуклеотид, що кодує пептид" в контексті цього винаходу означає нуклеотидну послідовність, що кодує пептид, включаючи штучні (створені руками людини) старт- і стоп-кодони, сумісні з біологічною системою, якою ця послідовність буде експресуватися, наприклад, з дендритними клітинами або іншою системою клітин, застосованих для отримання ТКР.

Термін "нуклеотид, що кодує ТКР" в контексті цього винаходу означає одну або більше нуклеотидних послідовностей, що кодує(-ють) ТКР, включаючи штучні (створені руками людини)

старт- і стоп-кодони, сумісні з біологічною системою, якою ця послідовність буде експресуватися, наприклад, з Т-клітиною або іншою системою клітин, застосовних для отримання ТКР.

Для цілей цього винаходу посилання на послідовність нуклеїнової кислоти означає як одноланцюгову, так і дволанцюгову нуклеїнову кислоту. Отже, наприклад, для ДНК, конкретна послідовність, якщо контекст на вказує на інше, відноситься до одноланцюгової ДНК такої послідовності, дуплекса такої послідовності з її комплементом (дволанцюгова ДНК) і комплементу такої послідовності.

Термін "кодуюча ділянка" відноситься до тієї частини гена, яка або природно, або нормально кодує продукт експресії цього гена в його природному геномному оточенні, тобто до ділянки, що кодує *in vivo* природний продукт експресії гена.

Кодуюча ділянка може бути ділянкою немутованого ("нормального"), мутованого або зміненого гена, або навіть ділянкою послідовності ДНК, або гена, повністю синтезованого в лабораторії з використанням методів, добре відомих фахівцям у галузі синтезу ДНК.

Термін "продукт експресії" означає поліпептид або білок, котрий є природним трансляційним продуктом гена та будь-якої нуклеїново-кислотної послідовності, що кодує еквіваленти, які є результатом виродження генетичного коду, і, таким чином, кодує ту ж амінокислоту (ті ж амінокислоти).

Термін "фрагмент", стосовно кодуючої послідовності, означає частину ДНК, яка містить менш ніж повну кодуючу ділянку, і продукт експресії якої зберігає по суті ту ж біологічну функцію чи активність, що й продукт експресії повної кодуючої ділянки.

Термін "сегмент ДНК" відноситься до полімеру ДНК у формі окремого фрагмента чи як компонент більшої конструкції ДНК, що одержаний з ДНК, виділеної принаймні один раз по суті в чистій формі, тобто без забруднюючих ендogenous матеріалів та в кількості чи концентрації, яка дає змогу ідентифікувати, виконувати маніпуляції та відновлювати сегмент і його складові нуклеотидні послідовності за допомогою стандартних біохімічних методів, наприклад, з використанням вектора клонування. Такі сегменти надаються у формі відкритої рамки зчитування, без порушень внутрішніми нетрансльованими послідовностями, чи інтронів, які зазвичай присутні в еукаріотичних генах. Послідовності нетрансльованих ДНК можуть бути присутні за відкритою рамкою зчитування, де вони не заважають маніпуляціям або експресії кодуючих ділянок.

Термін "праймер" означає коротку нуклеїново-кислотну послідовність, котра може бути спарена з одним ланцюгом ДНК та надає вільний 3'ОН-кінець, на якому ДНК-полімераза починає синтез дезоксирибонуклеотидного ланцюга.

Термін "промотор" означає ділянку ДНК, яка бере участь у зв'язуванні РНК-полімерази для ініціації транскрипції.

Термін "виділений" означає, що матеріал видаляється зі свого первісного середовища (наприклад, природного середовища, якщо він має природне походження). Наприклад, існуючий у природі полінуклеотид чи поліпептид, присутній у живих тваринах, не є виділеним, але той самий полінуклеотид чи поліпептид, відокремлений від якихось чи всіх співіснуючих матеріалів в природній системі, є виділеним. В одному аспекті такі полінуклеотиди є часткою вектора, і (або) такі полінуклеотиди чи поліпептиди є частиною композиції і все ж таки є виділеними, якщо такий вектор чи композиція не є частиною свого природного середовища.

Ці полінуклеотиди та рекомбінантні чи імуногенні поліпептиди, розкриті відповідно до цього опису, також можуть бути в "очищеній" формі. Термін "очищений" не вимагає абсолютної чистоти; скоріше він має відносне значення та може включати препарати високого ступеню очищення або препарати, які тільки частково очищені, в тому сенсі, як спеціалісти в цій галузі розуміють такі терміни. Наприклад, окремі клони, виділені з бібліотеки кДНК, були стандартним чином очищені до електрофоретичної однорідності. Очищення вихідного матеріалу чи природного матеріалу принаймні на порядок величини, переважно на два-три порядки, та більш переважно, на чотири-п'ять порядків величини, чітко передбачається в цьому винаході. Крім того, заявлений поліпептид, який має чистоту переважно 99,999, або принаймні 99,99 % чи 99,9 % і навіть бажано 99 % за масою чи більше, також чітко пропонується у винаході.

Нуклеїнові кислоти та поліпептиди як продукти експресії, що розкриваються відповідно до цього опису, а також вектори експресії, які містять такі нуклеїнові кислоти і (або) такі поліпептиди, можуть бути в "збагаченій формі". Термін "збагачений" в тому вигляді, в якому він використовується тут, означає, що концентрація матеріалу принаймні приблизно в 2, 5, 10, 100 або 1000 разів перевищує його природну концентрацію (наприклад), бажано 0,01 %, за масою, переважно принаймні приблизно 0,1 % за масою. Також маються на увазі збагачені препарати приблизно в 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 % та 20 % за масою. Послідовності, конструкції, вектори, клони

та інші матеріали, які складають цей винахід, можуть, що більш сприятливо, бути у збагаченій чи виділений формі. Термін "активний фрагмент" означає фрагмент, зазвичай пептиду, поліпептиду або нуклеїново-кислотної послідовності, що генерує імунну реакцію (тобто має імунотенну активність) при введенні індивідуально чи, необов'язково, з прийнятним ад'ювантом або у векторі, тварині, наприклад, ссавцю, такому як кролик чи миша, і також включаючи людину, до того ж така імунна реакція має вид стимуляції Т-клітинної відповіді у тварини-реципієнта, такої як людина. Альтернативно, "активний фрагмент" також може використовуватись для індукції Т-клітинної відповіді *in vitro*.

В цьому винаході терміни "частка", "сегмент" і "фрагмент", якщо вони використовуються по відношенню до поліпептидів, означають безперервну послідовність залишків, таких як амінокислотні залишки, причому ця послідовність утворює підгрупу більшої послідовності. Наприклад, якщо поліпептид був підданий обробці будь-якою з типових ендопептидаз, таких як трипсин або хімотрипсин, олігопептиди, одержані в результаті такої обробки, будуть представляти частки, сегменти чи фрагменти початкового поліпептиду. Якщо такі терміни використовуються стосовно полінуклеотидів, вони означають продукти, одержані після обробки згаданих полінуклеотидів будь-якою з типових ендонуклеаз.

Відповідно до цього опису, термін "відсоткова ідентичність" або "відсоток ідентичності" відносно послідовності означає, що послідовність порівнюється із заявленою або описаною послідовністю після вирівнювання послідовності, яка порівнюється ("Послідовність, що порівнюється"), з описаною або заявленою послідовністю ("Контрольна послідовність"). Відсоткова ідентичність визначається відповідно до наведеної нижче формули:

$$\text{Відсоткова ідентичність} = 100 [1 - (C/R)]$$

де С – кількість відмінностей між Контрольною послідовністю та Послідовністю, що порівнюється, на довжині вирівнювання між Контрольною послідовністю та Послідовністю, що порівнюється, де

(i) кожна основа чи амінокислота в Контрольній послідовності, котра не має відповідної вирівняної основи чи амінокислоти у Послідовності, що порівнюється, і

(ii) кожний розрив у Контрольній послідовності та

(iii) кожна вирівняна основа чи амінокислота в Контрольній послідовності, котра не має відповідної вирівняної основи чи амінокислоти у Послідовності, що порівнюється, становить відмінність, і

(iv) вирівнювання повинне починатися з позиції 1 вирівняних послідовностей;

і R є числом основ або амінокислот у Контрольній послідовності по довжині вирівнювання з Послідовністю, що порівнюється, причому будь-який розрив, створений у Контрольній послідовності, також вважається основою або амінокислотою.

Якщо існує вирівнювання між Послідовністю, що порівнюється, та Контрольною послідовністю, для якої відсоткова ідентичність, що розрахована вище, є приблизно рівною чи більшою, ніж зазначена мінімальна Відсоткова ідентичність, то Послідовність, що порівнюється, має зазначену мінімальну відсоткову ідентичність до Контрольної послідовності, хоча можуть існувати вирівнювання, в яких розрахована, як описано вище, Відсоткова ідентичність є меншою, ніж зазначена Відсоткова ідентичність.

У цьому описі термін "гомологічний" означає ступінь ідентичності (див. "Відсоткова ідентичність" вище) послідовностей двох амінокислотних послідовностей, тобто пептидних або поліпептидних послідовностей. Згадана вище "гомологія" визначається порівнянням двох послідовностей, що були вирівняні в оптимальних умовах щодо послідовностей, які порівнюються. Таку гомологічність послідовностей можна розрахувати, створивши вирівнювання за допомогою, наприклад, алгоритму ClustalW. Загальнодоступне програмне забезпечення для аналізу послідовностей, більш конкретно, Vector NTI, GENETYX або інші інструменти можна знайти у базах даних у вільному доступі.

Фахівець у цій галузі в змозі оцінити, чи будуть Т-клітини, індуковані варіантом конкретного пептиду, вступати в перехресну реакцію із самим пептидом.

Під терміном "варіант" даної амінокислотної послідовності автори винаходу мають на увазі, що бокові ланцюги, наприклад, одного чи двох амінокислотних залишків змінюються (зокрема, шляхом заміни їх боковим ланцюгом іншого природно існуючого амінокислотного залишку чи якимось іншим боковим ланцюгом) таким чином, що пептид все ще здатний зв'язуватися з молекулою HLA, по суті, у такий же спосіб, як і пептид, що має амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 1. Наприклад, пептид може бути модифікований так, що він буде принаймні зберігати, чи навіть поліпшувати, здатність взаємодіяти та зв'язуватися зі зв'язувальною щільною прийнятною молекулою MHC, такої як HLA-A*02 або -DR, і у такий спосіб принаймні зберігати чи навіть поліпшувати здатність зв'язуватися з ТКР активованих Т-клітин.

Аналогічно, білок ТКР може бути модифікований так, що він буде принаймні зберігати, чи навіть поліпшувати, здатність взаємодіяти та зв'язуватися з прийнятним комплексом KIQEILTQV (SEQ ID NO: 1)/молекула МНС, така як HLA-A*02 або -DR, і у такий спосіб принаймні зберігати чи навіть поліпшувати здатність активувати Т-клітини.

Ці Т-клітини можуть згодом вступати в перехресну реакцію із клітинами і знищувати клітини, які експресують поліпептид, що містить природну амінокислотну послідовність спорідненого пептиду, такого як KIQEILTQV (SEQ ID NO: 1), як визначено в аспектах цього опису. Як можна дізнатися з наукових публікацій і баз даних (Rammensee et al., 1999), окремі позиції пептидів, що зв'язують HLA, є типово якірними залишками, які формують ключову послідовність, що відповідає зв'язувальному мотиву рецептора HLA, який визначається полярністю, електрофізичними, гідрофобними властивостями і просторовою структурою поліпептидних ланцюгів, що утворюють зв'язувальну щілину. В одному аспекті фахівець у цій галузі зможе, виходячи з ідей, викладених у цьому описі, модифікувати амінокислотні послідовності ТКР, зберігаючи відомі якірні залишки, і буде здатний визначити, чи зберігають такі варіанти ТКР здатність зв'язувати комплекси молекули МНС I або II класу/KIQEILTQV (SEQ ID NO: 1). Варіанти ТКР за цим описом зберігають здатність зв'язувати комплекси молекули МНС I або II класу/KIQEILTQV (SEQ ID NO: 1). Т-клітини, які експресують варіанти ТКР за цим описом, можуть згодом знищувати клітини, які експресують поліпептид, що містить природну амінокислотну послідовність спорідненого пептиду, такого як KIQEILTQV (SEQ ID NO: 1).

В одному аспекті пептиди або ТКР, що розкриваються тут, можуть модифікуватися заміщенням одного чи кількох залишків на різних, можливо, селективних, ділянках пептидного ланцюгу, якщо не зазначено інакше. Переважно, щоб ці заміщення знаходилися на кінці амінокислотного ланцюга згаданого пептиду. У випадку ТКР переважно, щоб ці заміщення знаходилися у варіабельних доменах альфа-ланцюга ТКР і бета-ланцюга ТКР. Такі заміщення можуть бути консервативного характеру, наприклад, коли одна амінокислота замінюється амінокислотою подібної структури та характеристик, наприклад, коли гідрофобна амінокислота замінюється іншою гідрофобною амінокислотою. Навіть більш консервативною буде заміна амінокислот такого ж чи подібного розміру та хімічного характеру, наприклад, коли лейцин замінюється на ізолейцин. В дослідженнях варіацій послідовностей в сімействах природних гомологічних білків певні амінокислотні заміщення допускаються частіше, ніж інші, і вони часто демонструють кореляцію зі схожістю за розміром, зарядом, полярністю та гідрофобністю між первісною амінокислотою та її заміною, і це є основою для визначення "консервативних заміщень".

Консервативні заміщення визначаються в цьому документі як обмін в межах однієї з наведених нижче п'яти груп: група 1 – малі аліфатичні, неполярні чи слабо полярні залишки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); група 2 – полярні, негативно заряджені залишки та їх аміді (Asp, Asn, Glu, Gln); група 3 – полярні, позитивно заряджені залишки (His, Arg, Lys); група 4 – великі аліфатичні неполярні залишки (Met, Leu, Ile, Val, Cys); та група 5 – великі ароматичні залишки (Phe, Tyr, Trp).

Менш консервативні заміщення можуть включати заміну однієї амінокислоти іншою, яка має подібні характеристики, але дещо відрізняється за розміром, наприклад, заміна аланіну залишком ізолейцину. Високо-неконсервативні заміни можуть включати заміщення кислотої амінокислоти полярною, або навіть такою, що є основною за своїм характером. Такі "радикальні" заміщення не можуть, однак, відхилятися як потенційно неефективні, оскільки їх хімічні наслідки не є повністю прогнозованими, та радикальні заміщення також можуть несподівано призвести до сприятливих ефектів, які неможливо передбачити за простими хімічними принципами.

В одному аспекті такі заміщення можуть включати структури, що відрізняються від звичайних L-амінокислот. Отже, D-амінокислоти можуть заміщуватися L-амінокислотами, котрі зазвичай виявляються в антигенних пептидах цього опису та все ж охоплюються розкриттям в ньому. Крім того, нестандартні амінокислоти (тобто інші, ніж стандартні амінокислоти природних білків), також можуть використовуватись для заміщення з метою отримання імуногенів та імуногенних поліпептидів відповідно до цього опису.

Якщо виявляється, що заміщення в більш ніж одній позиції приводять до утворення пептиду по суті з еквівалентною чи більшою антигенною активністю, як визначено нижче, тоді комбінації цих заміщень будуть досліджуватись з метою визначення, чи мають комбіновані заміщення додатковий чи синергічний вплив на антигенність пептиду. Як правило, в пептиді замінюються одночасно не більш ніж 4 позиції.

Т-КЛІТИННІ РЕЦЕПТОРИ (ТКР)

У переважному втіленні винахід стосується ТКР, який містить альфа-ланцюг ТКР, наведений у Таблиці 1, і його варіанти; і бета-ланцюг ТКР, наведений у Таблиці 1, і його варіанти. В одному аспекті описаний тут ТКР має здатність зв'язуватися або специфічно зв'язуватися з комплексом молекули головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I класу/KIQEILTQV (SEQ ID NO: 1) або з комплексом молекули II класу/KIQEILTQV (SEQ ID NO: 1).

Таблиця 1

Типові ТКР за цим описом

Ідентифікатор ТКР	Опис	Послідовність
Альфа-ланцюг R10P1A7	альфа-ланцюг	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINC TYTDSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLL NKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAESKETRLMFGDGTQLVVKP NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVY ITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNL LMTLRLWSS (SEQ ID NO: 2)
	L-сегмент (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSR (SEQ ID NO: 3)
	V-ланцюг (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINC TYTDSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLL NKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAES (SEQ ID NO: 4)
	CDR1	DSSSTY (SEQ ID NO: 5)
	CDR2	IFS (SEQ ID NO: 6)
	CDR3	CAESKETRLMF (SEQ ID NO: 7)
	J-сегмент (TRAJ31)	RLMFGDGTQLVVKP (SEQ ID NO: 8)
Бета-ланцюг R10P1A7	Константна ділянка (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVY ITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNL LMTLRLWSS (SEQ ID NO: 9)
	бета-ланцюг	MLLLLLLLGPGISLLPGSLAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSV KIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQG VEKDKFLINHASLTSLTLTVTSAHPEDSSFYICSARAGGHEQFF GPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG FYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLS SRLRVSATFWQNPРНHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO: 10)
	L-сегмент (TRBV20-1)	MLLLLLLLGPGISLLPGSLAGSGL (SEQ ID NO: 11)
	V-ланцюг (TRBV20-1)	MLLLLLLLGPGISLLPGSLAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSV KIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQG VEKDKFLINHASLTSLTLTVTSAHPEDSSFYICSAR (SEQ ID NO: 12)
	CDR1	DFQATT (SEQ ID NO: 13)
	CDR2	SNEGSKA (SEQ ID NO: 14)
	CDR3	CSARAGGHEQFF (SEQ ID NO: 15)
	J-ланцюг (TRBJ2-1)	EQFFGPGTRTLTVL (SEQ ID NO: 16)
	Константна ділянка (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATF WQNPРНHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWG RADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO: 17)

Альфа- і бета-ланцюги альфа/бета ТКР і гамма- і дельта-ланцюги гамма/дельта ТКР взагалі вважаються як такі, кожний із яких має два "домени", а саме варіабельні і константні домени.

Варіабельний домен складається з послідовно розташованих варіабельного сегменту (V) і з'єднувального сегменту (J). Варіабельний домен може також включати лідерний сегмент (L). Бета- і дельта-ланцюги можуть також включати сегмент різноманітності (D). Альфа- і бета-константні домени можуть також містити С-кінцеві трансмембранні (TM) домени, які заякорюють альфа- і бета-ланцюги на клітинній мембрані.

Отже, у цьому описі термін "альфа-варіабельний домен ТКР" означає зчеплення сегменту альфа V (TRAV) ТКР без лідерного сегменту (L), і сегменту альфа J (TRAJ) ТКР, а термін "альфа-константний домен ТКР" означає зовнішньоклітинну частину TRAC або С-кінцеву усічену послідовність TRAC і, необов'язково, трансмембранний домен альфа (VIGFRILLKLVAGFNLLMTL (SEQ ID NO: 18)).

Подібним чином, термін "бета-варіабельний домен ТКР" означає зчеплення сегменту бета V (TRBV) ТКР без лідерного сегменту (L), і сегменту бета D/J (TRBD/TRBJ) ТКР, а термін "бета-константний домен ТКР" означає зовнішньоклітинну частину TRBC або С-кінцеву усічену послідовність TRBC і, необов'язково, трансмембранний домен бета (TILYEILLGKATLYAVLVLSALVL (SEQ ID NO: 19)).

Що стосується гамма/дельта ТКР, термін "гамма-варіабельний домен ТКР" у тому вигляді, в якому він використовується тут, означає зчеплення сегменту гамма V ТКР (TRGV) без лідерного сегменту (L) і сегменту ТКР гамма J (TRGJ), а термін "константний домен ТКР гамма" означає позаклітинний сегмент TRGC або С-кінцеву усічену послідовність TRGC. Подібним чином, термін "дельта-варіабельний домен ТКР" означає зчеплення сегменту ТКР дельта V (TRGV) без лідерного сегменту (L) і сегменту ТКР дельта D/J (TRDD/TRDJ), а термін "константний домен ТКР дельта" означає позаклітинний сегмент TRDC або С-кінцеву усічену послідовність TRDC.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з альфа-ланцюга ТКР, який принаймні на 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний, переважно на 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний альфа-ланцюгу ТКР, наведеному у Таблиці 1. Альфа-ланцюги ТКР, наведені у Таблиці 1, містять лідерний сегмент (L), V-ланцюг, три комплементарні детермінантні групи (CDR1, CDR2 і CDR3), з'єднувальний сегмент (J) і константну ділянку, як визначено у Таблиці 1.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з альфа-варіабельного домену ТКР, який принаймні на 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний, переважно на 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний альфа-варіабельному домену ТКР, наведеному у Таблиці 1.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з альфа-константного домену ТКР, який принаймні на 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний, переважно на 75 % ідентичний альфа-константному домену ТКР, наведеному у Таблиці 1.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з альфа-варіабельного домену ТКР, що містить принаймні одну ділянку альфа-ланцюга, що визначає комплементарність (CDR), вибрану з групи, що складається з CDR1, CDR2 і CDR3 альфа-ланцюга, показаних у Таблиці 1. У переважному втіленні альфа-варіабельний домен ТКР містить CDR3 альфа-ланцюга, показаний у Таблиці 1. В іншому переважному втіленні альфа-варіабельний домен ТКР містить CDR1, CDR2 і CDR3 альфа-ланцюга, показаний у Таблиці 1.

В особливо переважному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з альфа-варіабельного домену ТКР, що має принаймні 90 % ідентичність послідовності до альфа-варіабельного домену ТКР за Таблицею 1 і містить CDR1, CDR2 і CDR3 того ж альфа-варіабельного домену за Таблицею 1.

В одному втіленні ТКР за цим описом містить або складається з бета-ланцюга ТКР, який принаймні на 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний, переважно на 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний бета-ланцюгу ТКР, наведеному у Таблиці 1. Бета-ланцюги ТКР, наведені у Таблиці 1, містять лідерний сегмент (L), V-ланцюг, три комплементарні детермінантні групи (CDR1, CDR2 і CDR3), з'єднувальний сегмент (J) і константну ділянку, як визначено у Таблиці 1.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з бета-варіабельного домену ТКР, який принаймні на 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний, переважно на 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний бета-варіабельному домену ТКР, наведеному у Таблиці 1.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з бета-константного домену ТКР, який принаймні на 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний, переважно на 75 % ідентичний бета-константному домену ТКР, наведеному у Таблиці 1.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з бета-варіабельного домену ТКР, що містить принаймні одну ділянку бета-ланцюга, що визначає комплементарність (CDR), вибрану з групи, що складається з CDR1, CDR2 і CDR3 бета-ланцюга, показаних у Таблиці 1. У переважному втіленні бета-варіабельний домен ТКР містить CDR3 бета-ланцюга, показаний у Таблиці 1. В іншому переважному втіленні бета-варіабельний домен ТКР містить CDR1, CDR2 і CDR3 бета-ланцюга, показаний у Таблиці 1.

В особливо переважному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з бета-варіабельного домену ТКР, що має принаймні 90 % або 95 % ідентичності послідовності до бета-варіабельного домену ТКР за Таблицею 1 і містить CDR1, CDR2 і CDR3 того ж бета-варіабельного домену за Таблицею 1.

Варіабельний домен альфа-ланцюга може містити один або більше доменів CDR-альфа, які мають одну, дві, три або чотири амінокислотні заміни відносно відповідної послідовності CDR, наведеної у Таблиці 1. Подібним чином, варіабельний домен бета-ланцюга може містити один або більше доменів CDR-бета, які мають одну, дві, три або чотири амінокислотні заміни відносно відповідної послідовності CDR-бета, наведеної у Таблиці 1.

Альфа-ланцюг ТКР і бета-ланцюг ТКР можна злити з утворенням одноланцюгового ТКР. Альтернативно, альфа- і бета-ланцюги ТКР можуть експресуватися як окремі білки, які можуть бути зібрані у гетеродимер.

В одному втіленні будь-який альфа-ланцюг ТКР за Таблицею 1 спарюють із будь-яким іншим бета-ланцюгом ТКР з отриманням ТКР, який специфічно зв'язується з комплексом пептид IGF2BP3-001-молекула HLA. В іншому втіленні будь-який бета-ланцюг ТКР за Таблицею 1 спарюють із будь-яким іншим альфа-ланцюгом ТКР з отриманням ТКР, який специфічно зв'язується з комплексом пептид IGF2BP3-001-молекула HLA.

ТКР R10P1A7

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з альфа-ланцюга і (або) бета-ланцюга ТКР R10P1A7, які відповідають послідовностям за SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 10 відповідно.

Альфа-варіабельний домен ТКР R10P1A7 містить або, як альтернатива, складається з амінокислот від 22 до 130 послідовності SEQ ID NO: 2; альфа-константний домен ТКР R10P1A7 містить або, як альтернатива, складається з амінокислот від 131 до 271 послідовності SEQ ID NO: 2; бета-варіабельний домен ТКР R10P1A7 містить або, як альтернатива, складається з амінокислот від 26 до 139 послідовності SEQ ID NO: 10; і бета-константний домен ТКР містить або, як альтернатива, складається з амінокислот від 140 до 318 послідовності SEQ ID NO: 10.

В одному конкретному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з альфа-ланцюга ТКР, який принаймні на 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний, переважно на 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний альфа-ланцюгу ТКР з послідовністю SEQ ID NO: 2.

В іншому втіленні ТКР за цим винаходом містить альфа-варіабельний домен ТКР, який принаймні на 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний, переважно на 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний альфа-варіабельному домену ТКР з послідовністю SEQ ID NO: 2.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить або складається з альфа-константного домену ТКР, який принаймні на 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний, переважно на 75 % ідентичний альфа-константному домену ТКР з послідовністю SEQ ID NO: 2.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить альфа-варіабельний домен ТКР, що містить принаймні одну ділянку альфа-ланцюга, що визначає комплементарність (CDR), вибрану з групи, що складається з CDR1, CDR2 і CDR3 альфа-ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 2. У переважному втіленні альфа-варіабельний домен ТКР містить CDR3 альфа-ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 2. У іншому переважному втіленні альфа-варіабельний домен ТКР містить CDR1, CDR2 і CDR3 альфа-ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 2.

В особливо переважному втіленні ТКР за цим винаходом містить альфа-варіабельний домен ТКР, що має принаймні 90 % ідентичності послідовності до альфа-варіабельного домену ТКР з послідовністю SEQ ID NO: 2 і містить CDR1, CDR2 і CDR3 з послідовністю SEQ ID NO: 2.

В іншому конкретному втіленні ТКР за цим винаходом містить бета-ланцюг ТКР, який принаймні на 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний, переважно на 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний бета-ланцюгу ТКР з послідовністю SEQ ID NO: 10.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить бета-варіабельний домен ТКР, який принаймні на 75 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %

ідентичний, переважно на 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний бета-варіабельному домену ТКР з послідовністю SEQ ID NO: 10.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить бета-константний домен ТКР, який
 5 ідентичний, переважно на 75 % ідентичний бета-константному домену ТКР з послідовністю SEQ ID NO: 10.

В одному втіленні ТКР за цим винаходом містить бета-варіабельний домен ТКР, що містить
 10 принаймні одну ділянку бета-ланцюга, що визначає комплементарність (CDR), вибрану з групи, що складається з CDR1, CDR2 і CDR3 бета-ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 10. У переважному втіленні бета-варіабельний домен ТКР містить CDR3 бета-ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 10. У іншому переважному втіленні бета-варіабельний домен ТКР містить CDR1, CDR2 і CDR3 бета-ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 10.

В особливо переважному втіленні ТКР за цим винаходом містить бета-варіабельний домен
 15 ТКР, що має принаймні 90 % ідентичність послідовності до бета-варіабельного домену ТКР з послідовністю SEQ ID NO: 10 і містить CDR1, CDR2 і CDR3 з послідовністю SEQ ID NO: 10.

Варіабельний домен альфа-ланцюга може містити один або більше доменів CDR-альфа, які
 20 мають одну, дві, три або чотири амінокислотні заміни відносно відповідної послідовності CDR з SEQ ID NO: 2. Подібним чином, варіабельний домен бета-ланцюга може містити один або більше CDR доменів бета-ланцюга, які мають одну, дві, три або чотири амінокислотні заміни відносно відповідної послідовності CDR-бета з послідовністю SEQ ID NO: 10.

У ще одному переважному втіленні ТКР за цим винаходом специфічно зв'язуються з
 25 комплексом пептид IGF2BP3-молекула HLA, де пептид IGF2BP3 вибраний із KIQEILTQV (SEQ ID NO: 1) і його варіантів. В одному втіленні молекулою MHC I класу є молекула HLA, вибрана з групи, що складається з молекул HLA-A, HLA-B і HLA-C. В одному втіленні молекулою HLA є HLA-A*02. В іншому втіленні молекулою MHC II класу є молекула HLA, вибрана з групи, що складається з молекул HLA-DP, HLA-DQ і HLA-DR.

ТКР за цим описом переважно зв'язуються з комплексом пептид IGF2BP3-молекула HLA зі
 30 спорідненістю (K_D) приблизно 100 мкМ або менше, приблизно 50 мкМ або менше, приблизно 25 мкМ або менше, або приблизно 10 мкМ або менше. Більш переважними є високоафінні ТКР, які мають спорідненості приблизно 1 мкМ або менше, приблизно 100 нМ або менше, приблизно 50 нМ або менше, приблизно 25 нМ або менше. Приклади, що не мають обмежувального характеру, переважних діапазонів спорідненості для ТКР за цим винаходом включають від приблизно 1 нМ до приблизно 10 нМ, від приблизно 10 нМ до приблизно 20 нМ, від приблизно 20 нМ до приблизно 30 нМ, від приблизно 30 нМ до приблизно 40 нМ, від приблизно 40 нМ до
 35 приблизно 50 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 60 нМ, від приблизно 60 нМ до приблизно 70 нМ, від приблизно 70 нМ до приблизно 80 нМ, від приблизно 80 нМ до приблизно 90 нМ, від приблизно 90 нМ до приблизно 100 нМ.

В тому виді, в якому він використовується тут, у зв'язку з ТКР за цим описом, "специфічне
 40 зв'язування" та його граматичні варіанти використовуються для позначення ТКР, що має спорідненість (K_D) для комплексу пептид IGF2BP3-молекула HLA 100 мкМ або менше.

Альфа/бета гетеродимерні ТКР за цим винаходом можуть мати введені дисульфідні зв'язки
 45 між їх константними доменами. Переважними ТКР цього типу включають такі, що мають послідовність константних доменів TRAC і послідовність константних доменів TRBC1 або TRBC2, за винятком того, що Thr 48 послідовності TRAC і Ser 57 послідовності TRBC1 або TRBC2 замінені залишками цистеїну, причому згадані цистеїни утворюють дисульфідний зв'язок між послідовністю константних доменів TRAC і послідовністю константних доменів TRBC1 або TRBC2 Т-клітинного рецептору.

З введенням згаданим вище міжланцюговим зв'язком або без нього, альфа/бета
 50 гетеродимерні ТКР за цим описом можуть мати послідовність константних доменів TRAC і послідовність константних доменів TRBC1 або TRBC2, а послідовність константних доменів TRAC і послідовність константних доменів TRBC1 або TRBC2 Т-клітинного рецептору можуть бути з'єднані природним дисульфідним зв'язком між Cys4 екзону 2 у TRAC і Cys2 екзону 2 у TRBC1 або TRBC2.

ТКР за цим описом можуть містити детектовану мітку, вибрану з групи, що складається з
 55 радіонукліду, флуорофору і біотину. ТКР за цим описом можуть бути кон'юговані з терапевтично активною речовиною, такою як радіонуклід, хіміотерапевтичний препарат або токсин.

У одному втіленні ТКР за цим винаходом, що має принаймні одну мутацію в альфа-ланцюгу і (або) має принаймні одну мутацію у бета-ланцюгу, має модифіковане глікозилювання у порівнянні з немутованим ТКР.

У одному втіленні ТКР, що містить принаймні одну мутацію в альфа-ланцюгу і (або) у бета-ланцюгу ТКР, має спорідненість до і (або) напівперіод зв'язування з комплексом пептид IGF2BP3-молекула HLA, які принаймні вдвічі вище таких для ТКР, що містить немутований альфа-ланцюг ТКР і (або) немутований бета-ланцюг ТКР. Підсилення афінності пухлинно-специфічних ТКР та її застосування ґрунтується на існуванні "вікна" для оптимальної афінності ТКР. Існування такого вікна базується на спостереженнях, що ТКР, специфічні до патогенів, рестрикованих за молекулами HLA-A2, мають значення KD, які, як правило, приблизно у 10 разів нижчі, якщо їх порівняти з ТКР, специфічних до "своїх" власних антигенів (аутоантигенів), рестрикованих за молекулами HLA-A2 (Aleksic et al. 2012; Kunert et al. 2013). Зараз відомо, що хоча пухлинні антигени мають потенціал ставати імуногенними, оскільки пухлини виникають із власних клітин індивіда, тільки мутовані білки або білки зі зміненою трансляційною модифікацією будуть сприйматися імунною системою як чужорідні. Антигени, які мають підвищену активність або надмірно експресуються (так звані аутоантигени), зовсім необов'язково викликають функціональну імунну відповідь на пухлину. Т-клітини, що експресують ТКР, які є високоактивними по відношенню до цих антигенів, будуть піддаватися негативному відбору у тимусі у процесі, відомому як центральна толерантність (Xing et al. 2012; Ruella et al. 2014; Sharpe et al. 2015), що означає, що залишаться лише Т-клітини з низькоафінними ТКР до аутоантигенів. Таким чином, афінність ТКР або їх варіантів за цим описом до пептиду IGF2BP3 можна підвищити методами, добре відомими фахівцям у цій галузі.

"Фармацевтична композиція" є композицією, прийнятною для введення людині у медичній установі. Переважно, фармацевтична композиція є стерильною і виробляється відповідно до вимог належної виробничої практики (GMP).

Фармацевтичні композиції за цим описом також включають принаймні одну клітину-хазяїн, яка експресує ТКР за цим описом, у фармацевтично прийнятному носії.

Фармацевтичні композиції за цим описом можуть також включати фармацевтично прийнятні допоміжні речовини і (або) стабілізатори.

Ця композиція може застосовуватися для парентерального введення, наприклад, підшкірного, внутрішньошкірного, внутрішньом'язового або для перорального застосування. Для цього пептиди і необов'язково інші молекули розчиняють або суспендують у фармацевтично прийнятному, переважно водному носії. Крім того, композиція може містити допоміжні речовини, такі як буфери, зв'язувальні агенти, баластні речовини, розріджувачі, ароматизатори, антифрикційні речовини тощо. Великий перелік допоміжних речовин, які можна використовувати у такій композиції, можна знайти, наприклад, у посібнику A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000). Ця композиція може застосовуватися для попередження, профілактики і (або) лікування аденоматозних або ракових захворювань. Приклади фармацевтичних композицій наведені, наприклад, у EP2112253, включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

Згідно з ще одним аспектом опису пропонуються нуклеїнові кислоти (наприклад, полінуклеотиди), що кодують пептид, варіанти пептиду, ТКР і варіанти ТКР за описом. Полінуклеотид може бути, наприклад, ДНК, кДНК, ПНК, СНК, РНК чи їх комбінацією, як одноланцюговою, так і (або) дволанцюговою, або природними чи стабілізованими формами полінуклеотидів, такими як, наприклад, полінуклеотиди з фосфоротіоатним скелетом; він може містити або не містити інтрони, за умови, що він кодує пептид. Звичайно, що тільки пептиди, що містять природно існуючі амінокислотні залишки, з'єднані природно існуючими пептидними зв'язками, можуть бути кодовані полінуклеотидом. Згідно з ще одним аспектом цього опису, пропонується вектор експресії, здатний експресувати поліпептид відповідно до опису.

Було розроблено багато способів зв'язування полінуклеотидів, особливо ДНК, з векторами, наприклад, за допомогою комплементарних липких кінців. Наприклад, можуть бути додані комплементарні гомополімерні хвости до сегменту ДНК, щоб бути вставленими у вектор ДНК. Цей вектор і сегмент ДНК потім з'єднують водневим зв'язком між комплементарними гомополімерними хвостами з утворенням молекул рекомбінантної ДНК.

Синтетичні лінкери, що містять один або більше сайтів рестрикції, забезпечують альтернативний спосіб об'єднання фрагментів ДНК у вектори. Синтетичні лінкери, що містять різноманітні сайти впізнавання рестрикційних ендонуклеаз, комерційно доступні у декількох джерелах, включаючи компанію International Biotechnologies Inc., Нью Хейвен, Коннектикут, США.

У бажаному методі модифікації ДНК, що кодує поліпептид за описом, використовується полімеразна ланцюгова реакція, як це розкрито у роботі Saiki RK і співавт... (Saiki et al., 1988). Цей метод може використовуватися для введення цієї ДНК у відповідний вектор, наприклад, шляхом створення відповідних сайтів рестрикції, або його можна застосовувати для модифікації

ДНК у інший прийнятний спосіб, відомий фахівцям у цій галузі. Якщо використовуються вірусні вектори, переважними є вектори на основі поксвірусу або аденовірусу.

Згідно з одним аспектом винаходу, для отримання Т-клітин, що експресують ТКР за цим описом, нуклеїнові кислоти, які кодують ТКР-альфа і (або) ТКР-бета ланцюги за цим винаходом, клонують у вектори експресії, такі як гамма-ретровірус або лентівірус. Рекомбінантні віруси отримують, а потім перевіряють на функціональність, таку як специфічність до антигену і функціональну авідність. Аліквоту кінцевого продукту після цього використовують для трансдукції цільової популяції Т-клітин (як правило очищених від МКПК пацієнта), яку культивують перед введенням пацієнту.

У іншому аспекті, з метою отримання Т-клітин, які експресують ТКР за цим описом, синтезують РНК ТКР за методиками, відомими фахівцям у цій галузі, наприклад, використанням систем транскрипції *in vitro*. Синтезовані *in vitro* РНК ТКР потім вводять у первинні CD8+ Т-клітини, отримані від здорових донорів електропорацією для повторної експресії альфа- і (або) бета-ланцюгів ТКР, специфічних для пухлини.

Ланцюги ТКР, введені у периферичні Т-клітини, конкурують із ендегенними ланцюгами ТКР за асоціацію з CD3-комплексом, що необхідно для поверхневої експресії ТКР. Оскільки високий рівень поверхневої експресії ТКР є суттєвим для забезпечення належної специфічності для ініціювання клітинами, які експресують пухлинний антиген-мішень (Cooper et al., 2000; Labrecque et al., 2001), стратегії, які підвищують рівні генної експресії ТКР-альфа і ТКР-бета, є важливим міркуванням у генній терапії Т-клітинними рецепторами.

Для підвищення рівня експресії нуклеїнові кислоти, що кодують ТКР за цим описом, можна функціонально зв'язати з потужними промоторами, такими як довгі кінцеві повтори ретровірусу (LTR), цитомегаловірусу (CMV), вірусу стовбурових клітин мишей (MSCV) U3, фосфогліцераткіназа (PGK), бета-актин, убіквітин і композиційний промотор мавпячого вірусу 40 (SV40)/CD43 (Cooper et al., 2004; Jones et al., 2009), фактор елонгації (EF)-1a (Tsuji et al., 2005) і промотор вірусу некрозу селезінки (SFFV) (Joseph et al., 2008). У переважному втіленні промотор є гетерологічним по відношенню до нуклеїнової кислоти, що експресується.

На додаток до сильних промоторів, касети експресії ТКР за цим описом можуть містити додаткові елементи, які можуть посилити трансгенну експресію, включаючи центральний поліпуриновий тракт (сРРТ), який сприяє ядерній транслокації лентівірусних конструкцій (Follenzi et al., 2000), посттранскрипційний регуляторний елемент вірусу гепатиту американських байбаків (wPRE), який підвищує рівень трансгенної експресії шляхом підвищення стабільності РНК (Zufferey et al., 1999).

Альфа- і бета-ланцюги ТКР за цим винаходом можуть кодуватися нуклеїновими кислотами, розташованими у різних векторах, або кодуватися полінуклеотидами, розташованими у одному і тому ж векторі.

Щоб досягти високого рівня поверхневої експресії ТКР, необхідно, щоб як альфа-, так і бета-ланцюги ТКР введеного ТКР транскрибувалися на високому рівні. Щоб досягти цього, альфа- і бета-ланцюги ТКР за цим описом можуть бути клоновані у біцистронні конструкції в одному векторі, які, як було показано, здатні подолати цю перешкоду. Використання ділянки внутрішньої посадки рибосоми вірусу (IRES) між альфа- і бета-ланцюгами ТКР приводить до координованої експресії обох ланцюгів, оскільки альфа- і бета-ланцюги ТКР утворюються з одного транскрипту, який розділяється на два білки в ході трансляції, забезпечуючи утворення рівних молярних співвідношень альфа- і бета-ланцюгів ТКР (Schmitt et al. 2009).

Нуклеїнові кислоти, що кодують ТКР за цим описом, можуть бути кодон-оптимізовані для підвищення рівня експресії клітиною-хазяїном. Надмірність генетичного коду дозволяє деяким кислотам кодуватися більш ніж одним кодоном, але певні кодони є менш "оптимальними" ніж інші внаслідок відносної наявності відповідних тРНК, а також інших факторів (Gustafsson et al., 2004). Як було показано, модифікація послідовностей генів альфа- і бета-ланцюгів ТКР таким чином, щоб кожна амінокислота кодувалася оптимальним кодоном для експресії генів у ссавців, а також видалення мотивів нестабільності іРНК або прихованих сайтів сплайсингу, значно підвищує експресію генів альфа- і бета-ланцюгів ТКР (Scholten et al., 2006).

Крім того, порушення парування між введеними і ендегенними ланцюгами ТКР може привести до набуття таких видів специфічності, які становлять значний ризик для аутоімунності. Наприклад, утворення суміші димерів ТКР може знизити кількість молекул CD3, що доступні для утворення належним чином спарених комплексів ТКР, і у такий спосіб може значно зменшити функціональну авідність клітин, які експресують введені ТКР (Kuball et al., 2007).

Для зменшення порушень парування, С-кінцевий домен ланцюгів введеного ТКР за цим описом можна модифікувати, щоб підвищити взаємодію між ланцюгами, у той же час зменшити здатність введених ланцюгів утворювати пари з ендегенним ТКР. Ці підходи можуть включати

заміну С-кінцевих доменів альфа- і бета-ланцюгів ТКР їх мишачими двійниками (наближений до мишачого С-кінцевий домен), утворюючи другий міжланцюговий дисульфідний зв'язок у С-кінцевому домені шляхом введення другого залишку цистеїну як у альфа-ланцюги ТКР, так і у бета-ланцюги ТКР введеного ТКР (цистеїнова модифікація); перестановку взаємодіючих залишків С-кінцевих доменів альфа- і бета-ланцюгів ТКР ("виступ-у-западину") і злиття варіабельних доменів альфа- і бета-ланцюгів ТКР безпосередньо з CD3 ζ (злиття CD3 ζ). (Schmitt et al. 2009).

Ця ДНК (або, у випадку ретровірусного вектора, РНК) може потім експресуватися у відповідному організмі-хазяїні, утворюючи поліпептид, що містить пептид або чи його варіант за описом. Таким чином, ДНК, яка кодує пептид чи його варіант за описом, може використовуватися відповідно до відомих методик, належним чином модифікованих виходячи з ідей, розкритих у цьому описі, для конструювання вектора експресії, який після цього використовується для трансформації відповідних клітин-хазяїв таким чином, щоб вони набули здатність експресувати і виробляти пептиди за описом. Ці методики включають такі, що розкриті, наприклад, у патентах США 4 440 859, 4 530 901, 4 582 800, 4 677 063, 4 678 751, 4 704 362, 4 710 463, 4 757 006, 4 766 075 і 4 810 648, які включені в цей документ шляхом посилання.

Ця ДНК (або, у випадку ретровірусного вектора, РНК), яка кодує поліпептид, що є предметом цього опису, може бути з'єднана з широким спектром інших послідовностей ДНК для введення у відповідну клітину-хазяїна. Ця супутня ДНК буде залежати від природи хазяїна, способу представлення ДНК хазяїну, і від того, необхідне утримання в епісомальній чи інтегрованій формі.

Зазвичай ДНК вставляється у вектор експресії, такий як плазміда, у належній орієнтації і коректній рамці зчитування для експресії. Якщо необхідно, ДНК може бути зв'язаною з відповідними нуклеотидними послідовностями, що забезпечують координацію транскрипції і трансляції, що розпізнаються бажаним хазяїном, хоча такі контрольні елементи зазвичай містяться у векторі експресії. Вектор згодом вводиться хазяїну із використанням стандартних методик. Загалом, не всі хазяї трансформуються вектором. Отже, необхідно виділити трансформовані клітини-хазяї. Одна з методик виділення включає введення до складу вектора експресії такої послідовності ДНК із будь-якими необхідними контрольними елементами, яка кодує вибрану ознаку у трансформованій клітині, таку як резистентність до антибіотиків.

Як альтернатива, ген для такої вибраної ознаки може бути вбудованим в інший вектор, який використовується для спільної трансформації бажаної клітини-хазяїна.

Клітини-хазяї, які були трансформовані рекомбінантною РНК за описом, потім культивують протягом достатнього періоду часу у відповідних умовах, які відомі фахівцям в цій галузі з точки зору ідей, розкритих тут, з метою дати можливість експресувати поліпептид, який потім може бути виділений.

Фахівцям відомі багато експресійних систем, включаючи бактерії (наприклад, *E. coli* і *Bacillus subtilis*), дріжджі (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*), міцеліальні гриби (наприклад, *Aspergillus* spec.), клітини рослин, тварин і комах. Переважно, система може бути клітинами ссавців, таких як клітини CHO, які комерційно доступні від Американської колекції типових культур ATCC.

У одному втіленні клітина-хазяїн отримана методами генної інженерії з метою експресувати ТКР за цим описом. У переважних втіленнях клітина-хазяїн є Т-клітиною людини або попередником Т-клітини людини. У деяких втіленнях Т-клітина або попередник Т-клітини отримані від хворого на рак пацієнта. У інших втіленнях Т-клітина або попередник Т-клітини отримані від здорового донора. Клітини-хазяї за цим описом можуть бути алогенними або аутологічними по відношенню до пацієнта, якого належить лікувати. У одному втіленні клітиною-хазяїном є гамма/дельта Т-клітина, трансформована для експресії альфа/бета ТКР.

Типова векторна плазміда клітин ссавців для конститутивної експресії включає вірус CMV або промотор SV40 з відповідним поліаденільним хвостом poly(A)-tail і маркером резистентності, таким є неоміцин. Одним із прикладів є pSVL, доступний від компанії Pharmacia, Піскатеуей, Нью-Джерсі, США. Прикладом вектора індукційної експресії у ссавців є pMSG, також доступний від компанії Pharmacia. Корисними є плазмідні вектори дріжджів pRS403–406 і pRS413–416, які доступні від компанії Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, Каліфорнія 92037, США. Плазмідні вектори pRS403, pRS404, pRS405 і pRS406 є дріжджовими інтегруючими плазмідами (YIp) і включають дріжджові селективні маркери HIS3, TRP1, LEU2 і URA3. Плазмідні вектори pRS413–416 є дріжджовими плазмідами з центромерами (Ycp). Вектори на базі промотору CMV (наприклад, від компанії Sigma-Aldrich) забезпечують тимчасову або стабільну експресію, цитоплазматичну експресію або секрецію і N-термінальне або С-термінальне мічення для різних комбінацій FLAG, 3xFLAG, с-тус або MAT. Ці злиті білки можна використовувати для

виявлення, очищення і аналізу рекомбінантного білка. Злиття з використанням двох міток забезпечує гнучкість під час виявлення.

Сильна регуляторна область промотора цитомегаловірусу (CMV) людини підвищує рівні конститутивної експресії білка у клітинах лінії COS до таких високих значень, як 1 мг/л. У разі не таких активних ліній клітин рівні білка зазвичай становлять ~0,1 мг/л. Присутність ділянки початку реплікації у фрагменті SV40 приводить до високих рівнів реплікації ДНК у пермісивних клітинах COS. Вектори CMV, наприклад, можуть містити рMB1 (похідне рBR322) ділянку початку реплікації у клітинах бактерій, ген бета-лактамази для вибору резистентності бактерій до ампіциліну, poly(A) гормону росту людини і ділянку початку реплікації f1. Вектори, що містять лідерну послідовність препротрипсину (PPT), можуть направляти секрецію злитих білків FLAG в культуральному середовищі на очищення антитіл проти FLAG, смол і планшетів. Інші вектори і експресійні системи також добре відомі у цій галузі для використанні у багатьох клітинах-хазяїнах.

В іншому втіленні два або більше пептидів або варіантів пептидів за описом кодуються і, отже, експресуються послідовно (подібно до конструкцій "вузли на мотузці"). При цьому пептиди або варіанти пептидів можуть бути зв'язані або злиті одне з одним фрагментами лінкерних амінокислотних послідовностей, такими, наприклад, як LLLLLL, або можуть зв'язатися без будь-яких додаткових пептидів між ними. Ці структури можуть також застосовуватися для терапії раку і можуть індукувати імунну відповідь за участі як молекул МНС I класу, так і МНС II класу.

Цей опис також стосується клітини-хазяїна, трансформованої полінуклеотидною векторною конструкцією за описом. Клітина-хазяїн може бути або прокариотичною, або еукаріотичною. Бактеріальні клітини можуть бути переважно прокариотичними клітинами-хазяїнами у деяких обставинах, а зазвичай це штам *E. coli*, такий як, наприклад, штам DH5 *E. coli*, доступний від компанії Bethesda Research Laboratories Inc., Бетесда, Меріленд, США, і RR1, доступний від Американської колекції типових культур ATCC, Роквіл, Меріленд, США (Номер ATCC 31343). Переважні еукаріотичні клітини-хазяї включають клітини дріжджів, комах і ссавців, переважно клітини хребетних, такі як лінії фібробластів і клітин товстої кишки від мишей, щурів, мавп або людини. Дріжджові клітини-хазяї включають YPH499, YPH500 і YPH501, які зазвичай доступні від компанії Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, 92037, Каліфорнія, США. Переважні клітини-хазяї ссавців включають клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), доступні як штам ATCC CCL61, клітини ембріонів швейцарської миші штаму NIH/3T3, доступні з колекції ATCC CRL 1658, клітини COS-1 з нирок мавп, доступні з колекції ATCC CRL 1650 і клітини 293 нирок ембріонів людини. Переважними клітинами комах є клітини Sf9, що можуть бути трансфеговані бакуловірусними векторами експресії. Огляд публікацій щодо вибору відповідних клітин-хазяїв для експресії можна знайти, наприклад, у підручнику: Paulina Balbás and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, і інших літературних джерелах, відомих фахівцю у цій галузі.

Трансформація відповідних клітин-хазяїв за допомогою ДНК-конструкції за цим описом здійснюється добре відомими методами, вибір яких, як правило, залежить від типу вектора, що використовується. Щодо трансформації прокариотичних клітин-хазяїв див., наприклад, Cohen et al. (Cohen et al., 1972) і (Green and Sambrook, 2012). Трансформація дріжджових клітин описана в роботі Sherman et al. (Sherman et al., 1986). Метод Бігса (Beggs, 1978) також є корисним. Щодо клітин хребетних, реагенти, придатні для трансфекції таких клітин, наприклад, фосфат кальцію і ДЕАЕ-декстран або ліпосомні препарати, доступні від компанії Stratagene Cloning Systems, або Life Technologies Inc., Гейтерсберг, Меріленд 20877, США. Електропорація також придатна для трансформації і (або) трансфекції клітин і відома в цій галузі як метод трансформації клітин дріжджів, клітин бактерій, клітин комах і клітин хребетних.

Успішно трансформовані клітини, тобто клітини, що містять ДНК-конструкцію за цим описом, можуть бути ідентифіковані добре відомими методами, такими як ПЛР. Альтернативно, присутність білка у супернатанті можна виявити за допомогою антитіл.

Зрозуміло, що певні клітини-хазяї за описом здатні синтезувати пептиди за описом, наприклад, клітини бактерій, дріжджів і комах. Проте в певних терапевтичних методах можуть використовуватися інші клітини-хазяї. Наприклад, антиген-презентуючі клітини, такі як дендритні клітини, можуть принагідно використовуватися, щоби експресувати пептиди за описом, які можуть бути навантажені на відповідні молекули МНС. Отже, цей опис також стосується клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту або вектор експресії за цим описом.

У переважному втіленні клітина-хазяїн є антиген-презентуючою клітиною, зокрема дендритною клітиною або антиген-презентуючою клітиною. Управління з контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами (FDA) США 29 квітня 2010 року схвалило

застосування АПК, навантажених рекомбінантним злитим білком, що містить простатичну кислоту фосфатазу (PAP), для лікування метастатичного HRPC (гормон-рефрактерного раку передміхурової залози), що протікає безсимптомно або з мінімально вираженими симптомами (сіпулейцел-Т) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

5 Згідно з ще одним аспектом опису пропонується спосіб отримання пептиду або його варіанта, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна і виділення пептиду з клітини-хазяїна або її культурального середовища.

В іншому втіленні білки ТКР, нуклеїнова кислота або вектор експресії за описом застосовуються у медицині. Наприклад, пептид або його варіант може бути приготований для
10 внутрішньовенного (в/в) введення, підшкірного (п/ш) введення, внутрішньошкірного (в/ш) введення, внутрішньочеревного (в/ч) введення, внутрішньом'язового (в/м) введення. Переважні способи введення пептиду – це п/ш, в/ш, в/ч, в/м і в/в. Переважними способами введення ДНК є в/ш, в/м, п/ш, в/ч і в/в. Можуть вводитись дози, наприклад, від 50 мкг до 1,5 мг, переважно від 125 мкг до 500 мкг пептиду або ДНК залежно від відповідного пептиду чи ДНК. Дози в цьому
15 діапазоні успішно використовувались в попередніх дослідженнях (Walter et al., 2012).

Полінуклеотид, що застосовується для активної вакцинації, може бути по суті чистим або включеним в належний вектор чи в систему доставки. Нуклеїнова кислота може бути, наприклад, ДНК, кДНК, ПНК, РНК чи їхньою комбінацією. Методи конструювання і введення такої нуклеїнової кислоти добре відомі фахівцям в цій галузі. Їх огляд наведений, наприклад, у
20 роботі Teufel et al. (Teufel et al., 2005). Полінуклеотидні вакцини легко приготувати, але механізм дії цих векторів у виникненні імунної відповіді повністю не з'ясований. Прийнятні векторні системи і системи доставки включають вірусну ДНК і (або) РНК, такі як системи на базі аденовірусу, вірусу коров'ячої віспи, ретровірусу, вірусу герпесу, аденоасоційованого вірусу або гібридів, що містять елементи більш ніж одного вірусу. Невірусні системи доставки включають
25 катіонні ліпіди та катіонні полімери, добре відомі в галузі засобів доставки ДНК. Також може використовуватись фізична доставка, наприклад, за допомогою "генної гармати". Пептид або пептиди, що кодуються нуклеїновою кислотою, може (можуть) бути злитим білком, наприклад, з епітопом, що стимулює Т-клітини щодо відповідних протилежних CDR, як відзначається вище.

Цей опис також стосується аптамерів. Аптамери (див., наприклад, WO 2014/191359 і
30 посилання, наведені в цій роботі) є молекулами коротких одноланцюгових нуклеїнових кислот, які можуть складатися у певні тривимірні структури і розпізнавати специфічні структури-мішені. Вони, очевидно, є прийнятними альтернативами для розробки таргетної терапії. Було показано, що аптамери селективно зв'язуються з багатьма складними мішенями з високою афінністю і специфічністю.

35 Аптамери, що розпізнають розташовані на поверхні молекули, були ідентифіковані у минулому десятиріччі і забезпечують засоби для розробки діагностичних і терапевтичних підходів. Оскільки було показано, що аптамери майже не проявляють жодної токсичності і імуногенності, вони є перспективними кандидатами у речовини для біомедичних застосувань. Справді, аптамери, наприклад, такі, що розпізнають простат-специфічні мембранні антигени,
40 були успішно застосовані для таргетної терапії, і було показано, що вони виявляють ці функції в трансплантатних моделях in vivo. Більш того, були ідентифіковані аптамери, які розпізнають конкретні лінії пухлинних клітин.

Можуть бути вибрані аптамери ДНК, що проявляють розпізнавальні властивості широкого спектру по відношенню до різних ракових клітин, особливо до таких, що отримані з солідних пухлин, у той час як непухлинногенні і первинні здорові клітини ними не розпізнаються. Якщо
45 ідентифіковані аптамери розпізнають не тільки підтип конкретної пухлини, але скоріше взаємодіють з рядом пухлин, це надає аптамерам властивість бути застосовними в якості так званих діагностичних і терапевтичних засобів широкого спектру.

Далі, дослідження зв'язувальних властивостей по відношенню до клітин методом проточної
50 цитометрії показало, що аптамери виявляють дуже добру позірну афінність, яка знаходиться у наномольному діапазоні.

Аптамери можуть використовуватися для діагностичних і терапевтичних цілей. В одному аспекті принаймні один або декілька аптамерів поглинаються пухлинними клітинами і таким чином можуть використовуватися як молекулярні носії для цілеспрямованої доставки
55 протиракових препаратів, таких як міПНК, у пухлинні клітини.

Можуть бути вибрані аптамери проти складних мішеней, таких як клітини і тканини і комплекси пептидів або ТКР, що включають, переважно що складаються з послідовності відповідно до будь якої послідовності від SEQ ID NO 14 до SEQ ID NO 15 за цим описом із молекулою МНС з використанням методики SELEX (Систематична еволюція лігандів шляхом експоненційного збагачення).
60

В одному з втілень пропонується спосіб отримання ТКР, як описано у цьому документі, де згаданий спосіб включає культивування клітини-хазяїна, здатної експресувати ТКР за умов, прийнятних для сприяння експресії цих ТКР.

Цей винахід також стосується способу ідентифікації і виділення ТКР відповідно до цього опису, причому згаданий спосіб включає інкубування МКПК, отриманих у HLA-A*02-негативних здорових донорів, із A2/мономерами IGF2BP3, інкубування МКПК з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу ідентифікації і виділення ТКР відповідно до цього опису, причому згаданий спосіб включає інкубування МКПК, отриманих у HLA-A*02-негативних здорових донорів, із A2/p286-1Y2L мономерами, інкубування МКПК з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу ідентифікації і виділення ТКР відповідно до цього опису, причому згаданий спосіб включає інкубування МКПК, отриманих у HLA-A*02-негативних здорових донорів, із A2/p286-1Y2L9L мономерами, інкубування МКПК з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу ідентифікації і виділення ТКР відповідно до цього опису, де згаданий спосіб включає отримання трансгенної миші з цілими локусами гена людини ТКР $\alpha\beta$ (1,1 і 0,7 млн. п. н.), Т-клітини якої експресують широкий спектр ТКР людини, які компенсують дефіцит ТКР у миші, імунізацію миші IGF2BP3-001, інкубування МКПК, отриманих від трансгенної миші, з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу ідентифікації і виділення ТКР відповідно до цього опису, де згаданий спосіб включає отримання трансгенної миші з цілими локусами генів людини ТКР $\alpha\beta$ (1,1 і 0,7 млн. п. н.), Т-клітини якої експресують широкий спектр ТКР людини, які компенсують дефіцит ТКР у миші, імунізацію миші p286-1Y2L, інкубування МКПК, отриманих від трансгенної миші, з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу ідентифікації і виділення ТКР відповідно до цього опису, де згаданий спосіб включає отримання трансгенної миші з цілими локусами генів людини ТКР $\alpha\beta$ (1,1 і 0,7 млн. п. н.), Т-клітини якої експресують широкий спектр ТКР людини, які компенсують дефіцит ТКР у миші, імунізацію миші p286-1Y2L9L, інкубування МКПК, отриманих від трансгенної миші, з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу за цим описом, де Т-клітина містить вектор експресії, що здатний експресувати ТКР А за цим описом.

Цей опис також стосується способу знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого аберантно експресують IGF2BP3, причому спосіб включає введення пацієнту ефективною кількістю ТКР, розчинних ТКР і (або) Т-клітин за цим описом.

Цей опис також стосується застосування будь-якого ТКР, що описаний тут, нуклеїнової кислоти за цим описом, вектора експресії за цим описом, клітини за цим описом або активованого цитотоксичного Т-лімфоцита за цим описом як лікарського засобу або в процесі виробництва лікарського засобу. Цей опис також стосується застосування за цим описом, де лікарський засіб виявляє протиракову активність.

Цей опис також стосується застосування за цим описом, де згадані ракові клітини є клітинами недрібноклітинного раку легенів або клітинами інших солідних або гематологічних пухлин, таких як недрібноклітинний рак легенів, дрібноклітинний рак легенів, нирковоклітинний рак, рак головного мозку, рак шлунка, колоректальний рак, гепатоцелюлярний рак, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, лейкоз, рак молочної залози, карцинома з клітин Меркеля, меланома, рак яєчника, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура і жовчних протоків і рак стравоходу.

Цей опис також стосується способу знищення ракових клітин, що включає контактування ракових клітин із клітиною-хазяїном за цим описом. У одному втіленні клітина-хазяїн експресує ТКР за цим описом. У одному втіленні клітина-хазяїн є Т-клитиною або попередником Т-клітини. У одному втіленні У переважному втіленні ракові клітини вибрані з клітин недрібноклітинного раку легенів або клітин інших солідних або гематологічних пухлин, таких як недрібноклітинний рак легенів, дрібноклітинний рак легенів, нирковоклітинний рак, рак головного мозку, рак шлунка, колоректальний рак, гепатоцелюлярний рак, рак підшлункової залози, рак

передміхурової залози, лейкоз, рак молочної залози, карцинома з клітин Меркеля, меланома, рак яєчника, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура і жовчних протоків і рак стравоходу. У деяких втіленнях ТКР є кон'югованим із терапевтично активною речовиною. У певних втіленнях терапевтично активна речовина вибрана з групи, що складається з

5 радіонукліду, хіміотерапевтичного препарату і токсину.
Цей винахід також стосується способу лікування раку, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, клітини-хазяїна за цим винаходом. У одному втіленні клітина-хазяїн експресує ТКР за цим описом. У одному втіленні клітина-хазяїн є Т-клітиною або попередником Т-клітини. У одному втіленні клітина-хазяїн є аутологічною відносно суб'єкта, якого належить лікувати. У

10 одному втіленні клітина-хазяїн є алогенною відносно суб'єкта, якого належить лікувати. У переважному втіленні ракові клітини вибрані з клітин недрібноклітинного раку легенів або клітин інших солідних або гематологічних пухлин, таких як недрібноклітинний рак легенів, дрібноклітинний рак легенів, нирковоклітинний рак, рак головного мозку, рак шлунка, колоректальний рак, гепатоцелюлярний рак, рак підшлункової залози, рак передміхурової

15 залози, лейкоз, рак молочної залози, карцинома з клітин Меркеля, меланома, рак яєчника, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура і жовчних протоків і рак стравоходу.

У деяких втіленнях ТКР є кон'югованим із терапевтично активною речовиною. У цьому документі термін "терапевтично активна речовина" означає сполуку, яка застосовується для лікування або попередження захворювання або небажаного медичного стану. У одному втіленні

20 терапевтично активна речовина застосовується для лікування або попередження раку. У певних втіленнях терапевтично активна речовина вибрана з групи, що складається з радіонукліду, хіміотерапевтичного препарату і токсину.

ТКР, нуклеїнові кислоти і клітини-хазяї за цим описом та їх фармацевтичні композиції можуть вводитися суб'єкту, який цього потребує, шляхом, відомим фахівцям у цій галузі, і може змінюватися залежно від виду раку, який належить лікувати. Шляхи введення включають,

25 наприклад, місцеве введення (таке як внутрішньопухлинне) і парентеральне введення, таке як підшкірне, внутрішньочеревне, внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньопортальне і внутрішньопечінкове. У переважному втіленні ТКР, нуклеїнові кислоти або клітини-хазяї за цим описом або їх фармацевтичні композиції вводяться суб'єкту місцевою інфузією, наприклад з

30 використанням інфузійного насоса і (або) через систему катетерів у ділянку, яку належить лікувати, таку як солідну пухлину. У одному втіленні композицію за цим винаходом вводять інфузією в солідну пухлину, кровоносну судину, яка живить солідну пухлину, і (або) ділянку, яка оточує солідну пухлину.

У переважному втіленні композиції за цим винаходом вводять суб'єкту з використанням

35 схеми дозування із щонайменше двох введень, які розділяють щонайменше 24 години. Схеми дозування, прийнятні для введення композицій за цим описом, включають, наприклад, один раз на день, один раз на два дні і один раз на три дні. Більш переважні схеми дозування включають один раз на тиждень, два рази на тиждень, один раз на два тижні, один раз на місяць і два рази на місяць. У конкретних втіленнях використовується режим з ескалацією дози, коли серію

40 зростаючих доз вводять суб'єкту протягом періоду часу, який складає дні, тижні або місяці.

Ефективні дози клітин-хазяїв, які експресують ТКР за цим винаходом, включають, наприклад, принаймні близько 10^4 , принаймні близько 10^5 , принаймні близько 10^6 , принаймні близько 10^7 , принаймні близько 10^8 , принаймні близько 10^9 і принаймні 10^{10} клітин-хазяїв на дозу. У одному втіленні клітини-хазяї за цим винаходом вводять у дозі між приблизно 10^4 і

45 приблизно 10^{10} клітин на дозу, переважно у дозі між приблизно 10^5 і приблизно 10^9 клітин на дозу. У переважних втіленнях дози вводять за схемою дозування протягом курсу, що складається принаймні двох або більше циклів дозування.

Цей винахід також стосується способу лікування раку, який включає введення ТКР, нуклеїнової кислоти або клітини-хазяїна за цим описом у комбінації з принаймні одним

50 хіміотерапевтичним препаратом і (або) променевою терапією.

Також пропонується спосіб лікування раку у суб'єкта, який цього потребує, який включає:

а) виділення клітини з організму згаданого суб'єкта;

б) трансформацію клітини принаймні одним вектором, який кодує ТКР за цим описом для отримання трансформованої клітини;

55 в) культивування трансформованої клітини для отримання великої кількості трансформованих клітин; і

г) введення великої кількості трансформованих клітин згаданому суб'єкту.

Також пропонується спосіб лікування раку у суб'єкта, який цього потребує, який включає:

а) виділення клітини з організму здорового донора;

б) трансформація клітини вектором, який кодує ТКР за цим описом для отримання трансформованої клітини;

в) культивування трансформованої клітини для отримання великої кількості трансформованих клітин; і

5 г) введення великої кількості трансформованих клітин згаданому суб'єкту.

Також пропонується спосіб виявлення раку у біологічному зразку, який включає:

а) контактування біологічного зразка з ТКР за цим описом;

б) виявлення зв'язування ТКР із біологічним зразком.

У деяких втіленнях спосіб виявлення раку здійснюється *in vitro*, *in vivo* або *in situ*.

10 Цей опис також стосується конкретних маркерних білків і біомаркерів на основі пептидів за цим описом, які у цьому документі іменуватимуться як "мішені", які можуть використовуватися в діагностиці і (або) визначенні прогнозу перебігу недрібноклітинного раку легенів. Цей опис також стосується застосування цих нових мішеней для лікування раку.

У ще одному аспекті цей опис стосується способу отримання розчинного Т-клітинного рецептора (рТКР), що розпізнає конкретний комплекс пептиду і МНС. Такі розчинні Т-клітинні рецептори можуть бути отримані зі специфічних клонів Т-клітин, і їх спорідненість можна підвищити мутагенезом, націленим на ділянки, що визначають комплементарність. З метою вибору Т-клітинних рецепторів може використовуватися метод фагового дисплея (Заявка США 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). З метою стабілізації Т-клітинних рецепторів у процесі фагового дисплея і у разі застосування як лікарського препарату альфа- і бета-ланцюги можуть буди зв'язані, наприклад ненативними дисульфідними зв'язками або іншими ковалентними зв'язками (одноланцюговий Т-клітинний рецептор) або доменами димеризації (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). Т-клітинний рецептор може бути зв'язаний з токсинами, лікарськими препаратами, цитокінами (див., наприклад, заявку США 2013/0115191), або доменами, що залучають ефекторні клітини, такі як домени антитіл проти CD3 тощо, щоб виконувати конкретні функції на клітинах-мішенях. В іншому аспекті він експресується у Т-клітинах, що використовуються для адоптивного переносу. (Див., наприклад, WO 2004/033685A1, WO 2004/074322A1, і WO 2013/057586A1, вміст яких включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті).

30 Крім того, пептиди і (або) ТКР, або антитіла, або інші зв'язувальні молекули за цим описом можуть використовуватися для підтвердження діагнозу "рак", поставленому патоморфологом на основі дослідження біоптату.

Ці антитіла або ТКР можуть використовуватися також для діагностики *in vivo*. Зазвичай антитіла або ТКР мітять радіонуклідами (такими як ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P або ^{35}S), щоб пухлину можна було локалізувати, використовуючи імуноскінтіграфію. В одному з втілень антитіла або їх фрагменти зв'язуються з зовнішньоклітинними доменами двох або більше таких мішеней білка, вибраного з групи, що складається з вищезгаданих білків, із константою зв'язування (Kd) меншою ніж 1×10 мкМ.

Антитіла або ТКР для діагностичного застосування можна мітити зондами, що підходять для виявлення різними методами візуалізації. Методи виявлення зондів включають, але не обмежуються ними, флуоресценцію, світлову, конфокальну і електронну мікроскопію, магнітно-резонансну візуалізацію і спектроскопію, флуороскопію, комп'ютерну томографію та позитронну емісійну томографію. Відповідні зонди включають, але не обмежуються ними, флуоресцеїн, родамін, еозин та інші флуорофори, радіоізотопи, золото, гадоліній та інші лантаноїди, парамагнітне залізо, фтор-18 та інші радіонукліди, що випромінюють позитрони. Крім цього, зонди можуть бути бі- або багатофункціональними і виявлятися більш ніж одним із зазначених методів. Ці антитіла і (або) ТКР можуть бути безпосередньо або опосередковано мічені вищезгаданими зондами. Прикріплення зондів до антитіл і (або) ТКР включає ковалентне зв'язування зонда, включення зонда в антитіло або ТКР і ковалентне прикріплення хелатуючої сполуки для зв'язування зонда, серед інших методів, добре відомих фахівцю у цій галузі. У разі імуногістохімічних методів зразок хворої тканини може бути свіжим чи замороженим або може бути залитим у парафін і фіксованим за допомогою консерванту, такого як формалін. Фіксовані або залиті зразки зрізів тканин приводять у контакт із міченим первинним антитілом і вторинним антитілом, де антитіло використовується для виявлення експресії цих білків *in situ*.

55 ПРИКЛАДИ

Алореактивну відповідь можна використати для уникання ауто толерантності і отримання Т-клітин з вищою авідністю у порівнянні з Т-клітинами аутологічного походження, тобто від аутологічних пацієнтів. Приклади таких умов включають отримання *in vitro* ало-HLA-реактивних пептид-специфічних Т-клітин (Sadovnikova et al. 1998; Savage et al. 2004; Wilde et al. 2012) та імунізацію мишей, трансгенних для МНС або ТКР людини (Stanislawski et al. 2001; Li et al. 2010).

Приклад 1

Отримання *in vitro* ало-HLA реактивних, пептид-специфічних Т-клітин (Savage et al. 2004)

Використовувалися МКПК від HLA-A*02-позитивних і HLA-A*02-негативних здорових донорів після отримання від них інформованої згоди. Мономери біотинільованих рекомбінантних молекул HLA-A2 I класу та A2-флуоресцентні тетрамери, що містять IGF2BP3-001, були отримані у MBLI (Вуберн, Массачусетс, США). МКПК інкубували з антитілами проти CD20SA, розведеними забуференим фосфатами фізіологічним розчином (PBS) протягом 1 години за кімнатної температури, промивали і інкубували з біотинільованими мономерами A2/IGF2BP3-001 протягом 30 хвилин за кімнатної температури, промивали і висаджували в концентрації 3×10^6 клітин/лунку на 24-лункові планшети з середовищем RPMI, у яке додана 10 % АВ-сироватка людини. Інтерлейкін 7 (ІЛ-7, R&D Systems, Міннеаполіс, Міннесота, США) додавали у день 1 у концентрації 10 нг/мл, та у день 4 додавали 10 Од/мл ІЛ-2 (Chiron, Херфілд, Велика Британія). Протягом 5 тижнів клітини щотижнево рестимулювали свіжими МКПК, змішували з клітинами-респондерами у співвідношенні 1:1 і висаджували на 24-лункові планшети у концентрації 3×10^6 /клітину.

Для отримання високоавідних Т-клітин інкубували приблизно 10^6 МКПК з HLA-A2/IGF2BP3-001-тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) (отриманим у MBLI) протягом 30 хвилин за температури 37 °С, з наступним інкубуванням з антитілами до CD8-флуоресцеїнізотіоціанату (FITC)/алофікоціаніну (APC) на протязі 20 хвилин за температури 4 °С, яке супроводжувалося флуоресцентним сортуванням клітин (FACS) і аналізом на аналізаторі Calibur. Сортування проводили на приладі FACS-Vantage (Becton Dickinson, Коулі, Оксфорд, Велика Британія). Сортвані тетрамер-позитивні клітини висівали на 24-лункові планшети з використанням на кожну лунку 2×10^5 сортваних клітин, 2×10^6 опромінених A2-негативних МКПК як живильних клітин, 2×10^4 CD3/CD28 мікрогранул/мл (DynaI, Осло, Норвегія) та ІЛ-2 (1000 Од/мл). Отримані таким чином високоавідні Т-клітини були згодом використані для ідентифікації та виділення ТКР з використанням методів, добре відомих фахівцям у цій галузі, таким як метод 5' RACE для одиничних клітин (швидка ампліфікація кінців кДНК). Ненадлишкові ДНК рецепторів ТКР згодом аналізувалися з метою визначення послідовностей амінокислот/ДНК і клонування у вектори експресії з використанням методів, добре відомих фахівцям у цій галузі.

Приклад 2. Клонування ТКР

Методи клонування ТКР відомі в цій галузі., наприклад описані у патенті США 8519100, вміст якого що стосується згаданих методів таким чином включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті. Олігонуклеотид A1 (ggaattccatgatgagtcacaaggagaagaagatcc SEQ ID NO: 22), специфічний для послідовності варіабельної ділянки альфа-ланцюга, який кодує сайт рестрикції NdeI, введений метіонін для ефективного ініціювання експресії у бактерій, і олігонуклеотид A2 (ttgtcagtcgacttagagctctcagctggtacacg SEQ ID NO: 23), специфічний для послідовності константної ділянки альфа-ланцюга, який кодує сайт рестрикції Sall, використовуються для ампліфікації варіабельної ділянки альфа-ланцюга. У випадку бета-ланцюга для ампліфікації варіабельної ділянки бета-ланцюга використовуються специфічний для послідовності варіабельної ділянки бета-ланцюга олігонуклеотид B1 (tctctcatatggatgggtgaattactcaatcccca SEQ ID NO: 24), який кодує сайт рестрикції NdeI, введений метіонін для ефективного ініціювання експресії у бактерій, і олігонуклеотид B2 (tagaaaccgggtggccaggcacaccagtggtggc SEQ ID NO: 25), специфічний для послідовності константної ділянки бета-ланцюга, який кодує сайт рестрикції AgeI.

Послідовності ДНК, які кодують продукт розщеплення альфа-ланцюга ТКР за допомогою NdeI і Sall, лігували у вектор pGMT7+С α , який розщеплювали за допомогою NdeI і XhoI. Послідовності ДНК, які кодують продукт розщеплення бета-ланцюга ТКР за допомогою NdeI і AgeI, лігували в окремий вектор pGMT7+С β , який також розщеплювали за допомогою NdeI і AgeI. Отримані в результаті лігування плазмід трансформують у компетентний штам *Escherichia coli* XL1-blue і висівають на чашки з агаром Лурія-Бертані, які містять 100 мкг/мл ампіциліну. Після інкубації протягом ночі за температури 37° С поодинокі колонії збирають і вирощують в 10 мл агару Лурія-Бертані, який містить 100 мкг/мл ампіциліну, протягом ночі за температури 37° С зі струшуванням. Клоновані плазмід очищають за допомогою набору Miniprep (Qiagen), і вставки секвенують на автоматичному секвенаторі ДНК (Lark Technologies).

ТКР R10P1A7, який кодує пухлиноспецифічні альфа-ланцюги ТКР і бета-ланцюги ТКР, виділяли і ампліфікували із Т-клітин здорових донорів. Клітини, отримані від здорових донорів, стимулювали *in vitro* відповідно до методу, описаному Walter і співавт. 2003. Специфічні до мішені клітини піддавали одиничному клітинному сортуванню з використанням специфічних до мішені мультимерів з наступним виділенням ТКР. Послідовності ТКР виділяли шляхом реакцій 5' RACE стандартними методами, описаними, наприклад у лабораторному посібнику Green and

Sambrook "Molecular Cloning", четверте видання. ТКР R10P1A7 виділяли із зразків, отриманих від HLA-A2-негативного донора. Секвенували варіабельні ділянки альфа та бета ТКР R20P1H7, R7P1D5 і R10P2G12.

Було визначено, що альфа-варіабельний домен ТКР R10P1A7 має амінокислотну послідовність, яка відповідає залишкам 22–130 послідовності SEQ ID NO: 2. Було визначено, що бета-варіабельний домен ТКР R10P1A7 має амінокислотну послідовність, яка відповідає залишкам 26–139 послідовності SEQ ID NO: 10.

Для отримання бібліотек варіантів ТКР з метою ідентифікувати високоафінні мутанти може використовуватися фаговий дисплей. Методи фагового дисплея ТКР і скринінгу, описані в (Li et al, (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354), можуть бути застосовані до контрольного ТКР, вибраного з описаних у Таблиці 1 ТКР.

Наприклад, усі три ділянки CDR послідовностей альфа-ланцюга SEQ ID NO: 2 і всі три ділянки CDR послідовностей бета-ланцюга SEQ ID NO: 10 можуть служити мішенями для мутагенів, і кожну бібліотеку CDR піддавали панорамуванню і скринінгу окремо.

Відповідно до цього ідентифікуються ТКР зі спорідненостями і (або) напівперіодами зв'язування принаймні вдвічі вищими, ніж у контрольного ТКР (і тому, як мається на увазі, принаймні вдвічі вищими, ніж у природних ТКР).

Гетеродимери ТКР піддають рефолдингу з використанням методу, який включає введені цистеїни у константні ділянки з метою забезпечення утворення штучного міжланцюгового дисульфідного зв'язку. Таким чином отримують ТКР, які складаються з (а) контрольного бета-ланцюга ТКР разом із мутованими альфа-ланцюгами; (б) контрольного альфа-ланцюга ТКР разом із мутованими бета-ланцюгами і (в) різними комбінаціями бета- і альфа-ланцюгів, що містять мутантні варіабельні домени.

Взаємодію між високоафінними розчинними ТКР, зшитими дисульфідним зв'язком, і варіантами ТКР, і комплексом природного пептиду KIQEILTQV (SEQ ID NO: 1) з молекулою HLA можна проаналізувати за допомогою методу BIAcore.

Високоавідні варіанти ТКР можна також вибрати з бібліотеки мутантних CDR дріжджовим або Т-клітинним дисплеєм (Holler et al. 2003; Chervin et al. 2008). Отже, кандидати у варіанти ТКР забезпечують настанову для конструювання мутацій CDR Т-клітинних рецепторів для одержання високоавідних варіантів ТКР (Robbins et al. 2008; Zoete et al. 2007).

Приклад 3. Генетична інженерія аутологічних Т-клітин

Т-клітини отримують методами генетичної інженерії з метою експресії високоавідних ТКР (так звані лікарські препарати ТКР) або отримані злиттям білків химерні антигенні рецептори (CAR), які мають підвищену специфічність до антигена комплексу молекула МНС I класу/IGF2BP3-001 або комплексу молекула МНС II класу/IGF2BP3-001. В одному аспекті цей підхід знімає деякі обмеження, асоційовані з центральною і периферичною толерантністю і генерує Т-клітини, які є ефективнішими для націлювання на пухлини без необхідності активації Т-клітин пацієнта *de novo*.

В одному аспекті для отримання Т-клітин, що експресують ТКР за цим описом, нуклеїнові кислоти, які кодують ідентифіковані та виділені пухлиноспецифічні ТКР-альфа і (або) ТКР-бета ланцюги як описано у Прикладах 1-2, клонують у вектори експресії, такі як гамма-ретровірус або лентівірус. Реконбінантні віруси отримують, а потім перевіряють на функціональність, таку як специфічність до антигену і функціональну авідність. Аліквоту кінцевого продукту після цього використовують для трансдукції цільової популяції Т-клітин (як правило очищених від МКПК пацієнта), яку культивують перед введенням пацієнту.

У іншому аспекті, з метою отримання Т-клітин, які експресують ТКР за цим описом, синтезували РНК ТКР за методиками, відомими фахівцям у цій галузі, наприклад, використанням систем транскрипції *in vitro*. Синтезовані *in vitro* РНК ТКР потім вводять у первинні CD8+ Т-клітини, отримані від здорових донорів, електропорацією для повторної експресії альфа- і (або) бета-ланцюгів ТКР, специфічних для пухлини.

Для перевірки наявності функціональної експресії екзогенних ТКР на клітинній поверхні трансформованих Т-клітин була використана методика забарвлювання тетрамером для виявлення Т-клітин, зв'язаних із МНС/IGF2BP3-001. Як показано на Фіг. 5 і у Таблиці 2, вищий відсоток популяції CD3-позитивних специфічних Т-клітин, тобто 6,78 %, спостерігався для CD8+Т-клітин, які експресують ТКР, за результатами барвлення флуоресцентно міченими тетрамерами МНС/IGF2BP3-001, ніж тетрамерами МНС/неспоріднений пептид (наприклад NYESO1-001), наприклад 1,53 %, або контролем з імітацією, наприклад 1,73 %. Як контроль, первинні CD8+Т-клітини, трансформовані контрольним ТКР, ТКР 1G4, щодо якого відомо, що він специфічно зв'язується з комплексом МНС/NYESO1-001, легко виявлявся тетрамером МНС/NYESO1-001, тобто 17,69 %. Ці результати свідчать про те, що ТКР R10P1A7

експресується на поверхні Т-клітин і може специфічно зв'язуватися з комплексом MHC/IGF2BP3-001. Альфа- і бета-ланцюги ТКР 1G4 представлені послідовностями SEQ ID NO: 20 і SEQ ID NO: 21 відповідно:

альфа-ланцюг 1G4 (SEQ ID NO: 20):

5 METLLGLLLILWLQLQWVSSKQEVTPAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTS
LLLIQSSQREQTSGRNLASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPY
IQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNK
SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRL
WSS

бета-ланцюг 1G4 (SEQ ID NO: 21):

10 MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGL
RLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLT
VLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKE
QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRAD
15 CGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

Для визначення специфічності та афінності ТКР трансформовані Т-клітин інкубували сумісно з клітинами-мішенями, навантаженими пептидом IGF2BP3-001, або з клітинами-мішенями, навантаженими гомологічним, але не спорідненим пептидом CLUA-001 (SEQ ID NO: 26), CHCHD6-001 (SEQ ID NO: 27), CDC42BPG-001 (SEQ ID NO: 28), PARP14-002 (SEQ ID NO: 29), SYNE2-001 (SEQ ID NO: 30), IFT7-001 (SEQ ID NO: 31), DHRS12-001 (SEQ ID NO: 32), STX12-001 (SEQ ID NO: 33), EEA-001 (SEQ ID NO: 34), SENP7-001 (SEQ ID NO: 35) або контрольним пептидом NYESO1-001 (SEQ ID NO: 36), з наступним аналізом вивільнення ІФН-гамма. Як контролі використовували ненавантажені клітини-мішені і самі лише CD8+Т-клітини. Секреція ІФН-гамма із CD8+Т-клітин є свідченням активації Т-клітин шляхом набуття ними цитотоксичної активності.

Таблиця 2

Код ТКР	Донор/HLA-A2 (+ або -)	ІФН-гамма (пг/мл)	EC50	% IGF2BP3-001- тетармер-позитивних первинних CD8+Т- клітин	% NYESO1-001- тетармер-позитивних первинних CD8+Т- клітин
R10P1A7	HBC-688/(-)	175	~1 нМ	6,78	1,53

Як показано на Фіг. 6, первинні CD8+Т-клітини, у які методом електропорації введена РНК, що кодує ТКР R10P1A7 за цим описом, після сумісної інкубації з клітинами мішенями, навантаженими IGF2BP3-001, вивільняють набагато вищі рівні ІФН-гамма, ніж клітини-мішені, стимульовані контрольним пептидом, і ніж контролі. Аналіз пептиду-мішені титруванням виявив значення EC50, що приблизно дорівнюють 1 нМ (Таблиця 2). Ці результати наводять на думку, що ТКР R10P1A7 за цим винаходом може активувати прояви цитотоксичності Т-клітин, наприклад вивільнення ІФН-гамма, шляхом специфічної взаємодії з комплексом молекула MHC/R10P1A7-001.

Для визначення зв'язувального мотиву рецептора ТКР R10P1A7 для комплексу MHC/IGF2BP3-001 виконували аланінове сканування з метою ідентифікації положень на кожній із 9 амінокислот пептиду IGF2BP3-001-001. Пептиди IGF2BP3-001 із заміщеними аланіном амінокислотами наведені у Таблиці 3.

Таблиця 3

Позиції:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IGF2BP3-001 (SEQ ID NO: 1)	K	I	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A1 (SEQ ID NO: 37)	A	I	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A2 (SEQ ID NO: 38)	K	A	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A3 (SEQ ID NO: 39)	K	I	A	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A4 (SEQ ID NO: 40)	K	I	Q	A	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A5 (SEQ ID NO: 41)	K	I	Q	E	A	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A6 (SEQ ID NO: 42)	K	I	Q	E	I	A	T	Q	V
IGF2BP3-001 A7 (SEQ ID NO: 43)	K	I	Q	E	I	L	A	Q	V
IGF2BP3-001 A8 (SEQ ID NO: 44)	K	I	Q	E	I	L	T	A	V
IGF2BP3-001 A9 (SEQ ID NO: 45)	K	I	Q	E	I	L	T	Q	A

Стисло, CD8+Т-клітини, трансформовані ТКР R10P1A7, інкубували сумісно з клітинами-мішенями, навантаженими пептидами IGF2BP3-001, від IGF2BP3-001-A1 до IGF2BP3-001-A9, або контрольним пептидом NYESO1-001, після чого аналізували вивільнення ІФН-гамма як описано вище.

- 5 Результати ідентифікації позицій у рецепторі ТКР R10P1A7 за допомогою аланінового сканування наведені на Фіг. 7 і зведені у Таблицю 4.

Таблиця 4

ТКР	Позиції у IGF2BP3-001, які забезпечують зв'язування з ТКР
R10P1A7	1, 3–7

- 10 Скринінг усього генома на пептиди, що зв'язують A*02, на ТКР R10P1A7 з ідентичним мотивом не виявив потенційних пептидів, що беруть участь у перехресній реакції. Ці результати означають, що описаний тут ТКР виявляє дуже специфічний характер розпізнавання зі зниженим ризиком позацільових ефектів.

- 15 Для визначення ефективності Т-клітин, які експресують описані тут ТКР, CD8+Т-клітини, у які методом електропорації введена РНК, що кодує ТКР R10P1A7, інкубували сумісно з клітинами різних ліній раку людини, наприклад А-375 (лінія клітин меланоми людини), і Т98G (лінія клітин гліобластоми людини), які є позитивними до HLA-A2 і позитивними до IGF2BP3-001 (мішені), і SK-BR-3 (лінія клітин раку молочної залози людини), яка є негативною до HLA-A2 і негативною до IGF2BP3-001, після чого аналізували вивільнення ІФН-гамма.

- 20 Як показано на Фіг. 8, вивільнення ІФН-гамма спостерігалось як у клітинах А-375, так і у Т98G, які є HLA-A2-позитивними і IGF2BP3-001-позитивними, але не у клітинах SK-BR-3, які виявляють базальні рівні вивільнення ІФН-гамма, подібні до таких у контрольних ефекторних клітинах. Ці результати показують, що Т-клітини, які експресують ТКР R10P1A7, можуть специфічно стимулювати цитотоксичну активність, спрямовану проти ракових клітин у специфічний до комплексу HLA-A2/IGF2BP3-001 спосіб.

- 25 Предметом цього опису є ТКР для лікування раку та інших пухлин, переважно меланоми і гліобластоми, які надмірно чи виключно презентують IGF2BP3-001.

Приклад 5. Генетична інженерія алогенних Т-клітин

- 30 Гамма-дельта (γδ) Т-клітини, які є нетрадиційними ефекторами Т-лімфоцитів, задіяними у першій лінії захисту від патогенів, можуть взаємодіяти з пухлинними клітинами і знищувати їх незалежно від МНС шляхом активації рецепторів, серед інших, ТКР-гамма ланцюгів і ТКР-дельта ланцюгів. Ці γδ-Т-клітини виявляють попередньо активований фенотип, який забезпечує швидку продукцію цитокінів (ІФН-гамма, TNF-альфа) і сильну цитотоксичну відповідь після активації. Ці Т-клітини виявляють протипухлинну активність щодо багатьох видів раку і є свідченням того, що опосередкована γδ Т-клітинами імунотерапія є здійсненою і може викликати об'єктивні протипухлинні відповіді. (Braza et al. 2013).

- 40 Недавні досягнення в галузі іммобілізованих антигенів, агоністичних моноклональних антитіл (мАТ), отриманих із пухлин штучних антиген-презентуючих клітин (штучні АПК) або комбінацій активуючих мАТ і штучних АПК дозволили досягнути успіх у культивуванні гамма-дельта Т-клітин зі спектром олігоклональних або поліклональних ТКР. Наприклад, іммобілізований білок А, пов'язаний із ланцюгом головного комплексу гістосумісності І класу, був стимулом для γδ Т-клітин, які експресують ізотипи ТКР-δ1, а зв'язані на чашках Петрі активувальні антитіла сприяли культивуванню клітин Vδ1 і Vδ2 ex vivo. Клінічно достатні кількості ТКР-δ1, ТКР-δ2 та ТКР-δ1^{нег}ТКР-δ2^{нег} були отримані після сумісного культивування на штучних АПК, і ці підтипи виявляли відмінність у фенотипі пам'яті і реактивності до пухлин in vitro та in vivo. (Deniger et al. 2014).

- 45 Крім того, γδ Т-клітини піддаються генній модифікації, про що свідчить введення альфа- і бета-ланцюгів ТКР (Hiasa et al. 2009). Інший аспект цього опису стосується продукції γδ Т-клітин, що експресують ТКР-альфа і ТКР-бета, які зв'язуються з IGF2BP3-001. Щоб досягти цього, γδ Т-клітини культивують методами, описаними у статті Deniger et al. 2014, з наступною трансдукцією рекомбінантних вірусів, що експресують ТКР, які зв'язуються з IGF2BP3-001 (як описано у Прикладі 3), в γδ Т-клітини після культивування. Трансдуковані вірусом γδ Т-клітини згодом вводять пацієнту.

Приклад 6. Лентівірусні конструкції та аналіз експресії

- 55 Стисло, були створені дві тестові конструкції ("R10"). Ці конструкції були згодом використані для отримання лентівірусних супернатантів з прийнятним титром і продуктивністю. Ці лентівірусні супернатанти згодом використовували для трансдукції первинних Т-клітин (2

донорів) з наступною поверхневою експресією на ТКР, яку на основі зв'язування тетрамерів визначали методом проточної цитометрії.

Таблиця 5А

Лентівірусні конструкції і контроль – відповідні досліджувані донори
(лінії у таблицях відповідають конструкціям)

		Назва	Партія №	p24 (нг/мл) PN	кПЛР НЕК (ПК/мл)	кПЛР SUP T1 (ПК/мл)	Об'єм для досягнення MOI 50 (мкл)
1863R	IGF2 BP3	MSCV-R10P1A7A-2A-R10P1A7B-WPRE	0139-0516-230	35590	7,2E+09	1,3E+10	3,9
1864R		MSCV-R10P1A7B-2A-R10P1A7A-WPRE	0139-0516-231	55724	9,7E+09	1,6E+10	3,2
VSVG-GFP	Конт-роль	EF1a-GFP	0139-0616-250	62176	1,3E+09	8.21E+08	60,9

Донор 1						
Загальна кількість клітин під час пропускання	Життєздатність	% CD3+	% CD3+ тетр.+	% CD4+	% CD8+	% CD8+ тетр.+
126234	99,36%	98,05	2,3	40,75	57,3	3,93
98272	99,08%	97,78	15,15	39,88	57,9	21,99
92038	95,70%	98,81	0,21			0,04

Донор 2						
Загальна кількість клітин під час пропускання	Життєздатність	% CD3+	% CD3+ тетр.+	% CD4+	% CD8+	% CD8+ тетр.+
132888	98,47	97,98	0,99	26,8	69,35	1,79
135418	98,74	98,01	8,12	29,47	71,2	11,72
104276	99,13	98,17	0	27,82	3,59	0,06

5 Список посилань:

1. Adair SJ, Hogan KT (2009). Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules. Cancer Immunol. Immunother. 58, 589-601.

10 2. Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givel JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immuno-logical evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. Cancer Immunol. Immunother. 56, 839-847.

15 3. Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. Cancer Immun. 8, 2.

4. Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 12, 764-771.
5. Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Rugghetti A, Panici PB, Nuti M (2007). Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur. J Cancer* 43, 2621-2627.
6. Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009).
7. Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 27, 899-905.
10. 8. Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA (2005). Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod. Pathol.* 18, 119-126.
9. Coral S, Parisi G, Nicolay HJ, Colizzi F, Danielli R, Fratta E, Covre A, Taverna P, Sigalotti L, Maio M (2013). Immunomodulatory activity of SGI-110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 605-614.
15. 10. Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, Lienard D, Monnier P, Romero P, Bron L, Rimoldi D (2011). Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J Cancer* 128, 2625-2634.
11. Forghanifard MM, Gholamin M, Farshchian M, Moaven O, Memar B, Forghani MN, Dadkhah E, Naseh H, Moghbeli M, Raeisossadati R, Abbaszadegan MR (2011). Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 12, 191-197.
20. 12. Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, Gottschalk SM, Savoldo B, Vera JF, Heslop HE, Brenner MK, Bollard CM, Rooney CM, Leen AM (2011). Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol. Ther.* 19, 2258-2268.
25. 13. Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S (2013). Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery* 154, 1456-1462.
30. 14. Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8055-8062.
15. Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM, Parker AS, Leibovich BC, Jiang Z, Kwon ED (2008). External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 112, 1471-1479.
35. 16. Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de Rakt MW, Figdor CG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol.* 88, 273-280.
17. Kang J, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. *PLoS. ONE.* 10, e0118927.
40. 18. Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 743-750.
19. Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* 109, 568-575.
45. 20. Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 11, 1809-1814.
50. 21. Lifantseva N, Koltsova A, Krylova T, Yakovleva T, Poljanskaya G, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int.* 2011, 795239.
22. Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br. J Dermatol.* 151, 1213-1218.
55. 23. Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* 118, 696-703.

24. Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol.* 27, 1255-1266.
- 5 25. Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, Takano A, Tsunoda T, Kawaguchi Y, Nakamura Y, Fujii H (2008). Detection of novel cancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes, and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*
26. Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnajatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fu-kumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Can-cer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 119, 3097-3104.
- 10 27. Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosenberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* 8, 7.
28. Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* 66, 4693-4700.
- 15 29. Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Chen WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* 219, 223-232.
30. Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J Cancer* 123, 1551-1555.
- 20 31. Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* 26, 1053-1057.
32. Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H (2008). IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* 21, 431-437.
- 25 33. Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
34. Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs*. (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).
- 30 35. Resnick MB, Sabo E, Kondratiev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J Cancer* 101, 190-195.
36. Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 64, 443-449.
- 35 37. Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevogt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* 13, 156.
38. Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 51, 870-880.
- 40 39. Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 5442-5447.
- 45 40. Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 68, 105-110.
41. Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gammacnull mice. *Cancer Sci.* 103, 17-25.
- 50 42. Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* 1, 326-330.
- 55 43. Su C, Xu Y, Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer-testis antigens in stage Ib-IIIa non-small cell lung cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.
44. Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Bühring HJ, Rammensee HG, Stevanović S. (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol.* 171(10), 4974-8
- 60

45. Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping Y, Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Combined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.
- 5 46. Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N (2013). Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434.
- 10 47. Yantiss RK, Cosar E, Fischer AH (2008). Use of IMP3 in identification of carcinoma in fine needle aspiration biopsies of pancreas. *Acta Cytol.* 52, 133-138.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> ТРАНСФЕКОВАНІ Т-КЛІТИНИ ТА Т-КЛІТИННІ РЕЦЕПТОРИ ДЛЯ
ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ

ІМУНОТЕРАПІЇ РАКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

<130> I32956WO

<150> GB1604494.3

<151> 2016-03-16

<150> US 62/308,970

<151> 2016-03-16

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 2

<211> 271

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
1 5 10 15

Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
20 25 30

Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
50 55 60

Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
85 90 95

Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
100 105 110

Ser Lys Glu Thr Arg Leu Met Phe Gly Asp Gly Thr Gln Leu Val Val
115 120 125

Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp
130 135 140

Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser
145 150 155 160

Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp
165 170 175

Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala
 180 185 190
 Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn
 195 200 205
 Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
 210 215 220
 Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu
 225 230 235 240
 Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys
 245 250 255
 Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 260 265 270
 <210> 3
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Asp Cys Met Ser Arg
 20
 <210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
 20 25 30
 Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
 35 40 45
 Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
 50 55 60
 Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
 65 70 75 80
 Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
 85 90 95
 Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
 100 105 110
 Ser

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Ile Phe Ser
 1

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Cys Ala Glu Ser Lys Glu Thr Arg Leu Met Phe
 1 5 10

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Arg Leu Met Phe Gly Asp Gly Thr Gln Leu Val Val Lys Pro
 1 5 10

<210> 9
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
 35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
 85 90 95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
 100 105 110

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
115 120 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
130 135 140

<210> 10
<211> 318
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gly Ile Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

Pro Gly Ser Leu Ala Gly Ser Gly Leu Gly Ala Val Val Ser Gln His
20 25 30

Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly Thr Ser Val Lys Ile Glu Cys
35 40 45

Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met Phe Trp Tyr Arg Gln Phe
50 55 60

Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala Thr Ser Asn Glu Gly Ser Lys
65 70 75 80

Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys Asp Lys Phe Leu Ile Asn His
85 90 95

Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr Val Thr Ser Ala His Pro Glu
100 105 110

Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala Arg Ala Gly Gly His Glu Gln
115 120 125

Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn
130 135 140

Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile
145 150 155 160

Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr
165 170 175

Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His
180 185 190

Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu
195 200 205

Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr
210 215 220

Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr
225 230 235 240

Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val

	245		250		255										
Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe
	260							265					270		
Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr
	275						280					285			
Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala
	290					295					300				
Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly		
305					310					315					
<210> 11															
<211> 25															
<212> PRT															
<213> Homo sapiens															
<400> 11															
Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Gly	Ser	Gly	Leu							
			20					25							
<210> 12															
<211> 122															
<212> PRT															
<213> Homo sapiens															
<400> 12															
Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Pro	Gly	Ser	Leu	Ala	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ser	Gln	His
			20					25					30		
Pro	Ser	Trp	Val	Ile	Cys	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Val	Lys	Ile	Glu	Cys
	35						40					45			
Arg	Ser	Leu	Asp	Phe	Gln	Ala	Thr	Thr	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Phe
	50					55					60				
Pro	Lys	Gln	Ser	Leu	Met	Leu	Met	Ala	Thr	Ser	Asn	Glu	Gly	Ser	Lys
65					70					75				80	
Ala	Thr	Tyr	Glu	Gln	Gly	Val	Glu	Lys	Asp	Lys	Phe	Leu	Ile	Asn	His
			85						90					95	
Ala	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Ala	His	Pro	Glu
			100					105					110		
Asp	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ile	Cys	Ser	Ala	Arg						
	115						120								
<210> 13															
<211> 6															
<212> PRT															
<213> Homo sapiens															

```

<400> 13
Asp Phe Gln Ala Thr Thr
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14
Ser Asn Glu Gly Ser Lys Ala
1 5

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15
Cys Ser Ala Arg Ala Gly Gly His Glu Gln Phe Phe
1 5 10

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16
Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 17
<211> 179
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17
Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
50 55 60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
65 70 75 80

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
85 90 95

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
100 105 110

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
115 120 125

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser

```

130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
145 150 155 160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
165 170 175

Ser Arg Gly

<210> 18
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18
Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu
1 5 10 15

Leu Met Thr Leu
20

<210> 19
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 19
Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
1 5 10 15

Leu Val Ser Ala Leu Val Leu
20

<210> 20
<211> 274
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20
Met Glu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp
1 5 10 15

Val Ser Ser Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val
20 25 30

Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala
35 40 45

Ile Tyr Asn Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr
50 55 60

Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg
65 70 75 80

Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile
85 90 95

Ala Ala Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg
100 105 110

Pro Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser
115 120 125

Leu Ile Val His Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
130 135 140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
145 150 155 160

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
180 185 190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
195 200 205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
210 215 220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
225 230 235 240

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
245 250 255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
260 265 270

Ser Ser

<210> 21

<211> 311

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
1 5 10 15

Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
20 25 30

Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
35 40 45

Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
50 55 60

Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
65 70 75 80

Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
85 90 95

Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser

100	105	110
Ser Tyr Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg		
115	120	125
Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala		
130	135	140
Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr		
145	150	155
Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser		
165	170	175
Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro		
180	185	190
Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu		
195	200	205
Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn		
210	215	220
His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu		
225	230	235
Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu		
245	250	255
Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln		
260	265	270
Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala		
275	280	285
Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val		
290	295	300
Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
305	310	

<210> 22
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 ggaattccat atgagtcaac aaggagaaga agatcc
 36

<210> 23
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 ttgtcagtcg acttagagtc totcagctgg tacacg
 36

<210> 24

<211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 tctctcatat ggatggtgga attactcaat ccccaa
 36

<210> 25
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 tagaaaccgg tggccaggca caccagtgtg gc
 32

<210> 26
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 000
 <210> 27
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 000
 <210> 28
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 000
 <210> 29
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 000
 <210> 30
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 000
 <210> 31
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 000
 <210> 32
 <211> 0
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 000
 <210> 33


```

<211> 0
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 33
000
<210> 34
<211> 0
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 34
000
<210> 35
<211> 0
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 35
000
<210> 36
<211> 0
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 36
000
<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 37
Ala Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1          5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 38
Lys Ala Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1          5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 39
Lys Ile Ala Glu Ile Leu Thr Gln Val
1          5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 40
Lys Ile Gln Ala Ile Leu Thr Gln Val
1          5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT

```

<213> Homo sapiens
<400> 41
Lys Ile Gln Glu Ala Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 42
Lys Ile Gln Glu Ile Ala Thr Gln Val
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 43
Lys Ile Gln Glu Ile Leu Ala Gln Val
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 44
Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Ala Val
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 45
Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Ala
1 5

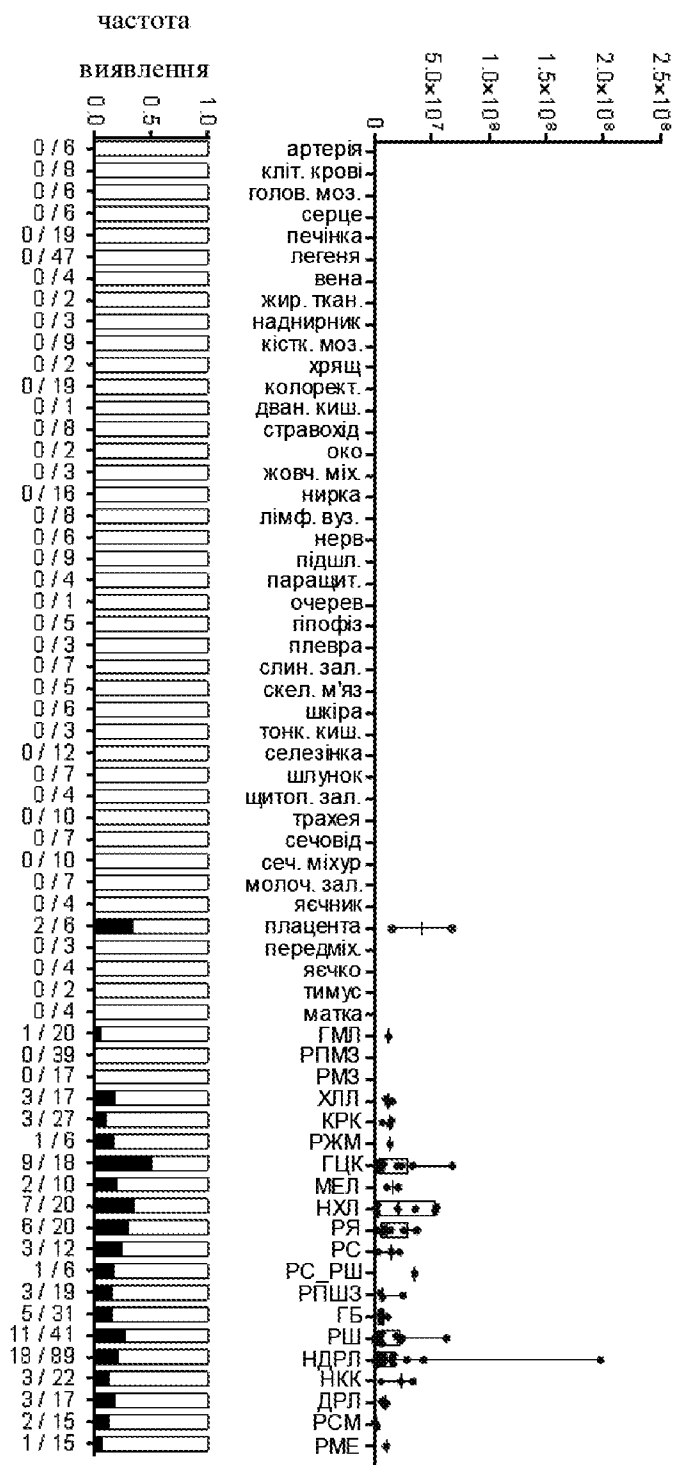
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. ТКР, що містить варіабельний домен альфа ТКР, який містить ділянки, що визначають комплементарність CDR1 відповідно до SEQ ID NO: 5, і CDR3 відповідно до SEQ ID NO: 7; та варіабельний домен бета ТКР, який містить ділянки, що визначають комплементарність CDR1 відповідно до SEQ ID NO: 13, і CDR3 відповідно до SEQ ID NO: 15, і де ТКР специфічно зв'язується з комплексом пептид IGF2BP3-001-молекула МНС, причому пептид IGF2BP3-001 складається з SEQ ID NO: 1.
- 10 2. ТКР за п. 1, у якому варіабельний домен альфа ТКР додатково містить CDR2 відповідно до SEQ ID NO: 6, і варіабельний домен бета ТКР додатково містить CDR2 відповідно до SEQ ID NO: 14.
- 15 3. ТКР за п. 1 або 2, що містить варіабельний домен альфа, ТКР принаймні на 90 % ідентичний з SEQ ID NO: 4, і CDR1 відповідно до SEQ ID NO: 5, CDR2 відповідно до SEQ ID NO: 6, і CDR3 відповідно до SEQ ID NO: 7; та варіабельний домен бета ТКР принаймні на 90 % ідентичний з SEQ ID NO: 12, і CDR1 відповідно до SEQ ID NO: 13, CDR2 відповідно до SEQ ID NO: 14, і CDR3 відповідно до SEQ ID NO: 15.
- 20 4. ТКР за будь-яким з пп. 1-3, який додатково містить константний домен альфа ТКР і константний домен бета ТКР, де константний домен альфа ТКР принаймні на 90 % ідентичний з SEQ ID NO: 9, і константний домен бета ТКР принаймні на 90 % ідентичний з SEQ ID NO: 17.
5. ТКР за будь-яким з пп. 1-4, у якому константний домен альфа містить трансмембранний домен альфа VIGFRILLKLVAGFNLLMTL (SEQ ID NO: 18) і константний домен бета містить трансмембранний домен бета TILYEILLGKATLYAVLVSAVL (SEQ ID NO: 19).

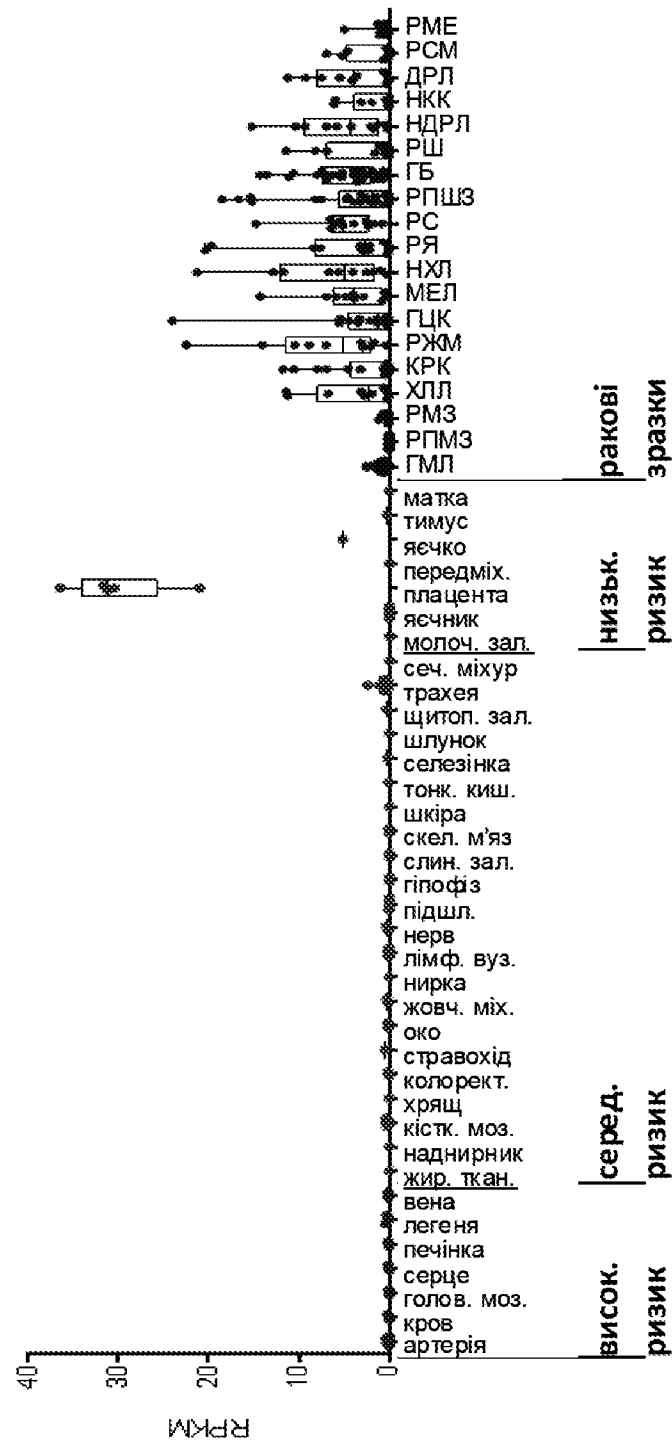
6. ТКР за будь-яким із пп. 1-5, у якому константний домен альфа ТКР складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 9 і константний домен бета ТКР складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 17.
7. ТКР за будь-яким із пп. 1-6, що містить альфа-ланцюг, який містить варіабельний домен альфа ТКР і бета-ланцюг, який містить варіабельний домен бета ТКР.
8. ТКР за будь-яким із пп. 1-7, що містить альфа-ланцюг, який складається з SEQ ID NO: 2, і бета-ланцюг, який складається з SEQ ID NO: 10.
9. ТКР за будь-яким із пп. 1-8, у якому альфа-ланцюг і бета-ланцюг злиті з утворенням одноланцюгового ТКР.
10. ТКР за будь-яким із пп. 1-9, у якому альфа-ланцюг та/або бета-ланцюг містять(ить) детектовану мітку.
11. ТКР за п. 10, у якому детектована мітка вибрана з групи, що складається з радіонукліду, флуорофору і біотину.
12. ТКР за будь-яким із пп. 1-11, у якому альфа-ланцюг та/або бета-ланцюг кон'юговані(ий) з терапевтично активною речовиною.
13. ТКР за п. 12, у якому терапевтично активна речовина вибрана з групи, що складається з радіонукліду, хіміотерапевтичного препарату і токсину.
14. ТКР, що містить гамма-ланцюг і дельта-ланцюг, де гамма-ланцюг містить ділянки, що визначають комплементарність CDR1 відповідно до SEQ ID NO: 5, CDR2 відповідно до SEQ ID NO: 6 і CDR3 відповідно до SEQ ID NO: 7; та дельта-ланцюг ТКР містить ділянки, що визначають комплементарність CDR1 відповідно до SEQ ID NO: 13, CDR2 відповідно до SEQ ID NO: 14 і CDR3 відповідно до SEQ ID NO: 15, і де ТКР специфічно зв'язується з комплексом пептид IGF2BP3-001-молекула MHC, причому пептид IGF2BP3-001 складається з SEQ ID NO: 1.
15. ТКР за будь-яким із пп. 1-14, у якому молекула MHC є молекулою HLA I класу або молекулою HLA II класу.
16. Нуклеїнова кислота, яка кодує альфа-ланцюг та/або бета-ланцюг ТКР за будь-яким із пп. 1-13 або гамма-ланцюг та/або дельта-ланцюг ТКР за п. 14.
17. Вектор експресії, що містить нуклеїнову кислоту за п. 16, функціонально зв'язану з принаймні однією послідовністю промотору.
18. Клітина-хазяїн, трансформована вектором експресії за п. 17.
19. Клітина-хазяїн за п. 18, яка є Т-клітиною або попередником Т-клітини.
20. Клітина-хазяїн за п. 19, де Т-клітина або попередник Т-клітини отримані від хворого на рак пацієнта.
21. Клітина-хазяїн за п. 19, де Т-клітина або попередник Т-клітини отримані від здорового донора.
22. Фармацевтична композиція, яка містить принаймні один активний компонент, вибраний з групи, що включає: ТКР за будь-яким із пп. 1-15, нуклеїнову кислоту за п. 16, вектор експресії за п. 17 та клітину-хазяїна за будь-яким із пп. 18-21, і фармацевтично прийнятний носій.
23. Фармацевтична композиція за п. 22, яка додатково містить фармацевтично прийнятні допоміжні речовини та/або стабілізатори.
24. Спосіб отримання ТКР, який специфічно зв'язується з пептидом з послідовністю SEQ ID NO: 1, якщо він презентується молекулою MHC, причому згаданий спосіб включає культивування клітини-хазяїна за будь-яким із пп. 18-21 за умов, прийнятних для сприяння експресії ТКР.
25. Спосіб лікування раку, який експресує IGF2BP3, що включає введення суб'єкту, який цього потребує, ТКР за будь-яким із пп. 1-15, нуклеїнової кислоти за п. 16, вектора експресії за п. 17, клітини-хазяїна за будь-яким із пп. 18-21 та/або фармацевтичної композиції за п. 22 або 23.
26. Спосіб за п. 25, де ТКР експресується на поверхні клітини-хазяїна.
27. Спосіб за п. 25, де клітина-хазяїн вибрана з групи, що складається з Т-клітини або попередника Т-клітини.
28. Спосіб за п. 27, де Т-клітина або попередник Т-клітини є аутологічними.
29. Спосіб за п. 27, де Т-клітина або попередник Т-клітини є алогенними.
30. Спосіб за п. 25, де ТКР кон'югований з терапевтично активною речовиною.
31. Спосіб за п. 30, де терапевтично активна речовина вибрана з групи, що складається з радіонукліду, хіміотерапевтичного препарату та токсину.
32. Спосіб за будь-яким із пп. 25-31, де хвороба на рак є недрібноклітинним раком легенів, дрібноклітинним раком легенів, нирковоклітинним раком, раком головного мозку, раком шлунка, колоректальним раком, гепатоцелюлярним раком, раком голови та шиї, раком підшлункової залози, раком передміхурової залози, лейкозом, раком молочної залози, карциномою з клітин Меркеля, меланомою, раком яєчника, раком сечового міхура, раком матки, раком жовчного міхура і жовчних протоків, раком стравоходу або їхньою комбінацією.

33. Спосіб за будь-яким із пп. 25-32, що додатково включає введення суб'єкту принаймні одного хіміотерапевтичного препарату.
34. Спосіб за будь-яким із пп. 32-33, що додатково включає проведення променевої терапії суб'єкту.
- 5 35. Спосіб лікування раку у суб'єкта, який цього потребує, який включає:
- а) виділення клітини з організму згаданого суб'єкта;
 - б) трансформацію клітини вектором, який кодує ТКР за будь-яким із пп. 1-15 для отримання трансформованої клітини;
 - в) культивування трансформованої клітини для отримання великої кількості трансформованих клітин; і
 - г) введення великої кількості трансформованих клітин згаданому суб'єкту.
36. Спосіб за п. 35, де клітина вибрана з Т-клітини або попередника Т-клітини.
37. Спосіб лікування раку у суб'єкта, який цього потребує, який включає:
- а) виділення клітини з організму здорового донора;
 - 15 б) трансформацію клітини вектором, який кодує ТКР за будь-яким із пп. 1-15, для отримання трансформованої клітини;
 - в) культивування трансформованої клітини для отримання великої кількості трансформованих клітин; і
 - г) введення великої кількості трансформованих клітин згаданому суб'єкту.
- 20 38. Спосіб за п. 37, де клітина вибрана з Т-клітини або попередника Т-клітини.
39. Спосіб виявлення раку у біологічному зразку, який включає:
- а) контактування біологічного зразка з ТКР за будь-яким із пп. 1-15, і
 - б) виявлення зв'язування ТКР із біологічним зразком.
40. Спосіб за п. 39, де ТКР містить детектовану мітку.
- 25 41. Спосіб за п. 40, де детектована мітка вибрана з групи, що складається з радіонукліду, флуорофору і біотину.
42. Спосіб за будь-яким із пп. 39-41, де згадане виявлення здійснюється *in vitro*, *in vivo* або *in situ*.
43. Спосіб за будь-яким із пп. 39-42, де згадана хвороба на рак є недрібноклітинним раком легенів, дрібноклітинним раком легенів, нирковоклітинним раком, раком головного мозку, раком шлунка, колоректальним раком, гепатоцелюлярним раком, раком голови та шиї, раком підшлункової залози, раком передміхурової залози, лейкозом, раком молочної залози, карциномою з клітин Меркеля, меланомою, раком яєчника, раком сечового міхура, раком матки, раком жовчного міхура і жовчних протоків, раком стравоходу або їхньою комбінацією.
- 35 44. Клітина-хазяїн за будь-яким із пп. 18-21, де Т-клітина є гамма/дельта Т-клітиною.
45. Спосіб знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого аберантно експресують IGF2BP3, причому спосіб включає введення пацієнту ефективної кількості Т-клітин, які експресують ТКР за будь-яким із пп. 1-15, нуклеїнової кислоти за п. 16, вектора експресії за п. 17, клітини-хазяїна за будь-яким із пп. 18-21 та/або фармацевтичної композиції за п. 22 або
- 40 23.
46. ТКР за будь-яким із пп. 1-15, який є розчинним ТКР.
47. ТКР за будь-яким із пп. 1-15, де альфа-ланцюг містить варіабельний домен альфа ТКР, який принаймні на 95 % ідентичний амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 2; і бета-ланцюг містить варіабельний домен бета ТКР, який принаймні на 95 % ідентичний амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 10, і де ТКР специфічно зв'язується з комплексом пептид IGF2BP3-001-молекула МНС.
- 45 48. ТКР за будь-яким із пп. 1-15, який має принаймні одну мутацію в альфа-ланцюгу відносно послідовності SEQ ID NO: 2 та/або має принаймні одну мутацію в бета-ланцюгу відносно послідовності SEQ ID NO: 10, і де ТКР має модифіковане глікозилювання у порівнянні з немутованим ТКР.
- 50 49. Спосіб за будь-яким із пп. 25-38 і 45, де ТКР за будь-яким із пп. 1-15, нуклеїнову кислоту за п. 16, вектор експресії за п. 17, клітину-хазяїна за будь-яким із пп. 18-21 або фармацевтичну композицію за п. 22 або 23 вводять щонайменше за два введення, які розділяють щонайменше 24 години.
- 55 50. Спосіб за п. 49, де ТКР за будь-яким із пп. 1-15, нуклеїнову кислоту за п. 16, вектор експресії за п. 17, клітину-хазяїна за будь-яким із пп. 18-21 або фармацевтичну композицію за п. 22 або 23 вводять суб'єкту протягом періоду часу, який складає дні, тижні або місяці.
51. Спосіб за п. 49 або 50, де ТКР за будь-яким із пп. 1-15, нуклеїнову кислоту за п. 16, вектор експресії за п. 17, клітину-хазяїна за будь-яким із пп. 18-21 або фармацевтичну композицію за п. 22 або 23 вводять місцевою інфузією.
- 60

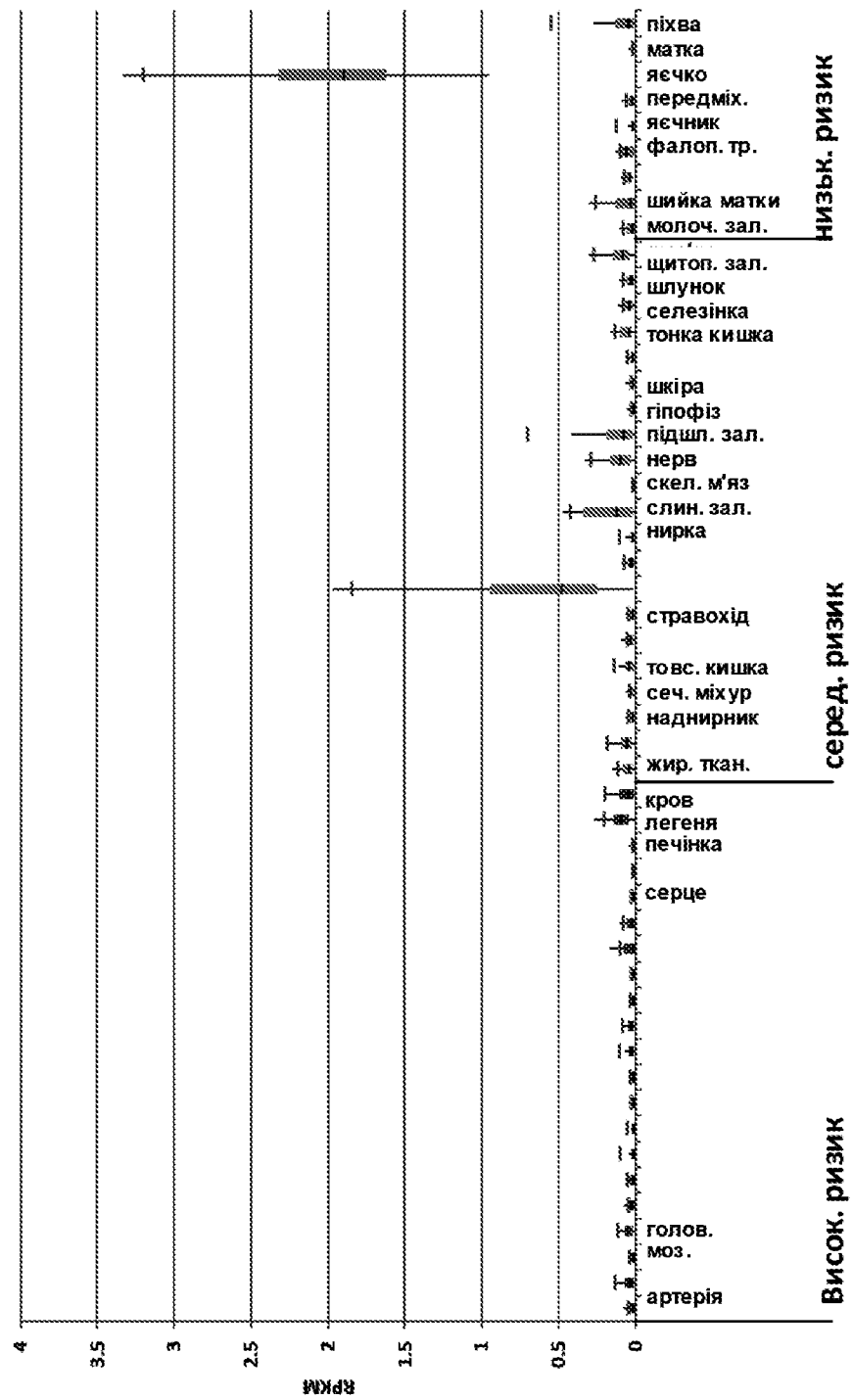
52. Спосіб за п. 51, де місцеву інфузію здійснюють інфузійним насосом та/або через систему катетерів.
53. Спосіб за п. 51 або 52, де згадана місцева інфузія проводиться в солідну пухлину, кровоносну судину, яка живить солідну пухлину та/або ділянку, яка оточує солідну пухлину.
54. Спосіб за будь-яким із пп. 25-38, 45 і 49-53, де ТКР за будь-яким із пп. 1-15, нуклеїнову кислоту за п. 16, вектор експресії за п. 17, клітину-хазяїна за будь-яким із пп. 18-21 або фармацевтичну композицію за п. 22 або 23 вводять у дозі приблизно від 10^4 до приблизно 10^{10} клітин на дозу.



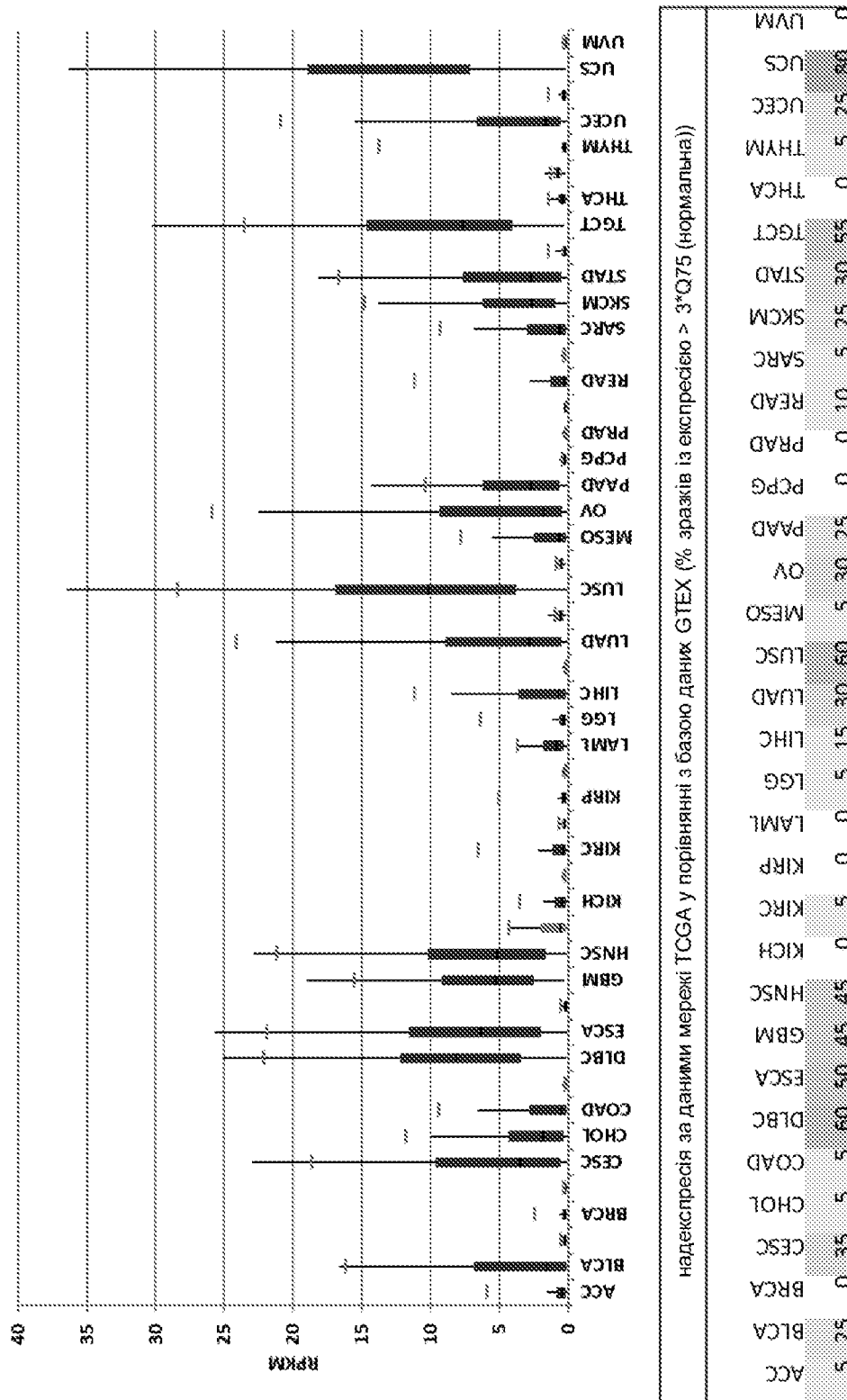
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

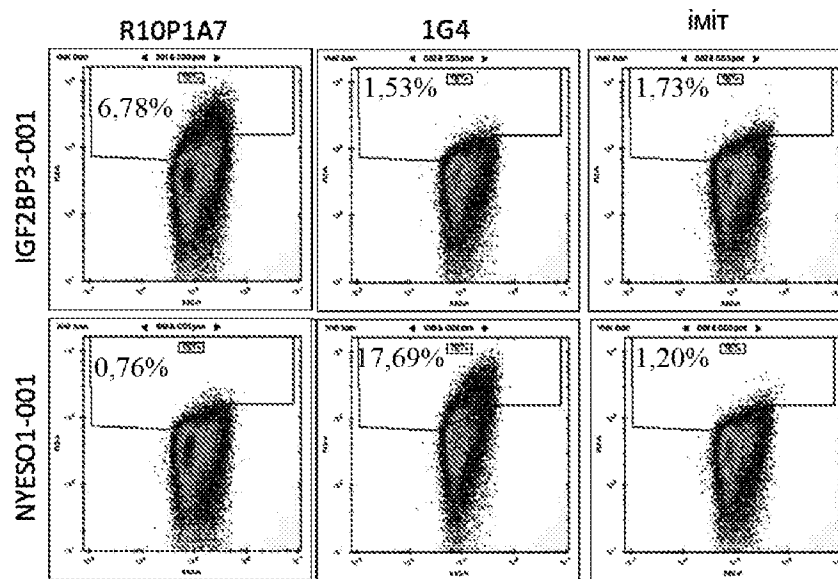
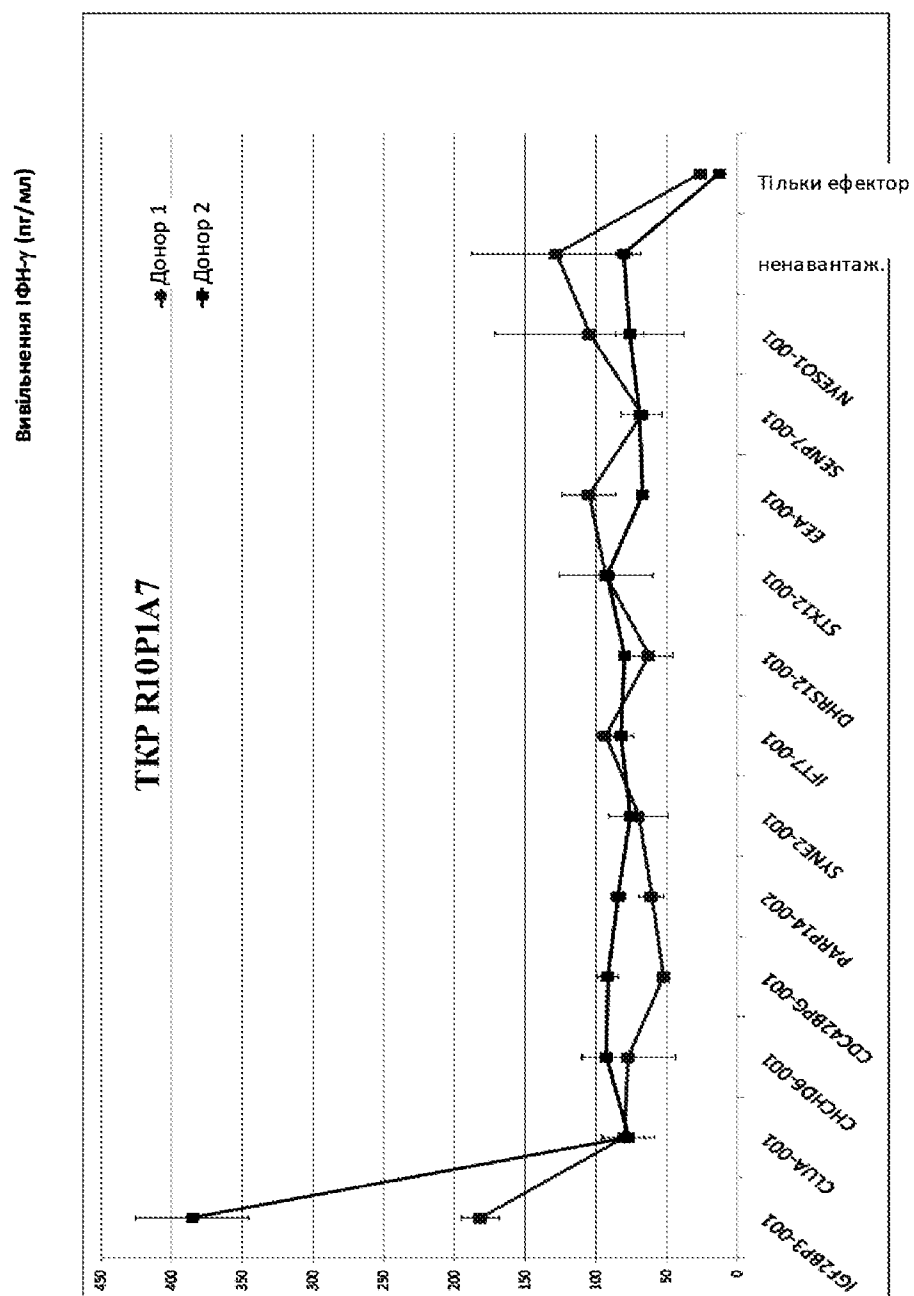
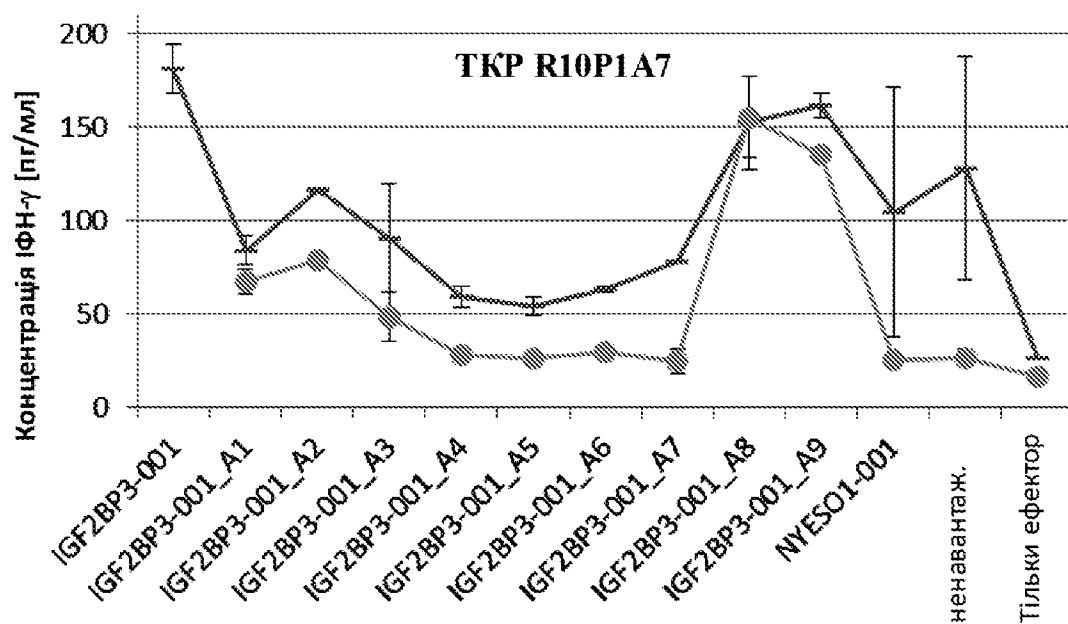


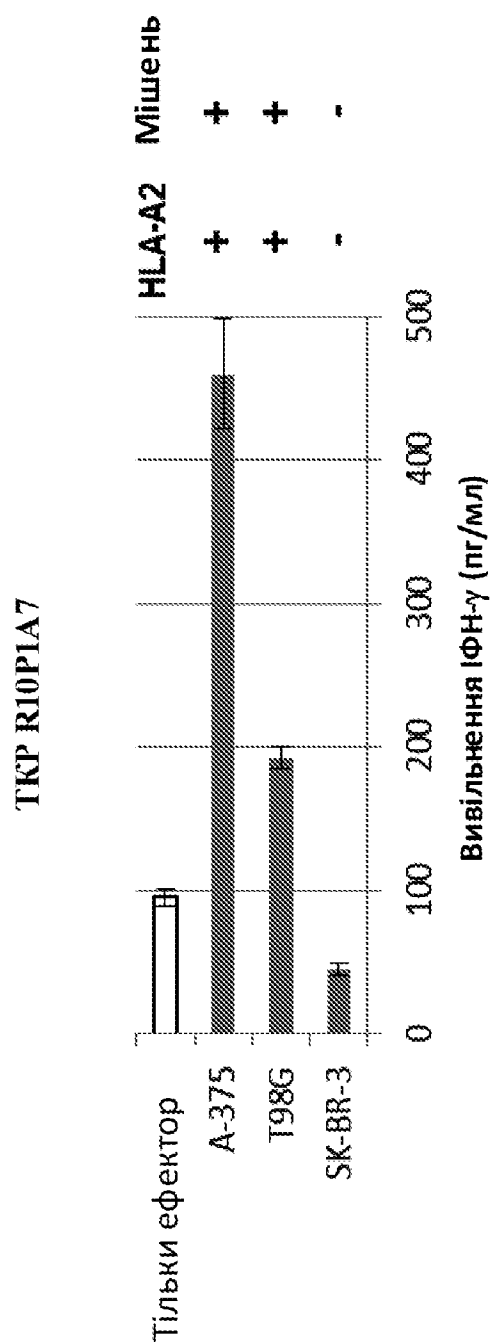
Fig. 5



Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8