



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2018130123, 02.05.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
03.05.2012 US 61/642,358

(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2014148286 01.12.2014

(43) Дата публикации заявки: 07.11.2018 Бюл. №  
31

Адрес для переписки:

123242, Москва, пл. Кудринская, д. 1, а/я 35,  
"Михайлюк, Сороколат и партнеры -  
патентные поверенные"

(71) Заявитель(и):

**ФРЕД ХАТЧИНСОН КАНСЭР РИСЁЧ  
СЕНТЕР (US)**

(72) Автор(ы):

**ШМИТТ Томас М. (US),  
ГРИНБЕРГ Филип Д. (US)**

**(54) КЛЕТКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР (TCR), ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ  
В КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ**

**(57) Формула изобретения**

1. Клетка, экспрессирующая Т-клеточный рецептор (TCR), для применения в клеточной иммунотерапии, при этом клетка получена способом, включающим:

а. приведение клеток, способных к дифференцировке в клетки Т-клеточной линии дифференцировки, в контакт со стромальными клетками и пептидным антигеном при условиях и в течение времени, достаточных для индукции дифференцировки клеток, способных к дифференцировке в клетки Т-клеточной линии дифференцировки, в DN TCR $\alpha\beta^+$  тимоциты,

при этом клетки, способные к дифференцировке в клетки Т-клеточной линии дифференцировки, содержат неэндогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TCR $\alpha$ -цепь из исходного TCR, специфичного в отношении пептидного антигена, и

при этом стромальные клетки содержат неэндогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Delta-like-1 или Delta-like-4, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу МНС; и

б. введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей TCR $\beta$ -цепь из DN TCR $\alpha\beta^+$  тимоцита, полученного на этапе (а), в клетку, способную экспрессировать TCR на клеточной поверхности и содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TCR $\alpha$ -цепь, полученную на этапе (а), с получением тем самым клетки, экспрессирующей TCR.

2. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 1, где пептидный антиген выбран из

вирусного антигена, бактериального антигена, ракового антигена и аутоиммунного антигена.

3. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 1 или 2, где способ дополнительно включает оценку сродства связывания TCR, экспрессируемого клеткой, полученной на этапе (b).

4. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–3, где клетки, способные к дифференцировке в клетки Т-клеточной линии дифференцировки, содержат гемопоэтические стволовые клетки, клетки-предшественники тимоциты или эмбриональные стволовые клетки, причем эмбриональные стволовые клетки получены из (a) клеток J1 ES, (b) клеток 129 J ES, (c) клеток D3, (d) клеток R1, (e) клеток E14K, (f) клеток, полученных от мышей Balb/c, (g) клеток, полученных от мышей C57B1/6, или любой их комбинации.

5. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–4, где клетки, способные к дифференцировке в клетки Т-клеточной линии дифференцировки, включают гемопоэтические стволовые клетки, полученные из костного мозга или пуповинной крови.

6. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–5, где неэндогенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TCR $\alpha$ -цепь, специфичную в отношении пептидного антигена, была введена в клетки, способные к дифференцировке в клетки Т-клеточной линии дифференцировки, с применением вирусного вектора и/или она содержится в вирусном векторе.

7. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 6, где вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

8. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 6, где вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

9. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 6, где вирусный вектор дополнительно содержит генный маркер трансдукции.

10. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 9, где генный маркер трансдукции включает зеленый флуоресцентный белок или внеклеточный домен CD2 человека.

11. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–10, где стромальные клетки экспрессируют Delta-like-1.

12. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–11, где стромальные клетки представляют собой стромальные клетки костного мозга или получены из него.

13. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–12, где способ дополнительно включает отбор клетки, полученной на этапе (b), с помощью окрашивания посредством тетрамера МНС-пептид.

14. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 13, где клетка отобрана с помощью многократного окрашивания посредством тетрамера МНС-пептид.

15. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–14, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая TCR $\beta$ -цепь, полученная на этапе (b), введена в клетку, способную экспрессировать TCR на клеточной поверхности с помощью вирусного вектора и/или она содержится в вирусном векторе.

16. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 15, где вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

17. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 15, где вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

18. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 15, где вирусный вектор дополнительно содержит генный маркер трансдукции.

19. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 18, где генный маркер трансдукции включает зеленый флуоресцентный белок.

20. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–19, где в клетке, способной экспрессировать TCR на клеточной поверхности, отсутствует эндогенная экспрессия TCR или она была модифицирована для блокирования или ингибирования экспрессии TCR $\alpha$ -цепи, TCR $\beta$ -цепи или обеих.

21. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 20, где клетка, способная экспрессировать TCR на клеточной поверхности, получена из TCR $\alpha$  $\beta$ <sup>-</sup> 58 T-клеточной гибридомы.

22. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–21, где клетка, способная экспрессировать TCR на клеточной поверхности, была модифицирована для экспрессии CD3.

23. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–22, где клетка, TCR или оба получены от человека.

24. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–23, где молекула MHC включает молекулу MHC класса I или молекулу MHC класса II.

25. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 24, где молекула MHC включает HLA-A2 и человеческий бета-2-микроглобулин ( $\beta$ 2M).

26. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 2–25, где пептидный антиген представляет собой пептидный антиген WT1 или пептидный антиген мезотелин.

27. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 26, где пептидный антиген WT1 содержит аминокислотную последовательность RMFPNAPYL (SEQ ID NO:2).

28. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 26, где пептидный антиген мезотелин содержит аминокислотную последовательность GQKMNAQAI (SEQ ID NO:31).

29. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 2–25, где пептидный антиген представляет собой пептидный антиген CD20.

30. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–29, где пептидный антиген добавляют к клеткам, способным к дифференцировке в клетки T-клеточной линии дифференцировки, и стромальным клеткам в культуре.

31. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–30, где стромальные клетки содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептидный антиген.

32. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–31, где дополнительно предусмотрено перед введением на этапе (b) выделение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей TCR $\beta$ -цепь из DN TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> тимоцита, причем выделение дополнительно включает выбор последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей TCR $\beta$ -цепь и содержащей такой же V $\beta$ -ген, как и исходная TCR $\beta$ -цепь, перед введением выбранной последовательности нуклеиновой кислоты в клетку.

33. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 12–32, где стромальные клетки костного мозга получены из MS5, S17, HGS2.11, HGS2.52, HGS.18, HGS3.30, HGS3.65, HGS.3.66, HGS3.103, HGS3.114, OP9 или любой их комбинации.

34. Клетка, экспрессирующая TCR, по п. 33, где клетки костного мозга получены из OP9.

35. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 2–34, где TCR характеризуется более сильным связыванием с пептидным антигеном по сравнению с исходным TCR.

36. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–35, где TCR дополнительно содержит выявляемый компонент.

37. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–36, где клетка включает CD4<sup>+</sup> T-клетку, CD8<sup>+</sup> T-клетку или регуляторную T-клетку.

38. Клетка, экспрессирующая TCR, по любому из пп. 1–37, где TCR содержит такие же аминокислотные последовательности V $\beta$  CDR1 и CDR2, как и исходный TCR.

39. Способ клеточной иммунотерапии, включающий введение субъекту, имеющему заболевание, характеризующееся наличием пептидного антигена, клетки,

экспрессирующей TCR, по любому из пп. 1–38.

40. Способ клеточной иммунотерапии по п. 39, где пептидный антиген выбран из вирусного, бактериального, ракового или аутоиммунного антигена.

41. Способ клеточной иммунотерапии по п. 40, где пептидный антиген представляет собой пептидный антиген WT1, пептидный антиген мезотелин или пептидный антиген CD20.

42. Способ клеточной иммунотерапии по п. 41, где:

(i) пептидный антиген WT1 содержит аминокислотную последовательность RMFPNAPYL (SEQ ID NO:2); или

(ii) пептидный антиген мезотелин содержит аминокислотную последовательность GQKMNAQAI (SEQ ID NO:31).

43. Способ клеточной иммунотерапии по п. 39, где клетка, экспрессирующая TCR, включает CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или регуляторную Т-клетку.

44. Способ клеточной иммунотерапии по любому из пп. 39–43, где клетка, экспрессирующая TCR, является аутологической по отношению к субъекту.

45. Клетка, способная экспрессировать TCR на клеточной поверхности, содержащая:

(i) первую гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR $\alpha$ -цепь из исходного TCR, специфичного в отношении пептидного антигена; и

(ii) вторую гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR $\beta$ -цепь, полученную не из исходного TCR,

причем кодируемая TCR $\alpha$ -цепь и кодируемая TCR $\beta$ -цепь образуют TCR, специфичный в отношении пептидного антигена.

46. Клетка по п. 45, где TCR характеризуется более сильным связыванием с пептидным антигеном по сравнению с исходным TCR.

47. Клетка по п. 45 или 46, где пептидный антиген выбран из вирусного, бактериального, ракового или аутоиммунного антигена.

48. Клетка по п. 47, где пептидный антиген представляет собой пептидный антиген WT1, пептидный антиген мезотелин или пептидный антиген CD20.

49. Клетка по п. 48, где:

(i) пептидный антиген WT1 содержит аминокислотную последовательность RMFPNAPYL (SEQ ID NO:2); или

(ii) пептидный антиген мезотелин содержит аминокислотную последовательность GQKMNAQAI (SEQ ID NO:31).

50. Клетка по любому из пп. 45–49, где клетка включает CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку, регуляторную Т-клетку или любую их комбинацию.

51. Клетка по любому из пп. 45–50, где TCR содержит такие же аминокислотные последовательности V $\beta$  CDR1 и CDR2, как и исходный TCR.

52. Клетка по любому из пп. 45–51, где клетка, TCR или оба получены от человека.

53. Композиция на основе клеточной культуры, содержащая:

(i) клетку, способную к дифференцировке в клетку Т-клеточной линии дифференцировки и содержащую неэндогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TCR $\alpha$ -цепь из исходного TCR, специфичного в отношении пептидного антигена;

(ii) стромальную клетку, содержащую неэндогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Delta-like-1 или Delta-like-4, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу МНС; и

(iii) пептидный антиген.

54. Способ клеточной иммунотерапии, включающий:

а. приведение клеток, способных к дифференцировке в клетки Т-клеточной линии

дифференцировки, в контакт со стромальными клетками и пептидным антигеном при условиях и в течение времени, достаточных для индукции дифференцировки клеток, способных к дифференцировке в клетки Т-клеточной линии дифференцировки, в DN TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> тимоциты,

при этом клетки, способные к дифференцировке в клетки Т-клеточной линии дифференцировки, содержат неэндогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TCR $\alpha$ -цепь из исходного TCR, специфичного в отношении пептидного антигена, и

при этом стромальные клетки содержат неэндогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Delta-like-1 или Delta-like-4, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу МНС; и

в. введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей TCR $\beta$ -цепь из DN TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> тимоцита, полученного на этапе (а), в клетку, способную экспрессировать TCR на клеточной поверхности и содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TCR $\alpha$ -цепь, полученную на этапе (а), с получением тем самым клетки, экспрессирующей TCR; и

с. введение одной или более клеток, экспрессирующих TCR, субъекту, имеющему заболевание, характеризующееся наличием пептидного антигена.

55. Способ клеточной иммунотерапии по п. 54, где пептидный антиген выбран из вирусного, бактериального, ракового или аутоиммунного антигена.

56. Способ клеточной иммунотерапии по п. 54 или 55, где клетки, экспрессирующие TCR, содержат CD4<sup>+</sup> Т-клетки, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, регуляторные Т-клетки или любую их комбинацию.