

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201892217** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2019.08.30**

(51) Int. Cl. **C07K 14/725** (2006.01)  
**C07K 14/495** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2017.05.09**

(54) **Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, КОТОРЫЕ РАСПОЗНАЮТ МУТАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ  
СО СДВИГОМ РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ TGFβRII**

(31) **1608052.5**

(32) **2016.05.09**

(33) **GB**

(86) **PCT/EP2017/061087**

(87) **WO 2017/194555 2017.11.16**

(71) Заявитель:

**ОСЛО УНИВЕРСИТЕТССЮКЕХУС  
ХФ (NO)**

(72) Изобретатель:

**Индерберг Эльза Марит, Гаудернак  
Густав, Волкли Себастьян, Квалхейм  
Гуннар (NO)**

(74) Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к молекулам ТКР, которые распознают неопептиды, вырабатываемые в результате связанной с раком мутации со сдвигом рамки считывания "-1A" в TGFβRII человека. Молекулы ТКР способны связывать пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, причем указанный пептид представлен ГКГС класса I и содержит домен α-цепи и домен β-цепи, где каждый домен цепи содержит три последовательности CDR, причем а) CDR 1, 2 и 3 из домена α-цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4 соответственно; и б) CDR 1, 2 и 3 из домена β-цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и при этом одна или более из указанных последовательностей CDR необязательно могут быть модифицированы путем замены, добавления или делеции 1 или 2 аминокислот. Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим такие ТКР, а также к растворимым молекулам ТКР, содержащим указанные последовательности CDR. Молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению можно применять для модификации иммунных эффекторных клеток для экспрессии ТКР, как определено в настоящем документе, и такие модифицированные иммунные эффекторные клетки, а также растворимые ТКР, определенные выше, можно применять в терапии рака.

**201892217**  
**A1**

**201892217**  
**A1**

## **Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, КОТОРЫЕ РАСПОЗНАЮТ МУТАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ СО СДВИГОМ РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ TGFβRII**

Настоящее изобретение относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), которые  
5 распознают мутантные варианты со сдвигом рамки считывания рецептора  
трансформирующего фактора роста-β типа II (TGFβRII). Такие ТКР применяют для  
лечения рака, в частности, разновидностей рака, которые содержат отдельные мутации со  
сдвигом рамки считывания TGFβRII. Настоящее изобретение относится к молекулам ТКР,  
10 молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют указанные ТКР, и векторам,  
содержащим указанные молекулы нуклеиновых кислот. Молекулы нуклеиновых кислот и  
векторы согласно настоящему изобретению можно применять для модификации  
иммунных эффекторных клеток, включая, в частности, Т-клетки, для экспрессии ТКР.  
Молекулы нуклеиновых кислот и векторы также можно применять для модификации  
15 продуцирующих клеток-хозяев для получения ТКР. Такие модифицированные иммунные  
эффекторные клетки можно применять при терапии на основе адоптивного переноса  
клеток. В частности, ТКР согласно настоящему изобретению основаны или происходят из  
конкретного ТКР, определенного в настоящем документе как Radium-1, который был  
идентифицирован в клоне цитотоксического Т-лимфоцита (ЦТЛ), выделенном у пациента  
с клиническим ответом на лечение, иммунизированного с применением пептида TGFβRII,  
20 несущего мутацию со сдвигом рамки считывания, и который распознает  
последовательность неопитопа пептида, несущего мутацию со сдвигом рамки  
считывания, RLSSCVPVA (SEQ ID NO: 1).

Во всем мире колоректальная карцинома (CRC) является третьим по  
распространенности видом рака у мужчин и вторым по распространенности видом рака у  
25 женщин, причем самая высокая частота CRC наблюдается в Западном полушарии.  
Синдром Линча, или наследственный неполипозный колоректальный рак (HNPCC),  
представляет собой наследственное состояние, при котором нарушается репарация  
неправильного спаривания оснований ДНК, что приводит к микросателлитной  
нестабильности (MSI). У индивидуумов, страдающих синдромом Линча, высок риск  
30 развития различных видов рака, включая CRC. MSI также характерна для подгруппы  
спорадических видов рака (т. е. ненаследственных видов рака), включая колоректальный  
рак и рак желудка.

MSI приводит к вставке или делеции одиночных нуклеотидов или динуклеотидов в  
коротких повторяющихся последовательностях ДНК. Когда такие мутации происходят в  
35 генах, кодирующих белки, они вызывают сдвиг в рамке считывания гена (т. е. они

являются мутациями со сдвигом рамки считывания). Такие мутации обычно приводят к образованию усеченных нефункциональных белков.

Белки трансформирующего фактора роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) связываются с белками рецептора TGF $\beta$ RII на поверхности клетки, активируя путь передачи сигнала, который приводит к остановке клеточного цикла. Мутация TGF $\beta$ RII может привести к инактивации этого пути, что способствует канцерогенезу. Мутации со сдвигом рамки считывания, которые инактивируют TGF $\beta$ RII, встречаются приблизительно в 90% видов рака толстой кишки, характеризующегося микросателлитной нестабильностью (MSI<sup>+</sup>), и приблизительно в 15% видов рака толстой кишки, характеризующегося микросателлитной стабильностью (MSS, не-MSI<sup>+</sup> или MSI<sup>-</sup>). Такие мутации в основном происходят в уязвимом для мутаций полиадениновом тракте в экзоне 3 TGF $\beta$ RII.

Разновидности MSI<sup>+</sup> рака толстой кишки считаются более иммуногенными, чем разновидности MSS рака, вследствие выработки неопептидов (т. е. пептидов, последовательности которых не встречаются в природе у индивидуума, которые, соответственно, распознаются иммунной системой как «неаутологичные»), возникающих в результате мутаций со сдвигом рамки считывания в генах, содержащих микросателлитные повторы в пределах кодирующих областей их транскрибируемых последовательностей. Пациенты с синдромом Линча и пациенты с подтипом MSI<sup>+</sup> разновидностей sporадического рака толстой кишки имеют лучший прогноз по сравнению с пациентами, страдающими другими разновидностями sporадического рака толстой кишки. Количество и присутствие определенных мутаций со сдвигом рамки считывания при MSI<sup>+</sup> раке толстой кишки коррелирует с повышенной плотностью инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ИОЛ), характеризующих эти разновидности рака. Также хорошо установлена корреляция между повышенной плотностью ИОЛ при разных видах MSI<sup>+</sup> колоректального рака и улучшенной выживаемостью по сравнению с разными видами не-MSI<sup>+</sup> колоректального рака. Усиленный иммунный ответ хозяина может, по меньшей мере частично, объяснить улучшенный прогноз для таких разновидностей рака. Эти наблюдения указывают на то, что некоторые пациенты с MSI<sup>+</sup> CRC могут получить пользу от иммунотерапии, нацеленной на продукты мутаций со сдвигом рамки считывания в генах, таких как TGF $\beta$ RII.

В таких неопептидах, полученных в результате мутаций со сдвигом рамки считывания, были идентифицированы Т-клеточные эпитопы. Мутация TGF $\beta$ RII «-1A», при которой один остаток аденина удален из вышеупомянутого полиаденинового тракта в экзоне 3 TGF $\beta$ RII, является примером мутации, которая приводит к выработке

неопептидов, которые содержат Т-клеточные эпитопы, включая и CD4<sup>+</sup>, и CD8<sup>+</sup> Т-клеточные эпитопы.

Т-клеточные эпитопы распознаются ТКР, которые представляют собой белковые комплексы, выступающие из клеточной мембраны Т-клетки. Большинство ТКР содержат  $\alpha$ -цепь и  $\beta$ -цепь, обе из которых состоят из варибельной области и константной области. Варибельная область расположена на N-конце цепи и является полностью внеклеточной; константная область расположена на С-конце цепи и состоит из внеклеточного домена, трансмембранного домена и короткого цитоплазматического домена. Цепи ТКР кодируются и синтезируются в незрелой форме с N-концевой сигнальной (или лидерной) последовательностью. Эта последовательность образует N-конец варибельной области  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -цепи ТКР при ее синтезе. После синтеза цепи ТКР сигнальная последовательность отщепляется и, следовательно, не присутствует в зрелом ТКР, расположенном на поверхности клетки. Недавно были разработаны растворимые ТКР (рТКР), которые содержат варибельные области и внеклеточные домены константных областей  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, присутствующие в нативных ТКР, но не содержат трансмембранные и цитоплазматические домены константных областей. Растворимые ТКР могут экспрессироваться и секретироваться любой клеткой.

Варибельная область  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи содержит три гиперварибельные участки, определяющие комплементарность (CDR). Такие CDR определяют специфичность ТКР, причем CDR3 (то есть третий CDR с N-конца) является наиболее важным CDR при определении специфичности ТКР. Участки варибельных областей цепей ТКР, которые не образуют CDR, известны как каркасные участки. Варибельная область ТКР содержит четыре таких каркасных участка. Каркасный участок 1 расположен на N-конце CDR1; каркасный участок 2 соединяет CDR1 и CDR2; каркасный участок 3 соединяет CDR2 и CDR3; каркасный участок 3 соединяет CDR3 с константной областью цепи ТКР. Упомянутые каркасные участки намного менее изменчивы, чем CDR, и образуют остов для CDR. Последовательность каркасных участков важна для функции ТКР, поскольку они определяют общую структуру варибельной области цепи ТКР. Эта структура должна поддерживать CDR в правильных ориентациях и относительных положениях для того чтобы они могли связаться с антигеном-мишенью.

Варибельная область ТКР, следовательно, связывается с антигеном-мишенью, причем антигены ТКР являются белками. Специфичная часть антигена, связанная ТКР, представляет собой Т-клеточный эпитоп. Т-клеточные эпитопы представляют собой короткие антигенные фрагменты, обычно пептиды, содержащие от 8 до 17 аминокислот. Соответствующий антигенный фрагмент представляется ТКР главным комплексом

гистосовместимости (ГКГС). После связывания антигена ТКР активирует путь передачи сигнала, который активирует Т-клетку для инициации иммунного ответа.

5 Существует два класса ГКГС: класс I и класс II. ГКГС класса I экспрессируются всеми ядродержащими клетками; ГКГС II класса экспрессируются только специализированными антигенпрезентирующими клетками (АПК), такими как дендритные клетки. Функция всех ГКГС состоит в том, чтобы представлять короткие пептидные сегменты для распознавания Т-клетками. ГКГС класса I представляет пептидные фрагменты из внутреннего содержимого клетки, на которой он экспрессируется, и распознается  $CD8^+$  Т-клетками (цитотоксическими Т-клетками). Если  $CD8^+$  Т-клетка распознает пептид, представленный ГКГС класса I в качестве антигена, Т-клетка инициирует апоптоз клетки, на которой экспрессируется ГКГС класса I. ГКГС II класса представляет пептидные фрагменты из белков, которые подверглись эндоцитозу антиген-презентирующими клетками, на которых он экспрессируется, и распознается  $CD4^+$  Т-клетками (хелперными Т-клетками). Если наивная  $CD4^+$  Т-клетка распознает пептид, представленный ГКГС класса II в качестве антигена, то она будет пролиферировать. Ее дочерние клетки затем будут дифференцироваться в эффекторные Т-клетки, Т-клетки памяти и регуляторные Т-клетки, которые совместно опосредуют иммунный ответ других компонентов иммунной системы и обеспечивают долгосрочный иммунитет против инфекции. В связи с этим ГКГС класса I в целом важны при инициации иммунного ответа на инфицированные вирусом клетки или клетки, содержащие мутации, вызывающие выработку в них патологических белков (такие как раковые или предраковые клетки); ГКГС II класса в целом важны для инициации иммунного ответа на внеклеточные патогены.

У человека ГКГС состоят из белков, известных как антигены лейкоцитов человека (HLA). Каждый человек имеет 3 основных гена HLA ГКГС класса I (*HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C*) и 6 основных генов HLA ГКГС класса II (*HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRA* и *HLA-DRB1*). При связывании ТКР с комплексом ГКГС-антиген, как антиген, так и белки ГКГС вступают в контакт с ТКР, это означает, что ТКР распознают конкретные комплексы ГКГС-антиген, а не просто антиген. Полагают, что такое взаимодействие ТКР с ГКГС происходит посредством CDR2, и это означает, что ТКР распознают антигены, только если они образуют комплекс с конкретным белком HLA, эта особенность известна как ограничение по ГКГС. Гены HLA являются чрезвычайно полиморфными, это означает, что разные индивидуумы чаще всего несут разные аллели HLA и что конкретный ТКР не будет функциональным у всех индивидуумов (только у тех, кто несет соответствующий аллель HLA, по которому ограничен ТКР).

ТКР, которые распознают опухолевые антигены, можно применять в терапии рака, в частности, в терапии на основе адоптивного переноса Т-клеток (June, С., J Clin Invest. 2007 Jun 1; 117(6): 1466–1476). Т-клетки могут быть перенацелены против опухолевых клеток путем переноса генов, кодирующих ТКР, которые распознают опухолевые антигены.

5 Такие перенацеленные Т-клетки могут быть введены пациентам, страдающим раком, при котором вырабатывается соответствующий антиген. Упомянутые Т-клетки затем должны запустить иммунный ответ против раковых клеток, что вызовет их гибель. Как ожидается, это уменьшит размер опухоли-мишени, что может привести к излечению пациента или по меньшей мере увеличению продолжительности его жизни.

10 Однако недавние клинические испытания показали, что адоптивный перенос Т-клеток с перенацеленными ТКР, нацеленными на антигены зародышевой линии рака, может быть связан с тяжелой токсичностью, что подчеркивает необходимость тщательного рассмотрения выбора антигена. В одном из исследований трое из девяти пациентов, страдавших раком, которые получали аутологичные модифицированные Т-

15 клетки, несущие ТКР против MAGE-A3 (MAGE-A3, ассоциированный с меланомой антиген 3, представляет собой белок с неизвестной функцией, связанный с разными видами рака, включая меланому, но который также присутствует в здоровых клетках), испытывали тяжелую неврологическую токсичность (которая была летальной в двух случаях) вследствие перекрестной реактивности ТКР (Morgan, R.A. *et al.* (2013), Journal of

20 Immunotherapy, 36(2):133-151). Во втором исследовании, в котором у пациентов с миеломой и меланомой нацелено воздействовали на MAGE-A3 с применением ТКР, ограниченного по HLA-A\*01, выявили летальную перекрестную реактивность с повреждением миокарда (Linette, G.P. *et al.* (2013), Blood 122(6):863-871; Cameron, B.J. *et al.* (2013), Science Translational Medicine 5(197):197ra103). Соответственно, истинные

25 опухолеспецифические неоантигены могут быть оптимальными мишенями для терапии с применением ТКР с нацеленным воздействием на опухоли без разрушения нормальной ткани. Тем не менее, это может быть связано с определенными проблемами, поскольку большинство таких неоантигенов возникают в результате уникальных мутаций, которые не являются сходными у пациентов. Еще одна проблема, связанная с терапией на основе

30 адоптивного переноса Т-клеток, заключается в том, что ТКР ограничены по ГКГС, как описано выше. Следовательно, индивидуальный ТКР функционирует только у индивидуумов, несущих аллель HLA, которым он ограничен, или родственную изоформу.

Авторы настоящего изобретения выделили ТКР, который применяют в терапии на основе адоптивного переноса Т-клеток. Данный ТКР представляет собой ограниченный по

35 HLA-A2 ТКР, специфический в отношении TGF $\beta$ RII, несущего мутацию со сдвигом

рамки считывания, выделенный у пациента с MSI<sup>+</sup> раком толстой кишки, вакцинированного с применением пептида TGFβRII. Было показано, что данный ТКР, известный как Radium-1, является особенно эффективным при перенаправлении Т-клеток для распознавания раковых клеток, несущих мутацию со сдвигом рамки считывания, и уменьшении роста рака в животной модели. Radium-1 представляет собой необычно эффективный ТКР, свойства которого делают его особенно полезным в медицине. Radium-1 имеет очень высокую аффинность в отношении комплекса когнатного антигена/ГКГС. Его аффинность в отношении комплекса когнатного антигена/ГКГС выше, чем аффинность MART-1-специфического ТКР, DMF5, в отношении комплекса когнатного антигена/ГКГС. DMF5 успешно применяют в клинических условиях при лечении меланомы. Высокая аффинность в отношении своего антигена является важной характеристикой ТКР для клинического применения, и такая высокая аффинность Radium-1 в отношении его мишени, в комбинации с очень успешным лечением опухолей в животных моделях, демонстрирует его большой потенциал для клинического применения. Одно из необычных свойств Radium-1 также заключается в том, что он не зависит от корецепторов CD4 и CD8. Большинство ТКР нуждаются во взаимодействии корецепторов CD8 или CD4 с комплексом ГКГС на клетке-мишени, чтобы опосредовать гибель клеток-мишеней, однако это не относится к Radium-1, это означает, что как CD8<sup>+</sup>, так и CD4<sup>+</sup> Т-клетки могут функционально экспрессировать Radium-1 и, как было показано, способны напрямую опосредовать гибель клеток-мишеней.

ТКР Radium-1 был выделен у пациента, вакцинированного пептидом, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 49 (SLVRLSSCVVALMSAMTTSSSQ). Применение таких пептидов в вакцинации против рака человека описано в WO 1999/058552. Radium-1 был выделен из клона Т-клетки, полученной от пациента, который был вакцинирован аналогичным способом, как и пациенты в исследовании, описанном в WO 1999/058552. Однако конкретный пациент, от которого был получен Radium-1, не являлся участником данного конкретного исследования, а был участником более позднего клинического исследования, которое проходило в 2001 году. Radium-1 распознает эпитоп с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1 (RLSSCVVA). Это неопептид, полученный в результате вышеописанной мутации со сдвигом рамки считывания, -1A TGFβRII, которая как таковая является оптимальной мишенью для терапии на основе адоптивного переноса Т-клеток, так как последовательность не обнаружена в нормальном протеоме человека, это означает, что токсичность ТКР должна быть минимальной. Неоантиген, полученный из часто встречающейся мутации со сдвигом рамки считывания, такой как пептид, содержащий

последовательность SEQ ID NO: 1, является идеальной мишенью для терапии на основе адоптивного переноса Т-клеток.

Помимо этого Radium-1 ограничен по HLA-A2 (HLA-A2 представляет собой аллель HLA-A). Было показано, что Radium-1 распознает антигены, представленные с HLA-A\*02:01-изоформой HLA-A2, однако может распознавать другие изоформы HLA-A2. HLA-A2 является одним из наиболее распространенных аллелей HLA, при этом приблизительно 40-50% белых американцев и европейцев являются носителями HLA-A\*02:01 ([www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net)). В этой связи, как ожидается, ТКР будет функционален в значительной части популяции Западного полушария. Соответственно, Т-клетки, перенаправленные с помощью Radium-1 или родственного ТКР согласно настоящему изобретению, можно применять в терапии рака. В частности, их можно применять в терапии на основе адоптивного переноса клеток, например, с Т-клетками. Такие перенацеленные Т-клетки или другие иммунные эффекторные клетки особенно полезны в терапии любого вида рака, который содержит мутацию со сдвигом рамки считывания -1A TGFβRII, включая разновидности MSI<sup>+</sup> CRC, такие как те, которые часто наблюдают у индивидуумов, страдающих синдромом Линча.

Неопептиды, возникающие в результате мутации со сдвигом рамки считывания -1A TAFβRII, ранее были описаны как возможные мишени для иммунотерапии рака (см., например, WO 1999/058552; Sæterdal, I. *et al.*, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, Vol. 98, pp. 13255-13260; Sæterdal, I. *et al.*, 2001, *Cancer Immunol Immunother* 50(9):469-476; Linnebacher, M. *et al.*, 2001, *International journal of cancer. Journal international du cancer* 93(1):6-11). Однако невозможно разработать функциональный ТКР, который будет связываться с антигеном-мишенью, на основании лишь информации о соответствующей последовательности антигена. Невозможно предсказать, какая последовательность белка ТКР потребуется для связывания с определенным антигеном применительно к конкретному аллелю белка HLA. В этой связи, несмотря на признание того факта, что ТКР, который связывается с неоантигеном, полученным в результате мутации со сдвигом рамки считывания TGFβRII, применительно к распространенному аллелю HLA, может быть полезным, проблема заключалась в отсутствии такого эффективного ТКР и, в частности, отсутствии известной последовательности для такого ТКР, поскольку специалист не может сконструировать такой ТКР с помощью доступных в настоящее время инструментов. Важно отметить, что не все ТКР, распознающие пептид неоантигена, полученный в результате мутации со сдвигом рамки считывания, могут быть эффективными на практике при стимуляции клеточного ответа против раковой клетки, экспрессирующей пептид. Выделение и характеристика ТКР Radium-1, описанного в



настоящем документе, который представляет собой требуемый ТКР, обеспечивает решение данной проблемы.

Несмотря на то, что ТКР Radium-1 ранее не был общедоступным, последовательности CDR3  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей ТКР Radium-1 были описаны в 2011 в диссертации на соискание ученой степени кандидата наук «Раковые вакцины и виды опухолеспецифической терапии на основе Т-клеток; Разработка новых видов иммунотерапии рака» Эльзой Марит Индерберг Сусо, Университет Осло. Однако даже при наличии последовательностей CDR3 все еще невозможно предсказать функциональные последовательности полных цепей ТКР, поскольку для получения функционального ТКР требуются две дополнительные последовательности CDR в каждой цепи. В силу вышесказанного настоящее изобретение обеспечивает информацию о полной последовательности для ТКР Radium-1, и, в частности, для CDR1 и 2 из Radium-1.

Соответственно, в первую очередь настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу ТКР, направленную против мутантного белка TGF $\beta$ RII, который содержит последовательность SEQ ID NO: 1, причем указанная молекула ТКР способна связываться с пептидом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 1, при этом указанный пептид представляется ГКГС класса I, и при этом указанная молекула ТКР содержит домен  $\alpha$ -цепи и/или домен  $\beta$ -цепи, где каждый домен цепи содержит три последовательности CDR, при этом:

а) CDR 1, 2 и 3 из домена  $\alpha$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно; и

б) CDR 1, 2 и 3 из домена  $\beta$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, и

при этом одна или более из указанных последовательностей CDR и, в более конкретном варианте реализации, одна или более из указанных последовательностей CDR1 или CDR2 необязательно могут быть модифицированы путем замены, добавления или делеции 1 или 2 аминокислот.

Аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2  $\alpha$ -цепи Radium-1 приведены в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и ранее раскрытая последовательность CDR3  $\alpha$ -цепи Radium-1 приведена в SEQ ID NO: 4. Аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2  $\beta$ -цепи Radium-1 приведены в SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно, и ранее раскрытая последовательность CDR3  $\beta$ -цепи Radium-1 приведена в SEQ ID NO: 7.

Последовательности CDR  $\alpha$ -цепи представляют собой, или соответствуют им, последовательности CDR вариабельной области  $\alpha$ -цепи Radium-1. Последовательность

вариабельной области  $\alpha$ -цепи Radium-1 приведена в SEQ ID NO: 8. Последовательности CDR  $\beta$ -цепи представляют собой, или соответствуют им, последовательности CDR вариабельной области  $\beta$ -цепи Radium-1. Последовательность вариабельной области  $\beta$ -цепи Radium-1 приведена в SEQ ID NO: 13. SEQ ID NO: 2, 3 и 4, относящиеся, соответственно, к CDR 1, 2 и 3  $\alpha$ -цепи Radium-1, расположены в положениях 47-51, 69-73 и 107-117 последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8, соответственно. SEQ ID NO: 5, 6 и 7, относящиеся, соответственно, к CDR 1, 2 и 3  $\beta$ -цепи Radium-1, расположены в положениях 46-50, 68-73 и 110-122 последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13, соответственно.

10           Изменение последовательности CDR1 или CDR2 цепи ТКР с меньшей вероятностью изменит специфичность ТКР и может улучшить аффинность связывания ТКР с его антигеном-мишенью. Соответственно, в предпочтительном варианте реализации CDR3 не модифицирован, и в другом предпочтительном варианте реализации все CDR не модифицированы.

15           Молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению можно применять для получения иммунных эффекторных клеток (в частности, модифицированных иммунных эффекторных клеток), направленных против клеток, экспрессирующих мутантный рецептор TGF $\beta$ RII, или более конкретно представляющих пептид, полученный в результате мутации со сдвигом рамки считывания, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1. Такие (модифицированные) иммунные эффекторные клетки экспрессируют ТКР на своей поверхности и способны распознавать или связываться с клеткой-мишенью, представляющей пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, например, с раковой клеткой. Соответственно, молекула нуклеиновой кислоты может быть такой, что иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая указанный ТКР (т. е. ТКР, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты), обладает эффекторной активностью (например, цитотоксической активностью) против (например, вызывает гибель) клетки-мишени, представляющей пептид, полученный в результате мутации со сдвигом рамки считывания, содержащий последовательность, приведенную SEQ ID NO: 1. Другими словами, молекула нуклеиновой кислоты кодирует молекулу ТКР, которая, при ее экспрессии на поверхности иммунной эффекторной клетки, способна связывать пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, причем указанный пептид представлен ГКГС класса I. Модифицированная иммунная эффекторная клетка, соответственно, представляет собой генетически модифицированную или сконструированную иммунную эффекторную клетку

или, иными словами, иммунную эффекторную клетку, которая была трансдуцирована молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

Следовательно, согласно одному варианту реализации, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу ТКР, направленную  
5 против мутантного белка TGF $\beta$ RII, который содержит последовательность SEQ ID NO: 1, причем указанная молекула ТКР, при ее экспрессии на поверхности иммунной эффекторной клетки, способна связывать пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, если указанный пептид представлен ГКГС класса I, и при этом указанная молекула ТКР содержит домен  $\alpha$ -цепи и/или домен  $\beta$ -цепи, где каждый домен цепи  
10 содержит три последовательности CDR, при этом:

а) CDR 1, 2 и 3 из домена  $\alpha$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно; и

б) CDR 1, 2 и 3 из домена  $\beta$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, и

15 причем одна или более из указанных последовательностей CDR и, согласно более конкретному варианту реализации настоящего изобретения, одна или более из указанных последовательностей CDR1 или CDR2 необязательно могут быть модифицированы путем замены, добавления или делеции 1 или 2 аминокислот.

Согласно другому варианту, молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему  
20 изобретению можно применять для экспрессии молекулы растворимого ТКР клеткой-хозяином. Молекула растворимого ТКР согласно настоящему изобретению способна связывать пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, если указанный пептид представлен ГКГС класса I, и, в частности, ее можно применять для доставки токсина в клетку-мишень, представляющую пептид, полученный в результате мутации со сдвигом  
25 рамки считывания, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, чтобы уничтожить клетку-мишень. Соответственно, молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может кодировать ТКР, который, при его экспрессии иммунной эффекторной клеткой, локализован на поверхности клетки; в другом варианте молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может кодировать растворимый  
30 ТКР.

Следовательно, согласно другому варианту реализации, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу растворимого ТКР, направленного против мутантного белка TGF $\beta$ RII, который содержит последовательность SEQ ID NO: 1, причем указанная молекула ТКР, экспрессируемая клеткой-хозяином,  
35 секретируется и способна связывать пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO:

1, если указанный пептид представлен ГКГС класса I, и при этом указанная молекула ТКР содержит домен  $\alpha$ -цепи и/или домен  $\beta$ -цепи, где каждый домен цепи содержит три последовательности CDR, при этом:

а) CDR 1, 2 и 3 из домена  $\alpha$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно; и

б) CDR 1, 2 и 3 из домена  $\beta$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, и

при этом одна или более из указанных последовательностей CDR и, согласно более конкретному варианту реализации настоящего изобретения, одна или более из указанных последовательностей CDR1 или CDR2 необязательно могут быть модифицированы путем замены, добавления или делеции 1 или 2 аминокислот.

Молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может быть введена в клетку, в частности, иммунную эффекторную клетку, такую как Т-клетка или продуцирующая клетка-хозяин, в виде мРНК или ДНК для экспрессии в клетке. Векторы можно применять для переноса молекулы нуклеиновой кислоты в клетку или для получения нуклеиновой кислоты для переноса (например, для получения мРНК для переноса или для получения молекулы нуклеиновой кислоты для получения вектора экспрессии для переноса в клетку).

Соответственно, согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, определенную в настоящем документе.

Вектор может представлять собой, например, вектор экспрессии мРНК, вектор для клонирования или вектор экспрессии для переноса в иммунную клетку или продуцирующую клетку-хозяина, например, вирусный вектор. В случае если вектор представляет собой вирусный вектор, он может представлять собой, например, ретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена иммунная эффекторная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или вектор согласно настоящему изобретению, определенные в настоящем документе. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения иммунная эффекторная клетка может представлять собой Т-клетку или НК-клетку.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения, в котором иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку (или более конкретно  $CD8^+$  Т-клетку или  $CD8^+$  Т-клетку человека), ТКР или более конкретно молекула нуклеиновой кислоты не является нативной для Т-клетки, т. е. молекула нуклеиновой кислоты не

присутствует эндогенно в Т-клетке, а введена в Т-клетку. Другими словами, Т-клетка модифицирована с помощью молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, т. е. модифицирована для экспрессии ТКР; такая клетка не является нативной или природной Т-клеткой.

5 Настоящее изобретение также относится к продуцирующей клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты или вектор согласно настоящему изобретению, определенные в настоящем документе. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения продуцирующая клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающих, например, клетку линии НЕК-293, НЕК-293Т  
10 или СНО.

Настоящее изобретение также относится к способу получения иммунной эффекторной клетки, которая специфически распознает пептид TGF $\beta$ RII, несущий мутацию со сдвигом рамки считывания, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, причем указанный способ включает введение в иммунную эффекторную клетку молекулы  
15 нуклеиновой кислоты или вектора согласно настоящему изобретению.

Такой способ может включать стимуляцию клетки и индукцию ее пролиферации до и/или после введения молекулы нуклеиновой кислоты или вектора.

Настоящее изобретение также относится к молекуле ТКР, определенной в настоящем документе, в частности, к молекуле растворимого ТКР, определенной в настоящем  
20 документе. Как описано выше и более подробно описано ниже, растворимые ТКР можно применять в терапии.

Как отмечено выше, растворимые ТКР и иммунные эффекторные клетки согласно настоящему изобретению можно применять в терапии. Соответственно, дополнительные аспекты изобретения включают:

25 композицию, в частности, терапевтическую или фармацевтическую композицию, содержащую растворимый ТКР или иммунную эффекторную клетку согласно настоящему изобретению, определенные в настоящем документе, и по меньшей мере один физиологически приемлемый носитель или вспомогательное вещество;

растворимый ТКР, иммунную эффекторную клетку или композицию согласно  
30 настоящему изобретению, определенные в настоящем документе, для применения в терапии, в частности, терапии на основе адоптивного переноса клеток;

растворимый ТКР, иммунную эффекторную клетку или композицию согласно настоящему изобретению, определенные в настоящем документе, для применения при лечении рака, в частности, для лечения колоректального рака, вызванного HNPCC;

способ лечения рака, в частности, колоректального рака, причем указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, растворимого ТКР, иммунной эффекторной клетки или композиции согласно настоящему изобретению, определенных в настоящем документе, в частности, эффективное количество указанной клетки или композиции; и

применение растворимого ТКР или иммунной эффекторной клетки, определенных в настоящем документе, для производства лекарственного средства (или композиции) для применения в терапии рака, в частности, для лечения колоректального рака.

В способе получения модифицированной иммунной эффекторной клетки согласно настоящему изобретению указанная иммунная эффекторная клетка, которая модифицирована путем введения молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, может быть получена от субъекта, подлежащего лечению (например, субъекта, страдающего раком, таким как колоректальный рак). После модификации иммунной эффекторной клетки, и необязательно ее размножения в условиях *in vitro*, модифицированные иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие ТКР, могут быть повторно внедрены (например, введены) субъекту. Соответственно, аутологичные иммунные эффекторные клетки можно применять в терапевтических способах и вариантах применения согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту, можно применять гетерологичные (т. е. донорские или аллогенные, или сингенные, или ксеногенные) иммунные эффекторные клетки.

Иммунная эффекторная клетка может представлять собой любую иммунную клетку, способную к иммунному ответу против клетки-мишени, представляющей пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1. Более конкретно иммунная эффекторная клетка способна подавлять, повреждать или устранять клетку-мишень, т. е. снижать или ингибировать жизнеспособность клетки-мишени, предпочтительно вызывая гибель клетки-мишени (другими словами, уменьшая жизнеспособность клетки-мишени или делая ее нежизнеспособной). Соответственно, иммунная эффекторная клетка предпочтительно представляет собой цитотоксическую иммунную эффекторную клетку.

Термин «цитотоксический» является синонимом «цитолитический» и используется в настоящем документе для обозначения клетки, способной индуцировать гибель клеток путем лизиса или апоптоза в клетке-мишени.

В настоящем документе термин «иммунная эффекторная клетка» включает не только зрелые или полностью дифференцированные иммунные эффекторные клетки, но и их клетки-предшественники (или прогениторные клетки), включая стволовые клетки (в частности гемопоэтические стволовые клетки, HSC), или клетки, происходящие из HSC.

Соответственно, иммунная эффекторная клетка может представлять собой Т-клетку, НК-клетку, НКТ-клетку, нейтрофил, макрофаг или клетку, происходящую из HSC, содержащуюся в популяции CD34<sup>+</sup> клеток, полученных из гемопоэтической ткани, например, из костного мозга, пуповинной крови или, например, мобилизованной периферической крови, которая при введении субъекту дифференцируется в зрелые иммунные эффекторные клетки. Как будет описано более подробно ниже, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку. Можно применять первичные клетки, например, клетки, выделенные у субъекта, подлежащего лечению, или донора, необязательно с промежуточным этапом культивирования клеток (например, для размножения клеток), или другие культивируемые клетки или клеточные линии (например, клеточные линии НК, такие как клеточная линия NK92).

Термин «направленный против пептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1» является синонимом «специфический в отношении пептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1», т. е. означает только то, что ТКР способен специфически связываться с пептидом. В частности, антигенсвязывающий домен ТКР способен специфически связываться с пептидом (более конкретно, если ТКР экспрессируется на поверхности иммунной эффекторной клетки). Специфическое связывание можно отличить от неспецифического связывания с нецелевым антигеном (в данном случае с пептидом, отличным от пептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1). Соответственно, иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая ТКР в соответствии с настоящим изобретением, перенаправлена для того чтобы специфически связываться и проявлять цитотоксичность (например, вызывать гибель) в отношении клетки-мишени, представляющей пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1. Иными словами, иммунная эффекторная клетка модифицирована для перенаправления цитотоксичности преимущественно в отношении клеток-мишеней, представляющих указанный пептид или экспрессирующих мутантный рецептор TGFβRII, содержащий указанный пептид.

Связывание антигенсвязывающего домена ТКР с пептидом на поверхности клетки-мишени передает активирующий стимул к ТКР-содержащей клетке, что приводит к индукции сигнальных путей эффекторной клетки. Связывание с пептидом-мишенью может тем самым запускать пролиферацию, выработку цитокинов, фагоцитоз, литическую активность и/или выработку молекул, которые могут опосредовать гибель клетки-мишени с помощью способа, не зависящего от ГКГС.

Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению может вырабатываться любой подходящей продуцирующей клеткой-мишенью. Подходящая клетка предпочтительно представляет собой клетку млекопитающего, например, клетку человека или клетку грызунов. Можно применять любую подходящую клеточную линию, включая клетки 5 линий НЕК-293, НЕК-293Т и СНО. Связывание растворимого ТКР согласно настоящему изобретению с пептидом на поверхности клетки-мишени приводит к интернализации комплекса ГКГС класса I-антиген-ТКР. Соответственно, растворимые ТКР можно применять для специфической доставки токсинов в клетки-мишени, что приводит к гибели клеток-мишеней.

10 Молекула ТКР согласно настоящему изобретению может содержать домен  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению и домен  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту, молекула ТКР может содержать домен  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению, но не домен  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению; или молекула ТКР может содержать домен  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению, но не 15 домен  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению. Другими словами, молекула ТКР согласно настоящему изобретению содержит домен  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению и/или домен  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению. Однако предпочтительно молекула ТКР согласно настоящему изобретению содержит как домен  $\alpha$ -цепи, определенный в настоящем документе, так и домен  $\beta$ -цепи, определенный в 20 настоящем документе.

Согласно данному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, в котором молекула ТКР согласно настоящему изобретению содержит как домен  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению (далее «домен  $\alpha$ -цепи»), так и домен  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению (далее «домен  $\beta$ -цепи»), домен  $\alpha$ -цепи и домен  $\beta$ -цепи могут кодироваться по отдельности (например, они кодируются отдельными генами 25 или более конкретно отдельными молекулами нуклеиновых кислот или отдельными частями (в значении отдельно контролируемых частей) или открытыми рамками считывания (ORF) молекулы нуклеиновой кислоты и синтезируются как отдельные белки). Согласно другому варианту, они могут совместно кодироваться одним геном (т. е. 30 одной молекулой нуклеиновой кислоты или одной ORF и т. д.), в этом случае они синтезируются в виде единого белка. В том случае, если домен  $\alpha$ -цепи и домен  $\beta$ -цепи кодируются в виде единого белка, этот белок известен как одноцепочечный ТКР (оцТКР). ОцТКР содержит домен  $\alpha$ -цепи, соединенный с доменом  $\beta$ -цепи. В настоящем документе термин «домен  $\alpha$ -цепи» относится к  $\alpha$ -цепи ТКР, которая либо представляет собой 35 индивидуальный белок, либо является частью белка, и, в частности, частью оцТКР. В



настоящем документе термин «домен  $\beta$ -цепи» относится к  $\beta$ -цепи ТКР, которая либо представляет собой индивидуальный белок, либо является частью белка, и, в частности, частью оцТКР. Экспрессия доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи в единой молекуле оцТКР гарантирует, что домены двух цепей экспрессируются в одно и то же время и со сходными уровнями. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения молекула ТКР согласно настоящему изобретению кодируется в виде оцТКР.

В том случае, если молекула ТКР согласно настоящему изобретению кодируется в виде оцТКР, домены  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи могут быть соединены с помощью линкера. Такой линкер состоит из аминокислотной последовательности между доменами  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи. Предпочтительно домен  $\alpha$ -цепи расположен на N-конце оцТКР, затем следует линкер, за которым расположен домен  $\beta$ -цепи на C-конце оцТКР. Однако домен  $\beta$ -цепи может быть расположен, в другом варианте, на N-конце оцТКР, при этом домен  $\alpha$ -цепи располагается на C-конце, и линкер располагается между ними.

Аминокислотная последовательность линкера может иметь любую подходящую длину. Линкерная последовательность может содержать 1-30 аминокислот или более предпочтительно 1-25 или 1-20 аминокислот. Однако линкер предпочтительно должен быть расщепляемым так, что две цепи ТКР могут быть отделены друг от друга; если они не могут быть отделены друг от друга, то две цепи могут быть не способны принимать корректные конформации и правильно взаимодействовать, в результате этого ТКР может быть нефункциональным.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения линкер способен к аутосплайсингу. Линкер способный к аутосплайсингу может катализировать расщепление молекулы оцТКР в положении линкера, отделяя тем самым домены  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей. Для протекания данной реакции сплайсинга не требуется стимуляция или индукция, и реакция сплайсинга в оптимальном варианте происходит до транспортировки доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи к поверхности клетки. В результате реакции расщепления линкер может быть полностью вырезан из молекулы ТКР; в другом варианте линкер, или часть линкера, может оставаться присоединенным к одной или обоим готовым отдельным цепям ТКР. Реакция сплайсинга, катализируемая линкером, может происходить после трансляции (т. е. может представлять собой реакцию автокаталитического протеолиза), или она может происходить котрансляционно. Котрансляционный сплайсинг может происходить за счет предотвращения образования пептидной связи в линкере или между линкером и одним из доменов цепи, расположенных по обе стороны от него.

Предпочтительный линкер способный к аутосплайсингу представляет собой линкер, происходящий из саморасщепляющегося пептида 2А пикорнавируса. Пептиды 2А

содержат приблизительно 20-25 аминокислот и заканчиваются мотивом консервативной последовательности Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro (SEQ ID NO: 52). Пептиды 2A подвергаются котрансляционному аутосплайсингу за счет предотвращения образования пептидной связи между консервативным остатком глицина и концевым остатком пролина, что приводит к эффективному расщеплению белка между этими двумя аминокислотами. После расщепления пептид 2A (за исключением C-концевого пролина) остается присоединенным к C-концу белка, расположенного перед ним; концевой остаток пролина остается присоединенным к N-концу белка, расположенного после него. Особенно предпочтительная последовательность линкера, происходящего из пептида 2A, приведена в SEQ ID NO: 18. Однако последовательность пептида, расположенного перед мотивом консервативной C-концевой последовательности 2A (SEQ ID NO: 52), может быть изменена без существенной потери аутосплайсинговой активности. Соответственно, линкер также может содержать последовательность, которая по меньшей мере на 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, при условии, что она заканчивается вышеописанным мотивом консервативной последовательности и сохраняет аутосплайсинговую активность. В частности, способные к аутосплайсингу варианты последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, могут сохранять по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% аутосплайсинговой активности пептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 18.

Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из домена  $\alpha$ -цепи происходят из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, в то время как последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из домена  $\beta$ -цепи происходят из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно. Иными словами, CDR1, CDR2 и CDR3 из домена  $\alpha$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, или содержат варианты указанных последовательностей, которые были модифицированы путем замены, добавления или делеции 1 или 2 аминокислот. CDR1, CDR2 и CDR3 из домена  $\beta$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, или содержат варианты указанных последовательностей, которые были модифицированы путем замены, добавления или делеции 1 или 2 аминокислот. Варианты CDR функционально эквивалентны своим соответствующим родственным нативным немодифицированным CDR. Под функциональной эквивалентностью подразумевается, что белок или аминокислотная последовательность (в настоящем документе CDR) сохраняет, или по существу сохраняет, функцию или активность белка или аминокислотной последовательности (в настоящем документе

CDR), из которой он (она) происходит, или на которой он (она) основана (т. е. которой он (она) соответствует). В частности, функционально эквивалентный вариант может сохранять по меньшей мере 70% или более конкретно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% активности или функции соответствующего (немодифицированного) белка или аминокислотной последовательности. Фактически это означает, что вариант CDR не оказывает отрицательного влияния, или по существу не оказывает отрицательного влияния, на функцию или активность, или свойства ТКР, в котором он присутствует (по сравнению с нативным или немодифицированным ТКР, или по сравнению с ТКР, в котором участки CDR не модифицированы). Прежде всего, это означает, что вариант CDR не оказывает отрицательного влияния на специфичность связывания ТКР, т. е. ТКР сохраняет способность специфически связываться с пептидом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 1, при надлежащем представлении на клетке-мишени. Помимо этого аффинность связывания ТКР по существу не снижена по сравнению с нативным или немодифицированным ТКР или ТКР с немодифицированными участками CDR. Однако аффинность связывания ТКР может быть улучшена путем модификации участков CDR, в частности, CDR 1 и/или 2.

Соответственно, последовательности CDR1 и CDR2, модифицированные (или мутированные), как описано выше, могут иметь улучшенную аффинность связывания со своим антигеном-мишенью без потери специфичности связывания. Такие мутированные последовательности, следовательно, можно применять при лечении разновидностей рака, при которых вырабатывается неопептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1. Такие пригодные модифицированные последовательности ТКР можно идентифицировать путем скрининга библиотек клонов ТКР с введенными случайными мутациями в их участках CDR1 и/или CDR2. Клоны растворимого ТКР с улучшенной аффинностью связывания со своими антигенами-мишенями могут быть идентифицированы, например, методом поверхностного плазмонного резонанса или с помощью количественного исследования термических флуктуаций. Клоны нерастворимых ТКР с улучшенной аффинностью связывания с их антигенами-мишенями могут быть идентифицированы, например, с помощью функциональных количественных исследований, при которых высвобождение цитокинов анализируют для мониторинга активации иммунных эффекторных клеток посредством ТКР. Однако согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения все последовательности CDR1 и CDR2 как домена  $\alpha$ -цепи, так и домена  $\beta$ -цепи являются немодифицированными (т. е. CDR 1 и 2 из домена  $\alpha$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 2 и 3, соответственно, и CDR 1 и 2 из домена  $\beta$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 5 и 6, соответственно).

Последовательности CDR3 доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи предпочтительно содержат последовательности SEQ ID NO: 4 и 7, соответственно, и указанные последовательности предпочтительно не изменены или не модифицированы.

Полноразмерный ТКР согласно настоящему изобретению (т. е. нерастворимый ТКР, который, при его экспрессии иммунной эффекторной клеткой, локализован на поверхности клетки), при его экспрессии на поверхности иммунной эффекторной клетки, такой как Т-клетка, способен повторно направлять клетку, на которой он экспрессируется, так, что клетка распознает неоантиген, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, когда он представлен ГКГС класса I. Другими словами, такой ТКР согласно настоящему изобретению активирует иммунную эффекторную клетку, чтобы направлять ее действие или функцию, например, ее цитотоксическую активность, против клетки-мишени, которая подверглась мутации со сдвигом рамки считывания -1A в TGF $\beta$ RII, или фактически любой аналогичной мутации, которая приводит к выработке неоантигена, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1. Иммунная эффекторная клетка, на поверхности которой экспрессирован полноразмерный ТКР согласно настоящему изобретению, может представлять собой любую иммунную эффекторную клетку, как обсуждалось выше и далее ниже, однако в одном предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой CD4<sup>+</sup> Т-клетку, CD8<sup>+</sup> Т-клетку или любой другой тип Т-клеток.

Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению способен распознавать, т. е. связывать, неоантиген, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, когда он представлен ГКГС класса I, и подвергаться таким образом селективной интернализации клеткой-мишенью. Селективная интернализация растворимых ТКР согласно настоящему изобретению может быть идентифицирована любым способом, известным в данной области техники. Например, растворимый ТКР может быть конъюгирован с флуорофором (например, с флуоресцентным белком, таким как GFP), и вследствие этого интернализация ТКР может быть выявлена по интернализации флуоресценции. Если растворимый ТКР интернализуется клетками, которые экспрессируют неоантиген, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, но не интернализуется (или интернализуется в более низкой степени) клетками, которые не экспрессируют последовательность SEQ ID NO: 1, можно сказать, что растворимый ТКР селективно интернализуется клетками-мишенями. Как описано выше, растворимые ТКР содержат как  $\alpha$ -цепь, так и  $\beta$ -цепь, но каждая цепь усечена на своем С-конце за счет делеции трансмембранных и внутриклеточных доменов константной области. В связи с этим цепи растворимого ТКР содержат N-концевую лидерную последовательность (до момента ее отщепления во время созревания полипептидов), вариабельную область и N-конец (т. е.

внеклеточный домен) константной области. Соответственно, можно сказать, что растворимый ТКР является усеченным ТКР с усеченными  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями, тогда как нерастворимый ТКР (такой как ТКР дикого типа), который экспрессируется на поверхности иммунной эффекторной клетки, такой как Т-клетка, можно назвать

5 полноразмерным ТКР с полноразмерными  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями.

ГКГС класса I, который представляет неоантиген, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, ТКР согласно настоящему изобретению (ТКР, который присутствует в растворе, т. е. растворимому ТКР, или Т-клетке, экспрессирующей полноразмерный ТКР согласно настоящему изобретению), может содержать HLA-A2-аллель HLA-A. Более

10 конкретно ГКГС класса I может содержать HLA-A\*02:01-изоформу HLA-A2. Однако ГКГС класса I не ограничен компонентами ГКГС, содержащими HLA-A\*02:01-изоформу, или фактически HLA-A2; он может содержать любой белок HLA, который способен распознавать ТКР. В частности, он может содержать изоформу HLA-A2, отличную от HLA-A\*02:01-изоформы. Другими словами, он может содержать любую изоформу HLA-

15 A2.

Как упоминалось выше, CDR из  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -цепи ТКР расположены в пределах вариабельной области цепи. Каждая вариабельная область содержит 3 последовательности CDR в остове из 4 каркасных последовательностей. На основании

20 лишь последовательностей CDR невозможно предсказать, какие последовательности каркасных участков будут удерживать последовательности CDR вместе в функциональном ТКР. Как упоминалось выше, аминокислотные последовательности вариабельных областей  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей ТКР Radium-1 приведены в SEQ ID NO: 8 и 13, соответственно. Однако некоторые модификации природных каркасных последовательностей обычно можно осуществлять без отрицательного влияния на

25 функцию ТКР. Соответственно, в ТКР согласно настоящему изобретению каркасные участки вариабельных областей доменов  $\alpha$ -цепи и/или  $\beta$ -цепи могут быть аналогичны каркасным участкам нативного рецептора Radium-1 (т. е., поскольку он был выделен или обнаружен в природе), но не обязательно. Соответственно, каркасные участки вариабельных областей рецептора Radium-1 могут быть модифицированы (например,

30 путем замены, добавления, вставки или делеции аминокислот), включая их замены, например, каркасными участками мыши или каркасными участками, содержащими фрагменты последовательности мыши (соответственно, аминокислотная последовательность каркасных участков может быть модифицирована и/или заменена).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\alpha$ -цепи ТКР

35 содержит вариабельную область, имеющую, или содержащую или состоящую из нее,

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична указанной аминокислотной последовательности. В том случае, если домен  $\alpha$ -цепи ТКР содержит последовательность, которая представляет собой вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8 (т. е. последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8, но которая не полностью идентична ей), последовательности CDR домена  $\alpha$ -цепи представляют собой последовательности согласно настоящему изобретению, определенные выше.

10 Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения домен  $\beta$ -цепи ТКР содержит вариабельную область, имеющую, или содержащую или состоящую из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична указанной аминокислотной последовательности. В том случае, если домен  $\beta$ -цепи ТКР  
15 содержит последовательность, которая представляет собой вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13 (т. е. последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13, но которая не полностью идентична ей), то последовательности CDR домена  $\beta$ -цепи представляют собой последовательности согласно настоящему изобретению,  
20 определенные выше.

На основании вышеизложенного следует, что вариабельные области нативного ТКР Radium-1 могут быть модифицированы. Как указано выше применительно к обсуждению модификаций CDR, в объем настоящего изобретения включены функционально эквивалентные варианты ТКР Radium-1. Такие функционально эквивалентные варианты  
25 ТКР или доменов  $\alpha$ -цепи и/или  $\beta$ -цепи или их вариабельных и/или константных областей, в которых нативная аминокислотная последовательность ТКР Radium-1 (или домена цепи или ее области) была модифицирована, сохраняют или по существу сохраняют активность, свойство или функцию ТКР, или домена цепи или ее области, как обсуждалось выше. В частности, такая модифицированная функционально эквивалентная  
30 молекула ТКР или модифицированный функционально эквивалентный домен цепи, или ее область применительно к молекуле ТКР, сохраняет или по существу сохраняет активность рецептора ТКР, например, как указано выше, сохраняет по меньшей мере 70% или более активности, например, активности ТКР, направленной на распознавание клетки-мишени (например, раковой клетки) и/или на цитотоксическое действие против клетки-мишени.

Как обсуждалось выше, терапия на основе адоптивного переноса клеток может представлять угрозу для безопасности пациентов. В качестве защитного механизма можно кодировать метку в ТКР согласно настоящему изобретению, которая позволяет осуществлять нацеленное уничтожение клеток, экспрессирующих полноразмерный ТКР.

5 Нацеленное уничтожение клеток можно выполнять, если пациент имеет отрицательную реакцию на терапию. Нацеленное уничтожение клеток можно выполнять с использованием антител, которые распознают введенную метку. Такой механизм описан в Kieback, E. *et al.*, 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, Vol. 105, pp. 623-628. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ТКР содержит последовательность  
10 общеизвестной метки. Примеры подходящих меток хорошо известны в данной области техники и включают метку FLAG, полигистидиновую метку (His-метку), HA-метку, Strep-метку, S-метку и Мус-метку. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения ТКР согласно настоящему изобретению содержит метку Мус. В ТКР может присутствовать несколько (т. е. две или более, например, от 2 до 10, от 2 до 8  
15 или от 2 до 6) предпочтительно смежных копий последовательности метки. В особенно предпочтительном варианте реализации ТКР содержит двойную метку Мус. Такая двойная метка Мус имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

Метка может быть расположена в любой цепи ТКР. Для того чтобы обеспечить оптимальный доступ антитела к метке, она предпочтительно должна быть расположена на  
20 N-конце цепи ТКР. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\alpha$ -цепи содержит вариабельную область, которая дополнительно содержит двойную метку Мус с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 19. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения домен  $\beta$ -цепи содержит вариабельную область, которая дополнительно содержит двойную метку Мус с  
25 аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 19. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения оба домена  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи содержат вариабельные области, содержащие двойную метку Мус.

Как упоминалось выше, синтезированный N-конец цепи ТКР представляет собой сигнальный пептид. Такой сигнальный пептид обычно расположен между примерно 15 и  
30 примерно 30 аминокислотами. Сигнальный пептид для  $\alpha$ -цепи Radium-1, по прогнозам, состоит из первых 20 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 8, которые представлены последовательностью SEQ ID NO: 50. Сигнальный пептид  $\beta$ -цепи Radium-1, по прогнозам, состоит из первых 16 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 13, которые представлены последовательностью SEQ ID NO: 51. Как упоминалось выше,  
35 указанные лидерные последовательности отсутствуют в зрелом ТКР.

Для того чтобы поместить метку на N-конце зрелой цепи ТКР, последовательность метки может быть вставлена в переменную область домена цепи ТКР непосредственно после лидерной последовательности. Метка может быть вставлена как в домен  $\alpha$ -цепи, так и в домен  $\beta$ -цепи. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения двойная метка Мус, содержащая последовательность SEQ ID NO: 19, вставлена в переменную область домена  $\alpha$ -цепи, при этом последовательность SEQ ID NO: 8 расположена непосредственно на C-конце по отношению к лидерной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 50. Согласно данному варианту реализации настоящего изобретения переменная область домена  $\alpha$ -цепи ТКР согласно настоящему изобретению имеет, или содержит или состоит из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична указанной последовательности. В том случае, если переменная область домена  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность, которая представляет собой вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 20 (т. е. последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична указанной последовательности, но не полностью идентична ей), то последовательности CDR представляют собой последовательности домена  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению, определенные выше, и последовательность двойной метки Мус остается неизменной по сравнению с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 19.

ТКР с доменом  $\alpha$ -цепи, содержащим переменную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, как описано выше, остается функциональным, несмотря на то, что он может иметь незначительное снижение активности по сравнению с ТКР с  $\alpha$ -цепью, содержащей переменную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Такой вариант является предпочтительным для применения в терапии, поскольку клетки, экспрессирующие ТКР на своей поверхности, могут быть уничтожены, если необходимо (если пациент страдает тяжелой отрицательной реакцией на лечение), путем впрыскивания антител к метке Мус.

Как полноразмерные, так и усеченные (растворимые) ТКР согласно настоящему изобретению могут содержать домены  $\alpha$ -цепи и/или  $\beta$ -цепи с переменными областями, описанными выше.

Как описано выше, обе  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи ТКР содержат переменную и константную области. Последовательность константной области  $\alpha$ -цепи ТКР Radium-1 приведена в SEQ ID NO: 9, и последовательность константной области  $\beta$ -цепи ТКР Radium-1 приведена в SEQ ID NO: 14. Как и все полноразмерные константные области цепи ТКР указанные



области содержат внеклеточный домен, трансмембранную спираль и короткий внутриклеточный домен (как упоминалось ранее, константные области усеченных цепей растворимого ТКР содержат только внеклеточный домен соответствующей полноразмерной последовательности).

5 Константная область домена  $\alpha$ -цепи полноразмерного ТКР согласно настоящему изобретению может иметь, или содержать или состоять из нее, последовательность константной области  $\alpha$ -цепи Radium-1. Другими словами, домен  $\alpha$ -цепи может содержать константную область, имеющую, т. е. содержащую или состоящую из нее, последовательность SEQ ID NO: 9. Согласно другому варианту, домен  $\alpha$ -цепи может  
10 содержать константную область, имеющую последовательность, сходную с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 9. В частности, домен  $\alpha$ -цепи ТКР согласно настоящему изобретению может содержать константную область, имеющую, т. е. содержащую или состоящую из нее, последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности,  
15 приведенной в SEQ ID NO: 9. Соответственно, как указано выше, в объем настоящего изобретения включен функционально эквивалентный вариант константной области  $\alpha$ -цепи Radium-1 с модифицированной последовательностью.

Домен  $\alpha$ -цепи полноразмерного ТКР согласно настоящему изобретению может, в другом варианте реализации, содержать константную область, которая имеет, или  
20 содержит или состоит из нее, последовательность мыши, эквивалентную константной области  $\alpha$ -цепи Radium-1. Иными словами, домен  $\alpha$ -цепи может содержать константную область, имеющую последовательность, которая представляет собой муринизированный вариант SEQ ID NO: 9. Соответственно, в таком домене  $\alpha$ -цепи константная область человека была заменена константной областью мыши.

25 Последовательность константного домена  $\alpha$ -цепи ТКР мыши, которая эквивалентна последовательности константной области  $\alpha$ -цепи ТКР Radium-1, приведенной в SEQ ID NO: 9, представляет собой последовательность SEQ ID NO: 23. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения, в котором константная область домена  $\alpha$ -цепи муринизирована, указанная муринизированная константная область, имеет, или  
30 содержит или состоит из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения муринизированная константная область имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 23.

Константная область домена  $\beta$ -цепи полноразмерного ТКР согласно настоящему изобретению может иметь, или содержать или состоять из нее, последовательность константной области  $\beta$ -цепи Radium-1. Иными словами, домен  $\beta$ -цепи может содержать константную область, имеющую, т. е. содержащую или состоящую из нее, последовательность SEQ ID NO: 14. Согласно другому варианту, домен  $\beta$ -цепи может содержать константную область, последовательность которой сходна с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 14. В частности, домен  $\beta$ -цепи ТКР согласно настоящему изобретению может содержать константную область, имеющую, т. е. содержащую или состоящую из нее, последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 14. Соответственно, как указано выше, в область настоящего изобретения включен функционально эквивалентный вариант константной области  $\beta$ -цепи Radium-1 с модифицированной последовательностью.

Домен  $\beta$ -цепи полноразмерного ТКР согласно настоящему изобретению может, в другом варианте реализации, содержать константную область, которая имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность мыши, эквивалентную константной области  $\beta$ -цепи Radium-1. Иными словами, домен  $\beta$ -цепи может содержать константную область, имеющую последовательность, которая представляет собой муринизированный вариант SEQ ID NO: 14. Соответственно, в таком домене  $\beta$ -цепи константная область человека была заменена константной областью мыши.

Последовательность константной области домена  $\beta$ -цепи ТКР мыши, которая эквивалентна последовательности константной области домена  $\beta$ -цепи ТКР Radium-1, приведенной в SEQ ID NO: 14, представляет собой последовательность SEQ ID NO: 29. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения, в котором константная область домена  $\beta$ -цепи муринизирована, указанная муринизированная константная область имеет, или содержит или состоит из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения муринизированная константная область имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 29.

В ТКР согласно настоящему изобретению, несмотря на то, что  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи могут кодироваться в виде одной полипептидной цепи (т. е. как оцТКР), в своей зрелой форме они образуют отдельные цепи. Каждая из  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей кодируется в виде отдельных полипептидов, или они кодируются как оцТКР, в этом случае они соединены с помощью линкера, который расщепляется до их созревания и транспортировки к клеточной

мембране. Это означает, что в зрелом ТКР согласно настоящему изобретению  $\alpha$ -цепь и  $\beta$ -цепь образуют дискретные полипептидные цепи: т. е. они больше не соединены с помощью пептидных связей.

Во всех зрелых  $\alpha\beta$ -ТКР  $\alpha$ -цепь и  $\beta$ -цепь ковалентно соединены межцепочечными дисульфидными связями, которые образуются между остатками цистеина, расположенными в константных областях каждой цепи. Межцепочечные дисульфидные связи обеспечивают тесную связь двух цепей ТКР после образования ТКР, что имеет большое значение для функциональности ТКР. В том случае, когда ТКР экзогенно экспрессируется в Т-клетке, существует риск того, что экзогенно кодируемые цепи ТКР будут формировать комплекс с эндогенно кодируемыми цепями ТКР, что приведет к образованию смешанных ТКР, содержащих экзогенно кодируемую  $\alpha$ -цепь и эндогенно кодируемую  $\beta$ -цепь, или наоборот. Применительно к настоящему изобретению это означает, что  $\alpha$ -цепь согласно настоящему изобретению (такая как  $\alpha$ -цепь Radium-1) может образовывать комплекс ТКР с  $\beta$ -цепью ТКР, кодируемой Т-клеткой, в которой она экспрессируется, или наоборот. В такой ситуации активность ТКР согласно настоящему изобретению (такого как ТКР Radium-1) может быть снижена по сравнению с ситуацией, в которой цепи ТКР согласно настоящему изобретению образуют комплекс только друг с другом.

Было обнаружено, что можно стимулировать преимущественное спаривание  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи путем введения дополнительного остатка цистеина в константные области доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи ТКР согласно настоящему изобретению. Было показано, что это усиливает экспрессию и функцию ТКР в некоторых Т-клетках. Соответственно, константная область домена  $\alpha$ -цепи и/или константная область домена  $\beta$ -цепи могут быть модифицированы путем введения остатка цистеина. Предпочтительно константные области доменов как  $\alpha$ -цепи, так и  $\beta$ -цепи модифицированы путем введения остатка цистеина. Дополнительный остаток цистеина может быть введен путем вставки (т. е. путем вставки дополнительного остатка аминокислоты в константную область домена  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -цепи) или путем замены (т. е. путем замены цистеином аминокислоты, отличной от цистеина, уже присутствующей в константной области домена  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -цепи). Если остаток цистеина должен быть введен в константные области доменов как  $\alpha$ -цепи, так и  $\beta$ -цепи, то для каждого домена цепи можно применять различные способы введения цистеина. Цепи ТКР или домены цепи согласно настоящему изобретению, в которые был введен дополнительный остаток цистеина, могут называться «модифицированные цистеином».

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения константная область  $\alpha$ -цепи полноразмерного ТКР имеет последовательность константной области  $\alpha$ -цепи Radium-1, модифицированную цистеином. Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения константная область  $\alpha$ -цепи Radium-1 модифицирована путем замены T48C. Другими словами, треонин 48 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 9, заменен цистеином. Последовательность константной области домена  $\alpha$ -цепи, состоящая из SEQ ID NO: 9 с заменой T48C, приведена в SEQ ID NO: 10, поэтому согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\alpha$ -цепи содержит константную область, имеющую, т. е. содержащую или состоящую из нее, последовательность SEQ ID NO: 10. Согласно другому варианту, домен  $\alpha$ -цепи может содержать константную область, имеющую, т. е. содержащую или состоящую из нее, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10, при условии, что остаток цистеина в положении 48 (или в положении, соответствующем положению 48 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10) остается неизменным.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения константная область  $\beta$ -цепи полноразмерного ТКР имеет последовательность константной области  $\beta$ -цепи Radium-1, модифицированную цистеином. Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения константная область  $\beta$ -цепи Radium-1 модифицирована путем замены S57C. Другими словами, серин 57 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 14, заменен цистеином. Последовательность константной области домена  $\beta$ -цепи, состоящая из SEQ ID NO: 14 с заменой S57C, приведена в SEQ ID NO: 15, поэтому согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\beta$ -цепи содержит константную область, имеющую, т. е., содержащую или состоящую из нее, последовательность SEQ ID NO: 15. Согласно другому варианту, домен  $\beta$ -цепи может содержать константную область, имеющую, т. е. содержащую или состоящую из нее, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 15, при условии, что остаток цистеина в положении 57 (или в положении, соответствующем положению 57 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 15) остается неизменным.

В вариантах реализации, в которых один или оба домена цепей ТКР содержат мураинизированную константную область, указанная мураинизированная константная область может быть модифицирована цистеином. Предпочтительная последовательность мураинизированной константной области и модифицированной цистеином, из домена  $\alpha$ -цепи полноразмерного ТКР согласно настоящему изобретению приведена в SEQ ID NO: 24. Последовательность SEQ ID NO: 24 представляет собой модифицированный цистеином вариант последовательности SEQ ID NO: 23. Последовательность SEQ ID NO: 24 получают путем замены остатка в мышинной последовательности SEQ ID NO: 23, который эквивалентен треонину 48 в последовательности человека SEQ ID NO: 9, остатком цистеина. Соответственно, домен  $\alpha$ -цепи может содержать модифицированную цистеином мураинизированную константную область, имеющую, т. е. содержащую или состоящую из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности, в которой остаток цистеина в положении 47 (или в положении, соответствующем положению 47 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 24) остается неизменным.

Предпочтительная последовательность модифицированной цистеином мураинизированной константной области, из домена  $\beta$ -цепи полноразмерного ТКР согласно настоящему изобретению приведена в SEQ ID NO: 30. Последовательность SEQ ID NO: 30 представляет собой модифицированный цистеином вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 29. Последовательность SEQ ID NO: 30 получают путем замены остатка в мышинной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 29, который эквивалентен серину 57 в последовательности человека, приведенной в SEQ ID NO: 14, остатком цистеина. Соответственно, домен  $\beta$ -цепи может содержать модифицированную цистеином мураинизированную константную область, имеющую, т. е. содержащую или состоящую из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности, в которой остаток цистеина в положении 56 (или в положении, соответствующем положению 56 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 30) остается неизменным.

Как описано в настоящем документе, каждый из доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи в полноразмерном ТКР согласно настоящему изобретению может содержать или состоять из переменной области и константной области, при этом последовательности переменных и константных областей определены и описаны выше. Различные последовательности переменных и константных областей могут быть объединены в

любых возможных комбинациях, при этом наиболее предпочтительным является комбинирование последовательностей вариабельной области  $\alpha$ -цепи с последовательностями константной области  $\alpha$ -цепи, и комбинирование последовательностей вариабельной области  $\beta$ -цепи с последовательностями константной области  $\beta$ -цепи.

Согласно одному варианту реализации полноразмерного ТКР согласно настоящему изобретению домен  $\alpha$ -цепи содержит вариабельную область и константную область с соответствующими последовательностями вариабельной и константной областей  $\alpha$ -цепи ТКР Radium-1. Согласно данному варианту реализации домен  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению может иметь последовательность  $\alpha$ -цепи ТКР Radium-1, которая приведена в SEQ ID NO: 11. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\alpha$ -цепи имеет, или содержит или состоит из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

Как подробно описано выше, домен  $\alpha$ -цепи может содержать метку в своем вариабельном домене. Такая метка предпочтительно расположена непосредственно на С-конце по отношению к лидерной последовательности домена  $\alpha$ -цепи так, что она образует крайнюю часть N-конца зрелого домена цепи. Предпочтительная метка представляет собой двойную метку Мус.  $\alpha$ -Цепь ТКР Radium-1 с двойной меткой Мус, вставленной непосредственно на С-конце по отношению к лидерной последовательности, имеет последовательность SEQ ID NO: 21. Соответственно, согласно другому варианту реализации настоящего изобретения домен  $\alpha$ -цепи полноразмерного ТКР имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность SEQ ID NO: 21. Согласно другому варианту, домен  $\alpha$ -цепи полноразмерного ТКР может иметь, или содержать или состоять из нее, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 21, при условии, что последовательности CDR (и последовательность двойной метки Мус, в тех случаях, когда она присутствует) представляют собой последовательности, определенные выше.

Как описано выше, константная область домена  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению альтернативно может быть мышинной: в частности, она может представлять собой мышиный (или муринизированный) вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 9, однако она может представлять собой любую другую константную область  $\alpha$ -цепи ТКР мыши. В том случае, если константная область домена  $\alpha$ -цепи муринизирована, вариабельная область также может быть муринизирована (в частности, каркасные участки вариабельного домена могут быть муринизированы), однако это не

является обязательным. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, в случае если константная область домена  $\alpha$ -цепи мурилизирована, переменная область представляет собой переменную область человека. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения, в случае если константная область домена  $\alpha$ -цепи полноразмерного ТКР является мышиной, она содержит последовательность SEQ ID NO: 23, в то время как переменная область представляет собой переменную область  $\alpha$ -цепи Radium-1. Последовательность  $\alpha$ -цепи полноразмерного ТКР с переменной областью  $\alpha$ -цепи Radium-1 и константной областью, имеющей последовательность SEQ ID NO: 23, приведена в SEQ ID NO: 25.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\alpha$ -цепи ТКР содержит мурилизированную константную область и переменную область человека, и имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность SEQ ID NO: 25.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полноразмерный домен  $\alpha$ -цепи содержит константную область мыши и переменную область, которая содержит метку, предпочтительно двойную метку Мус, предпочтительно непосредственно на С-конце относительно лидерной последовательности. Согласно данному варианту реализации настоящего изобретения константный домен предпочтительно содержит последовательность SEQ ID NO: 23, и переменный домен, содержит последовательность SEQ ID NO: 20 (SEQ ID NO: 20 представляет собой переменную область  $\alpha$ -цепи Radium-1 с двойной меткой Мус, встроенной непосредственно на С-конце лидерной последовательности). Последовательность домена  $\alpha$ -цепи, состоящего из константной области мыши, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 23, и переменной области, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 20, приведена в SEQ ID NO: 27. Соответственно, домен  $\alpha$ -цепи полноразмерного ТКР согласно настоящему изобретению может иметь, или содержать или состоять из нее, последовательность SEQ ID NO: 27. В другом варианте домен  $\alpha$ -цепи полноразмерного ТКР может иметь, или содержать или состоять из нее, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 27, при условии, что последовательности CDR (и последовательность двойной метки Мус, в тех случаях, когда она присутствует) представляют собой последовательности, определенные выше.

Как описано выше, константные области доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи могут быть модифицированы цистеином, чтобы повысить специфичность взаимодействия  $\alpha$ -цепи с  $\beta$ -цепью ТКР согласно настоящему изобретению. Такая модифицированная константная область может быть спарена с любой переменной областью согласно настоящему

изобретению: например, модифицированный цистеином константный домен может быть спарен с вариабельной областью, содержащей двойную метку Мус, однако это не является обязательным. Соответственно, домен  $\alpha$ -цепи может содержать константную область, которая была модифицирована цистеином. Предпочтительные модифицированные цистеином константные области домена  $\alpha$ -цепи были описаны выше: полноразмерный модифицированный цистеином константный домен  $\alpha$ -цепи Radium-1 содержит последовательность SEQ ID NO: 10, тогда как модифицированный цистеином муринизированный эквивалент последовательности SEQ ID NO: 10 приведен в SEQ ID NO: 24.

10 Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения полноразмерный домен  $\alpha$ -цепи содержит вариабельный домен  $\alpha$ -цепи Radium-1, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 8, и модифицированный цистеином константный домен Radium-1, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 10, или модифицированный цистеином муринизированный константный домен, 15 последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 24. Домен  $\alpha$ -цепи, который состоит из вариабельного домена, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 8, и константного домена, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 10, имеет последовательность SEQ ID NO: 12, и домен  $\alpha$ -цепи, который состоит из вариабельного домена, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 8, и константного домена, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 24, имеет последовательность SEQ ID NO: 26. Соответственно, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения полноразмерный домен  $\alpha$ -цепи имеет, или содержит или состоит из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, или, согласно другому варианту, домен  $\alpha$ -цепи может иметь, или содержать или состоять из нее, 25 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности, при условии, что последовательности CDR и модификация цистеином представляют собой те, которые определены выше. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\alpha$ -цепи имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность SEQ ID NO: 26, или, 30 согласно другому варианту, домен  $\alpha$ -цепи может иметь, или содержать или состоять из нее, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности, при условии, что последовательности CDR и модификация цистеином представляют собой те, которые определены выше.

35 Согласно более предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения полноразмерный домен  $\alpha$ -цепи содержит вариабельный домен  $\alpha$ -цепи Radium-1, который



был модифицирован путем вставки метки, предпочтительно двойной метки Мус, такой как та, которая приведена в SEQ ID NO: 20. Согласно наиболее предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения домен  $\alpha$ -цепи содержит переменную область, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 20, и модифицированный цистеином константный домен Radium-1, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 10, или модифицированный цистеином мурилизированный константный домен, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 24. Домен  $\alpha$ -цепи, который состоит из переменной области, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 20, и константного домена, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 10, имеет последовательность SEQ ID NO: 22, и домен  $\alpha$ -цепи, который состоит из переменного домена, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 20, и константного домена, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 24, имеет последовательность SEQ ID NO: 28.

Соответственно, согласно наиболее предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения полноразмерный домен  $\alpha$ -цепи имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность SEQ ID NO: 2, или, согласно другому варианту, домен  $\alpha$ -цепи может иметь, или содержать или состоять из нее, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности, при условии, что последовательности CDR, последовательность двойной метки Мус и модификация цистеином представляют собой те, которые определены выше. Согласно другому наиболее предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\alpha$ -цепи имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность SEQ ID NO: 28, или, согласно другому варианту, домен  $\alpha$ -цепи может иметь, или содержать или состоять из нее, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности, при условии, что последовательности CDR, последовательность двойной метки Мус и модификация цистеином представляют собой те, которые определены выше.

Сходно с доменом  $\alpha$ -цепи, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, полноразмерный домен  $\beta$ -цепи содержит переменную область и константную область с соответствующими последовательностями переменной и константной областей  $\beta$ -цепи ТКР Radium-1. Согласно данному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению может содержать последовательность  $\beta$ -цепи ТКР Radium-1, которая приведена в SEQ ID NO: 16. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\beta$ -цепи имеет, или содержит или состоит из нее, аминокислотную последовательность SEQ

ID NO: 16. Согласно другому варианту, домен  $\beta$ -цепи может иметь, или содержать или состоять из нее, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 16, при условии, что последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше.

5 Сходно с доменом  $\alpha$ -цепи константная область полноразмерного домена  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению альтернативно может быть мышиной: в частности, она может представлять собой мышиный (или может мурилизирован) вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 14, однако она может представлять собой  
10 любую другую константную область  $\beta$ -цепи ТКР мыши. В том случае, если константная область домена  $\beta$ -цепи мурилизирован, переменная область также может быть мурилизирована (в частности, каркасные участки переменной области могут быть мурилизированными), однако это не является обязательным. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, в случае если константная область домена  $\beta$ -цепи мурилизирован, переменная область представляет  
15 собой переменную область человека. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения, в случае если константная область полноразмерного домена  $\beta$ -цепи ТКР является мышиной, она содержит последовательность SEQ ID NO: 29, тогда как переменная область представляет собой переменную область  $\beta$ -цепи Radium-1. Последовательность  $\beta$ -цепи ТКР с переменной областью  $\beta$ -цепи Radium-1 и константной областью, содержащей последовательность SEQ ID NO: 29, приведена в SEQ  
20 ID NO: 31. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\beta$ -цепи ТКР содержит мурилизированную константную область, и переменную область человека, и имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность SEQ ID NO: 31. Согласно другому варианту, домен  $\beta$ -цепи может иметь, или содержать или состоять из  
25 нее, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 31, при условии, что последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше.

Сходно с доменом  $\alpha$ -цепи полноразмерный домен  $\beta$ -цепи может содержать константную область, которая была модифицирована цистеином. Предпочтительные  
30 модифицированные цистеином константные области домена  $\beta$ -цепи были описаны выше: модифицированный цистеином константный домен  $\beta$ -цепи Radium-1 содержит последовательность SEQ ID NO: 15, тогда как модифицированный цистеином мурилизированный эквивалент последовательности SEQ ID NO: 15, приведен в SEQ ID NO: 30.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения полноразмерный домен  $\beta$ -цепи содержит переменный домен  $\beta$ -цепи Radium-1, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 13, и модифицированный цистеином константный домен Radium-1, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 15, или модифицированный цистеином мурилизированный константный домен, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 30. Домен  $\beta$ -цепи, который состоит из переменного домена, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 13, и константного домена, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 15, имеет последовательность SEQ ID NO: 17, и домен  $\beta$ -цепи, который состоит из переменного домена, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 13, и константного домена, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 30, имеет последовательность SEQ ID NO: 32. Соответственно, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения полноразмерный домен  $\beta$ -цепи имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность SEQ ID NO: 17, или, согласно другому варианту, домен  $\beta$ -цепи может иметь, или содержать или состоять из нее, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности, при условии, что последовательности CDR и модификация цистеином представляют собой те, которые определены выше. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\beta$ -цепи имеет, или содержит или состоит из нее, последовательность SEQ ID NO: 32, или, согласно другому варианту, домен  $\beta$ -цепи может иметь, или содержать или состоять из нее, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности, при условии, что последовательности CDR и модификация цистеином представляют собой те, которые определены выше.

Как подробно описано выше, домен  $\beta$ -цепи может содержать метку в своем переменном домене. Такая метка предпочтительно расположена непосредственно на C-конце относительно лидерной последовательности домена  $\beta$ -цепи так, что она образует самую дальнюю часть N-конца зрелого домена цепи. Предпочтительной меткой является двойная метка Мус.

В растворимом ТКР согласно настоящему изобретению константные области доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи могут соответствовать усеченным вариантам полноразмерных константных областей, описанных выше. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения усеченная константная область домена  $\alpha$ -цепи соответствует аминокислотам 1-95 константной области  $\alpha$ -цепи Radium-1 (т. е. аминокислотам 1-95 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 9). Указанная последовательность

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

приведена в SEQ ID NO: 60. Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению может содержать домен  $\alpha$ -цепи, содержащий константную область, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 60, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична указанной последовательности. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения усеченная константная область домена  $\beta$ -цепи соответствует аминокислотам 1-131 константной области  $\beta$ -цепи Radium-1 (т. е. аминокислотам 1-131 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 14). Указанная последовательность приведена в SEQ ID NO: 62. Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению может содержать домен  $\beta$ -цепи, содержащий константную область, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 62, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична указанной последовательности.

15  
20  
25  
30  
35

Существенным аспектом растворимого ТКР является то, что  $\alpha$ -цепь и  $\beta$ -цепь зрелого ТКР соединены. В том случае, если они не соединены, цепи будут диффундировать друг от друга в растворе, и функциональность ТКР будет недостаточной или будет отсутствовать. Цепи могут быть соединены ковалентно или нековалентно. Предпочтительный способ, с помощью которого  $\alpha$ -цепь и  $\beta$ -цепь могут быть ковалентно соединены, включает образование одной или более дисульфидных связей. Такие связи могут образовываться между остатками цистеина, присутствующими в нативных цепях ТКР, однако согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения один или более остатков цистеина введены в константные области каждой цепи, между которыми могут образовываться дисульфидные связи. Применительно к полноразмерному ТКР согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения константные области доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи растворимого ТКР модифицированы цистеином. Применительно к цепям полноразмерного ТКР каждая цепь может быть модифицирована путем встраивания остатка цистеина или замены нативного остатка остатком цистеина.

30  
35

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения усеченная константная область  $\alpha$ -цепи Radium-1 (т. е. последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 60) модифицирована путем замены T48C. Последовательность такой модифицированной цистеином усеченной константной области домена  $\alpha$ -цепи приведена в SEQ ID NO: 61 (и соответствует аминокислотам 1-95 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10, в которой приведена модифицированная цистеином последовательность полноразмерной константной области  $\alpha$ -цепи Radium-1).

Соответственно, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения растворимый ТКР согласно настоящему изобретению содержит домен  $\alpha$ -цепи, содержащий константную область, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 61, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична указанной последовательности. В случае если домен  $\alpha$ -цепи представляет собой вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 61 (т. е. он имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60%, но менее чем на 100%, идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 61), то аминокислота в положении 48 (или в положении, соответствующем положению 48 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 61), представляет собой цистеин.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения усеченная константная область  $\beta$ -цепи Radium-1 (т. е. последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 62) модифицирована с помощью замены S57C. Последовательность такой модифицированной цистеином усеченной константной области домена  $\beta$ -цепи приведена в SEQ ID NO: 63 (и соответствует аминокислотам 1-131 в последовательности SEQ ID NO: 15, в которой приведена модифицированная цистеином последовательность полноразмерной константной области  $\beta$ -цепи Radium-1). Соответственно, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения растворимый ТКР согласно настоящему изобретению содержит домен  $\beta$ -цепи, содержащий константную область, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 63, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична указанной последовательности. В том случае, если домен  $\alpha$ -цепи представляет собой вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 63 (т. е. он имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60%, но менее чем на 100%, идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 63), то аминокислота в положении 48 (или в положении, соответствующем положению 48 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 63), представляет собой цистеин.

Другой способ соединения  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи растворимого ТКР включает нековалентные взаимодействия. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения для нековалентного соединения цепей используют лейциновые молнии. Согласно данному варианту реализации настоящего изобретения как  $\alpha$ -цепь, так и  $\beta$ -цепь содержат домены лейциновой молнии на С-конце их усеченных константных областей (т. е.  $\alpha$ -цепь содержит домен лейциновой молнии на своем С-конце, и  $\beta$ -цепь содержит

домен лейциновой молнии на своем С-конце). Лейциновые молнии и их последовательности хорошо известны в данной области техники и рассматриваются, например, в Busch & Sassone-Corsi (1990), Trends Genet 6: 36-40. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для соединения  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи растворимого ТКР можно применять как ковалентные, так и нековалентные способы, например,  $\alpha$ -цепь и  $\beta$ -цепь могут быть модифицированы цистеином и могут содержать домены лейциновой молнии.

Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению, соответственно, может содержать домен  $\alpha$ -цепи, соответствующий усеченной  $\alpha$ -цепи Radium-1, в которой отсутствуют 46 С-концевых аминокислот. Такая усеченная  $\alpha$ -цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 64 (соответствующую остаткам 1-222 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 11). Если константная область модифицирована цистеином, как описано выше (т. е. константная область содержит замену Thr→Cys по сравнению с последовательностью дикого типа, что соответствует замене T175C в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 64), то усеченная  $\alpha$ -цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 65. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\alpha$ -цепи растворимого ТКР содержит или состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 65, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности. В случае если  $\alpha$ -цепь содержит или состоит из варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 64 или 65, последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше, и в случае варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 65, остаток в положении 175 (или в положении, соответствующем положению 175 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 65), представляет собой цистеин.

Домен  $\beta$ -цепи растворимого ТКР согласно настоящему изобретению может соответствовать усеченной  $\beta$ -цепи Radium-1, в которой отсутствуют 48 С-концевых аминокислот. Такая усеченная  $\beta$ -цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 66 (соответствующую остаткам 1-262 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 16). Если константная область модифицирована цистеином, как описано выше (т. е. константная область содержит замену Ser→Cys по сравнению с последовательностью дикого типа, что соответствует замене S188C в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 66), усеченная  $\beta$ -цепь имеет последовательность SEQ ID NO: 67. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\beta$ -цепи растворимого ТКР содержит или состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID

NO: 66 или SEQ ID NO: 67, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности. В случае если  $\alpha$ -цепь содержит или состоит из варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 66 или 67, последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше, и в случае варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67, остаток в положении 188 (или в положении, соответствующем положению 188 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 67), представляет собой цистеин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения метка для очистки, описанная выше, кодируется на С-конце домена  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -цепи. Предпочтительная метка представляет собой гексагистидиновую (His) метку. Указанная метка может быть присоединена к С-концу  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -цепи с помощью линкера, такого как короткий линкер Gly-Gly-Gly.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ТКР содержит только один из доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи, описанных выше. Например, он может содержать домен  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению, но домен  $\beta$ -цепи, который не включен в объем настоящего изобретения; он может содержать домен  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению, но домен  $\alpha$ -цепи, который не включен в объем настоящего изобретения. Согласно другому варианту, молекула ТКР согласно настоящему изобретению может содержать только домен  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению или только домен  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению. Тем не менее, предпочтительно молекула ТКР содержит как домен  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению, так и домен  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению.

В случае если ТКР согласно настоящему изобретению содержит как домен  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению, так и домен  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению, он может содержать любую комбинацию описанных выше доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи согласно настоящему изобретению. Например, домен  $\alpha$ -цепи, содержащий константную область человека, может быть спарен с  $\beta$ -цепью, содержащей константную область мыши, и наоборот. Обычно предпочтительным является спаривание сходных цепей так, что, например, домен  $\alpha$ -цепи, содержащий константную область человека, спарен с доменом  $\beta$ -цепи, содержащим константную область человека, и наоборот; домен  $\alpha$ -цепи, содержащий константную область мыши, спарен с доменом  $\beta$ -цепи, содержащим константную область мыши, и наоборот; или домен  $\alpha$ -цепи, содержащий константную область, которая была модифицирована цистеином, спарен с доменом  $\beta$ -цепи, содержащим константную область, которая была модифицирована цистеином, и наоборот.

Как описано выше, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения ТКР кодируется в виде оцТКР, в котором С-конец домена  $\alpha$ -цепи соединен с N-концом домена  $\beta$ -цепи с помощью линкера. Линкер должен быть расщепляемым: предпочтительно линкер представляет собой линкер способный к аутосплайсингу, такой как линкер, полученный из пептида 2А пикорнавируса. Наиболее предпочтительно линкер содержит последовательность SEQ ID NO: 18, или ее вариант.

Полноразмерный ТКР согласно настоящему изобретению может кодироваться как оцТКР. Согласно одному такому варианту реализации настоящего изобретения оцТКР содержит домен  $\alpha$ -цепи с последовательностью  $\alpha$ -цепи Radium-1 и домен  $\beta$ -цепи с последовательностью  $\beta$ -цепи Radium-1, соединенные с помощью линкерной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18. Такой оцТКР имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения константные области доменов как  $\alpha$ -цепи, так и  $\beta$ -цепи оцТКР, имеющего последовательность SEQ ID NO: 33, модифицированы цистеином. Как описано выше, предпочтительная последовательность модифицированного цистеином домена  $\alpha$ -цепи Radium-1 имеет последовательность SEQ ID NO: 12, и предпочтительная последовательность модифицированного цистеином домена  $\beta$ -цепи Radium-1 имеет последовательность SEQ ID NO: 17. оцТКР, содержащий модифицированный цистеином домен  $\alpha$ -цепи Radium-1, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 12, и модифицированный цистеином домен  $\beta$ -цепи Radium-1, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 17, соединенные линкером, содержащим последовательность SEQ ID NO: 18, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации, в частности, полноразмерного ТКР согласно настоящему изобретению, переменная область домена  $\alpha$ -цепи и/или  $\beta$ -цепи ТКР согласно настоящему изобретению содержит последовательность метки, предпочтительно двойную метку Мус. Предпочтительно переменная область только одного из доменов  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -цепи содержит последовательность метки, наиболее предпочтительно переменная область домена  $\alpha$ -цепи. Как описано выше, предпочтительный полноразмерный домен  $\alpha$ -цепи согласно настоящему изобретению представляет собой домен, содержащий последовательность  $\alpha$ -цепи Radium-1 с двойной меткой Мус, вставленной непосредственно на С-конце его лидерной последовательности, приведенную в SEQ ID NO: 21. Содержащий двойную метку Мус домен  $\alpha$ -цепи, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 21, предпочтительно может быть комбинирован с полноразмерным доменом  $\beta$ -цепи Radium-1



(который имеет последовательность SEQ ID NO: 16). ОцТКР, содержащий домен  $\alpha$ -цепи с двойной меткой Мус, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 21, и домен  $\beta$ -цепи Radium-1, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 16, соединенные линкером, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 18, имеет

5 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации, в частности, полноразмерного ТКР согласно настоящему изобретению, переменная область домена  $\alpha$ -цепи содержит двойную метку Мус и константные области доменов как  $\alpha$ -цепи, так и  $\beta$ -цепи модифицированы цистеином. Как описано выше, предпочтительная

10 последовательность полноразмерного домена  $\alpha$ -цепи, который содержит переменную область с двойной меткой Мус и модифицированную цистеином константную область, представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. Содержащий двойную метку Мус домен  $\alpha$ -цепи, модифицированный цистеином, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 22, предпочтительно может быть комбинирован с

15 полноразмерным модифицированным цистеином доменом  $\beta$ -цепи, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 17. оцТКР, содержащий меченый двойной меткой Мус и модифицированный цистеином домен  $\alpha$ -цепи, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 22, и модифицированный цистеином домен  $\beta$ -цепи, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 17, соединенные линкером, последовательность

20 которого приведена в SEQ ID NO: 18, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения молекула ТКР представляет собой оцТКР, аминокислотная последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 33, или, согласно другому варианту, оцТКР может иметь

25 аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 33, при условии, что последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше, и происходящий из пептида 2A линкер сохраняет свою способность к аутосплайсингу.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения молекула ТКР представляет собой оцТКР, аминокислотная последовательность которого

30 приведена в SEQ ID NO: 34, или, согласно другому варианту, оцТКР может иметь аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 34, при условии, что последовательности CDR и модификации цистеина представляют собой те, которые

определены выше, и происходящий из пептида 2А линкер сохраняет свою способность к аутосплайсингу.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения молекула ТКР представляет собой оцТКР, аминокислотная последовательность которого  
5 приведена в SEQ ID NO: 35, или, согласно другому варианту, оцТКР может иметь аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 35, при условии, что последовательности CDR и последовательность двойной метки Мус представляют собой те, которые определены выше, и происходящий из пептида 2А линкер сохраняет свою  
10 способность к аутосплайсингу.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения молекула ТКР представляет собой оцТКР с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 36, или, согласно другому варианту, оцТКР может иметь аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95%  
15 идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 36, при условии, что последовательности CDR, модификации цистеином и последовательность двойной метки Мус представляют собой те, которые определены выше, и происходящий из пептида 2А линкер сохраняет свою способность к аутосплайсингу.

Как обсуждалось выше, константные области доменов  $\alpha$ -цепи и/или  $\beta$ -цепи согласно  
20 настоящему изобретению могут быть мураинизированы. Предпочтительный полноразмерный домен  $\alpha$ -цепи, содержащий константную область мыши, имеет последовательность SEQ ID NO: 25, и предпочтительный полноразмерный домен  $\beta$ -цепи, содержащий константную область мыши, имеет последовательность SEQ ID NO: 31. оцТКР, содержащий домен  $\alpha$ -цепи, последовательность которого приведена в SEQ ID NO:  
25 25, и домен  $\beta$ -цепи, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 31, соединенные линкером, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 18, имеет последовательность SEQ ID NO: 37.

Как описано выше, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения константные области доменов как  $\alpha$ -цепи, так и  $\beta$ -цепи модифицированы  
30 цистеином. Предпочтительная последовательность полноразмерного домена  $\alpha$ -цепи, содержащего модифицированную цистеином мураинизированную константную область, приведена в SEQ ID NO: 26, и предпочтительная последовательность полноразмерного домена  $\beta$ -цепи, содержащего модифицированную цистеином мураинизированную константную область, приведена в SEQ ID NO: 32. оцТКР, содержащий домен  $\alpha$ -цепи,  
35 последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 26, и домен  $\beta$ -цепи,

последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 32, соединенные линкером, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 18, имеет последовательность SEQ ID NO: 38.

5 Как описано выше, согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения переменная область домена  $\alpha$ -цепи содержит двойную метку Мус. Предпочтительная последовательность полноразмерного домена  $\alpha$ -цепи, содержащего переменную область с двойной меткой Мус и мурализованную константную область, приведена в SEQ ID NO: 27. Домен  $\alpha$ -цепи, содержащий переменную область с двойной меткой Мус и мурализованную константную область, 10 последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 27, предпочтительно может быть комбинирован с полноразмерным доменом  $\beta$ -цепи, содержащим мурализованную константную область, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 31. оцТКР, содержащий домен  $\alpha$ -цепи, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 27, и домен  $\beta$ -цепи, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 31, соединенные 15 линкером, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 18, имеет последовательность SEQ ID NO: 39.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения домен  $\alpha$ -цепи содержит переменную область, содержащую двойную метку Мус, и константные области доменов как  $\alpha$ -цепи, так и  $\beta$ -цепи модифицированы цистеином. 20 Предпочтительный полноразмерный домен  $\alpha$ -цепи, который содержит переменную область с двойной меткой Мус и модифицированную цистеином мурализованную константную область, имеет последовательность SEQ ID NO: 28. Домен  $\alpha$ -цепи, содержащий переменную область с двойной меткой Мус и модифицированную цистеином мурализованную константную область, последовательность которой 25 приведена в SEQ ID NO: 28, предпочтительно может быть комбинирован с полноразмерным доменом  $\beta$ -цепи, содержащим модифицированную цистеином мурализованную константную область, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 32. оцТКР, содержащий домен  $\alpha$ -цепи, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 28, и домен  $\beta$ -цепи, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 32, 30 соединенные линкером, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 18, имеет последовательность SEQ ID NO: 40.

Соответственно, согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения молекула ТКР представляет собой оцТКР, аминокислотная последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 35 или SEQ ID NO: 40. Согласно другому варианту, оцТКР может иметь аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична одной из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40, при условии, что последовательности CDR и двойная метка Мус, в тех случаях, когда она присутствует, и/или модификации цистеином представляют собой те, которые определены выше, и происходящий из пептида 2А линкер сохраняет свою способность к аутосплайсингу.

Полипептиды оцТКР, последовательности которых приведены в SEQ ID NO: 33-40, кодируются нуклеотидными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 41-48, соответственно. Молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, которая кодирует молекулу ТКР согласно настоящему изобретению. Соответственно, молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует любую молекулу ТКР согласно настоящему изобретению, определенную выше. Молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, которая кодирует оцТКР с доменами  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи, которые содержат константные области человека, может, в частности, содержать нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44. Молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, которая кодирует оцТКР с доменами  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи, которые содержат константные области мыши, может, в частности, содержать нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 48.

Соответственно, молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может содержать нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 41-44 или 45-48. Согласно другому варианту, молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может содержать нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична любой из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 41-44 или 45-48, или вырождена до нуклеотидной последовательности любой из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 41-44 или 45-48. Молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, которая обратно комплементарна последовательности любой из вышеописанных молекул нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, также включена в объем настоящего изобретения.

Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению может кодироваться в виде оцТКР. Предпочтительные оцТКР для растворимых ТКР соответствуют тем, которые описаны выше для полноразмерных ТКР, с использованием соответствующих усеченных

доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи. Применительно к полноразмерному ТКР согласно настоящему изобретению оцТКР предпочтительно кодируется с доменом  $\alpha$ -цепи на его N-конце и с доменом  $\beta$ -цепи на его C-конце, при этом два домена разделены линкером, предпочтительно пептидом 2А пикорнавируса, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 18, или его производным, определенным выше.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения растворимый оцТКР содержит домен  $\alpha$ -цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 65 (или ее вариантом), и домен  $\beta$ -цепи с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 67 (или ее вариантом), при этом две цепи разделены 2А-производным линкером. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения указанный оцТКР содержит или состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 68, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности. В случае если оцТКР содержит или состоит из варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 68, последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше, и остатки в положениях 175 и 436 (или в положениях, соответствующих положениям 175 и 436 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 68) представляют собой остатки цистеина (эти положения соответствуют положениям 175 и 188 доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи, соответственно).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения His-метка расположена на C-конце оцТКР, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 68 (C-конец оцТКР соответствует C-концу  $\beta$ -цепи), при этом His-метка отделена от  $\beta$ -цепи с помощью линкера Gly-Gly-Gly. Указанный оцТКР имеет последовательность SEQ ID NO: 69. Согласно другому предпочтительному варианту настоящее изобретение относится к оцТКР, содержащему или состоящему из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере 90% или 95% идентична указанной последовательности. В случае если оцТКР содержит или состоит из варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69, последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше, и остатки в положениях 175 и 436 (или в положениях, соответствующих положениям 175 и 436 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 69) представляют собой остатки цистеина (эти положения соответствуют положениям 175 и 188 доменов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи, соответственно).

Аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68 и 69, кодируются нуклеотидными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 70 и 71. Молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению представляет собой

молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует ТКР согласно настоящему изобретению, включая молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют полноразмерные ТКР, и молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют растворимые ТКР. Молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, в определенных вариантах реализации, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71, или из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из последовательности, обратнo комплементарной последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 71, или нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанным последовательностям, также включена в объем настоящего изобретения.

Как описано выше, некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к полипептидам или полинуклеотидам с определенным уровнем идентичности последовательности с конкретной определенной последовательностью (эталонной последовательностью). В том случае, если процент идентичности последовательностей (%) в настоящем документе представлен в отношении конкретной эталонной последовательности, процент идентичности последовательностей (%) определяют по всей длине эталонной последовательности. При сравнении полипептидных или полинуклеотидных последовательностей две последовательности называются «идентичными», если последовательность нуклеотидов в двух последовательностях является одинаковой при сопоставлении для максимального соответствия. Способы определения идентичности последовательностей хорошо известны в данной области техники, и может быть использован любой удобный или доступный способ.

Оптимальное сопоставление последовательностей для сравнения может быть проведено с использованием программы Megalign в пакете программного обеспечения для биоинформатики Lasergene (DNASTAR, Inc., Мэдисон, Висконсин, США) с использованием параметров по умолчанию. Согласно другому варианту, оптимальное сопоставление последовательностей для сравнения может быть выполнено с помощью алгоритма для определения локальной идентичности Смита-Вотермана, Add. APL. Math 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания гомологичных областей последовательностей Нидлмана-Вунша, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), путем поиска сходства по методу Пирсона и Липмана, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), путем компьютеризованных внедрений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и

TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин, США) или путем проверки.

Аналогичным образом, в том случае, когда положение аминокислоты в варианте последовательности определяется как «соответствующее» конкретному положению аминокислоты в эталонной последовательности, соответствующее положение может быть идентифицировано с помощью сопоставления последовательностей, как описано выше. В том случае, когда вариант последовательности сопоставлен с эталонной последовательностью, аминокислоты, которые сопоставляются в любом конкретном положении, определяются в настоящем документе как «соответствующие». Например, если вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10, сопоставлен с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 10, положение в варианте последовательности, соответствующее положению 48 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10, представляет собой аминокислоту, которая сопоставляется с аминокислотой 48 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10. Положение в варианте последовательности, соответствующее положению в эталонной последовательности, может быть в том же месте, как и в эталонной последовательности, например, положение 48 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10, может соответствовать положению 48 в варианте последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10. Однако соответствующие положения могут находиться в разных местах. Например, если одна аминокислота была удалена с N-конца варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10 (и другие мутации не были введены), то положение 48 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10, будет соответствовать положению 47 в варианте последовательности.

Специалисты в данной области техники поймут, что в результате вырожденности генетического кода существует много нуклеотидных последовательностей, которые могут кодировать каждую индивидуальную молекулу ТКР, описанную в настоящем документе.

Молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может представлять собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты и может включать ДНК (включая кДНК) или РНК или химические производные ДНК или РНК, включая молекулы, содержащие радиоактивный изотоп или химический аддукт, такой как флуорофор, хромофор или биотин («метка»). Соответственно, нуклеиновая кислота может содержать модифицированные нуклеотиды. Упомянутые модификации включают модификации оснований, такие как бромурин, модификации рибозы, такие как арабинозид и 2',3'-дидезоксирибоза, и модификации межнуклеотидной связи, такие как фосфотиоат, фосфодитиоат, фосфоселеноат, фосфодиселеноат, фосфоанилотиоат,

фосфоанилат и фосфоамидат. Термин «молекула нуклеиновой кислоты» конкретно включает одно- и двухцепочечные формы ДНК и РНК.

Способы модификации нуклеотидных последовательностей для введения изменений в аминокислотные последовательности различных областей ТКР хорошо известны в данной области техники, например, можно применять способы мутагенеза, такие как сайт-специфический мутагенез. Способы получения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу ТКР, также хорошо известны, например, для конструирования молекулы нуклеиновой кислоты может быть использована обычная методика клонирования с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Например, молекулу нуклеиновой кислоты можно клонировать в вектор для клонирования общего назначения, такой как pENTR (Gateway), pUC19, pBR322, векторы pBluescript (Stratagene Inc.) или pCR TOPO® от Invitrogen Inc. Полученная в результате конструкция нуклеиновой кислоты (рекомбинантный вектор), несущая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую ТКР, затем может быть субклонирована в векторы экспрессии или вирусные векторы для экспрессии белка, например, в клетках млекопитающих. Этот этап может быть выполнен для получения белка ТКР или для экспрессии в иммунных эффекторных клетках, например, Т-клетках человека или клеточных линиях или других иммунных эффекторных клетках человека. Помимо этого нуклеиновая кислота может быть введена в векторы экспрессии мРНК для получения мРНК, кодирующей ТКР. Затем мРНК может быть перенесена в иммунные эффекторные клетки. Соответственно, согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

Вектор экспрессии мРНК альтернативно может транскрибироваться в условиях *in vitro* для получения мРНК, кодирующей ТКР. Для транскрипции в условиях *in vitro* (IVT) сначала получают матрицу. Это может быть линейаризованный вектор экспрессии мРНК. Вектор может быть линейаризован, например, с использованием фермента рестрикции. Согласно другому варианту, матрица может быть получена путем ПЦР-амплификации кассеты для экспрессии или любым другим способом, обычно известным специалисту. Затем матрицу очищают и транскрибируют. Транскрипция может быть выполнена с использованием набора IVT, такого как набор MEGAscript™, набор RiboMAX™ или набор MAXIscript™. Затем ДНК-матрица может быть удалена путем расщепления образца ДНКазой с последующей очисткой мРНК. Методы IVT хорошо известны специалистам в данной области техники.

Молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может быть введена в клетку в векторе или в виде выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, или в



виде рекомбинантной конструкции. Способы экспрессии гетерологичных генов известны в данной области техники, касательно как получения конструкции/вектора, так и введения молекулы нуклеиновой кислоты (вектора или конструкции) в клетку. Соответственно, промоторы и/или другие последовательности, управляющие экспрессией, пригодные для применения с клетками млекопитающих, в частности, с Т-клетками, и соответствующие векторы (например, вирусные векторы), хорошо известны в данной области техники.

Соответственно, молекула нуклеиновой кислоты может быть введена или вставлена в вектор. В настоящем документе термин «вектор» относится к носителю, в который может быть введена молекула нуклеиновой кислоты (например, ковалентно вставлена) так, чтобы вызвать экспрессию белка ТКР или мРНК и/или обеспечить клонирование молекулы нуклеиновой кислоты. Вектор может представлять собой, соответственно, вектор для клонирования или вектор для экспрессии.

Молекула нуклеиновой кислоты может быть вставлена в вектор с использованием любых подходящих способов, известных в данной области техники, например, но не ограничиваясь ими, вектор может быть расщеплен с использованием подходящих ферментов рестрикции, и затем может быть лигирован с молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей совпадающие концы рестрикции.

Векторы экспрессии могут содержать множество управляющих последовательностей, которые относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, необходимым для транскрипции и, возможно, трансляции функционально соединенной кодирующей последовательности в конкретной клетке-хозяине. В дополнение к управляющим последовательностям, которые регулируют транскрипцию и трансляцию, векторы могут содержать дополнительные последовательности нуклеиновых кислот, которые выполняют другие функции, включая, например, функции при репликации или функции в качестве селективных маркеров и т. д.

Вектор экспрессии должен иметь необходимые 5'-концевые и 3'-концевые регуляторные элементы для эффективной транскрипции и трансляции генов в соответствующей клетке-хозяине, такие как промоторные последовательности, примеры которых включают промоторы ЦМВ, PGK и EF1 $\alpha$ , ТАТА-боксы для распознавания рибосомой и связывания, а также последовательность терминации транскрипции 3'-UTR ААТААА (SEQ ID NO: 53). Другие подходящие промоторы включают конститутивный «ранний промотор» вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинного концевого повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор вируса лейкоза мышей Молони (MoMuLV), промотор вируса птичьего лейкоза (ALV), немедленный ранний промотор вируса

Эпштейна-Барр (EBV) и промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Также могут быть использованы промоторы генов человека, включая, но не ограничиваясь ими, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть векторов, экспрессирующих ТКР. Они обеспечивают молекулярный переключатель, способный запускать или блокировать экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты. Примеры индуцируемых промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор металлотионеина, промотор глюкокортикоидов, промотор прогестерона или промотор тетрациклина.

10 Помимо этого вектор экспрессии может содержать 5'- и 3'-нетранслируемые регуляторные последовательности, которые могут функционировать в качестве энхансерных последовательностей и/или последовательностей терминации, которые могут облегчать или усиливать эффективную транскрипцию молекулы нуклеиновой кислоты.

15 Примеры векторов включают плазмиды, автономно реплицирующиеся последовательности и транспонируемые элементы. Дополнительные примерные векторы включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как искусственная хромосома дрожжей (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома, происходящая из P1 (PAC), бактериофаги, такие как лямбда-фаг или фаг M13, и вирусы животных. Примеры 20 категорий вирусов животных, которые можно применять в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы (например, вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (например, SV40).  
25 Примеры векторов экспрессии включают векторы pCl-neo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих и pLenti4/V5-DEST™ и pLenti6/V5-DEST™ для опосредуемого лентивирусом переноса и экспрессии генов в клетках млекопитающих.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предпочтительными являются вирусные векторы. Вирусный вектор может быть получен 30 из ретровируса, в частности, лентивируса или спумавируса/пенистого вируса. В настоящем документе термин «вирусный вектор» относится к векторной конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит по меньшей мере один элемент вирусного происхождения и может быть упакована в вирусную векторную частицу. Вирусный вектор может содержать молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему 35 изобретению вместо несущественных вирусных генов. Вектор и/или частицу можно

применять для переноса ДНК, РНК или других нуклеиновых кислот в клетки как в условиях *in vitro*, так и в условиях *ex vivo*.

Соответственно, другой аспект настоящего изобретения включает вирусную частицу, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, определенную и описанную в настоящем документе, или препарат или композицию, содержащую такие вирусные частицы. Такая композиция также может содержать по меньшей мере один физиологически приемлемый носитель.

В данной области техники известны многочисленные формы вирусных векторов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Вектор может представлять собой самоинактивирующийся вектор, в котором 3'-LTR область энхансера-промотора, известная как область U3, была модифицирована (например, путем делеции или замены), чтобы предотвратить транскрипцию вируса после первого этапа репликации вируса. Соответственно, векторы способны инфицировать хозяина, а затем интегрироваться в его геном только один раз и не могут быть переданы дальше.

Ретровирусные векторы для применения в настоящем изобретении могут быть получены из любого известного ретровируса, например, ретровирусов типа C, таких как вирус саркомы мышей Молони (M-MSV), вирус саркомы мышей Харви (Ha-MuSV), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), вирус лейкоза гиббона (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирусы, вирус Фрэнд, вирус стволовых клеток мыши (MSCV) и вирус саркомы Рауса (RSV); вирусов Т-клеточного лейкоза человека, таких как HTLV-1 и HTLV-2; и лентивирусного семейства ретровирусов, таких как вирусы иммунодефицита человека ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита лошадей (EIV), и других классов ретровирусов.

Лентивирусный вектор происходит из лентивируса, группы (или рода) ретровирусов, которые вызывают медленно развивающееся заболевание. Вирусы, включенные в эту группу, включают ВИЧ (вирус иммунодефицита человека, включая ВИЧ типа 1 и ВИЧ типа 2).

Линия упаковывающих ретровирус клеток (обычно линия клеток млекопитающих) может быть использована для получения вирусных частиц, которые затем можно применять для трансдукции Т-клеток. Иллюстративные вирусные векторы описаны в WO2002087341, WO2002083080, WO2002082908, WO2004000220 и WO2004054512. Примерным ретровирусным вектором является pMP71, описанный в Wälchli *et al* 2011. Другие подходящие векторы включают pBABE, pWZL, pMCs-CAG, pMXs-CMV, pMXs-EF1 $\alpha$ , pMXs-IRES, pMXs-SR $\alpha$  и pMYs-IRES.

В объем настоящего изобретения включены сегменты генов, которые вызывают восприимчивость иммунных эффекторных клеток, несущих вектор или конструкцию согласно настоящему изобретению, к отрицательному отбору в условиях *in vivo*. Под «отрицательным отбором» подразумевается, что клетка после внедрения указанных 5 агентов может быть устранена в результате изменения состояния индивидуума в условиях *in vivo*. Отрицательный селективный фенотип может быть результатом вставки гена, который придает чувствительность к вводимому агенту, например, к соединению. Отрицательные селективные гены известны в данной области техники и включают, помимо всего прочего, следующие: ген тимидинкиназы вируса простого герпеса типа 1 10 (HSV-I TK) (Wigler *et al.*, Cell 11 (1):223-232, 1977), который придает чувствительность к ганцикловиру; ген клеточной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденинфосфорибозилтрансферазы (APRT) и бактериальной цитозиндезаминазы Mullen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33-37 (1992)). Соответственно, вектор или конструкция согласно настоящему изобретению могут содержать такой ген.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полезным 15 может быть включение в вектор или конструкцию согласно настоящему изобретению положительного маркера, который позволяет отбирать клетки с отрицательным селективным фенотипом в условиях *in vitro*, например, отбирать генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки. Положительный селективный маркер 20 может представлять собой ген, который после введения в клетку-хозяина экспрессирует доминантный фенотип, обеспечивающий положительный отбор клеток, несущих ген. Гены этого типа известны в данной области техники и включают, помимо всего прочего, ген гигромицин-В-фосфотрансферазы (hph), который придает устойчивость к гигромицину В, ген аминогликозидфосфотрансферазы (neo или aph) из Tn5, который 25 кодирует устойчивость к антибиотику G418, ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), ген аденозиндезаминазы (ADA) и ген множественной лекарственной устойчивости (MDR).

Предпочтительно положительный селективный маркер и отрицательный селективный элемент соединены так, что потеря отрицательного селективного элемента также обязательно сопровождается потерей положительного селективного маркера. Еще 30 более предпочтительно положительные и отрицательные селективные маркеры гибридизованы так, что потеря одного из них обязательно ведет к потере другого. Примером гибридного полинуклеотида, продуктом экспрессии которого является полипептид, обладающий желательными положительными и отрицательными селективными признаками, описанными выше, является гибридный ген 35 гигромицинофосфотрансферазы-тимидинкиназы (НуТК). При экспрессии этого гена

образуется полипептид, который обеспечивает устойчивость к гигромицину В для положительного отбора в условиях *in vitro* и чувствительность к ганцикловиру для отрицательного отбора в условиях *in vivo* (см. Lupton S. D., *et al*, Mol. and Cell. Biology 11:3374-3378, 1991).

5 Для клонирования молекулы нуклеиновой кислоты вектор может быть введен в клетку-хозяина (например, выделенную клетку-хозяина), и такие «клонированные клетки-хозяева», содержащие вектор для клонирования согласно настоящему изобретению, представляют дополнительный аспект настоящего изобретения. Подходящие клонирующие клетки-хозяева могут включать, но не ограничиваются ими, 10 прокариотические клетки, грибковые клетки, дрожжевые клетки или клетки высших эукариот, такие как клетки млекопитающих. Подходящие прокариотические клетки для этой цели включают, но не ограничиваются ими, эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, 15 *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также Bacilli, такие как *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*, и *Streptomyces*. В другом варианте клонирующая клетка-хозяин может содержать вектор экспрессии мРНК, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты.

Молекулы нуклеиновых кислот или векторы вводят в клетку-хозяина (например, 20 клонирующую клетку-хозяина, продуцирующую клетку-хозяина или Т-клетку) с помощью методик трансфекции и/или трансдукции, известных в данной области техники. В настоящем документе термины «трансфекция» и «трансдукция» относятся к процессам, посредством которых экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты вводят в клетку-хозяина. Нуклеиновая кислота может быть интегрирована в ДНК клетки-хозяина 25 или может поддерживаться в виде внехромосомного элемента. Нуклеиновая кислота может поддерживаться кратковременно или может быть стабильной. Трансфекцию можно осуществлять с помощью различных средств, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, совместное осаждение ДНК с фосфатом кальция, опосредуемую DEAE-декстраном трансфекцию, опосредуемую полибренном трансфекцию, 30 электропорацию, микроинъекцию, слияние липосом, липофекцию, слияние протопластов, ретровирусную инфекцию и баллистическую трансфекцию. Трансдукция относится к доставке гена (ов) с использованием вирусного или ретровирусного вектора с помощью вирусной инфекции, а не путем трансфекции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ретровирусные векторы трансдуцируют путем упаковки векторов 35 в вирусные частицы или вирионы перед контактом с клеткой.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты или вектор согласно настоящему изобретению. Такая клетка-хозяин может являться любым подходящим хозяином, включая клонирующего хозяина, продуцирующего хозяина или иммунную эффекторную клетку. Клетка-хозяин может  
5 быть получена из любых видов и фактически из любого царства в зависимости от ее функции.

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к иммунной эффекторной клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты или вектор согласно настоящему изобретению, который кодирует полноразмерный ТКР согласно  
10 настоящему изобретению. «Иммунная эффекторная клетка» представляет собой любую клетку иммунной системы, которая имеет одну или более эффекторных функций (например, цитотоксическую активность, направленную на уничтожение клеток, секрецию цитокинов, индукцию АЗКЦ и/или КЗЦ). Типичные иммунные эффекторные клетки, соответственно, включают Т-лимфоциты, в частности, цитотоксические Т-клетки  
15 (ЦТЛ; CD8<sup>+</sup> Т-клетки) и хелперные Т-клетки (ХТЛ; CD4<sup>+</sup> Т-клетки). Другие популяции Т-клеток также можно применять в настоящем изобретении, например, наивные Т-клетки и Т-клетки памяти. Другие иммунные эффекторные клетки включают НК-клетки, НКТ-клетки, нейтрофилы и макрофаги. Как отмечено выше, иммунные эффекторные клетки также включают предшественники эффекторных клеток, причем указанные клетки-  
20 предшественники могут быть индуцированы для дифференцировки в иммунные эффекторные клетки в условиях *in vivo* или в условиях *in vitro*. Т-клетки и НК-клетки представляют собой предпочтительные иммунные эффекторные клетки в соответствии с настоящим изобретением.

Т-клетка согласно настоящему изобретению может представлять собой любую Т-  
25 клетку. Указанная клетка может представлять собой цитотоксическую Т-клетку (CD8<sup>+</sup> Т-клетку), хелперную Т-клетку (CD4<sup>+</sup> Т-клетку), наивную Т-клетку, Т-клетку памяти или любой другой тип Т-клеток. Предпочтительно Т-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку. Как определено в настоящем документе, Т-клетка согласно настоящему изобретению также может представлять собой незрелую Т-клетку, такую как CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>  
30 клетка или CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> клетка, или клетку-предшественника Т-клетки.

Термин «НК-клетка» относится к крупному гранулярному лимфоциту, который представляет собой цитотоксический лимфоцит, происходящий из общего лимфоидного предшественника, который в природных условиях не содержит антигенспецифический рецептор (например, рецептор Т-клеток или рецептор В-клеток). НК-клетки могут быть  
35 дифференцированы на основании их фенотипа CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>. В настоящем документе

термин включает любую известную НК-клетку или любую НК-подобную клетку, или любую клетку, имеющую характеристики НК-клетки. Соответственно, можно применять первичные НК-клетки или, в другом варианте реализации, можно применять НК-клетку, известную в данной области техники, которая ранее была выделена и культивирована.

5 Соответственно, можно применять линию клеток НК. Ряд различных НК-клеток известен и описан в литературе, и применять можно любой из них, или клеточная линия может быть получена из первичной НК-клетки, например, путем вирусной трансформации (Vogel *et al.* 2014, *Leukemia* 28:192-195). Подходящие НК-клетки включают (но никоим образом не ограничиваются ими), помимо НК-92, клеточные линии NK-YS, NK-YT, 10 MOTN-1, NKL, KHYG-1, HANK-1 или NKG. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения клетка представляет собой клетку NK-92 (Gong *et al.* 1994, *Leukemia* 8:652-658) или ее вариант. Был получен, описан или доступен ряд различных вариантов исходных клеток NK-92, включая варианты NK-92, которые являются неиммуногенными. Любые такие варианты могут быть использованы и 15 включены в термин «NK-92». Также можно применять варианты других линий клеток.

Иммунная эффекторная клетка согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой клетку человека. Такая иммунная эффекторная клетка может быть получена от любого человека. Предпочтительно, в случае если иммунная эффекторная клетка предназначена для терапевтического применения, она представляет собой 20 аутологичную иммунную эффекторную клетку: т.е. она получена от пациента, подлежащего лечению, что обеспечивает гистосовместимость и неиммуногенность, это означает, что после генетической модификации указанная клетка не будет индуцировать иммунный ответ у пациента. Если иммунная эффекторная клетка является неаутологичной клеткой для терапевтического применения (т.е. она является донорской 25 клеткой, полученной от человека, отличного от пациента), предпочтительно она является неиммуногенной так, что при ее введении субъекту она не вызывает иммунный ответ, который оказывает отрицательное влияние, препятствует или предотвращает применение клеток в терапии. Соответственно, иммунная эффекторная клетка согласно настоящему изобретению может представлять собой клетку в условиях *ex vivo*. Согласно другому 30 варианту, она также может представлять собой клетку в условиях *in vitro*.

Неаутологичные иммунные эффекторные клетки могут быть неиммуногенными в природных условиях, если они совпадают с HLA пациента, т.е. они экспрессируют аналогичные аллели HLA. Неаутологичные иммунные эффекторные клетки, включая те, 35 которые не совпадают с HLA пациента и, соответственно, будут иммуногенными, и те, которые совпадают с HLA пациента и, соответственно, не будут иммуногенными, могут

быть модифицированы для устранения экспрессии молекулы ГКГС или лишь для незначительной экспрессии молекулы ГКГС на своей поверхности. Согласно другому варианту, такие клетки могут быть модифицированы для экспрессии нефункциональных молекул ГКГС.

5 Любые способы нарушения экспрессии функциональной молекулы ГКГС включены в объем настоящего изобретения. Следовательно, это может включать устранение или подавление молекулы комплекса ГКГС и/или может включать модификацию, которая предотвращает соответствующий транспорт и/или корректную экспрессию молекулы ГКГС или всего комплекса на клеточной поверхности.

10 В частности, может быть нарушена экспрессия одного или более функциональных белков класса ГКГС на поверхности иммунной эффекторной клетки согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения иммунные эффекторные клетки могут представлять собой клетки человека, которые являются HLA-отрицательными, такие как клетки, в которых нарушена (например, устранена) экспрессия  
15 одной или более молекул HLA, например, молекул комплекса HLA ГКГС класса I.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения нарушение экспрессии ГКГС класса I может быть выполнено путем устранения гена, кодирующего  $\beta_2$ -микроглобулин ( $\beta_2$ -m), компонент зрелого комплекса ГКГС класса I. Экспрессия  $\beta_2$ -m может быть устранена путем нацеленного разрушения гена  $\beta_2$ -m,  
20 например, путем сайт-направленного мутагенеза промотора  $\beta_2$ -m (для того чтобы инактивировать промотор) или в пределах гена, кодирующего белок  $\beta_2$ -m, чтобы внедрить инактивирующую мутацию, которая предотвращает экспрессию белка  $\beta_2$ -m, например, мутацию со сдвигом рамки считывания или преждевременный кодон «STOP» внутри гена. Согласно другому варианту, сайт-направленный мутагенез может быть использован для  
25 получения нефункционального белка  $\beta_2$ -m, который не способен образовывать активный белок ГКГС на поверхности клетки. Соответственно, белок  $\beta_2$ -m или ГКГС может удерживаться внутри клетки или может присутствовать на поверхности клетки, но являться нефункциональным.

Согласно другому варианту, иммунные эффекторные клетки могут подвергаться  
30 облучению перед введением субъекту. Не желая быть связанными соответствием какой-либо теории, авторы настоящего изобретения полагают, что облучение клеток приводит к тому, что клетки присутствуют у субъекта лишь кратковременно, уменьшая тем самым время, доступное для иммунной системы субъекта, чтобы вызывать иммунный ответ на клетки. Несмотря на то, что такие клетки могут экспрессировать функциональную  
35 молекулу ГКГС на своей поверхности, их также можно считать неиммуногенными.



Излучение может быть из любого источника  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$ -излучения или может представлять собой рентгеновское излучение или ультрафиолетовое излучение. Доза излучения 5-10 Гр может быть достаточной для устранения пролиферации, однако другие подходящие дозы излучения могут составлять 1-10, 2-10, 3-10, 4-10, 6-10, 7-10, 8-10 или 9-10 Гр, или более высокие дозы, такие как 11, 12, 13, 14, 15 или 20 Гр. Согласно другому варианту, клетки могут быть модифицированы, чтобы экспрессировать «ген самоубийства», который обеспечивает возможность индуцированного уничтожения клеток или позволяет предотвращать их репликацию в ответ на внешний стимул.

Соответственно, иммунная эффекторная клетка в соответствии с настоящим изобретением может быть модифицирована, чтобы быть неиммуногенной, посредством уменьшения ее возможности или способности пролиферировать, т. е. посредством уменьшения ее пролиферативной способности.

Модифицированные иммунные эффекторные клетки согласно настоящему изобретению также могут подвергаться модификации другими способами, например, для изменения или модификации других аспектов функции или поведения клеток и/или для экспрессии других белков. Например, клетки могут быть модифицированы для экспрессии рецептора хоуминга или рецептора локализации, функция которого заключается в нацеливании или улучшении локализации клеток в определенной ткани или месте в организме.

Настоящее изобретение также относится к способам создания иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют ТКР, описанный в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения способ включает трансфекцию или трансдукцию Т-клеток, выделенных у субъекта (который может являться пациентом или донором), так, что Т-клетки экспрессируют один или более ТКР, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки выделены у субъекта и модифицированы путем введения молекулы нуклеиновой кислоты без дальнейших манипуляций в условиях *in vitro*. Такие клетки затем могут быть непосредственно повторно введены субъекту. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки сначала активируют и стимулируют их пролиферацию в условиях *in vitro* (такая активация и стимуляция их пролиферации может быть названа размножением) перед их модификацией для экспрессии ТКР. В связи с этим Т-клетки могут быть культивированы до или после генетической модификации (т. е. трансдуцированы или трансфецированы для экспрессии ТКР, как описано в настоящем документе).

Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань вилочковой железы, ткань из очага инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухолевые ткани. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта с использованием любого количества способов, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение в градиенте Ficoll™. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения клетки из циркулирующей крови субъекта получают путем афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения клетки, собранные с помощью афереза, могут быть промыты для того чтобы удалить фракцию плазмы крови и поместить клетки в соответствующий буфер или среду для последующей обработки. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения клетки промывают фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Согласно другому варианту реализации, промывочный раствор не содержит кальций и/или магний или может не содержать многие, если не все, двухвалентные катионы. Специалисты в данной области техники поймут, что этап промывки может быть осуществлен с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, например, с использованием полуавтоматической проточной центрифуги. Например, с помощью устройства для обработки клеток Cobe 2991, Baxter CytoMate или т.п. После промывания клетки могут быть повторно суспендированы в различных биосовместимых буферах или другом физиологическом растворе с буфером или без него. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нежелательные компоненты образца афереза могут быть удалены в клетке, сразу же повторно суспендированной в культуральной среде.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки выделены из МКПК. МКПК могут быть выделены из лейкоцитарных пленок, полученных путем центрифугирования цельной крови в градиенте плотности, например, путем центрифугирования в градиенте LYMPHOPREP™, градиенте PERCOLL™ или градиенте FICOLL™. Т-клетки могут быть выделены из МКПК путем истощения моноцитов, например, с использованием CD14 Dynabeads®. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эритроциты могут быть лизированы перед центрифугированием в градиенте плотности.

Конкретные субпопуляции Т-клеток, такие как CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> или CD45RO<sup>+</sup> Т-клетки, при необходимости, могут быть дополнительно выделены с помощью

методик положительного или отрицательного отбора. Например, обогащение популяции Т-клеток путем отрицательного отбора может быть достигнуто с помощью комбинации антител, направленных к поверхностным маркерам, уникальным для отрицательно отобранных клеток. Один из способов, который можно применять в настоящем документе, включает сортировку и/или отбор клеток с помощью отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, при которой применяют коктейль моноклональных антител, направленных к поверхностным маркерам клеток, присутствующим на отрицательно отобранных клетках. Например, для обогащения CD4<sup>+</sup> клеток путем отрицательного отбора коктейль моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Для выделения популяций клеток, представляющих интерес для применения в настоящем изобретении, также можно применять проточную цитометрию и сортировку клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения цитотоксические и хелперные Т-клетки могут быть отсортированы на субпопуляции наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток до или после генетической модификации и/или размножения. CD8<sup>+</sup> Т-клетки могут быть получены с использованием стандартных способов, описанных выше. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CD8<sup>+</sup> Т-клетки могут быть далее отсортированы на наивные Т-клетки, Т-клетки центральной памяти и эффекторные Т-клетки путем идентификации поверхностных клеточных антигенов, которые связаны с каждым из упомянутых типов CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Т-клетки памяти могут присутствовать в обоих CD62L<sup>+</sup> и CD62L<sup>-</sup> подгруппах CD8<sup>+</sup> Т-клеток периферической крови. Т-клетки могут быть отсортированы на фракции CD62L<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> и CD62L<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> после окрашивания с использованием антител к CD8 и антител к CD62L. Фенотипические маркеры Т-клеток центральной памяти (TCM) могут включать экспрессию CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и CD127, а также отсутствие экспрессии гранзима В. TCM могут представлять собой CD45RO<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Эффекторные Т-клетки могут быть отрицательными в отношении экспрессии CD62L, CCR7, CD28 и CD127, и положительными в отношении экспрессии гранзима В и перфорина. Наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки могут быть охарактеризованы на основании экспрессии фенотипических маркеров наивных Т-клеток, включая CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA.

Выделенные иммунные эффекторные клетки могут быть модифицированы после выделения, или они могут быть активированы и размножены (или дифференцированы, в случае клеток-предшественников) в условиях *in vitro* перед их модификацией. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения клетки модифицируют путем

введения молекул нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению и затем активируют и размножают в условиях *in vitro*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения клетки активируют и размножают в условиях *in vitro* и затем модифицируют путем введения молекул нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Способы активации и размножения Т-клеток известны в данной области техники и описаны, например, в US6905874, US6867041, US6797514 и WO2012079000. Обычно такие способы включают приведение МКПК или выделенных Т-клеток в контакт со стимулирующим агентом и костимулирующим агентом, таким как антитела к CD3 и антитела к CD28, обычно присоединенные к грануле или другой поверхности (например, в виде CD3/CD28 Dynabeads<sup>®</sup>), в культуральной среде с добавлением соответствующих цитокинов, таких как ИЛ-2. Гранула с прикрепленными антителами к CD3 и антителами к CD28 служит в качестве имитатора антигенпрезентирующей клетки (АПК). В других вариантах реализации Т-клетки могут быть активированы и их пролиферация может быть стимулирована с применением питающих клеток и соответствующих антител и цитокинов с использованием способов, таких как те, которые описаны в US6040177, US5827642 и WO2012129514.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения Т-клетки трансдуцированы или трансфецированы с применением молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Способы трансдукции и трансфекции описаны выше. Молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может представлять собой вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению (т. е. молекулу, которая кодирует молекулу ТКР согласно настоящему изобретению). Согласно другому варианту, молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой молекулу мРНК, кодирующую молекулу ТКР согласно настоящему изобретению.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения CD34<sup>+</sup> клетки трансдуцируют или трансфецируют с применением молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированные (например, трансфецированные или трансдуцированные) CD34<sup>+</sup> клетки дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки в условиях *in vivo* после введения субъекту, обычно субъекту, у которого клетки были выделены первоначально. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения CD34<sup>+</sup> клетки могут быть стимулированы в условиях *in vitro* до или после введения молекулы нуклеиновой кислоты с применением одного или более из следующих цитокинов: лиганд Flt-3 (FL), фактор стволовых клеток (SF), фактор размножения и

дифференцировки мегакариоцитов (ТРО), ИЛ-3 и ИЛ-6 в соответствии со способами, известными в данной области техники.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к продуцирующей клетке-хозяину, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты или вектор согласно настоящему изобретению, который кодирует растворимый ТКР согласно настоящему изобретению. 5  
Продуцирующие клетки-хозяева пригодны для экспрессии и выработки растворимого ТКР. Продуцирующая клетка-хозяин может представлять собой любую клетку, пригодную для выработки белка. Например, продуцирующая клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, в частности, бактериальную 10  
клетку, такую как грамотрицательная бактериальная клетка (например, *Escherichia coli*) или грамположительная бактериальная клетка (например, *Bacillus subtilis*). Однако предпочтительно продуцирующая клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. Эукариотическая продуцирующая клетка-хозяин согласно настоящему изобретению может быть простой эукариотической клеткой, такой как дрожжевая или 15  
грибковая клетка. Предпочтительно эукариотическая продуцирующая клетка-хозяин представляет собой клетку животного. Животная клетка может представлять собой клетку насекомого или любую другую клетку животного, но предпочтительно клетку млекопитающего. Например, продуцирующая клетка-хозяин млекопитающих может быть 20  
клеткой примата, в частности, клеткой человека, или клеткой грызунов: например, она может представлять собой клетку линий НЕК-293, НЕК-293Т, COS (например, COS-7) или СНО. Продуцирующие клетки-хозяева млекопитающих, в частности, продуцирующие клетки-хозяева человека, являются предпочтительными, поскольку соответствующие посттрансляционные модификации происходят при экспрессии растворимого ТКР в клетке человека. Специалист в данной области техники сможет легко выбрать 25  
подходящую продуцирующую клетку-хозяина.

Настоящее изобретение также относится к молекуле ТКР, определенной в настоящем документе, в частности, к молекуле растворимого ТКР, определенной в настоящем документе. Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению представляет собой 30  
белок или белковый комплекс, который содержит усеченный домен  $\alpha$ -цепи и усеченный домен  $\beta$ -цепи, определенные выше. Растворимые ТКР подробно описаны в Walseng *et al.* (2015), PLoS ONE 10(4): e0119559.

Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению предпочтительно кодируется как одна цепь. Одноцепочечные растворимые ТКР описаны выше и, как подробно описано, такие оцТКР предпочтительно содержат саморасщепляющиеся линкерные

последовательности между доменами  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи, и, соответственно, образуют отдельные  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи.

Соответственно, растворимый ТКР согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой комплекс ТКР, содержащий  $\alpha$ -цепь и бета-цепь, который состоит из отдельных полипептидных цепей. Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению представляет собой ТКР, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, определенной выше. Как обсуждалось выше, переменные области  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей кодируются и синтезируются с лидерными последовательностями, которые направляют цепи для встраивания в мембрану или, в случае растворимого ТКР, для секреции. Такие лидерные последовательности отщепляются при секреции. Цепь ТКР, которая содержит лидерную последовательность, известна как незрелая, тогда как цепь, от которой отщеплена лидерная последовательность, известна как зрелая. Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой зрелый растворимый ТКР, в котором отсутствуют лидерные последовательности  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей.

Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, определенной выше. Соответственно, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения  $\alpha$ -цепь растворимого ТКР кодируется с переменной областью, содержащей последовательность SEQ ID NO: 8. Как описано выше, лидерная последовательность  $\alpha$ -цепи Radium-1 приведена в SEQ ID NO: 50, что соответствует аминокислотам 1-20 из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 8. Зрелая форма переменной области  $\alpha$ -цепи Radium-1 (т. е. переменная область без лидерной последовательности) имеет последовательность SEQ ID NO: 72. Предпочтительно растворимый ТКР согласно настоящему изобретению содержит  $\alpha$ -цепь, содержащую переменную область, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 72, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности. В случае варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 72, последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше.

Усеченная константная область  $\alpha$ -цепи растворимого ТКР предпочтительно имеет последовательность SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 61, как описано выше. Соответственно,  $\alpha$ -цепь растворимого ТКР согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит переменную область, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 72, и константную область, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 61. Такие последовательности  $\alpha$ -цепи

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

приведены в SEQ ID NO: 73 и 74, соответственно. Соответственно, растворимый ТКР согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит  $\alpha$ -цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 74, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности. В случае варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 73 или 74, последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше; в случае варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 74, аминокислота в положении 155 (или в положении, соответствующем положению 155 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 74), представляет собой цистеин. Положение 155 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 74, соответствует положению 175 в последовательности незрелой модифицированной цистеином усеченной  $\alpha$ -цепи, приведенной в SEQ ID NO: 65.

15  
20  
25

Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения  $\beta$ -цепь растворимого ТКР кодируется с вариабельной областью, содержащей последовательность SEQ ID NO: 13. Как описано выше, лидерная последовательность  $\beta$ -цепи Radium-1 приведена в SEQ ID NO: 51, что соответствует аминокислотам 1-16 последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13. Зрелая форма вариабельной области  $\beta$ -цепи Radium-1 (т. е. вариабельная область без лидерной последовательности) имеет последовательность SEQ ID NO: 75. Предпочтительно растворимый ТКР согласно настоящему изобретению содержит  $\beta$ -цепь, содержащую вариабельную область, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 75, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности. В случае варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 75, последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше.

30  
35

Усеченная константная область  $\beta$ -цепи растворимого ТКР предпочтительно имеет последовательность SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63, описанную выше. Соответственно,  $\beta$ -цепь растворимого ТКР согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит вариабельную область, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 75, и константную область, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63. Указанные последовательности  $\beta$ -цепи представлены в SEQ ID NO: 76 и 77, соответственно. Соответственно, растворимый ТКР согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит  $\alpha$ -цепь, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 76 или SEQ ID NO: 77, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на

90% или 95% идентична указанной последовательности. В случае варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 76 или 77, последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше; в случае варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 77, аминокислота в положении 172 (или в  
5 положении, соответствующем положению 172 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 77), представляет собой цистеин. Положение 172 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 77, соответствует положению 188 в последовательности незрелой модифицированной цистеином усеченной  $\alpha$ -цепи, приведенной в SEQ ID NO: 66.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего  
10 изобретения, как обсуждалось выше, каждая из  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи растворимого ТКР содержит последовательность лейциновой молнии на С-конце.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна цепь растворимого ТКР кодируется с меткой для очистки. Такая метка может представлять собой любую подходящую метку, известную специалисту, например, метку FLAG, метку His, метку HA, метку Strep, S-метку или метку Muc, глутатион-S-трансферазу (GST), связывающий мальтозу белок (MBP) и т.д. Метка предпочтительно расположена на С-конце  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -цепи, наиболее предпочтительно  $\beta$ -цепи. Соответственно, растворимый ТКР согласно настоящему изобретению может  
15 содержать метку для очистки в своей  $\alpha$ -цепи и/или  $\beta$ -цепи, предпочтительно на С-конце цепи (цепей). Цепь ТКР может кодироваться с линкером и/или сайтом расщепления протеазы между основной последовательностью цепи (т.е. варибельным доменом и присутствующим сегментом константного домена, в котором также присутствует домен лейциновой молнии) и меткой для очистки. Соответствующие сайты расщепления протеазы хорошо известны специалисту в данной области техники и включают сайты  
20 расщепления тромбина, фактора Ха, энтерокиназы, риновируса человека 3С (HRV) и сайты расщепления протеазы вируса гравировки табака (TEV). Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения  $\beta$ -цепь растворимого ТКР согласно настоящему изобретению содержит метку His, присоединенную к цепи посредством линкера Gly-Gly-Gly.

Последовательность  $\alpha$ -цепи, приведенная в SEQ ID NO: 74, с His-меткой, присоединенной к ее С-концу посредством линкера Gly-Gly-Gly, приведена в SEQ ID NO: 78; последовательность  $\beta$ -цепи, приведенная в SEQ ID NO: 77, с His-меткой присоединенной к ее С-концу посредством линкера Gly-Gly-Gly, приведена в SEQ ID NO: 79. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения  $\alpha$ -цепь  
35 растворимого ТКР содержит или состоит из аминокислотной последовательности,



приведенной в SEQ ID NO: 78, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности, и/или  $\beta$ -цепь растворимого ТКР содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 79, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности. В случае варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 78, последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше, аминокислота в положении 158 (или в положении, соответствующем положению 158 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 78) представляет собой цистеин, и С-концевая гексагистидиновая метка не имеет изменений; в случае варианта последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 79, последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше, аминокислота в положении 172 (или в положении, соответствующем положению 172 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 79) представляет собой цистеин, и С-концевая гексагистидиновая метка не имеет изменений.

Как подробно описано выше, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения растворимый ТКР кодируется в виде оцТКР, в котором домены  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей разделены линкером 2А. Линкеры 2А обсуждаются выше, и, как подробно описано выше, эти последовательности подвергаются котрансляционному расщеплению между их концевым остатком пролина и предпоследним остатком глицина. Концевой остаток пролина линкера 2А, следовательно, образует N-концевой остаток расположенного после него полипептида, тогда как остальные остатки линкера 2А образуют С-конец расположенного перед ними полипептида. В предпочтительном оцТКР согласно настоящему изобретению домен  $\alpha$ -цепи образует предшествующий полипептид и домен  $\beta$ -цепи образует последующий полипептид. Как подробно описано выше, N-конец каждой цепи ТКР представляет собой лидерную последовательность, которая отщепляется во время созревания полипептида. В оцТКР согласно настоящему изобретению концевой остаток пролина линкера 2А будет образовывать N-концевой остаток  $\beta$ -цепи и будет отщеплен от цепи с лидерной последовательностью. Следовательно, остаток не будет присутствовать в зрелой  $\beta$ -цепи. Однако другие остатки линкера 2А будут образовывать С-конец  $\alpha$ -цепи и будут присутствовать в зрелой  $\alpha$ -цепи.

Соответственно, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения растворимый ТКР содержит  $\alpha$ -цепь, в которой С-конец образован из всех остатков, за исключением концевого остатка пептида 2А. В частности, С-конец  $\alpha$ -цепи (т. е. 25 концевых остатков) может представлять собой аминокислоты 1-25 последовательности 2А, приведенной в SEQ ID NO: 18. Согласно данному варианту

реализации настоящего изобретения  $\alpha$ -цепь растворимого ТКР, в частности, может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 81, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности. Аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 81, представляет собой последовательность SEQ ID NO: 73 (зрелая усеченная  $\alpha$ -цепь Radium-1) с добавлением остатков 1-25 из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, на С-конце. Согласно другому варианту, растворимый ТКР содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 82, или из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% или 95% идентична указанной последовательности. Аминокислотная последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 82, представляет собой последовательность SEQ ID NO: 74 (зрелая усеченная модифицированная цистеином  $\alpha$ -цепь Radium-1) с добавлением остатков 1-25 из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 18, на С-конце. В том случае, если  $\alpha$ -цепь представляет собой вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 81 или 82, последовательности CDR представляют собой те, которые определены выше; в том случае, если  $\alpha$ -цепь представляет собой вариант последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 82, аминокислота в положении 155 (или в положении, соответствующем положению 155 в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 82), представляет собой цистеин.

Как описано выше,  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи растворимого ТКР соединены друг с другом: это является необходимым условием, поскольку в противном случае комплекс будет разделяться в растворе. Как обсуждалось выше,  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи могут быть соединены ковалентно, например, посредством дисульфидной связи, или соединены нековалентно посредством доменов лейциновой молнии, расположенных на С-концах цепей.

Как указано выше, все  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи ТКР экспрессируются с N-концевой лидерной последовательностью, которая направляет полипептидную цепь к мембране для встраивания/секреции.  $\alpha$ -Цепь растворимого ТКР согласно настоящему изобретению кодируется такой последовательностью, и растворимый ТКР согласно настоящему изобретению может содержать N-концевую лидерную последовательность или может не содержать такую последовательность. Аналогичным образом,  $\beta$ -цепь растворимого ТКР согласно настоящему изобретению кодируется с такой же последовательностью, и растворимый ТКР согласно настоящему изобретению может содержать N-концевую лидерную последовательность или может не содержать такую последовательность. Такие  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи и их лидерные последовательности описаны выше.

Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению может быть получен с помощью любого способа, известного в данной области техники, в частности, с помощью продуцирующей клетки-хозяина, определенной выше. Растворимый ТКР может быть экспрессирован с использованием стандартных способов экспрессии белка в стандартных условиях. Лидерные последовательности  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей нацеливают цепи для экспорта из клетки, в которой они экспрессируются (например, продуцирующей клетки-хозяина). Соответственно,  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи экспортируются из продуцирующей клетки-хозяина во внеклеточную среду, где цепи образуют комплекс, например, посредством дисульфидной связи или димеризации доменов лейциновой молнии. Затем растворимый комплекс ТКР может быть очищен: во-первых, культуру клеток можно центрифугировать и выделить супернатант. Затем растворимый комплекс ТКР может быть очищен от супернатанта методом аффинной хроматографии с использованием метки для очистки на С-конце  $\alpha$ - и/или  $\beta$ -цепи. Если сайт расщепления протеазы присутствует на N-конце метки для очистки, то метка может быть отщеплена от цепи с использованием соответствующей протеазы.

Если желательно, растворимый ТКР может быть мультимеризован с образованием мультимера растворимого ТКР. Такие мультимеры представляют аспект настоящего изобретения. Например, мультимеризацию можно выполнять путем конъюгации молекул ТКР с наногранулами, например, магнитными наногранулами. Способы такой конъюгации хорошо известны в данной области техники. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения комплексы растворимого ТКР могут быть биотинилированы и конъюгированы со стрептавидином с получением тетрамерных комплексов растворимого ТКР. Для биотинилирования комплекса растворимого ТКР одна из цепей ТКР должна быть экспрессирована с последовательностью BirA (SEQ ID NO: 59) на ее С-конце. Биотинилирование комплекса ТКР в последовательности BirA затем может быть выполнено с использованием BirA *E. coli* (биотинлигазы). После биотинилирования комплексы растворимого ТКР могут быть инкубированы со стрептавидином для получения тетрамеров растворимого ТКР.

Согласно особенно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения растворимый ТКР конъюгирован с токсином. Выбранный токсин представляет собой токсин, который по отдельности не способен проникать, уничтожать или иным образом разрушать клетку человека, но при поглощении клеткой человека посредством конъюгированной молекулы способен оказывать токсическое действие. Соответственно, такой токсин будет поглощаться только, и оказывать свое нацеленное воздействие на нее, клеткой, связанной растворимым ТКР согласно настоящему

изобретению, в которую проник растворимый ТКР. Токсин может представлять собой любые известные подходящие цитотоксические молекулы, т. е. он может представлять собой любой подходящий цитотоксин. В настоящем документе термин «цитотоксин» обозначает любой токсин, который ингибирует размножение и/или жизнеспособность клетки. Размножение включает деление клетки-мишени (т. е. клетки, в которую проникает токсин). Соответственно, токсин может представлять собой любой токсин, который снижает или оказывает отрицательное влияние на жизнеспособность или выживаемость клетки и, в частности, включает любой токсин, который индуцирует гибель клетки-мишени, например, токсин может индуцировать апоптоз или некроз клетки-мишени.

Такой токсин может представлять собой пептидный токсин, не содержащий нацеливающий домен. Например, токсин может представлять собой пептидный токсин, который в нативной форме не содержит нацеливающий домен, или он может представлять собой пептидный токсин, модифицированный по сравнению с его нативной формой для удаления его нацеливающего домена. Примерами таких токсинов являются сапорин и гелонин, которые представляют собой инактивирующие рибосому белки (RIP) из того же семейства, как и, например, рицин, но которые неспособны пересечь плазматическую мембрану клетки. Аналогичным образом, можно применять ферментативные домены (например, каталитические домены) цитотоксина из патогена, такие как ферментативный домен бактериального цитотоксина, например, ферментативный домен дифтерийного токсина, экзотоксина *Pseudomonas A* или клостридиального цитотоксина, например, TcsL из *Clostridium sordellii*.

Растворимый ТКР согласно настоящему изобретению может кодироваться как гибридный белок с токсином, расположенным на С-конце любой из  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -цепи. Согласно другому варианту, токсин может быть конъюгирован с растворимым ТКР с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники. Например, молекула растворимого ТКР может быть биотинилирована как на ее  $\alpha$ -цепи, так и на  $\beta$ -цепи и конъюгирована с токсином, конъюгированным со стрептавидином (или наоборот). Специалистам в данной области техники известны другие подходящие способы.

Настоящее изобретение относится к модифицированной иммунной эффекторной клетке для применения при лечении рака, модифицированной иммунной эффекторной клетке, экспрессирующей ТКР, описанный в настоящем документе. Например, модифицированные иммунные эффекторные клетки могут быть получены из МКПК, полученных от пациента, у которого диагностирован MSI<sup>+</sup> колоректальный рак. Для хранения, например, для криоконсервации, модифицированных иммунных эффекторных

клеток и/или препарата для применения у человека или другого субъекта могут быть использованы стандартные процедуры.

Модифицированные иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие ТКР согласно настоящему изобретению, можно применять в способах и композициях для иммунотерапии на основе адоптивного переноса клеток в соответствии с известными методиками. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки получают путем сначала их сбора из их культуральной среды и затем промывки и концентрирования клеток в среде и контейнерной системе, подходящей для введения («фармацевтически приемлемый» носитель), в эффективном для лечения количестве. Подходящая среда для инфузий может представлять собой любую изотоническую среду, обычно нормальный физиологический раствор, Normosol R (Abbott) или Plasma-Lyte A (Baxter), но также может быть использован 5% раствор декстрозы в воде или раствор Рингера с лактатом. Среда для инфузии можно дополнить сывороточным альбумином человека.

Количество клеток в композиции, которое является эффективным для лечения, составляет по меньшей мере 2 клетки (например, по меньшей мере 1 CD8<sup>+</sup> Т-клетку центральной памяти и по меньшей мере 1 CD4<sup>+</sup> хелперную Т-клетку) или более обычно более 10<sup>2</sup> клеток, и вплоть до 10<sup>6</sup>, вплоть до 10<sup>8</sup> или 10<sup>9</sup> клеток, и может быть более 10<sup>10</sup> клеток. Количество клеток, так же как и тип клеток, включенных в композицию, будет зависеть от конечного применения, для которого предназначена композиция. Для вариантов применения согласно настоящему изобретению клетки обычно находятся в объеме 1 литр или менее, 500 мл или менее, даже 250 мл или 100 мл или менее. Следовательно, плотность желательных клеток, как правило, превышает 10<sup>6</sup> клеток/мл и обычно составляет более 10<sup>7</sup> клеток/мл, обычно 10<sup>8</sup> клеток/мл или более. Клинически значимое количество иммунных клеток можно распределить на несколько инфузий, что в совокупности равно или превышает 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>11</sup> или 10<sup>12</sup> клеток. Например, пациенту может быть введено 2, 3, 4, 5, 6 или более отдельных инфузий с интервалами 24 или 48 часов или каждые 3, 4, 5, 6 или 7 дней. Инфузии также могут быть разделены интервалами времени, составляющими неделю, две недели или месяц, или интервалами времени, составляющим 6 недель или 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев. Инфузии также могут быть введены раз в год. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, поскольку все впрыснутые клетки перенаправлены к конкретному целевому антигену (а именно, пептиду TGFβRII, содержащему мутацию со сдвигом рамки считывания, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 1), может быть введено меньшее количество клеток, которое находится в диапазоне 10<sup>6</sup>/кг (10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> на

одного пациента). Композиции клеток можно вводить несколько раз в дозах, которые находятся в пределах указанных диапазонов. При необходимости, лечение также может включать введение митогенов (например, РНА) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (например, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-12, ТФР- $\alpha$ , ИЛ-18 и ТФР- $\beta$ , ГМ-КСФ, ИЛ-4, ИЛ-13, Flt3-L, RANTES, МГРТ- $\alpha$  и т. д.) для усиления индукции иммунного ответа.

Иммунные эффекторныe клетки согласно настоящему изобретению, которые экспрессируют молекулу ТКР согласно настоящему изобретению, могут быть введены либо по отдельности, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как ИЛ-2 или другие цитокины или клеточные популяции. В общих чертах, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат ТКР-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, например, Т-клетки, описанные в настоящем документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор и тому подобное; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно изготовлены для внутривенного введения.

Как отмечалось в других местах в отношении селективных маркеров в условиях *in vivo* для применения в векторах, кодирующих ТКР, нежелательные явления могут быть сведены к минимуму путем трансдукции иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих ТКР, геном «самоубийства», таким как индуцибельная каспаза 9 или тимидинкиназа, до, после или во время модификации клеток с применением молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту, как было отмечено в отношении ТКР согласно настоящему изобретению, ТКР может содержать метку, в частности, двойную метку Мус, обеспечивающую нацеленное уничтожение Т-клеток согласно настоящему изобретению с применением антитела, которое распознает используемую метку (например, антитела к Мус).

Настоящее изобретение также относится к растворимому ТКР, определенному в настоящем документе, и композиции, содержащей такой растворимый ТКР, для применения в терапии, в частности, для применения при лечении рака.

Жидкие фармацевтические композиции, будь то растворы, суспензии или другие подобные формы, могут содержать одно или более из следующих: стерильные

разбавители, такие как вода, солевой раствор (предпочтительно физиологический солевой раствор), раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды (которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды), полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для корректировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многоразовые флаконы из стекла или пластика. Фармацевтическая композиция для инъекций предпочтительно является стерильной.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить с помощью способа, соответствующего заболеванию, подлежащему лечению (или предотвращению). Количество и частота введений будут определяться такими факторами как состояние пациента, а также тип и степень тяжести заболевания пациента, хотя соответствующие дозы могут быть определены в клинических исследованиях.

Иммунный ответ, индуцированный у субъекта с помощью введения иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему изобретению, как описано в настоящем документе, может включать клеточные иммунные ответы, опосредуемые цитотоксическими Т-клетками или НК-клетками, способными уничтожать клетки-мишени (т. е. опухолевые клетки, экспрессирующие пептид TGF $\beta$ RII, несущий мутацию со сдвигом рамки считывания, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 1), регуляторными Т-клетками и хелперными Т-клетками. Также могут быть индуцированы гуморальные иммунные ответы, опосредуемые в первую очередь хелперными Т-клетками, способными активировать В-клетки и вызывать тем самым гуморальный ответ.

Введение субъекту растворимого ТКР, несущего токсин, как описано в настоящем документе, приводит к поглощению конъюгатов ТКР/токсин клетками-мишенями, что приводит к прямому и селективному уничтожению клеток-мишеней токсином.

Если указано «эффективное количество», то точное количество композиций, подлежащих введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, степени злокачественности и общем состоянии пациента (субъекта). Оптимальная дозировка и схема лечения для конкретного пациента могут быть

легко определены специалистом в области медицины путем наблюдения за субъектом для выявления признаков заболевания и соответствующей корректировки лечения.

Соответственно, настоящее изобретение относится к лечению субъекта, у которого диагностирован или подозревается, или имеется риск развития рака, который экспрессирует мутантный вариант со сдвигом рамки считывания TGF $\beta$ RII, причем указанный мутированный вариант со сдвигом рамки считывания содержит в своей последовательности неопептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1. Такой рак, вероятно, будет представлять собой MSI<sup>+</sup> рак, хотя может быть не-MSI<sup>+</sup> раком. Рак может представлять собой любой рак, который экспрессирует неопептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1. В частности, неограничивающие варианты рака представляют собой колоректальный рак, рак желудка, рак печени, ампулярную карциному, рак эндометрия, рак поджелудочной железы или лейкоз. Рак, в частности, может быть у пациента, страдающего синдромом Линча/HNPCC. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения предложено лечение колоректального рака у субъекта с HNPCC.

Иммунные эффекторные клетки и/или растворимые ТКР согласно настоящему изобретению могут быть введены в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами, которые могут включать любые другие известные способы лечения рака, такие как лучевая терапия, химиотерапия, трансплантация, иммунотерапия, гормональная терапия, фотодинамическая терапия и т. д. Иммунные эффекторные клетки и растворимые ТКР согласно настоящему изобретению могут быть введены вместе в виде комбинации. Композиции также могут быть введены в комбинации с антибиотиками или другими терапевтическими агентами, включая, например, цитокины (например, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15 и ИЛ-17), факторы роста, стероиды, НПВП, DMARD, противовоспалительные средства, анальгетики, химиотерапевтические средства (например, монOMETИЛ ауриСТАТИНА E, флударабин, гемцитабин, капецитабин, метотрексат, таксол, таксотер, меркаптопурин, тиогуанин, гидроксимочевину, цитарабин, циклофосфамид, ифосфамид, нитрозомочевины, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, митомицин, дакарбазин, прокарбазин, этопозид, тенипозид, кампатецины, блеомицин, доксорубин, идарубин, даунорубин, дактиномицин, пликамицин, митоксантрон, L-аспарагиназу и 5-фторурацил), радиотерапевтические средства, ингибиторы контрольной точки иммунитета (например, тремелиумаб, ипилиумаб, ниволумаб, МК-3475, урелумаб, бавитуксимаб, MPDL3280A и MEDI4736), низкомолекулярные ингибиторы или другие активные и вспомогательные агенты.



Соответственно, иммунные эффекторные клетки, растворимые ТКР и композиции согласно настоящему изобретению предназначены для применения в терапии или могут быть использованы при производстве лекарственного средства для применения в терапии, в частности, терапии рака, в частности, терапии для лечения MSI<sup>+</sup> рака или колоректального рака. Иммунные эффекторные клетки согласно настоящему изобретению (и содержащие их композиции), в частности, можно применять в терапии на основе адоптивного переноса клеток (также известной как адоптивная клеточная терапия), как описано в настоящем документе.

Термин «клетка-мишень» относится к любой клетке, которая должна быть уничтожена или нейтрализована модифицированными иммунными эффекторными клетками или растворимыми ТКР согласно настоящему изобретению. Как отмечено выше, она обычно будет представлять собой раковую (или, иными словами, опухолевую) клетку, которая экспрессирует мутантный вариант TGFβRII со сдвигом рамки считывания, причем указанный мутированный вариант со сдвигом рамки считывания содержит в своей последовательности неопептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1. Клетка-мишень может быть, в определенных вариантах реализации, клеткой MSI<sup>+</sup> рака или клеткой колоректального рака, или рака желудка, или фактически раковой клеткой из любого из перечисленных выше видов рака.

В настоящем документе рак определен широко, чтобы включать любое неопластическое состояние, будь то злокачественное, предзлокачественное или незлокачественное. Однако обычно это может быть злокачественное состояние. В объем настоящего изобретения включены как плотные, так и неплотные опухоли, и термин «раковая клетка» может быть принят как синоним «опухолевая клетка».

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения клетки, растворимый ТКР и/или композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены субъекту внутривенно. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения клетки, растворимый ТКР и/или композиция могут быть введены непосредственно в опухоль путем внутриопухолевой инъекции.

Субъект, подлежащий лечению с применением способов и клеток согласно настоящему изобретению, может представлять собой любой вид млекопитающих. Например, субъект может представлять собой любой вид домашнего животного, такого как мышь, крыса, грызун, кролик, морская свинка, хомяк, кошка или собака или домашний скот, такой как коза, овца, свинья, корова или лошадь. Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения субъектом может быть примат, такой как обезьяна, гиббон, горилла, орангутанг, шимпанзе или бонобо. Однако

согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения субъект является человеком. Предусмотрено, что иммунные эффекторныe клетки для применения в настоящем изобретении могут быть получены из любого вида млекопитающих, однако согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения иммунные эффекторныe клетки будут получены из того же вида млекопитающих, как и субъект, подлежащий лечению.

Настоящее изобретение можно более полно понять на основании неограничивающих примеров ниже и со ссылкой на чертежи, на которых:

На Фигуре 1 показано, что первоначально выделенные клоны Т-клетки являются специфическими в отношении TGFβRII, несущего мутацию со сдвигом рамки считывания, являются CD8<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> и вызывают гибель клетки-мишени в зависимости от дозы.

(a) показано, что исходный клон Т-клетки является CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т-клеткой.

(b) представлены результаты количественных исследований высвобождения Cr<sup>51</sup>, демонстрирующие специфический лизис, вызванный клоном 26 Т-клетки, клеточных линий рака толстой кишки, нагруженных 1 мкМ пептида p573 (который имеет последовательность SEQ ID NO: 1) или контрольного пептида I540 (который имеет последовательность SEQ ID NO: 54), при различных указанных соотношениях эффектор-мишень (Е:Т).

(c) представлены результаты количественных исследований высвобождения Cr<sup>51</sup>, демонстрирующие специфический лизис, вызванный клоном Т-клетки, аутологичной линии EBV-LCL (лимфобластная клеточная линия, трансформированная вирусом Эпштейна-Барр) или клеток Т2, нагруженных протитрованными концентрациями пептида p573. Также представлены результаты блокирования с использованием антител к HLA-класса I при максимальной концентрации пептида. Соотношение Е:Т составило 25:1. Показанные результаты являются типичными для трех независимых экспериментов.

На Фигуре 2 показана экспрессия ТКР, специфическая для TGFβRII, несущего мутацию со сдвигом рамки считывания -1A (TGFβRII<sup>mut</sup>), в трансфицированных Т-клетках, размноженных в условиях *in vitro*. Экспрессия TGFβRII<sup>mut</sup>-специфического ТКР соответствует Т-клеткам, которые являются Vβ3<sup>+</sup> (Vβ3=вариабельный домен β-цепи ТКР, TRBV28). Испытывали ложнотрансфицированные Т-клетки, Т-клетки, трансфицированные мРНК ТКР, и исходный клон Т-клетки.

На Фигуре 3 показано, что как ТКР-трансфицированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки, так и ТКР-трансфицированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки вырабатывают ИФН-γ и ФНО-α в ответ на клеточные линии рака толстой кишки, несущие мутацию со сдвигом рамки считывания TGFβRII -1A. Т-клетки трансфицировали мРНК ТКР и инкубировали в течение ночи перед совместной

инкубацией с клеточными линиями рака толстой кишки LS174T и SW480, экспрессирующими мутированный TGFβRII. Линия LS174T является отрицательной по HLA класса I, тогда как SW480 экспрессирует HLA-A2. Клетки SW480 загружали (+) или не загружали (-) пептидом T9FβRII, несущим мутацию со сдвигом рамки считывания, р573. После стимуляции в течение ночи клетки окрашивали внутриклеточно для оценки выработки цитокинов. На графиках представлены пропущенные популяции CD4 или CD8 Т-клеток, как указано. Показанные результаты являются типичными для трех независимых экспериментов.

На Фигуре 4 показано, что CD8<sup>+</sup> Т-клетки, трансфецированные TGFβRII<sup>mut</sup>-ТКР, вырабатывают больше ИФН-γ и подвергаются дегрануляции более эффективно, чем исходный клон Т-клетки, в ответ на клеточные линии рака толстой кишки, нагруженные пептидом р573. CD8<sup>+</sup> Т-клетки, трансфецированные ТКР, и исходный клон Т-клетки инкубировали с клеточными линиями рака толстой кишки в течение 6 часов перед проведением окрашивания CD107a и ИФН-γ. Все клеточные линии рака толстой кишки несут мутацию со сдвигом рамки считывания TGFβRII -1A. Обе линии, HCT116 и SW480, являются HLA-A2<sup>+</sup>, тогда как линия рака толстой кишки LS174T является HLA-A2<sup>-</sup>. На графиках представлена пропущенная популяция CD8 Т-клеток. Показанные результаты являются типичными для трех независимых экспериментов.

На Фигуре 5 показано, что Т-клетки, трансфецированные TGFβRII<sup>mut</sup>-ТКР, вызывают гибель клеток-мишеней, несущих мутацию со сдвигом рамки считывания TGFβRII -1A, с эффективностью, которая сопоставима с таковой для исходного клона Т-клетки. Клеточные линии рака толстой кишки LS174 и HCT116 были нагружены Cr<sup>51</sup>. Половина клеток HCT116 была нагружена пептидом T9FβRII, несущим мутацию со сдвигом рамки считывания, р573. Исходный клон Т-клетки пациента, ТКР-трансфецированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки и ложнотрансфецированные CD8<sup>+</sup> Т-клетки были добавлены в указанном соотношении Е:Т. Клетки совместно инкубировали в течение 6 часов перед измерением высвобождения Cr<sup>51</sup>. Показанные результаты являются типичными для трех независимых экспериментов.

На Фигуре 6 показано, что Т-клетки, трансдуцированные TGFβRII<sup>mut</sup>-ТКР, являются эффективными в условиях *in vitro* и в условиях *in vivo*. Донорские Т-клетки трансдуцировали с применением TGFβRII<sup>mut</sup>-ТКР или, в качестве отрицательного контроля, DMF5 (MART-1-специфического) ТКР.

(а) показано, что эффективность трансдукции, как было обнаружено, составляла примерно 60% для каждого из ТКР, когда Т-клетки окрашивали антителом к Vβ3 (TGFβRII<sup>mut</sup>-ТКР) или декстрамером к MART-1 (DMF5).

(b) представлены результаты испытания реактивности трансдуцированных Т-клеток в отношении когнатного антигена перед инфузией. HLA-A2<sup>+</sup> EBV-LCL были нагружены длинным пептидом, содержащим мутацию со сдвигом рамки считывания TGFβRII -1A, охватывающим эпитоп CD8<sup>+</sup> Т-клеток (p621, SEQ ID NO: 55), или нативным пептидом 26-35 MART-1 (SEQ ID NO: 56). Трансдуцированные Т-клетки совместно инкубировали с EBV-LCL в течение 5 часов при соотношении Е:Т равном 1:3 и окрашивали для оценки дегрануляции (CD107a) и ФНО-α.

(c) мыши линии NSG (TGFβRII<sup>mut</sup>-ТКР, n=10, MART-1 ТКР, n=10) получали внутрибрюшинные (в/б) инъекции 10<sup>6</sup> клеток НСТ116, экспрессирующих люциферазу светлячка, за два дня до внутрибрюшинной инъекции 8×10<sup>6</sup> ТКР-трансдуцированных Т-клеток (инъекции на 0 и 2 день, соответственно). Лечение повторяли на 5 и 10 день с использованием 2×10<sup>7</sup> TGFβRII<sup>mut</sup>-ТКР<sup>+</sup> Т-клеток. Опухолевую нагрузку оценивали с помощью визуализации биолюминесценции на 2, 9, 16, 24 и 30 дни.

(d) сигналы биолюминесценции (фотоны/с) для всех мышей представлены на диаграмме разброса, на которой указано среднее значение (±стандартное отклонение среднего значения).

(e) результаты анализа выживаемости по методу Каплана-Мейера указывают на то, что мыши, получавшие TGFβRII<sup>mut</sup>-ТКР<sup>+</sup> Т-клетки, имели значительно более длительный период выживания по сравнению с контрольными мышами (p=0,038; непарный t-тест). Эксперименты в условиях *in vivo* повторяли три раза, и представлены результаты одного типичного эксперимента.

(f) опухоли иссекали у мышей, подвергшихся эвтаназии, получали одноклеточные суспензии и окрашивали для определения присутствия трансдуцированных Т-клеток с использованием антитела к CD3 и антитела к Vβ3 (TGFβRII<sup>mut</sup>-ТКР) или декстрамера к MART-1 (DMF5). Процент MART-1-специфических Т-клеток в опухолях контрольной группы был значительно ниже, чем процент TGFβRII<sup>mut</sup>-специфических Т-клеток в опухолях мышей, получавших TGFβRII<sup>mut</sup>-специфический ТКР (p=0,0038).

На Фигуре 7 показано, что экспрессия CD107a для ТКР-трансфецированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток незначительно снизилась после стимуляции с использованием нагруженных пептидом клеток HLA-A2<sup>+</sup> НЕК, неспособных связывать CD8. Клетки линии НЕК293 трансфецировали мРНК, кодирующей HLA-A2 дикого типа или мутантный HLA-A2, неспособный связывать CD8. Клетки линии НЕК293 нагружали пептидом p573 и использовали для стимуляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток, трансфецированных TGFβRII<sup>mut</sup>-специфическим ТКР, в течение 5 часов.

На Фигуре 8 показано, что клетка рака толстой кишки HCT116 экспрессирует TRAIL-рецептор 4 (CD261). На левой панели представлены результаты окрашивания клеток HCT116 с помощью изотипических контролей; на правой панели представлены результаты окрашивания CD261 и CCR6 на клетках HCT116.

5 На Фигуре 9 показано, что как CD4<sup>+</sup> Т-клетки, так и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, перенаправленные с помощью ТКР Radium-1, непосредственно уничтожают клетки-мишени, представляющие когнатный антиген. Очищенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки (А) или очищенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки (В), подвергнутые электропорации с применением мРНК Radium-1, могут вызывать гибель клеток-мишеней, несущих как специфическую мутацию со сдвигом рамки считывания TGFβRII, так и HLA-A2 (HCT 116, клетки рака толстой кишки) («без пептида»). Добавление экзогенного длинного пептида TGFβRII, несущего мутацию со сдвигом рамки считывания, p621 (SEQ ID NO: 55), который содержит SEQ ID NO: 1 (также известную как последовательность p573), приводило к усилению уничтожения клеток. Очищенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки (С) или очищенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки (D) 10 также могли уничтожать HLA-A2-положительные клеточные линии (Granta, линия клеток В-клеточной лимфомы, отрицательная на присутствие мутации со сдвигом рамки считывания TGFβRII), нагруженные экзогенным пептидом p621. Все данные являются типичными для по меньшей мере двух независимых экспериментов.

На Фигуре 10 показано, что Т-клетки, подвергнутые электропорации мРНК ТКР Radium-1, уменьшают рост опухоли в условиях *in vivo* у мышей после многократных инфузий. (А) представлена экспериментальная шкала времени; (В) представлена опухольная нагрузка для различных групп мышей (n=10 для каждой группы), измеренная на основании биолюминесценции. Сигналы биолюминесценции представлены как суммарный поток (фотоны/с). Средние значения для всех мышей представлены на 20 приведенном выше графике; планки ошибок указывают стандартное отклонение среднего.

На Фигуре 11 представлены результаты сравнения ЭК<sub>50</sub> CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих ТКР Radium-1, с ЭК<sub>50</sub> CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих DMF5 ТКР, причем каждый из этих типов клеток распознает свой когнатный антиген. Все данные являются типичными для двух независимых экспериментов.

30 На Фигуре 12 представлены результаты исследования методом проточной цитометрии клеток SupT1 для выявления связывания растворимого ТКР Radium-1. Растворимый ТКР не связывается с HLA-A2-отрицательными клетками (А) или HLA-A2-положительными клетками, представляющими неспецифический пептид (В). Однако было показано, что растворимый ТКР связывается с HLA-A2-положительными клетками, на

которых представлен пептид TGFβRII, несущий мутацию со сдвигом рамки считывания, pс73 (SEQ ID NO: 1).

## **Примеры**

### **Пример 1**

#### **Материалы и методы:**

##### *Клеточные линии, среды и реагенты*

Клон ЦТЛ (цитотоксического Т-лимфоцита), реактивный в отношении TGFβRII, несущего мутацию со сдвигом рамки считывания, и ограниченный по HLA-A2, выделяли из крови пациента, страдающего MSI<sup>+</sup> раком толстой кишки, и клонировали с помощью метода предельных разведений. Пациент был вакцинирован 23-членным пептидом TGFβRII (-1A), несущим мутацию со сдвигом рамки считывания (пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 49). Клиническое исследование было одобрено Норвежским агентством по лекарственным средствам, Комитетом по этике медицинских исследований, Южным регионом и Экспертным советом больницы. Лечение проводили в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Было получено информированное согласие пациента. Аутологичную линию лимфобластных клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр (EBV-LCL), получали путем трансформации В-клеток донора. Клеточную линию T2, не способную к презентации антигена, использовали в качестве Т-клетки-мишени в количественном исследовании методом проточной цитометрии и количественном исследовании цитотоксичности. Клеточные линии рака толстой кишки HCT116, SW480 и LS174T, а также клетки мезонефроса человека 293 (НЕК) получали из АТСС (Роквилл, Мэриленд, США). Нек-Phoenix (Нек-Р, коллекция авторов настоящего изобретения) выращивали в DMEM (РАА, Пашинг, Австрия) с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (ФСТ) HyClone (HyClone, Логан, Юта, США) и 1% смеси антибиотика/антимикотика (пенициллин/стрептомицин, п/с, РАА).

В тех случаях, когда не указано иное, клетки культивировали в RPMI-1640 (РАА Laboratories, Пашинг, Австрия), дополненной гентамицином, 10% инактивированной нагреванием ФСТ (РАА Laboratories, Пашинг, Австрия). Линии клеток рака толстой кишки обрабатывали 500 Ед./мл ИФН-γ (PerгоTech, Роки-Хилл, Нью-Джерси, США) в течение ночи перед использованием в качестве клеток-мишеней.

Все Т-клетки выращивали в среде CellGro DC (CellGenix, Фрайбург, Германия), дополненной 5% инактивированной нагреванием сыворотки человека (Trina Bioreactives AG, Нэникон, Швейцария), 10 мМ N-ацетилцистеина (Mucomyst, AstraZeneca AS, Лондон,

Великобритания), 0,01 М HEPES (Life Technologies, Норвегия) и 0,05 мг/мл гентамицина (Garamycin, Schering-Plough Europe, Бельгия), которая в дальнейшем обозначает полную среду, если не указано иное.

*Получение Т-клеточных линий и клонов, специфичных в отношении пептидов*

5 *TGFβRII, несущих мутацию со сдвигом рамки считывания*

МКПК, собранные до и после вакцинации, были доступны для анализа. МКПК выделяли и замораживали, как описано ранее (Brunsvig, PF *et al.* (2006), *Cancer Immunol Immunother* 55(12):1553-1564). Размороженные МКПК стимулировали один раз с использованием пептида в течение 10-12 дней в условиях *in vitro*, и затем испытывали с 10 тремя повторами в количественных исследованиях пролиферации Т-клеток (H<sup>3</sup>-тимидин) с использованием аутологичных МКПК в качестве АПК. МКПК из разных временных точек стимулировали пептидами TGFβRII, несущими мутацию со сдвигом рамки считывания. Пептиды включали 573 (p573, SEQ ID NO: 1) и 621 (p621, SEQ ID NO: 55) из 15 белка TGFβRII, несущего мутацию со сдвигом рамки считывания, полученного в результате делеции 1 п.о. (-1A) в аденозиновом участке (A10) из оснований № 709-718 TGFβRII (номер доступа для последовательности TGFβRII человека дикого типа в GenBank: NM 003242). Пептид hTERT, I540 (SEQ ID NO: 54), использовали в качестве отрицательного контроля. Оба пептида были предоставлены Norsk Hydro, ASA, Порсгрунн, Норвегия.

20 Пептид MART-1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 56 (аминокислоты 26-35 нативного MART-1) был изготовлен компанией ProImmune Ltd, Великобритания. Стимулированные Т-клетки затем испытывали в количественных исследованиях пролиферации против нагруженных пептидом АПК, либо аутологичных МКПК, либо EBV-LCL. Индекс стимуляции (SI) определяли как показатель пролиферации с пептидом, 25 деленный на показатель пролиферации без пептида, и SI ≥ 2 считали положительным ответом. Клоны Т-клеток из реактивных линий Т-клеток получали, как описано ранее (Saeterdal, I *et al.* (2001), *Cancer Immunol Immunother* 50(9):469-476).

*Клонирование ТКР и HLA-A2*

30 Клоны Т-клеток, специфические в отношении мутации со сдвигом рамки считывания (26 и 30), выращивали, и получали общую РНК. Клонирование выполняли с использованием модифицированного метода 5'-RACE. В общих чертах, кДНК синтезировали с использованием праймера олиго-dT и к 5'-концу присоединяли участок, состоящий из остатков цитозина. Для амплификации цепей ТКР использовали полигуанозиноновый праймер с праймером, специфическим для константных доменов. 35 Ампликон клонировали и секвенировали. Конструкцию для экспрессии получали путем

амплификации  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи ТКР по отдельности с использованием специфических праймеров, и вторую ПЦР проводили для гибридизации цепей ТКР, чтобы получить конструкцию ТКР-2А. Рамку считывания ТКР-2А клонировали в pENTR (Invitrogen) и затем рекомбинировали в другие векторы экспрессии.

5 Для синтеза РНК вставку субклонировали в Gateway-модифицированный вариант pCpA<sub>102</sub> (Saeboe-Larssen, S *et al.* (2002), *J Immunol Methods* 259(1-2):191-203). Подробное описание способа, а также последовательности праймеров можно найти в (Wälchli, S *et al.* (2011), *PloS one* 6(11):e27930). Для ретровирусной трансдукции вставку субклонировали в вектор pM71. Конструкцию HLA-A\*0201-pCpA<sub>102</sub> клонировали, как описано ранее  
10 (Stronen, E *et al.* (2009), *Scand J Immunol* 69(4):319-328). Данную конструкцию использовали в качестве матрицы, чтобы получить мутантный вариант, не способный к связыванию с CD8, путем нацеливания на остатки D227 и T228 и замены их, соответственно, К и А, как описано в (Ху, XN *et al.* (2001), *Immunity* 14(5):591-602). Стандартный сайт-направленный мутагенез проводили с использованием следующих  
15 праймеров: 5'-GAGGACCAGACCCAGAAGGCGGAGCTCGTGGAGAC-3' (SEQ ID NO: 57) и 5'-GTCTCCACGAGCTCCGCCTTCTGGGTCTGGTCCTC-3' (SEQ ID NO: 58). Клетки HEK293 трансфецировали полученными конструкциями с использованием FuGENE-6 (Roche, Швейцария) в соответствии с протоколом производителя.

#### *Транскрипция мРНК в условиях in vitro*

20 Синтез мРНК в условиях *in vitro* по существу выполняли, как описано ранее (Almasbak, H *et al.* (2011), *Cytotherapy* 13(5):629-640). Аналог кэпа, предотвращающий обратную ориентацию (Trilink Biotechnologies Inc., Сан-Диего, Калифорния, США), использовали для кэпирования РНК. мРНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле и устройства Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Волтэм, Массачусетс,  
25 США).

#### *Размножение Т-клеток человека в условиях in vitro*

Т-клетки от здоровых доноров размножали с использованием протокола, приспособленного для получения Т-клеток с применением Dynabeads CD3/CD28 в соответствии с требованиями НМП по существу, как описано ранее (Almasbak, H. *et al.*  
30 (2011), *Cytotherapy* 13(5):629-640). В общих чертах, МКПК выделяли из лейкоцитарных пленок с помощью центрифугирования в градиенте плотности и культивировали с Dynabeads (Dynabeads<sup>®</sup> ClinExVivo<sup>™</sup> CD3/CD28, любезно предоставленными Dynal Invitrogen, Осло, Норвегия) при соотношении 3:1 в полной среде CellGro DC с добавлением 100 Ед./мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (ИЛ-2) (Proleukin,



Novartis Healthcare, США) в течение 10 дней. Клетки замораживали, и аликвоты оттаивали и оставляли в покое в полной среде до проведения трансфекции.

#### *Электропорация размноженных Т-клеток*

Размноженные Т-клетки дважды промывали, ресуспендировали в среде CellGro DC (CellGenix GmbH) и ресуспендировали до концентрации  $7 \times 10^7$  клеток/мл. мРНК смешивали с клеточной суспензией до концентрации 100 мкг/мл и электропорировали в кювете с просветом 4 мм при 500 В и с константой времени 2 мс, используя электропоратор с прямоугольными импульсами ВТХ 830 (ВТХ Technologies Inc., Хоторн, Нью-Йорк, США). Непосредственно после трансфекции Т-клетки переносили в полную культуральную среду при температуре 37 °С в 5% CO<sub>2</sub> и инкубировали в течение ночи, чтобы обеспечить экспрессию ТКР.

#### *Антитела и проточная цитометрия*

Т-клетки промывали в буфере для окрашивания (SB), состоящем из фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 0,1% сывороточного альбумина человека (САЧ) и 0,1% азида натрия, перед окрашиванием в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем клетки промывали в SB и фиксировали в SB, содержащем 1% параформальдегида. Для внутриклеточного окрашивания Т-клетки стимулировали в течение 6 часов или в течение ночи с использованием АПК, нагруженных р573 или без него, при соотношении Т-клетки:мишень 2:1 и в присутствии BD GolgiPlug и BD GolgiStop, разбавленных в соотношении 1:1000. Клетки окрашивали как внеклеточно, так и внутриклеточно с использованием набора PerFix-nc в соответствии с инструкциями производителя (Beckman Coulter Inc, США). Использовали следующие антитела: Vβ3-FITC (Beckman Coulter-Immunotech SAS, Франция), CD3-eFluor 450, CD4-eFluor 450, CD4-PE-Cy7, CD8-APC, CD8-eFluor 450, CD8-PE-Cy7, CD56-PE-Cy5.5 (BD Biosciences, США), CD107a-PE-Cy5 (BD Biosciences, США), CXCR2-PE, IFN-γ-FITC, IL-2-APC, TNF-α-PE (BD Biosciences, США) и CD261/TRAIL-R4-PE (BD Biosciences, США). Специфический в отношении MART-1 (аминокислоты 26-35) ТКР детектировали путем окрашивания с использованием декстрамера (Immudex, Дания) в соответствии с рекомендациями производителя. Все антитела приобрели в eBioscience, США, кроме случаев, когда это указано. Клетки получали на проточном цитометре BD LSR II, и данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Treestar Inc., Эшланд, Орегон, США).

#### *Количественные исследования высвобождения Cr<sup>51</sup>*

Количественные исследования высвобождения Cr<sup>51</sup> для оценки цитотоксичности проводили путем мечения  $2 \times 10^6$  клеток-мишеней в 0,5 мл ФСТ с Na<sub>2</sub>Cr<sup>51</sup>O<sub>4</sub> (7,5 МБк) (Perkin Elmer, Волтэм, Массачусетс, США) в течение 1 ч при осторожном перемешивании

каждые 15 мин. Клетки промывали три раза в холодной среде RPMI-1640 и высевали при плотности  $2 \times 10^3$  клеток-мишеней в 96-луночные планшеты для микротитрования с U-образным дном. В аутологичные клетки EBV-LCL, клетки-мишени T2 или клетки линии рака толстой кишки HCT116, SW480 и LS174T вводили 10 мкМ р573 или рI540 в течение 5 1 часа при 37 °С. Исходный клон Т-клетки, ТКР-трансфицированные Т-клетки или ложнотрансфицированные Т-клетки добавляли при указанных соотношениях эффектор:мишень (Е:Т) и планшет оставляли на 4 часа при 37 °С, как указано. Максимальное и спонтанное высвобождение  $Cr^{51}$  из клеток-мишеней определяли после инкубации с 5% тритоном X-100 (Sigma-Aldrich, Осло, Норвегия) или средой, 10 соответственно. Супернатанты собирали на планшеты Luma (Packard, Мериден, Коннектикут, США) и  $Cr^{51}$ , высвобождаемый из лизированных клеток, измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика для микропланшетов TopCount (Packard Instrument Company, Мериден, США). Процент удельного высвобождения хрома рассчитывали по формуле: [(экспериментальное высвобождение-спонтанное высвобождение)/(максимальное высвобождение-спонтанное высвобождение)] $\times 100$ . 15

#### *Ретровирусная трансдукция*

МКПК, выделенные у здоровых доноров, культивировали и активировали в среде CellGro DC (CellGenix GmbH, Германия), дополненной 5% сывороткой человека (HS) и 100 Ед./мл ИЛ-2 (Proleukin, Novartis Healthcare) в течение 48 ч в 24-луночном планшете, 20 предварительно покрытом антителом к CD3 (ОКТ-3) и антителами к CD28 (BD Biosciences, США). Через два дня культивирования МКПК собирали и дважды трансдуцировали ретровирусным супернатантом. Спинокуляцию МКПК проводили с использованием 1 объема ретровирусного супернатанта в 12-луночном культуральном необработанном планшете (Nunc A/S, Роскилле, Дания), предварительно покрытом 25 ретронектином (20 мкг/мл, Takara Bio. Inc., Шига, Япония). Через два дня клетки собирали с использованием ФСБ-ЭДТА (0,5 мМ). Трансдуцированные Т-клетки дополнительно размножали с помощью Dynabeads CD3/CD28, как описано выше.

#### *Исследования с использованием ксенотрансплантатной мышинной модели*

Мышей линии NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) выращивали на собственной 30 базе в соответствии с утвержденным протоколом по уходу за животными организации и поддерживали в стерильных условиях. Мышам в возрасте 6-8 недель в/б водили  $1-1,5 \times 10^6$  опухолевых клеток HCT116. Клетки HCT116 модифицировали с использованием ретровирусного вектора (предоставленного доктором Райнером Лёвом (Rainer Löw), EUFETS AG, Идар-Оберштайн, Германия) для экспрессии люциферазы светлячка и EGFP. 35 Рост опухоли контролировали с помощью визуализации биолюминесценции с

использованием системы Xenogen Spectrum и программного обеспечения Living Image v3.2. Анестезированным мышам в/б вводили 150 мг/кг массы тела D-люциферина (Caliper Life Sciences, Хопкингтон, Массачусетс, США). Животных исследовали с помощью визуализирующих методов через 10 минут после инъекции люциферина.

#### 5 Статистический анализ

Непрерывные данные описывали с использованием медианы, среднего значения и диапазона. Критерий Манна-Уитни использовали для анализа опухолевой нагрузки, тогда как выживание рассчитывали с использованием метода Каплана-Мейера с помощью непарного t-теста, который применяли для сравнения выживаемости в группах. Все  
10 приведенные значения p представляют собой двухсторонние значения. Значение p ниже 0,05 считалось значимым. Все статистические анализы выполняли с использованием GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., США).

#### Результаты

15 *Выделение клона Т-клетки, специфического в отношении TGFβRII, несущего мутацию со сдвигом рамки считывания*

ЦТЛ, реактивный в отношении TGFβRII, несущего мутацию со сдвигом рамки считывания, и ограниченный по HLA-A2, выделяли из крови пациента с MSI<sup>+</sup> раком толстой кишки. Пациент был вакцинирован с использованием 23-членного пептида TGFβRI, несущего мутацию со сдвигом рамки считывания, последовательность которого  
20 приведена в SEQ ID NO: 49. Было показано, что клоны ЦТЛ являются CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> и приблизительно 50% клеток экспрессировали CD56 (Фиг. 1a). Ранее предполагали, что клоны ЦТЛ являются моноклональными, поскольку было показано, что они экспрессируют ТКР Vβ3 (или TRBV 28, номенклатура IMGT) (Kyte, JA (2009), *Expert Opin Investig Drugs* 18(5):687-694). Молекулярное клонирование выявило, что они  
25 действительно представляли собой сестринские клоны, содержащие одну и ту же пару цепей ТКР. Специфический лизис клеток линий рака толстой кишки HCT116 и SW480 наблюдали в отсутствие экзогенно нагруженного пептида. Однако соотношение E:T, необходимое для лизиса клеточных линий с эндогенным пептидом, было выше, чем в случае нагрузки клеточных линий экзогенным пептидом TGFβRII, несущим мутацию со  
30 сдвигом рамки считывания (p573, SEQ ID NO: 1). В контрольных экспериментах другая линия рака толстой кишки LS174T, которая является HLA-A2-отрицательной, но экспрессирует мутацию TGFβRII, не подвергалась лизису (Фиг. 1b). Важно отметить, что, несмотря на экспрессию CD56 на клоне Т-клетки (Фиг. 1a), HLA-A2-отрицательная клеточная линия LS174T не подвергалась лизису, это указывает на то, что гибель клеток

не была опосредована активностью, сходной с таковой природных клеток-киллеров (NK), а была вызвана специфическим распознаванием молекул ГКГС, нагруженных пептидом.

Чтобы проверить относительную avidность клонов Т-клетки, TAP-дефицитные клетки T2 нагружали протитрованными количествами пептида (0,01-1,0 мкМ). Было обнаружено, что активность уничтожения клеток зависела от концентрации пептида (Фиг. 1с). Добавление HLA-специфических блокирующих антител уменьшало гибель клеток (Фиг. 1с), это подтверждает ограничение ТКР по HLA класса I. Аналогичные наблюдения сделали при использовании аутологичных клеток EBV-LCL в качестве АПК. В совокупности данные свидетельствуют о том, что  $TGF\beta RI^{mut}$ -специфические Т-клетки были отрицательными в отношении присутствия корцепторов, пептидспецифическими и ограничены по HLA класса I.

*TGFβRI<sup>mut</sup>-ТКР экспрессируется и активен как в CD4<sup>+</sup>, так и в CD8<sup>+</sup> Т-клетках после электропорации мРНК*

Идентифицировали α- и β-цепи ТКР из  $TGF\beta RI^{mut}$ -реактивных сестринских клонов Т-клетки и в дальнейшем называли ТКР Radium-1. Две цепи клонировали в вектор экспрессии мРНК (см. Материалы и методы), и Т-клетки, размноженные в течение 10 дней в условиях *in vitro*, подвергали электропорации, чтобы оценить их способность распознавать свои мишени. Экспрессию ТКР Radium-1 измеряли как в CD4<sup>+</sup>, так и в CD8<sup>+</sup> Т-клетках с помощью поверхностного окрашивания с использованием антитела к Vβ3 (TRBV 28) (Фиг. 2а). Приблизительно 70% трансфецированных Т-клеток экспрессировали цепь Vβ3, причем 42% этих Т-клеток были CD8-положительным и 32% Т-клеток экспрессировали CD4, тогда как менее 5% клеток экспрессируют Vβ3 естественным образом.

Затем активность Radium-1-трансфецированных Т-клеток контролировали путем внутриклеточного окрашивания цитокинов при совместной инкубации с клеточными линиями рака толстой кишки SW480 и LS174T. Клеточная линия рака толстой кишки SW480 была распознана как CD8<sup>+</sup>, так и CD4<sup>+</sup> Т-клетками в отсутствие и в присутствии экзогенно нагруженного пептида. Т-клетки продуцировали ФНО-α и ИФН-γ (Фиг. 3). Как и ожидалось, клеточная линия рака толстой кишки LS174T не была распознана. Эти данные подтвердили ограничение ТКР Radium-1 по пептиду HLA и его способность эффективно перенаправлять как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

*Выработка CD107a и ИФН-γ в CD8<sup>+</sup> Т-клетках, трансфецированных ТКР Radium-1*

Чтобы определить цитотоксический потенциал ТКР-трансфецированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток против клеточных линий рака толстой кишки, Т-клетки после электропорации мРНК совместно инкубировали с клеточными линиями рака толстой кишки в течение 6

часов и окрашивали антителами против маркеров дегрануляции, CD107a и ИФН- $\gamma$  (Фиг. 4). Очень низкие уровни выработки ИФН- $\gamma$  и экспрессии CD107a детектировали в отсутствие экзогенно нагруженного пептида. После добавления пептида p573 (SEQ ID NO: 1) как ТКР Radium-1-трансфицированные Т-клетки, так и исходный клон Т-клетки  
5 были сильно активированы. Интересно отметить, что ТКР-трансфицированные Т-клетки более эффективно вырабатывали ИФН- $\gamma$  и также проявляли более высокие уровни дегрануляции, чем исходный клон Т-клетки, тогда как ложнотрансфицированные Т-клетки не были активированы. Чтобы проверить отсутствие зависимости ТКР от корцепторов, клетки HEK293 трансфицировали с применением HLA-A2 дикого типа (WT) или  
10 мутантного HLA-A2, неспособного связывать CD8, нагружали пептидом p573 и использовали для стимуляции ТКР-трансфицированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Количество Т-клеток, экспрессирующих CD107a, составило 36% (HLA-A2 дикого типа) и 26% (мутантный вариант HLA-A2), это указывает на то, что данный ТКР по меньшей мере частично не зависит от корцепторов (Фиг. 7).

15 *Т-клетки, трансфицированные ТКР Radium-1, способны опосредовать специфический лизис опухолевых клеток*

Помимо выработки цитокинов основная функция, требующая адаптивного переноса перенаправленных Т-клеток, заключается в специфическом уничтожении опухолевых клеток. Чтобы изучить способность ТКР-трансфицированных Т-клеток лизировать клетки-мишени, их испытывали против клеточных линий рака толстой кишки в 6-часовом  
20 количественном исследовании высвобождения хрома (Фиг. 5). ТКР-трансфицированные Т-клетки лизировали клетки HCT116 на уровнях, сравнимых с таковыми для исходного клона пациента. Как и ожидалось, лизис дополнительно повышался при добавлении экзогенного p573 (SEQ ID NO: 1). Лизис HLA-A2-отрицательной линии клеток LS174T  
25 был сопоставим с таковым для ложнотрансфицированных Т-клеток, это свидетельствует о том, что низкий неспецифический лизис HCT116, вероятно, обусловлен экспрессией TRAIL-R на клетках-мишенях (Фиг. 8). Эта клеточная линия, как сообщалось, чувствительна к опосредуемому TRAIL лизису (Tang, W et al., (2009), Febs J 276 (2): 581-593).

30 *Т-клетки, трансдуцированные Radium-1-ТКР, являются эффективными в условиях in vitro и в условиях in vivo*

Ксенотрансплантатную модель рака толстой кишки мыши создавали с помощью внутрибрюшинной инъекции HCT116 (Kishimoto, H et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A 106(34):14514-14517). Т-клетки трансдуцировали ТКР с помощью ретровируса и  
35 испытывали для определения экспрессии, которая составила приблизительно 60% для

обоих ТКР Radium-1 и MART-1-специфического ТКР (DMF5), использованного в качестве контроля (Фиг. 6а). Перед инъекцией Т-клетки подвергали функциональным испытаниям против клеток HLA-A2<sup>+</sup> EBV-LCL, нагруженных длинным пептидом TGFβRII, несущим мутацию со сдвигом рамки считывания (p621, SEQ ID NO: 55), или низкоаффинным (дикий тип) пептидом MART-1 (SEQ ID NO: 56) (Фиг. 6б). Все Т-клетки, экспрессирующие ТКР Radium-1, ответили на EBV-LCL, нагруженные длинным пептидом TGFβRII, несущим мутацию со сдвигом рамки считывания, в то время как приблизительно половина клеток, экспрессирующих MART-1 ТКР, отвечала на низкоаффинный пептид MART-1. Мыши линии NSG получали в/б инъекции 10<sup>6</sup> клеток НСТ116 на 0 день и на 2, 5 и 10 день мышам вводили 8×10<sup>6</sup> (2 день) и 2×10<sup>7</sup> (5 и 10 день) Т-клеток (Фиг. 6с). Контрольные мыши получали Т-клетки, экспрессирующие MART-1-специфический ТКР.

Визуализирующие способы исследований мышей в условиях *in vivo* выявили, что опухолевая нагрузка была значительно ниже (p=0,038) у мышей, получавших лечение с применением TGFβRII<sup>mut</sup>-специфических Т-клеток, по сравнению с MART-1-специфическими контрольными Т-клетками (Фиг. 6д). Мыши, получавшие TGFβRII<sup>mut</sup>-специфические Т-клетки, также имели повышенную выживаемость по сравнению с контрольными мышами (p=0,038, Фиг. 6е). Опухоли иссекали у мышей, которые должны были быть подвергнуты эвтаназии из-за высокой опухолевой нагрузки. Получали одноклеточные суспензии опухолей и окрашивали антителом к CD3 человека и антителом к Vβ3 или декстрамером против MART-1. Было обнаружено, что процент ТКР-экспрессирующих Т-клеток в опухоли значительно выше у мышей, получавших лечение с применением TGFβRII<sup>mut</sup>-специфических Т-клеток (p=0,0038, Фиг. 6ф), несмотря на то, что эффективность трансдукции двух популяций Т-клеток была очень сходной, это указывает на то, что TGFβRII<sup>mut</sup>-специфические Т-клетки либо более эффективно привлекались к опухоли, либо размножались в условиях *in vivo* в результате антигенной стимуляции. В совокупности эти данные демонстрируют доклиническую эффективность ТКР Radium-1 в условиях *in vivo*.

### **Пример 2**

Чтобы изучить уничтожение клеток-мишеней под действием CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, трансдуцированных ТКР Radium-1, клетки-мишени стабильно трансдуцировали для экспрессии люциферазы. Использовали два набора клеток-мишеней: клеточную линию НСТ116 и клеточную линию Granta. Клетки НСТ116 описаны выше; клеточная линия Granta представляет собой линию В-клеточной лимфомы человека. Изменения биolumинесценции использовали, чтобы измерить изменения количества клеток-

мишеней во время культивирования с Radium-1-трансдуцированными Т-клетками, на основании которых делали выводы об уничтожении клеток-мишеней Т-клетками.

Трансдуцированные люциферазой клетки-мишени совместно культивировали с эффекторными Т-клетками при соотношении эффектор:мишень (Е:Т) равном 30:1, и измеряли биолюминесценцию. Клетки культивировали в течение 24 часов, и биолюминесценцию измеряли через 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 20, 21, 22, 23 и 24 часа. Эффекторные Т-клетки совместно культивировали с клетками Granta с экзогенным пептидом р621 (SEQ ID NO: 55), который содержит последовательность SEQ ID NO: 1, и без него.

Было обнаружено, что очищенные CD4<sup>+</sup> Т-клетки и очищенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, трансдуцированные Radium-1 мРНК, вызывали гибель клеток НСТ116 и клеток Granta (Фиг. 9). Уничтожение клеток Granta под действием как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Т-клеток было значительно выше в присутствии р621 («+пептид TGFβRII»), чем в его отсутствие («без пептида»). Это свидетельствует о том, что Radium-1-трансдуцированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки способны уничтожать клетки-мишени без взаимодействия с CD8<sup>+</sup> Т-клетками.

Цитолитическую активность в условиях *in vivo* Т-клеток, кратковременно трансдуцированных Radium-1, дополнительно изучали на мышах. Мышам линии NSG в/б вводили 10<sup>6</sup> клеток НСТ 116, стабильно трансдуцированных для экспрессии люциферазы. Через два дня (т. е. на 2 день) мышам вводили путем в/б или в/в (внутривенной) инъекции 8-10×10<sup>6</sup> Т-клеток, трансфецированных Radium-1. Последующие инъекции Radium-1-трансфецированных Т-клеток вводили на 5, 7, 10, 13, 15 и 21 день, и опухолевую нагрузку оценивали с помощью визуализации биолюминесценции на 2, 7, 17, 29, 45, 53 и 60 день (см. Фиг. 10А, последняя визуализация не указана).

Мыши, получавшие Т-клетки, трансфецированные ТКР Radium-1, имели значительно более низкую опухолевую нагрузку, чем мыши, получавшие ложнотрансфецированные Т-клетки (Фиг. 10В) (\*p=0,01, критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). Вследствие аллореактивности Т-клеток ложнотрансфецированные Т-клетки, как показано, оказывали некоторое влияние на рост опухоли после многократных инъекций. Однако этот эффект был временным. Поскольку в этом случае экспрессия ТКР была кратковременной, Т-клетки, вводимые путем внутривенной (в/в) инъекции, не влияли на рост опухоли.

Эффективность ТКР Radium-1 сравнивали в условиях *in vitro* с известным высокоаффинным ТКР. Для сравнения был выбран MART-1-специфический ТКР, DMF5. DMF5 использовали в клинических условиях для лечения меланомы (Johnson, L.A. *et al.* (2006), *J Immunol* 177(9):6548-6559).

CD8-T-клетки трансдуцировали с применением Radium-1 и MART-1 и сортировали. ТКР<sup>+</sup> Т-клетки инкубировали с HLA-A2<sup>+</sup> клетками T2 (T2 это линия лимфобластных клеток человека, которые не экспрессируют молекулы ГКГС класса II), нагруженными пептидом TGFβRII, p573, несущим мутацию со сдвигом рамки считывания (SEQ ID NO: NO: 1), и аналогом пептида 26-35 MART-1, ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 80), в течение 5 часов перед окрашиванием для оценки маркера дегрануляции CD107a в качестве маркера цитолитической способности с последующим исследованием методом проточной цитометрии. Аналог пептида 26-35 MART-1, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 80, содержит замену одной аминокислоты по сравнению с пептидом дикого типа, содержащим последовательность SEQ ID NO: 56, т. е. аланин в положении 2 из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 56, заменен лейцином. Полученный в результате аналог пептида обладает предпочтительными свойствами, поскольку он обладает повышенной аффинностью в отношении HLA-A2, что приводит к усиленному представлению пептида молекулами ГКГС класса I, содержащими HLA-A2, по сравнению с пептидом дикого типа.

Было показано, что значение ЭК<sub>50</sub> p573 для Radium-1 составило 2 нМ, по сравнению со значением ЭК<sub>50</sub> пептида MART-1, содержащего SEQ ID NO: 56, составившим 7 нМ для DMF5 (Фиг. 11). Это указывает на то, что Radium-1 имеет очень высокую аффинность в отношении комплекса когнатный антиген/ГКГС и не зависит от CD8. Помимо этого показано, что Radium-1 имеет более высокую аффинность в отношении комплекса когнатный антиген/ГКГС, чем ТКР DMF5, который, как известно, является клинически эффективным.

### **Пример 3**

Растворимый His-меченый ТКР Radium-1, кодируемый оцТКР, последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 69, экспрессировали в клетках НЕК. Выделяли супернатант экспрессирующих клеток НЕК. Клетки SupT1 (HLA-A2-отрицательная клеточная линия) трансдуцировали для экспрессии HLA-A2 либо гибридного с неспецифическим нецелевым пептидом, который не распознается Radium-1, либо гибридного с пептидом TGFβRII, несущим мутацию со сдвигом рамки считывания. Трансдуцированные клетки инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с растворимым ТКР Radium-1; нетрансдуцированные клетки также инкубировали с растворимым ТКР в качестве дополнительного отрицательного контроля. После инкубации клетки промывали и затем окрашивали аллофикоцианином (АФЦ) для идентификации связывания растворимого ТКР. Окрашивание проводили с использованием первичного мышинового антитела к His с последующей инкубацией с



АФЦ-конъюгированным вторичным антителом к IgG мыши. Затем окрашенные клетки исследовали методом проточной цитометрии (Фиг. 12).

Как показано на Фиг. 12А и 12В, по существу не наблюдали окрашивания отрицательных контролей, это свидетельствовало о том, что растворимый ТКР Radium-1 не связывался с клетками, которые не экспрессируют HLA-A2, или которые экспрессируют HLA-A2, но не представляют пептид TGF $\beta$ RII, несущий мутацию со сдвигом рамки считывания. На Фиг. 12С показано, что клетки, экспрессирующие HLA-A2 и представляющие пептид TGF $\beta$ RII, несущий мутацию со сдвигом рамки считывания, были распознаны растворимым ТКР Radium-1, это свидетельствовало о том, что он имеет ожидаемую специфичность.

Перечень последовательностей

<110> Oslo universitetssykehus HF

<120> Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, КОТОРЫЕ РАСПОЗНАЮТ МУТАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ СО СДВИГОМ РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ TGFBR11

<130> 27.18.123119/01

<150> GB 1608052.5

<151> 2016-05-09

<160> 82

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Leu Ser Ser Cys Val Pro Val Ala  
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ser Val Asn Asn  
1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ile Pro Ser Gly Thr  
1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe  
1 5 10

<210> 5  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Asp His Glu Asn  
1 5

<210> 6  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Tyr Asp Val Lys Met  
1 5

<210> 7  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7

Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe  
1 5 10

<210> 8  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile  
50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser  
65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser  
85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly  
100 105 110

Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro  
115 120 125

<210> 9  
<211> 141  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9

His 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> 141  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Модифицированная цистеином константная область альфа-цепи Radium-1

<400> 10

His 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 Cys  
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> 11  
<211> 268  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
 20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
 35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile  
 50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser  
 65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser  
 85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly  
 100 105 110

Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His  
 115 120 125

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

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

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

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 180 185 190

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 195 200 205

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val  
 210 215 220

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

Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly  
 245 250 255

Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
260 265

<210> 12

<211> 268

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Модифицированная цистеином альфа-цепь Radium-1

<400> 12

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile  
50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser  
65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser  
85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly  
100 105 110

Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His  
115 120 125

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

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

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

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
180 185 190

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
195 200 205

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val  
210 215 220

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

Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly  
245 250 255

Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
260 265

<210> 13  
<211> 131  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val  
1 5 10 15

Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
20 25 30

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
35 40 45

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

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser



100

105

110

Ser	Ser	Gly	Val	Thr	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Arg	Leu
		115					120					125			

Thr	Val	Leu
	130	

<210> 14  
 <211> 179  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 14

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> 15

<211> 179

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Модифицированная цистеином константная область бета-цепи Radium-1

<400> 15

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 Cys 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> 16  
<211> 310  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val  
1 5 10 15

Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
20 25 30

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
35 40 45

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

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser  
100 105 110

Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu  
115 120 125

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

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
165 170 175

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

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly  
260 265 270

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
275 280 285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
290 295 300

Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
305 310

<210> 17

<211> 310

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Модифицированная цистеином бета-цепь Radium-1

<400> 17

Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val  
1 5 10 15

Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
20 25 30

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
35 40 45

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

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser  
100 105 110

Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu  
115 120 125

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

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln  
180 185 190

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly  
260 265 270

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr

275

280

285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
290 295 300

Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
305 310

<210> 18  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Пикорнавирус

<400> 18

Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln  
1 5 10 15

Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro  
20 25

<210> 19  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Двойная метка Мус

<400> 19

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
1 5 10 15

Glu Glu Asp Leu  
20

<210> 20  
<211> 147  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариабельная область альфа-цепи Radium-1 с двойной меткой Мус

<400> 20

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln  
20 25 30

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro  
35 40 45

Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn  
50 55 60

Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp  
65 70 75 80

Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn  
85 90 95

Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu  
100 105 110

Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala  
115 120 125

Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met  
130 135 140

Val Lys Pro  
145

<210> 21  
<211> 288  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Альфа-цепь Radium-1 с двойной меткой Мус

<400> 21

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln  
20 25 30

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro  
35 40 45

Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn  
50 55 60

Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp  
65 70 75 80

Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn  
85 90 95

Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu  
100 105 110

Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala  
115 120 125

Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met  
130 135 140

Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg  
145 150 155 160

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp  
165 170 175

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr  
180 185 190

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser  
195 200 205

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe  
210 215 220

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser  
225 230 235 240

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn  
245 250 255

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu  
260 265 270

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
275 280 285



<210> 22  
 <211> 288  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Модифицированная цистеином альфа-цепь Radium-1 с двойной меткой  
 Мус

<400> 22

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
 1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln  
 20 25 30

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro  
 35 40 45

Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn  
 50 55 60

Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp  
 65 70 75 80

Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn  
 85 90 95

Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu  
 100 105 110

Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala  
 115 120 125

Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met  
 130 135 140

Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg  
 145 150 155 160

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp  
 165 170 175

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr

180

185

190

Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser  
195 200 205

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe  
210 215 220

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser  
225 230 235 240

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn  
245 250 255

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu  
260 265 270

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
275 280 285

<210> 23  
<211> 136  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 23

Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser  
1 5 10 15

Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn  
20 25 30

Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val  
35 40 45

Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp  
50 55 60

Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn  
65 70 75 80

Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu  
85 90 95

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

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

Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
130 135

<210> 24

<211> 136

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Модифицированная цистеином константная область, содержащая  
фрагменты последовательности мышцы, альфа-цепи Radium-1

<400> 24

Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser  
1 5 10 15

Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn  
20 25 30

Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Cys Val  
35 40 45

Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp  
50 55 60

Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn  
65 70 75 80

Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu  
85 90 95

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

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

Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
130 135

<210> 25  
<211> 263  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Альфа-цепь Radium-1 с константной областью, содержащей фрагменты последовательности МЫШИ

<400> 25

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile  
50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser  
65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser  
85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly  
100 105 110

Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro Ile  
115 120 125

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

Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val  
145 150 155 160

Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu  
165 170 175

Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser  
180 185 190

Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala  
195 200 205

Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys  
210 215 220

Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met  
225 230 235 240

Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met  
245 250 255

Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
260

<210> 26

<211> 263

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Альфа-цепь Radium-1 с модифицированной цистеином константной областью, содержащей фрагменты последовательности мыши

<400> 26

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile  
50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser  
65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser  
85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly

100 105 110  
 Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro Ile  
 115 120 125  
 Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln  
 130 135 140  
 Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu  
 165 170 175  
 Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser  
 180 185 190  
 Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala  
 195 200 205  
 Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys  
 210 215 220  
 Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met  
 225 230 235 240  
 Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met  
 245 250 255  
 Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 260

<210> 27  
 <211> 283  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Альфа-цепь Radium-1 с двойной меткой Мус и константной областью,  
 содержащей фрагменты последовательности МЫШИ  
 <400> 27

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
 1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln

	20		25		30												
Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Gln	Val	Glu	Gln	Ser	Pro		
	35						40					45					
Pro	Asp	Leu	Ile	Leu	Gln	Glu	Gly	Ala	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Cys	Asn		
	50					55					60						
Phe	Ser	Asp	Ser	Val	Asn	Asn	Leu	Gln	Trp	Phe	His	Gln	Asn	Pro	Trp		
65					70					75					80		
Gly	Gln	Leu	Ile	Asn	Leu	Phe	Tyr	Ile	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	Gln	Asn		
				85					90					95			
Gly	Arg	Leu	Ser	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	Tyr	Ser	Leu	Leu		
			100					105					110				
Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Thr	Thr	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala		
		115					120					125					
Val	Asn	Ala	Gly	Asn	Met	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Met		
	130					135					140						
Val	Lys	Pro	Ile	Gln	Asn	Pro	Glu	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Lys	Asp		
145					150					155					160		
Pro	Arg	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Leu	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser		
				165					170					175			
Gln	Ile	Asn	Val	Pro	Lys	Thr	Met	Glu	Ser	Gly	Thr	Phe	Ile	Thr	Asp		
			180					185					190				
Lys	Thr	Val	Leu	Asp	Met	Lys	Ala	Met	Asp	Ser	Lys	Ser	Asn	Gly	Ala		
		195					200					205					
Ile	Ala	Trp	Ser	Asn	Gln	Thr	Ser	Phe	Thr	Cys	Gln	Asp	Ile	Phe	Lys		
	210					215					220						
Glu	Thr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Pro	Ser	Ser	Asp	Val	Pro	Cys	Asp	Ala	Thr		
225					230					235					240		
Leu	Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Met	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn		
				245					250					255			

Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe  
260 265 270

Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
275 280

<210> 28

<211> 283

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Альфа-цепь Radium-1 с двойной меткой Мус и модифицированной цистеином константной областью, содержащей фрагменты последовательности МЫШИ

<400> 28

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln  
20 25 30

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro  
35 40 45

Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn  
50 55 60

Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp  
65 70 75 80

Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn  
85 90 95

Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu  
100 105 110

Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala  
115 120 125

Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met  
130 135 140

Val Lys Pro Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp



145 150 155 160

Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser  
165 170 175

Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp  
180 185 190

Lys Cys Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala  
195 200 205

Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys  
210 215 220

Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr  
225 230 235 240

Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn  
245 250 255

Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe  
260 265 270

Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
275 280

<210> 29  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 29

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro  
1 5 10 15

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

Ala Arg Gly Phe Phe 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 Ala Tyr Lys  
50 55 60

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala  
65 70 75 80

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

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro  
100 105 110

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

<210> 30

<211> 125

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Модифицированная цистеином константная область, содержащая  
фрагменты последовательности мыши, бета-цепи Radium-1

<400> 30

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro  
1 5 10 15

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

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

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys  
50 55 60

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala  
65 70 75 80

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

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro  
100 105 110

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

<210> 31  
<211> 256  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Бета-цепь Radium-1 с константной областью, содержащей фрагменты последовательности МЫШИ

<400> 31

Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val  
1 5 10 15

Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
20 25 30

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
35 40 45

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

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser  
100 105 110

Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu  
115 120 125

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

Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu  
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
165 170 175

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

Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg  
195 200 205

Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln  
210 215 220

Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser  
225 230 235 240

Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala  
245 250 255

<210> 32

<211> 256

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Бета-цепь Radium-1 с модифицированной цистеином константной областью, содержащей фрагменты последовательности мыши

<400> 32

Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val  
1 5 10 15

Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
20 25 30

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
35 40 45

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

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser  
100 105 110

Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu

115 120 125

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

Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu  
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln  
180 185 190

Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg  
195 200 205

Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln  
210 215 220

Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser  
225 230 235 240

Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala  
245 250 255

<210> 33  
<211> 604  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> ОцТКР Radium-1 с линкером 2A

<400> 33

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile

50						55						60			
Asn	Leu	Phe	Tyr	Ile	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	Gln	Asn	Gly	Arg	Leu	Ser
65					70					75					80
Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	Tyr	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ser
				85					90					95	
Ser	Gln	Thr	Thr	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Val	Asn	Ala	Gly
			100					105					110		
Asn	Met	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Met	Val	Lys	Pro	His
		115					120					125			
Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys	Ser
	130					135					140				
Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn
145					150					155					160
Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Thr	Val
				165					170					175	
Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp
			180					185					190		
Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile
		195					200					205			
Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp	Val
	210					215					220				
Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln
225					230					235					240
Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly
				245					250					255	
Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser	Arg	Ala	Lys	Arg
			260					265					270		
Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val
		275					280					285			

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala  
290 295 300

Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser  
305 310 315 320

Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys  
325 330 335

Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro  
340 345 350

Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys  
355 360 365

Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys  
370 375 380

Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser  
385 390 395 400

Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe  
405 410 415

Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe  
420 425 430

Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His  
435 440 445

Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp  
450 455 460

His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly  
465 470 475 480

Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp  
485 490 495

Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp  
500 505 510

Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu

515

520

525

Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln  
530 535 540

Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser  
545 550 555 560

Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile  
565 570 575

Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val  
580 585 590

Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
595 600

<210> 34  
<211> 604  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Модифицированный цистеином оцТКР Radium-1 с линкером 2А

<400> 34

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile  
50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser  
65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser  
85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly



		100						105						110		
Asn	Met	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Met	Val	Lys	Pro	His	
		115					120					125				
Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys	Ser	
	130					135					140					
Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn	
145					150					155					160	
Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Cys	Val	
				165					170					175		
Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp	
			180					185					190			
Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile	
		195					200					205				
Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp	Val	
	210					215					220					
Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	
225					230					235					240	
Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	
				245					250					255		
Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser	Arg	Ala	Lys	Arg	
			260					265					270			
Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	
		275					280					285				
Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala	
	290					295					300					
Phe	Cys	Phe	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	
305					310					315					320	
Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys	
				325					330					335		

Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro  
340 345 350

Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys  
355 360 365

Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys  
370 375 380

Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser  
385 390 395 400

Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe  
405 410 415

Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe  
420 425 430

Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His  
435 440 445

Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp  
450 455 460

His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly  
465 470 475 480

Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp  
485 490 495

Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp  
500 505 510

Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu  
515 520 525

Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln  
530 535 540

Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser  
545 550 555 560

Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile

565

570

575

Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val  
580 585 590

Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
595 600

<210> 35

<211> 624

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ОцТКР Radium-1 с линкером 2А и двойной меткой Мус

<400> 35

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln  
20 25 30

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro  
35 40 45

Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn  
50 55 60

Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp  
65 70 75 80

Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn  
85 90 95

Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu  
100 105 110

Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala  
115 120 125

Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met  
130 135 140

Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg

145																	
Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp		
				165					170					175			
Ser	Gln	Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr		
			180					185					190				
Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser		
		195					200					205					
Ala	Val	Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe		
	210					215					220						
Asn	Asn	Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser		
225					230					235					240		
Ser	Cys	Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn		
				245					250					255			
Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu		
			260					265					270				
Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser		
		275					280					285					
Arg	Ala	Lys	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln		
	290					295					300						
Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu		
305					310					315					320		
Cys	Arg	Val	Ala	Phe	Cys	Phe	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys		
				325					330					335			
Val	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val		
			340					345					350				
Phe	Leu	Glu	Cys	Val	Gln	Asp	Met	Asp	His	Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr		
		355					360					365					
Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp		
	370					375					380						

Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser  
385 390 395 400

Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr  
405 410 415

Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly  
420 425 430

Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu  
435 440 445

Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala  
450 455 460

Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly  
465 470 475 480

Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu  
485 490 495

Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro  
500 505 510

Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser  
515 520 525

Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln  
530 535 540

Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys  
545 550 555 560

Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys  
565 570 575

Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile  
580 585 590

Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val  
595 600 605

Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly

610

615

620

<210> 36

<211> 624

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Модифицированный цистеином оцТКР Radium-1 с линкером 2А и двойной меткой Мус

<400> 36

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln  
20 25 30

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro  
35 40 45

Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn  
50 55 60

Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp  
65 70 75 80

Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn  
85 90 95

Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu  
100 105 110

Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala  
115 120 125

Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met  
130 135 140

Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg  
145 150 155 160

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp  
165 170 175

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr  
180 185 190

Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser  
195 200 205

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe  
210 215 220

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser  
225 230 235 240

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn  
245 250 255

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu  
260 265 270

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
275 280 285

Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln  
290 295 300

Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu  
305 310 315 320

Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys  
325 330 335

Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val  
340 345 350

Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr  
355 360 365

Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp  
370 375 380

Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser  
385 390 395 400

Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr  
405 410 415

Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly  
420 425 430

Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu  
435 440 445

Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala  
450 455 460

Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly  
465 470 475 480

Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu  
485 490 495

Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro  
500 505 510

Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser  
515 520 525

Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln  
530 535 540

Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys  
545 550 555 560

Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys  
565 570 575

Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile  
580 585 590

Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val  
595 600 605

Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
610 615 620

<210> 37

<211> 545

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность



<220>

<223> ОцТКР Radium-1 с константной областью, содержащей фрагменты последовательности мыши, и линкером 2А

<400> 37

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile  
50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser  
65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser  
85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly  
100 105 110

Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro Ile  
115 120 125

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

Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val  
145 150 155 160

Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu  
165 170 175

Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser  
180 185 190

Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala  
195 200 205

Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys  
210 215 220

Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met  
225 230 235 240

Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met  
245 250 255

Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr  
260 265 270

Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly  
275 280 285

Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala  
290 295 300

Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val  
305 310 315 320

Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp  
325 330 335

His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg  
340 345 350

Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile  
355 360 365

Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu  
370 375 380

Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala  
385 390 395 400

Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg  
405 410 415

Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser  
420 425 430

Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr

435

440

445

Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser  
450 455 460

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro  
465 470 475 480

Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu  
485 490 495

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys  
500 505 510

Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly  
515 520 525

Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg  
530 535 540

Ala  
545

<210> 38

<211> 545

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ОцТКР Radium-1 с модифицированной цистеином константной областью, содержащей фрагменты последовательности мыши, и линкером 2A

<400> 38

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile  
50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser  
65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser  
85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly  
100 105 110

Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro Ile  
115 120 125

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

Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val  
145 150 155 160

Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu  
165 170 175

Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser  
180 185 190

Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala  
195 200 205

Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys  
210 215 220

Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met  
225 230 235 240

Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met  
245 250 255

Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr  
260 265 270

Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly  
275 280 285

Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala  
290 295 300

Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val  
305 310 315 320

Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp  
325 330 335

His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg  
340 345 350

Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile  
355 360 365

Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu  
370 375 380

Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala  
385 390 395 400

Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg  
405 410 415

Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser  
420 425 430

Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr  
435 440 445

Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser  
450 455 460

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro  
465 470 475 480

Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu  
485 490 495

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys  
500 505 510

Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly  
515 520 525

Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg  
530 535 540

Ala  
545

<210> 39

<211> 565

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ОцТКР Radium-1 с константной областью, содержащей фрагменты последовательности мыши, с двойной меткой Мус

<400> 39

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln  
20 25 30

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro  
35 40 45

Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn  
50 55 60

Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp  
65 70 75 80

Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn  
85 90 95

Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu  
100 105 110

Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala  
115 120 125

Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met  
130 135 140

Val Lys Pro Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp  
145 150 155 160

Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser  
165 170 175

Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp  
180 185 190

Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala  
195 200 205

Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys  
210 215 220

Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr  
225 230 235 240

Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn  
245 250 255

Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe  
260 265 270

Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser Arg Ala Lys Arg Gly  
275 280 285

Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu  
290 295 300

Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe  
305 310 315 320

Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser  
325 330 335

Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val  
340 345 350

Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly  
355 360 365

Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu  
370 375 380

Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu

385                      390                      395                      400  
 Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met  
                              405                      410                      415  
 Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly  
                              420                      425                      430  
 Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro  
                              435                      440                      445  
 Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys  
                              450                      455                      460  
 Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His  
 465                      470                      475                      480  
 Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val  
                              485                      490                      495  
 Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu  
                              500                      505                      510  
 Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn  
                              515                      520                      525  
 His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys  
                              530                      535                      540  
 Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu  
 545                      550                      555                      560  
 Ala Trp Gly Arg Ala  
                              565

<210> 40  
 <211> 565  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ОцТКР Radium-1 с модифицированной цистеином константной областью,  
 содержащей фрагменты последовательности мыши, линекром 2А и двойной  
 меткой Мус

<400> 40



Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln  
20 25 30

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro  
35 40 45

Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn  
50 55 60

Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp  
65 70 75 80

Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn  
85 90 95

Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu  
100 105 110

Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala  
115 120 125

Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met  
130 135 140

Val Lys Pro Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp  
145 150 155 160

Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser  
165 170 175

Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp  
180 185 190

Lys Cys Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala  
195 200 205

Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys  
210 215 220

Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr

225						230						235				240
Leu	Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Met	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	
				245					250					255		
Leu	Ser	Val	Met	Gly	Leu	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe	
			260					265					270			
Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser	Arg	Ala	Lys	Arg	Gly	
			275				280					285				
Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	
	290					295					300					
Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala	Phe	
305					310					315					320	
Cys	Phe	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	Ser	
				325					330					335		
Arg	Tyr	Leu	Val	Lys	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys	Val	
			340					345					350			
Gln	Asp	Met	Asp	His	Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	
		355					360					365				
Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Lys	Met	Lys	Glu	
	370					375					380					
Lys	Gly	Asp	Ile	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	
385					390					395					400	
Arg	Phe	Ser	Leu	Ile	Leu	Glu	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr	Ser	Met	
				405					410					415		
Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser	Ser	Ser	Gly	Val	Thr	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	Gly	
			420					425					430			
Glu	Gly	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Asn	Val	Thr	Pro	
		435					440					445				
Pro	Lys	Val	Ser	Leu	Phe	Glu	Pro	Ser	Lys	Ala	Glu	Ile	Ala	Asn	Lys	
	450					455					460					

Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His  
465 470 475 480

Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val  
485 490 495

Cys Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu  
500 505 510

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn  
515 520 525

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys  
530 535 540

Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu  
545 550 555 560

Ala Trp Gly Arg Ala  
565

<210> 41  
<211> 1815  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кодирует SEQ ID NO: 33

<400> 41  
atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga  
60

ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg  
120

ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgagc ggtttcatca aaacccttgg  
180

ggacagctca tcaacctggt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc  
240

gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca  
300

gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga  
360

acaagggttaa tgggtcaaacc ccatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga  
420

gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcacccg attttgattc tcaaacaat  
480

gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aaactgtgct agacatgagg  
540

tctatggact tcaagagcaa cagtgtctgtg gcctggagca acaaactctga ctttgcattg  
600

gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca gaagacacct tcttccccag ccagaaagt  
660

tcctgtgatg tcaagctggt cgagaaaagc tttgaaacag atacgaacct aaactttcaa  
720

aacctgtcag tgattgggtt ccgaatcctc ctccataaag tggccgggtt taatctgctc  
780

atgacgctgc ggctgtggtc cagcagagcc aagagaggca gcggcgccac caacttcagc  
840

ctgctgaagc aggccggcga cgtggaagag aaccctggac caatgggaat caggctcctc  
900

tgctcgtgtgg ccttttgttt cctggctgta ggcctcgtag atgtgaaagt aaccagagc  
960

tcgagatata tagtcaaaaag gacgggagag aaagtttttc tggaatgtgt ccaggatatg  
1020

gaccatgaaa atatgttctg gtatcgacaa gaccaggtc tggggctacg gctgatctat  
1080

ttctcatatg atgttaaaat gaaagaaaaa ggagatattc ctgaggggta cagtgtctct  
1140

agagagaaga aggagcgctt ctccctgatt ctggagtcgc ccagcaccaa ccagacatct  
1200

atgtacctct gtgccagcag ttctggagtc accggggagc tgttttttgg agaaggctct  
1260

aggctgaccg tactggagga cctgaaaaac gtgttcccac ccgaggtcgc tgtgtttgag  
1320

ccatcagaag cagagatctc ccacaccaa aaggccacac tgggtgtgctt ggccacaggc  
1380

ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg  
1440

gtcagcacag acccgcagcc cctcaaggag cagcccgcc tcaatgactc cagatactgc  
1500

ctgagcagcc gcctgagggt ctcgccacc ttctggcaga acccccgcaa ccacttccgc  
1560

tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag aatgacgagt ggacccagga tagggccaaa  
1620

cctgtcaccc agatcgtcag cgccgaggcc tggggtagag cagactgtgg cttcacctcc  
1680

gagtcttacc agcaaggggt cctgtctgcc accatcctct atgagatctt gctaggggaag  
1740

gccaccttgt atgccgtgct ggtcagtgcc ctctgtgctga tggccatggt caagagaaag  
1800

gattccagag gctag  
1815

<210> 42

<211> 1815

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодирован SEQ ID NO: 34

<400> 42

atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga  
60

ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg  
120

ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgcagt ggtttcatca aaacccttgg  
180

ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc  
240

gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca  
300

gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga  
360

acaaggtaa tgggtcaaacc ccatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga  
420

gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaaaaaat  
480

gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aatgcgtgct agacatgagg  
540

tctatggact tcaagagcaa cagtgtgtg gcctggagca acaaactctga ctttgcattg  
600

gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca gaagacacct tcttccccag ccagaaagt  
660

tcctgtgatg tcaagctggt cgagaaaagc tttgaaacag atacgaacct aaactttcaa  
720

aacctgtcag tgattggggt ccgaatcctc ctcctaaaag tggccggggt taatctgctc  
780

atgacgctgc ggctgtggtc cagcagagcc aagagaggca gcggcgccac caacttcagc  
840

ctgctgaagc aggccggcga cgtggaagag aaccctggac caatgggaat caggctcctc  
900

tgctgtgtgg ccttttgttt cctggctgta ggcctcgtag atgtgaaagt aaccagagc  
960

tcgagatata tagtcaaaag gacgggagag aaagtttttc tggaatgtgt ccaggatatg  
1020

gaccatgaaa atatgttctg gtatcgacaa gaccaggtc tggggctacg gctgatctat  
1080

ttctcatatg atgttaaaat gaaagaaaaa ggagatattc ctgaggggta cagtgtctct  
1140

agagagaaga aggagcgctt ctccctgatt ctggagtccg ccagcaccaa ccagacatct  
1200

atgtacctct gtgccagcag ttctggagtc accggggagc tgttttttgg agaaggctct  
1260

aggctgaccg tactggagga cctgaaaaac gtgttcccac ccgaggtcgc tgtgtttgag  
1320

ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa aaggccacac tgggtgtgcct ggccacaggc  
1380

ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg  
1440

gtctgtacag acccgcagcc cctcaaggag cagcccgcct tcaatgactc cagatactgc  
1500

ctgagcagcc gcctgagggt ctcggccacc ttctggcaga acccccgcaa ccaactccgc  
1560

tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa  
1620

cctgtcaccc agatcgtcag cgccgaggcc tggggtagag cagactgtgg cttcacctcc  
1680

gagtcttacc agcaaggggt cctgtctgcc accatcctct atgagatctt gctagggag  
1740

gccaccttgt atgccgtgct ggtcagtgcc ctcgtgctga tggccatggt caagagaaag  
1800

gattccagag gctag  
1815

<210> 43  
<211> 1875  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кодирует SEQ ID NO: 35

<400> 43  
atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga  
60

gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg  
120

ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg  
180

ctgCGgtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgCagt ggTttcatca aaacccttgg  
240

ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc  
300

gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca  
360

gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga  
420

acaaggttaa tggTcaaacc ccatatccag aaccctgacc ctgCGgtgta ccagctgaga  
480

gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaaacaaat  
540

gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aaactgtgct agacatgagg  
600

tctatggact tcaagagcaa cagtgtgtg gcctggagca acaaatctga ctttgcatgt  
660

gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca gaagacacct tcttccccag cccagaaagt  
720

tcctgtgatg tcaagctggT cgagaaaagc tttgaaacag atacgaacct aaactttcaa  
780

aacctgtcag tgattgggTt ccgaatcctc ctCctaaaag tggccgggTt taatctgctc  
840

atgacgctgc ggctgtggTc cagcagagcc aagagaggca gcggcgccac caacttcagc  
900

ctgctgaagc aggccggcga cgtggaagag aaccctggac caatgggaat caggctcctc  
960

tgtcgtgtgg ccttttgttt cctggctgta ggcctcgtag atgtgaaagt aaccagagc  
1020

tccagatata tagtcaaaaag gacgggagag aaagtttttc tggaatgtgt ccaggatatg  
1080

gaccatgaaa atatgttctg gtatcgacaa gaccaggtc tggggctacg gctgatctat  
1140

ttctcatatg atgttaaaaat gaaagaaaaa ggagatattc ctgaggggta cagtgtctct  
1200

agagagaaga aggagcgctt ctccttgatt ctggagtccg ccagcaccaa ccagacatct  
1260

atgtacctct gtgccagcag ttctggagtc accggggagc tgttttttgg agaaggctct  
1320

aggctgaccg tactggagga cctgaaaaac gtgttcccac ccgaggtcgc tgtgtttgag  
1380

ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa aaggccacac tgggtgtgcct ggccacaggc  
1440

ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg  
1500

gtcagcacag acccgcagcc cctcaaggag cagcccgcc tcaatgactc cagatactgc  
1560

ctgagcagcc gcctgagggg ctcggccacc ttctggcaga acccccgcaa ccacttcgcg  
1620

tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa  
1680

cctgtcacc agatcgtcag cgccgaggcc tggggtagag cagactgtgg cttcacctcc  
1740

gagtcttacc agcaaggggt cctgtctgcc accatcctct atgagatctt gctaggggaag  
1800

gccaccttgt atgccgtgct ggtcagtgcc ctcgtgctga tggccatggt caagagaaaag  
1860

gattccagag gctag  
1875

<210> 44

<211> 1875

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>



<223> Кодирует SEQ ID NO: 36

<400> 44

atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga  
60

gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg  
120

ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg  
180

ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgcagt ggtttcatca aaacccttgg  
240

ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc  
300

gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca  
360

gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga  
420

acaaggttaa tggtaaacc ccatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga  
480

gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaaacaat  
540

gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aatgcgtgct agacatgagg  
600

tctatggact tcaagagcaa cagtgtgtg gcctggagca acaaactga ctttgcattg  
660

gcaaacgect tcaacaacag cattattcca gaagacacct tcttccccag cccagaaagt  
720

tcctgtgatg tcaagctggc cgagaaaagc tttgaaacag atacgaacct aaactttcaa  
780

aacctgtcag tgattgggtt ccgaatcctc ctctaaaag tggccgggtt taatctgctc  
840

atgacgctgc ggctgtggtc cagcagagcc aagagaggca gcggcgccac caacttcagc  
900

ctgctgaagc aggccggcga cgtggaagag aaccctggac caatgggaat caggctcctc  
960

tgtcgtgtgg ccttttgttt cctggctgta ggctcgtag atgtgaaagt aaccagagc  
1020

tcgagatatc tagtcaaaag gacgggagag aaagtttttc tggaatgtgt ccaggatatg  
1080

gaccatgaaa atatgttctg gtatcgacaa gaccaggtc tggggctacg gctgatctat  
1140

ttctcatatg atgttaaaat gaaagaaaaa ggagatattc ctgaggggta cagtgtctct  
1200

agagagaaga aggagcgctt ctcctgatt ctggagtccg ccagcaccaa ccagacatct  
1260

atgtacctct gtgccagcag ttctggagtc accggggagc tgttttttgg agaaggctct  
1320

aggctgaccg tactggagga cctgaaaaac gtgttcccac ccgaggtcgc tgtgtttgag  
1380

ccatcagaag cagagatctc ccacaccaa aaggccacac tgggtgtgcct ggccacaggc  
1440

ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg  
1500

gtctgtacag acccgagcc cctcaaggag cagcccgcc tcaatgactc cagatactgc  
1560

ctgagcagcc gcctgagggg ctcgccacc ttctggcaga acccccgcaa ccacttccgc  
1620

tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa  
1680

cctgtcacc agatcgtcag cgccgaggcc tggggtagag cagactgtgg cttcacctcc  
1740

gagtcttacc agcaaggggt cctgtctgcc accatcctct atgagatctt gctaggggag  
1800

gccaccttgt atgccgtgct ggtcagtgcc ctctgtctga tggccatggt caagagaaa  
1860

gattccagag gctag  
1875

<210> 45

<211> 1638

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодирован SEQ ID NO: 37

<400> 45

atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga  
60

ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg  
120

ctgCGgtgca attttttctga ctctgtgaac aatttgcagt ggtttcatca aaacccttgg  
180

ggacagctca tcaacctggt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc  
240

gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca  
300

gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga  
360

acaagggtta tgggtcaaacc catccagaac ccagaacctg ctgtgtacca gttaaaagat  
420

cctcggcttc aggacagcac cctctgcctg ttcaccgact ttgactccca aatcaatgtg  
480

ccgaaaacca tggaatctgg aacgttcatc actgacaaaa ctgtgctgga catgaaagct  
540

atggattcca agagcaatgg ggccattgcc tggagcaacc agacaagctt cacctgccaa  
600

gatatcttca aagagaccaa cgccacctac cccagttcag acgttcctctg tgatgccacg  
660

ttgactgaga aaagctttga aacagatatg aacctaaact ttcaaaacct gtcagttatg  
720

ggactccgaa tcctcctgct gaaagtagcc ggatttaacc tgctcatgac gctgaggctg  
780

tgggtccagta gagccaagag aggcagcggc gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc  
840

ggcgacgtgg aagagaacct tggaccaatg ggaatcaggc tcctctgtcg tgtggccttt  
900

tgtttcctgg ctgtaggcct cgtagatgtg aaagtaacct agagctcgag atatctagtc  
960

aaaaggacgg gagagaaagt ttttctggaa tgtgtccagg atatggacca tgaaaatatg  
1020

ttctggatc gacaagacct aggtctgggg ctacggctga tctatttctc atatgatggt  
1080

aaaatgaaag aaaaaggaga tattcctgag gggtagactg tctctagaga gaagaaggag  
1140

cgcttctccc tgattctgga gtccgccagc accaaccaga catctatgta cctctgtgcc  
1200

agcagttctg gagtcaccgg ggagctgttt tttggagaag gctctaggct gaccgtactg  
1260

gaggatctga gaaatgtgac tccacccaag gtctccttgt ttgagccatc aaaagcagag  
1320

attgcaaaca aacaaaaggc taccctcgtg tgcttggcca ggggcttctt cctgaccac  
1380

gtggagctga gctgggtggg gaatggcaag gaggtccaca gtgggggtcag cacggaccct  
1440

caggcctaca aggagagcaa ttatagctac tgcttgagca gccgcctgag ggtctctgct  
1500

accttctggc acaatcctcg aaaccacttc cgctgccaag tgcagttcca tgggctttca  
1560

gaggaggaca agtggccaga gggctcacc aaacctgtca cacagaacat cagtgcagag  
1620

gcctggggcc gagcatag  
1638

<210> 46

<211> 1638

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодирован SEQ ID NO: 38

<400> 46

atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga  
60

ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg  
120

ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgcagt ggtttcatca aaacccttgg  
180

ggacagctca tcaacctggt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc  
240

gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca  
300

gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga  
360

acaaggttaa tgggtcaaacc catccagaac ccagaacctg ctgtgtacca gttaaaagat  
420

cctcggcttc aggacagcac cctctgctg ttcaccgact ttgactccca aatcaatgtg  
480

ccgaaaacca tggaatctgg aacgttcatc actgacaaat gcgtgctgga catgaaagct  
540

atggattcca agagcaatgg ggccattgcc tggagcaacc agacaagctt cacctgccaa  
600

gatatcttca aagagaccaa cgccacctac cccagttcag acgttcctcg tgatgccacg  
660

ttgactgaga aaagctttga aacagatatg aacctaaact ttcaaacct gtcagttatg  
720

ggactccgaa tcctcctgct gaaagtagcc ggatttaacc tgctcatgac gctgaggctg  
780

tgggccagta gagccaagag aggcagcggc gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc  
840

ggcgacgtgg aagagaacct tggaccaatg ggaatcaggc tcctctgtcg tgtggccttt  
900

tgtttcctgg ctgtaggcct cgtagatgtg aaagtaacct agagctcgag atatctagtc  
960

aaaaggacgg gagagaaagt ttttctggaa tgtgtccagg atatggacca tgaaaatatg  
1020

ttctggtatc gacaagacct aggtctgggg ctacggctga tctatttctc atatgatgtt  
1080

aaaatgaaag aaaaaggaga tattcctgag ggggtacagtg tctctagaga gaagaaggag  
1140

cgcttctccc tgattctgga gtccgccagc accaaccaga catctatgta cctctgtgcc  
1200

agcagttctg gagtcaccgg ggagctgttt tttggagaag gctctaggct gaccgtactg  
1260

gaggatctga gaaatgtgac tccaccaag gtctccttgt ttgagccatc aaaagcagag  
1320

attgcaaaca aacaaaaggc taccctcgtg tgcttgacca ggggcttctt ccctgaccac  
1380

gtggagctga gctggtgggt gaatggcaag gaggtccaca gtggggtctg tacggaccct  
1440

caggcctaca aggagagcaa ttatagctac tgcctgagca gccgcctgag ggtctctgct  
1500

accttctggc acaatcctcg aaaccacttc cgctgccaaag tgcagttcca tgggctttca  
1560

gaggaggaca agtggccaga gggctcacc aaacctgtca cacagaacat cagtgcagag  
1620

gcctggggcc gagcatag  
1638

<210> 47  
<211> 1698  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Кодирует SEQ ID NO: 39

<400> 47  
atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga  
60

gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg  
120

ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg  
180

ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgagc ggtttcatca aaacccttgg  
240

ggacagctca tcaacctggt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc  
300

gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca  
360

gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga  
420

acaaggttaa tggtcaaacc catccagaac ccagaacctg ctgtgtacca gttaaagat  
480

cctcggcttc aggacagcac cctctgcctg ttcaccgact ttgactccca aatcaatgtg  
540

ccgaaaacca tggaatctgg aacgttcatc actgacaaaa ctgtgctgga catgaaagct  
600

atggattcca agagcaatgg ggccattgcc tggagcaacc agacaagctt cacctgccaa  
660

gatatcttca aagagaccaa cgccacctac cccagttcag acgttccctg tgatgccacg  
720

ttgactgaga aaagctttga aacagatatg aacctaaact ttcaaaacct gtcagttatg  
780

ggactccgaa tcctcctgct gaaagtagcc ggatttaacc tgctcatgac gctgaggctg  
840

tggtccagta gagccaagag aggcagcggc gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc  
900

ggcgacgtgg aagagaacct tggaccaatg ggaatcaggc tcctctgtcg tgtggccttt  
960

tgtttcctgg ctgtaggcct cgtagatgtg aaagtaaccc agagctcgag atatctagtc  
1020

aaaaggacgg gagagaaagt ttttctggaa tgtgtccagg atatggacca tgaaaatag  
1080

ttctggatc gacaagaccc aggtctgggg ctacggctga tctatttctc atatgatggt  
1140

aaaatgaaag aaaaaggaga tattcctgag gggtagctg tctctagaga gaagaaggag  
1200

cgcttctccc tgattctgga gtccgccagc accaaccaga catctatgta cctctgtgcc  
1260

agcagttctg gagtcaccgg ggagctgttt tttggagaag gctctaggct gaccgtactg  
1320

gaggatctga gaaatgtgac tccaccaag gtctccttgt ttgagccatc aaaagcagag  
1380

attgcaaaca aacaaaaggc taccctcgtg tgcttgcca ggggcttctt cctgaccac  
1440

gtggagctga gctgggtgggt gaatggcaag gaggtccaca gtggggtcag cacggaccct  
1500

caggcctaca aggagagcaa ttatagctac tgccctgagca gccgcctgag ggtctctgct  
1560

accttctggc acaatcctcg aaaccacttc cgctgccaag tgcagttcca tgggctttca  
1620

gaggaggaca agtggccaga gggctcacc aaacctgtca cacagaacat cagtgcagag  
1680

gcctggggcc gagcatag  
1698

<210> 48

<211> 1698

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодирует SEQ ID NO: 40

<400> 48

atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga  
60

gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg  
120

ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccag  
180

ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgcagt ggtttcatca aaacccttgg  
240

ggacagctca tcaacctggt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc  
300

gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca  
360

gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga  
420

acaaggtaa tgggtcaaacc catccagaac ccagaacctg ctgtgtacca gttaaaagat  
480

cctcggcttc aggacagcac cctctgcctg ttcaccgact ttgactccca aatcaatgtg  
540

ccgaaaacca tggaatctgg aacgttcatc actgacaaat gcgtgctgga catgaaagct  
600

atggattcca agagcaatgg ggccattgcc tggagcaacc agacaagctt cacctgccaa  
660

gatatcttca aagagaccaa cgccacctac cccagttcag acgttcctctg tgatgccacg  
720

ttgactgaga aaagctttga aacagatatg aacctaaact ttcaaaacct gtcagttatg  
780

ggactccgaa tcctcctgct gaaagtagcc ggatttaacc tgctcatgac gctgaggctg  
840

tgggtccagta gagccaagag aggcagcggc gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc  
900

ggcgacgtgg aagagaacct tggaccaatg ggaatcaggc tcctctgtcg tgtggccttt  
960

tgtttcctgg ctgtaggcct cgtagatgtg aaagtaacct agagctcgag atatctagtc  
1020

aaaaggacgg gagagaaagt ttttctggaa tgtgtccagg atatggacca tgaaaatatg  
1080

ttctggatc gacaagacct aggtctgggg ctacggctga tctatttctc atatgatggt  
1140

aaaatgaaag aaaaaggaga tattcctgag gggtagactg tctctagaga gaagaaggag  
1200

cgcttctccc tgattctgga gtccgccagc accaaccaga catctatgta cctctgtgcc  
1260

agcagttctg gagtcaccgg ggagctgttt tttggagaag gctctaggct gaccgtactg  
1320



gaggatctga gaaatgtgac tccacccaag gtctccttgt ttgagccatc aaaagcagag  
1380

attgcaaaca aacaaaaggc taccctcgtg tgcttgGCCa ggggcttctt cctgaccac  
1440

gtggagctga gctgggtgggt gaatggcaag gaggtccaca gtgggggtctg tacggaccct  
1500

caggcctaca aggagagcaa ttatagctac tgcttgagca gccgcctgag ggtctctgct  
1560

accttctggc acaatcctcg aaaccacttc cgctgccaag tgcagttcca tgggctttca  
1620

gaggaggaca agtggccaga gggctcacc aaacctgtca cacagaacat cagtgcagag  
1680

gcctggggcc gagcatag  
1698

<210> 49  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 49

Ser Leu Val Arg Leu Ser Ser Cys Val Pro Val Ala Leu Met Ser Ala  
1 5 10 15

Met Thr Thr Ser Ser Ser Gln  
20

<210> 50  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg  
20

<210> 51  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 51

Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val  
1 5 10 15

<210> 52  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Пикорнавирус

<220>  
<221> X  
<222> (2)..(2)  
<223> Val или Ile

<220>  
<221> X  
<222> (4)..(4)  
<223> Любая аминокислота

<400> 52

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro  
1 5

<210> 53  
<211> 6  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 53  
aataaa

<210> 54  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 54

Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu  
1 5

<210> 55  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 55

Lys Ser Leu Val Arg Leu Ser Ser Cys Val Pro Val Ala Leu Met Ser  
1 5 10 15

Ala Met Thr

<210> 56  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 56

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val  
1                   5                   10

<210> 57  
<211> 35  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Прямой праймер для сайт-направленного мутагенеза

<400> 57

gaggaccaga cccagaaggc ggagctcgtg gagac  
35

<210> 58  
<211> 35  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Обратный праймер для сайт-направленного мутагенеза

<400> 58

gtctccacga gctccgcctt ctgggtctgg tcctc  
35

<210> 59  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Escherichia coli

<400> 59

Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His  
1                   5                   10                   15

<210> 60  
<211> 95  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 60

His 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  
85 90 95

<210> 61

<211> 95

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Модифицированная цистеином усеченная константная область альфа-цепи Radium-1

<400> 61

His 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 Cys  
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  
85 90 95

<210> 62  
<211> 131  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 62

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  
130

<210> 63  
<211> 131  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Модифицированная цистеином усеченная константная область бета-цепи Radium-1

<400> 63

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 Cys 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  
130

<210> 64  
<211> 222  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 64

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile  
50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser

65				70						75					80
Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	Tyr	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ser
				85					90					95	
Ser	Gln	Thr	Thr	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Val	Asn	Ala	Gly
			100					105					110		
Asn	Met	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Met	Val	Lys	Pro	His
		115					120					125			
Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys	Ser
	130					135					140				
Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn
145					150					155					160
Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Thr	Val
				165					170					175	
Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp
			180					185					190		
Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile
		195					200					205			
Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys		
	210					215					220				

<210> 65  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Модифицированная цистеином усеченная альфа-цепь Radium-1  
  
 <400> 65

Met	Lys	Arg	Ile	Leu	Gly	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Gln	Val
1				5					10					15	
Cys	Cys	Val	Arg	Gly	Ile	Gln	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Pro	Asp	Leu	Ile
			20					25					30		
Leu	Gln	Glu	Gly	Ala	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Cys	Asn	Phe	Ser	Asp	Ser

35	40	45																					
Val	Asn	Asn	Leu	Gln	Trp	Phe	His	Gln	Asn	Pro	Trp	Gly	Gln	Leu	Ile								
50						55						60											
Asn	Leu	Phe	Tyr	Ile	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	Gln	Asn	Gly	Arg	Leu	Ser								
65						70						75											
Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	Tyr	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ser								
				85						90						95							
Ser	Gln	Thr	Thr	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Val	Asn	Ala	Gly								
			100						105						110								
Asn	Met	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Met	Val	Lys	Pro	His								
		115						120						125									
Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys	Ser								
130						135						140											
Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn								
145						150						155						160					
Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Cys	Val								
				165						170						175							
Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp								
			180						185						190								
Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile								
		195						200						205									
Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys										
210						215						220											
<210>	66																						
<211>	262																						
<212>	PRT																						
<213>	Homo sapiens																						
<400>	66																						
Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala	Phe	Cys	Phe	Leu	Ala	Val								
1				5						10						15							



Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
20 25 30

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
35 40 45

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

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser  
100 105 110

Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu  
115 120 125

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

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
165 170 175

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

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys  
260

<210> 67

<211> 262

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Модифицированная цистеином усеченная бета-цепь Radium-1

<400> 67

Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val  
1 5 10 15

Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
20 25 30

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
35 40 45

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

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser  
100 105 110

Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu  
115 120 125

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

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln  
180 185 190

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys  
260

<210> 68

<211> 510

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Модифицированный цистеином растворимый оцТКР Radium-1 с линкером 2A

<400> 68

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile  
50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser  
65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser

85

90

95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly  
 100 105 110

Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His  
 115 120 125

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

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

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

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 180 185 190

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 195 200 205

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Arg Ala  
 210 215 220

Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly  
 225 230 235 240

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg  
 245 250 255

Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr  
 260 265 270

Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu  
 275 280 285

Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln  
 290 295 300

Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys  
 305 310 315 320

Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu  
325 330 335

Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln  
340 345 350

Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu  
355 360 365

Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn  
370 375 380

Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile  
385 390 395 400

Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr  
405 410 415

Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His  
420 425 430

Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu  
435 440 445

Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr  
450 455 460

Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr  
465 470 475 480

Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val  
485 490 495

Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys  
500 505 510

<210> 69

<211> 519

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Модифицированный цистеином растворимый оцТКР Radium-1 с С-концевой His-меткой или линкером

<400> 69

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val  
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile  
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser  
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile  
50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser  
65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser  
85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly  
100 105 110

Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His  
115 120 125

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

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

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

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
180 185 190

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
195 200 205

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Arg Ala  
210 215 220

Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly  
225 230 235 240

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg  
245 250 255

Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr  
260 265 270

Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu  
275 280 285

Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln  
290 295 300

Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys  
305 310 315 320

Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu  
325 330 335

Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln  
340 345 350

Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu  
355 360 365

Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn  
370 375 380

Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile  
385 390 395 400

Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr  
405 410 415

Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His  
420 425 430

Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu  
435 440 445

Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr  
450 455 460

Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr  
465 470 475 480

Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val  
485 490 495

Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Gly  
500 505 510

Gly His His His His His His  
515

<210> 70

<211> 1530

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодирован SEQ ID NO: 69

<400> 70

atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga  
60

ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg  
120

ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgagc ggtttcatca aaacccttgg  
180

ggacagctca tcaacctggt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc  
240

gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca  
300

gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga  
360

acaagggttaa tgggtcaaacc ccatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga  
420

gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaaacaat  
480

gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aatgcgtgct agacatgagg  
540

tctatggact tcaagagcaa cagtgtgtg gcctggagca acaaactga ctttgcattg  
600



gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca gaagacacct tcttccccag cccagaaagt  
660

tcctgtagag ccaagagagg cagcggcgcc accaacttca gcctgctgaa gcaggccggc  
720

gacgtggaag agaaccctgg accaatggga atcaggctcc tctgtcgtgt ggccttttgt  
780

ttcctggctg taggcctcgt agatgtgaaa gtaaccaga gctcgagata tctagtcaaa  
840

aggacgggag agaaagtttt tctggaatgt gtccaggata tggaccatga aaatatgttc  
900

tggtatcgac aagaccaggg tctggggcta cggctgatct atttctcata tgatgttaa  
960

atgaaagaaa aaggagatat tcctgagggg tacagtgtct ctagagagaa gaaggagcgc  
1020

ttctccctga ttctggagtc cgccagcacc aaccagacat ctatgtacct ctgtgccagc  
1080

agttctggag tcaccgggga gctgtttttt ggagaaggct ctaggctgac cgtactggag  
1140

gacctgaaaa acgtgttccc acccgaggtc gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc  
1200

tcccacacc aaaaggccac actggtgtgc ctggccacag gcttctaccc cgaccacgtg  
1260

gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag gtgcacagtg gggctctgtac agaccgcag  
1320

cccctcaagg agcagccccg cctcaatgac tccagatact gcctgagcag ccgctgagg  
1380

gtctcggcca cttctggca gaacccccgc aaccacttcc gctgtcaagt ccagttctac  
1440

gggctctcgg agaatgacga gtggaccag gatagggcca aacctgtcac ccagatcgtc  
1500

agcgccgagg cctggggtag agcagactgt  
1530

<210> 71

<211> 1557

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Кодирован SEQ ID NO: 69

<400> 71

atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga  
60

ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg  
120

ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgagc ggtttcatca aaacccttgg  
180

ggacagctca tcaacctggt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc  
240

gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca  
300

gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga  
360

acaaggtaa tggtaaacc ccatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga  
420

gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaacaat  
480

gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aatgcgtgct agacatgagg  
540

tctatggact tcaagagcaa cagtgtgtg gcctggagca acaaatctga ctttgcattg  
600

gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca gaagacacct tcttccccag ccagaaagt  
660

tcctgtagag ccaagagagg cagcggcgcc accaacttca gcctgctgaa gcaggccggc  
720

gacgtggaag agaaccctgg accaatggga atcaggctcc tctgtcgtgt ggcttttgt  
780

ttcctggctg taggcctcgt agatgtgaaa gtaaccaga gctcgagata tctagtcaaa  
840

aggacgggag agaaagtttt tctggaatgt gtccaggata tggaccatga aaatatgttc  
900

tggtatcgac aagaccagc tctggggcta cggctgatct atttctcata tgatgttaa  
960

atgaaagaaa aaggagatat tcctgagggg tacagtgtct ctagagagaa gaaggagcgc  
1020

ttctccctga ttctggagtc cgccagcacc aaccagacat ctatgtacct ctgtgccagc  
1080

agttctggag tcaccgggga gctgtttttt ggagaaggct ctaggctgac cgtactggag  
1140

gacctgaaaa acgtgttccc acccgaggtc gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc  
1200

tcccacaccc aaaaggccac actggtgtgc ctggccacag gcttctaccc cgaccacgtg  
1260

gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag gtgcacagtg gggctctgtac agaccgcag  
1320

cccctcaagg agcagcccgc cctcaatgac tccagatact gcttgagcag ccgctgagg  
1380

gtctcggcca ctttctggca gaacccccgc aaccacttcc gctgtcaagt ccagttctac  
1440

gggctctcgg agaatgacga gtggaccag gatagggcca aacctgtcac ccagatcgtc  
1500

agcgcggagg cctggggtag agcagactgt ggtggcggtc atcaccatca ccatcac  
1557

<210> 72  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 72

Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly  
1 5 10 15

Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu  
20 25 30

Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr  
35 40 45

Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val  
50 55 60

Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr  
65 70 75 80

Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro  
100 105

<210> 73

<211> 202  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 73

Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly  
1 5 10 15

Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu  
20 25 30

Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr  
35 40 45

Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val  
50 55 60

Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr  
65 70 75 80

Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro  
100 105 110

Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser  
115 120 125

Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser  
130 135 140

Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg  
145 150 155 160

Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser  
165 170 175

Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp  
180 185 190

Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys  
195 200

<210> 74  
<211> 202  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зрелая усеченная модифицированная цистеином альфа-цепь Radium-1

<400> 74

Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly  
1 5 10 15

Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu  
20 25 30

Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr  
35 40 45

Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val  
50 55 60

Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr  
65 70 75 80

Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro  
100 105 110

Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser  
115 120 125

Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser  
130 135 140

Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg  
145 150 155 160

Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser  
165 170 175

Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp  
180 185 190

Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys  
195 200

<210> 75  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 75

Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
1 5 10 15

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
20 25 30

Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu  
35 40 45

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
50 55 60

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
65 70 75 80

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser  
85 90 95

Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu  
100 105 110

Thr Val Leu  
115

<210> 76  
<211> 246  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 76

Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
1 5 10 15

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
20 25 30

Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu  
35 40 45

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
50 55 60

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
65 70 75 80

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser  
85 90 95

Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu  
100 105 110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
115 120 125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
130 135 140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
145 150 155 160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln  
165 170 175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
180 185 190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
195 200 205

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
210 215 220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
225 230 235 240

Trp Gly Arg Ala Asp Cys  
245

<210> 77  
<211> 246

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Зрелая усеченная модифицированная цистеином бета-цепь Radium-1

<400> 77

Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
1 5 10 15

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
20 25 30

Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu  
35 40 45

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
50 55 60

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
65 70 75 80

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser  
85 90 95

Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu  
100 105 110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
115 120 125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
130 135 140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
145 150 155 160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln  
165 170 175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
180 185 190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
195 200 205



Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
210 215 220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
225 230 235 240

Trp Gly Arg Ala Asp Cys  
245

<210> 78

<211> 211

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Зрелая усеченная модифицированная цистеином альфа-цепь Radium-1 с линкером и His-меткой

<400> 78

Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly  
1 5 10 15

Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu  
20 25 30

Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr  
35 40 45

Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val  
50 55 60

Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr  
65 70 75 80

Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro  
100 105 110

Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser  
115 120 125

Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser

130

135

140

Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg  
145 150 155 160

Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser  
165 170 175

Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp  
180 185 190

Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Gly Gly Gly His His His  
195 200 205

His His His  
210

<210> 79

<211> 255

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Зрелая усеченная модифицированная цистеином бета-цепь Radium-1 с линкером и His-меткой

<400> 79

Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys  
1 5 10 15

Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His  
20 25 30

Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu  
35 40 45

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro  
50 55 60

Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile  
65 70 75 80

Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser  
85 90 95

Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu  
100 105 110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
115 120 125

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
130 135 140

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
145 150 155 160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln  
165 170 175

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
180 185 190

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
195 200 205

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
210 215 220

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
225 230 235 240

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Gly Gly His His His His His His  
245 250 255

<210> 80  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Аналог пептида 26-35 MART-1

<400> 80

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val  
1 5 10

<210> 81  
<211> 227  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Зрелая усеченная альфа-цепь Radium-1 с остатками, происходящими из пептида 2A, на С-конце

<400> 81

Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly  
1 5 10 15

Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu  
20 25 30

Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr  
35 40 45

Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val  
50 55 60

Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr  
65 70 75 80

Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro  
100 105 110

Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser  
115 120 125

Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser  
130 135 140

Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg  
145 150 155 160

Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser  
165 170 175

Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp  
180 185 190

Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Arg Ala Lys Arg Gly Ser  
195 200 205

Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu  
210 215 220

Asn Pro Gly  
225

<210> 82

<211> 227

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Зрелая усеченная модифицированная цистеином альфа-цепь Radium-1 с остатками, происходящими из пептида 2A, на С-конце

<400> 82

Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly  
1 5 10 15

Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu  
20 25 30

Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr  
35 40 45

Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val  
50 55 60

Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr  
65 70 75 80

Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro  
100 105 110

Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser  
115 120 125

Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser  
130 135 140

Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg  
145 150 155 160

Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser  
165 170 175

Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp  
180 185 190

Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Arg Ala Lys Arg Gly Ser  
195 200 205

Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu  
210 215 220

Asn Pro Gly  
225

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу Т-клеточного рецептора (ТКР), направленного против мутированного белка TGF $\beta$ RII, который содержит последовательность SEQ ID NO: 1, причем указанная молекула ТКР способна связывать пептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, при этом указанный пептид представлен главным комплексом гистосовместимости класса I (ГКГС), и при этом указанная молекула ТКР содержит домен  $\alpha$ -цепи и/или домен  $\beta$ -цепи, где каждый домен цепи содержит три последовательности CDR, причем:
- 10 а) CDR 1, 2 и 3 из домена  $\alpha$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно; и
- б) CDR 1, 2 и 3 из домена  $\beta$ -цепи содержат последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, и
- при этом одна или более из указанных последовательностей CDR, предпочтительно одна или более из указанных последовательностей CDR1 или CDR2, необязательно могут быть модифицированы путем замены, добавления или делеции 1 или 2 аминокислот.
- 15 2. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, которая характеризуется тем, что указанный ГКГС класса I содержит HLA-A2.
3. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2, которая характеризуется тем, что указанная молекула ТКР кодируется в виде одноцепочечного ТКР (оцТКР), содержащего домен  $\alpha$ -цепи, соединенный с доменом  $\beta$ -цепи.
- 20 4. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, которая характеризуется тем, что указанные аминокислотные последовательности всех CDR не модифицированы.
5. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\alpha$ -цепи содержит вариабельную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.
- 25 6. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\alpha$ -цепи содержит вариабельную область, которая дополнительно содержит двойную метку Мус с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 19.
- 30 7. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 6, которая характеризуется тем, что указанная вариабельная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 20, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

8. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\beta$ -цепи содержит вариабельную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 5-8, которая характеризуется тем, что указанный ТКР, экспрессируемый иммунной эффекторной клеткой, расположен на поверхности указанной клетки.

10. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 9, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\alpha$ -цепи содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична указанной последовательности.

11. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 10, которая характеризуется тем, что указанная константная область мураинизирована.

12. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 11, которая характеризуется тем, что указанная мураинизированная константная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 10-12, которая характеризуется тем, что указанная константная область модифицирована путем вставки остатка цистеина или замены остатком цистеина.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 13, которая характеризуется тем, что указанная модифицированная константная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична указанной последовательности.

15. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 14, которая характеризуется тем, что указанная модифицированная мураинизированная константная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-10 или 13-14, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\alpha$ -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22,



или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

17. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-15, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\alpha$ -цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 25-28, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности.

18. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-17, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\beta$ -цепи содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична указанной последовательности.

19. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 18, которая характеризуется тем, что указанная константная область мураинизирована.

20. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 19, которая характеризуется тем, что указанная мураинизированная константная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности.

21. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 18-20, которая характеризуется тем, что указанная константная область модифицирована путем вставки остатка цистеина или замены остатком цистеина.

22. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 21, которая характеризуется тем, что указанная модифицированная константная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична указанной последовательности.

23. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 22, которая характеризуется тем, что указанная модифицированная мураинизированная константная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности.

24. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-18 или 21-22, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\beta$ -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

25. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-24, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\beta$ -цепи содержит аминокислотную последовательность либо SEQ ID NO: 31, либо SEQ ID NO: 32, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности.
- 5 26. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8, которая характеризуется тем, что указанный ТКР является растворимым.
27. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 26, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\alpha$ -цепи содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, или аминокислотную последовательность, которая по
- 10 меньшей мере на 60% идентична указанной последовательности.
28. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 27, которая характеризуется тем, что указанная константная область модифицирована путем вставки остатка цистеина или замены остатком цистеина.
29. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 28, которая характеризуется тем, что
- 15 указанная константная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична указанной последовательности.
30. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 27-29, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\alpha$ -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID
- 20 NO: 64 или SEQ ID NO: 65, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.
31. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 26, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\beta$ -цепи содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, или аминокислотную последовательность, которая по
- 25 меньшей мере на 60% идентична указанной последовательности.
32. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 31, которая характеризуется тем, что указанная константная область модифицирована путем вставки остатка цистеина или замены остатком цистеина.
33. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 32, которая характеризуется тем, что
- 30 указанная константная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична указанной последовательности.
34. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 33, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\beta$ -цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66

или SEQ ID NO: 67, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

35. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 3, которая характеризуется тем, что указанные домены  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей указанного оцТКР соединены с помощью линкера.

5 36. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 35, которая характеризуется тем, что указанный линкер способен к аутосплайсингу.

37. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 35 или 36, которая характеризуется тем, что указанный линкер представляет собой пептид 2А и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, или аминокислотную последовательность, которая по  
10 меньшей мере на 40% идентична указанной последовательности.

38. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 35-37, которая характеризуется тем, что указанный оцТКР содержит, в следующем порядке: (i) домен  $\alpha$ -цепи; (ii) линкер; и (iii) домен  $\beta$ -цепи.

39. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 38, которая характеризуется тем, что  
15 указанный оцТКР содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 33-36, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

40. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 38, которая характеризуется тем, что указанный оцТКР мураинизирован и содержит аминокислотную последовательность  
20 любой из SEQ ID NO: 37-40, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична указанной последовательности.

41. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 39, которая характеризуется тем, что указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность  
25 любой из SEQ ID NO: 41-44, или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

42. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 40, которая характеризуется тем, что указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность  
любой из SEQ ID NO: 45-48, или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

30 43. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 38, которая характеризуется тем, что указанный оцТКР содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 69, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

44. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 43, которая характеризуется тем, что  
35 указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность

SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71, или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

45. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-44, которая характеризуется тем, что указанная нуклеиновая кислота представляет собой РНК.

5 46. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-45.

47. Вектор по п. 46, который характеризуется тем, что указанный вектор представляет собой вектор экспрессии или вектор для клонирования.

48. Вектор по п. 46 или 47, который характеризуется тем, что указанный вектор представляет собой вектор экспрессии мРНК или вирусный вектор.

10 49. Вектор по любому из пп. 46-48, который характеризуется тем, что указанный вектор представляет собой ретровирусный или лентивирусный вектор.

50. Молекула ТКР по любому из пп. 1, 2 или 4, которая характеризуется тем, что указанный ТКР является растворимым.

15 51. Молекула ТКР по п. 50, которая характеризуется тем, что указанная молекула ТКР представляет собой молекулу, определенную в любом из пп. 5-8, 26-34 или 43.

52. Молекула ТКР по п. 50, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\alpha$ -цепи содержит вариабельную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 72, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

20 53. Молекула ТКР по п. 50 или 52, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\alpha$ -цепи содержит константную область, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 60.

25 54. Молекула ТКР по п. 53, которая характеризуется тем, что указанная константная область модифицирована путем вставки остатка цистеина или замены остатком цистеина, причем предпочтительно указанная константная область содержит последовательность SEQ ID NO: 61.

30 55. Молекула ТКР по любому из пп. 52-54, которая характеризуется тем, что указанная  $\alpha$ -цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 73 или 74, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

56. Молекула ТКР по п. 55, которая характеризуется тем, что указанная  $\alpha$ -цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 78, 81 или 82, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.

57. Молекула ТКР по любому из пп. 50 или 52-56, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\beta$ -цепи содержит переменную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 75, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична указанной последовательности.
- 5 58. Молекула ТКР по любому из пп. 52 или 52-57, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\beta$ -цепи содержит константную область, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 62.
59. Молекула ТКР по п. 58, которая характеризуется тем, что указанная константная область модифицирована путем вставки остатка цистеина или замены остатком цистеина, 10 причем предпочтительно указанная константная область содержит последовательность SEQ ID NO: 63.
60. Молекула ТКР по любому из пп. 57-59, которая характеризуется тем, что указанный домен  $\beta$ -цепи содержит последовательность SEQ ID NO: 76, 77 или 79, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична 15 указанной последовательности.
61. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-45, или вектор по любому из пп. 46-49.
62. Клетка-хозяин по п. 61, которая характеризуется тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой иммунную эффекторную клетку, причем указанная молекула 20 нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, определенную в любом из пп. 9-25, или указанный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, определенную в любом из пп. 9-25.
63. Иммунная эффекторная клетка по п. 62, которая характеризуется тем, что указанная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, предпочтительно Т-клетку.
- 25 64. Клетка-хозяин по п. 61, которая характеризуется тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой продуцирующую клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 26-34, 43 или 44.
65. Продуцирующая клетка-хозяин по п. 64, которая характеризуется тем, что указанная продуцирующая клетка-хозяин представляет собой клетку человека.
- 30 66. Композиция, содержащая молекулу ТКР по любому из пп. 55-60 или иммунную эффекторную клетку по п. 62 или 63 и по меньшей мере один физиологически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.
67. Молекула ТКР по любому из пп. 50-60, иммунная эффекторная клетка по п. 62 или 63 или композиция по п. 66 для применения в терапии.

68. Молекула ТКР по любому из пп. 50-60, иммунная эффекторная клетка по п. 62 или 63 или композиция по п. 66 для применения при лечении рака.
69. Иммунная эффекторная клетка или композиция для применения в соответствии с п. 67 или 68, причем указанная композиция содержит иммунную эффекторную клетку по п. 62 или 63, и указанная терапия представляет собой терапию на основе адоптивного переноса клеток, предпочтительно терапию на основе адоптивного переноса Т-клеток.
- 5 62 или 63, и указанная терапия представляет собой терапию на основе адоптивного переноса клеток, предпочтительно терапию на основе адоптивного переноса Т-клеток.
70. Молекула ТКР, иммунная эффекторная клетка или композиция для применения в соответствии с п. 68, которые характеризуются тем, что указанный рак представляет собой колоректальный рак, рак желудка, рак печени, ампулярную карциному, рак
- 10 эндометрия, рак поджелудочной железы или лейкоз.
71. Молекула ТКР, иммунная эффекторная клетка или композиция для применения по п. 70, которые характеризуются тем, что указанный колоректальный рак имеет место у субъекта с наследственным неполипозным колоректальным раком (HNPCC).
72. Способ лечения рака, в частности, колоректального рака, причем указанный способ
- 15 включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции по п. 66.
73. Способ получения иммунной эффекторной клетки, специфической в отношении мутантного варианта TGFβRII со сдвигом рамки считывания, причем указанный способ включает введение в иммунную эффекторную клетку молекулы нуклеиновой кислоты, определенной в любом из пп. 9-25, или вектора, определенного в любом из пп. 46-49,
- 20 причем указанный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, определенную в любом из пп. 9-25.
74. Способ по п. 73, который характеризуется тем, что указанный способ дополнительно включает стимуляцию клеток и индукцию их пролиферации до и/или после введения указанной молекулы нуклеиновой кислоты или вектора.
- 25 75. Способ по любому из пп. 73 или 74, который характеризуется тем, что указанная клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку, предпочтительно Т-клетку.
76. Применение молекулы ТКР по любому из пп. 50-60 или иммунной эффекторной клетки по пп. 62 или 63 для производства лекарственного средства для применения в терапии рака, в частности, для лечения колоректального рака.