

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.11

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

(21) Номер заявки
202090757

(22) Дата подачи заявки
2018.09.17

(54) **Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, РАСПОЗНАЮЩИЕ МУТАНТНЫЙ P53**

(31) **62/565,383**

(32) **2017.09.29**

(33) **US**

(43) **2020.08.21**

(86) **PCT/US2018/051285**

(87) **WO 2019/067243 2019.04.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ ЮНАЙТЕД СТЕЙТС ОФ
АМЕРИКА, ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ
ДЗЕ СЕКРЕТАРИ, ДЕПАРТМЕНТ
ОФ ХЕЛС ЭНД ХЬЮМАН
СЁРВИСЕЗ (US)**

(72) Изобретатель:
**Розенберг Стивен А., Ло Унифред М.,
Лу Йон-Чэнь, Паркхёрст Мария Р.,
Роббинс Пол Ф. (US)**

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(56) **WO-A1-2015164594
WO-A1-2015123642**

ULRICH H. WEIDLE ET AL.:
"TCR-MHC/peptide interaction: prospects for new anti-tumoral agents", *Cancer genomics & proteomics*, 1 November 2014 (2014-11-01), pages 267-278, XP55524064, Greece, retrieved from the Internet: URL: <http://cgp.iiarjournals.org/content/11/6/267.full.pdf+html> [retrieved on 2018-11-15], page 267, right-hand column, paragraph 2 - page 268, left-hand column, paragraph 1

YONG-CHEN LU ET AL.: "Cancer immunotherapy targeting neoantigens", *SEMINARS*

IN IMMUNOLOGY., vol. 28, № 1, 30 November 2015 (2015-11-30), pages 22-27, XP055364718, US, ISSN: 1044-5323, DOI: 10.1016/j.smim.2015.11.002, the whole document

S.A. ROSENBERG ET AL.: "Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer", *SCIENCE*, vol. 348, № 6230, 3 April 2015 (2015-04-03), pages 62-68, XP055256712, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aaa4967, pages 66-68; figure 4

WO-A1-2016053338

XI-ZHI J. GUO ET AL.: "Rapid cloning, expression, and functional characterization of paired alpha beta and gamma delta T-cell receptor chains from single-cell analysis", *MOLECULAR THERAPY - METHODS & CLINICAL DEVELOP.*, vol. 3, 1 January 2016 (2016-01-01), page 15054, XP055386592, GB, ISSN: 2329-0501, DOI: 10.1038/mtm.2015.54, the whole document

COHEN CYRILLE J. ET AL.: "Recognition of fresh human tumor by human peripheral blood lymphocytes transduced with a bicistronic retroviral vector encoding a murine anti-p53 TCR", *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS*, US, vol. 175, № 9, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 5799-5808, XP002466476, ISSN: 0022-1767, the whole document

HOLSTEGE HENNE ET AL.: "BRCA1-mutated and basal-like breast cancers have similar aCGH profiles and a high incidence of protein truncating TP53 mutations", *BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON*, GB, vol. 10, № 1, 30 November 2010 (2010-11-30), page 654, XP021087171, ISSN: 1471-2407, DOI: 10.1186/1471-2407-10-654, the whole document

(57) Раскрыт выделенный или очищенный Т-клеточный рецептор (TCR), обладающий антигенной специфичностью в отношении мутантного человеческого p53. Также предложены родственные полипептиды и белки, а также родственные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы, клетки-хозяева, популяции клеток и фармацевтические композиции. Также раскрыты способы выявления наличия рака у млекопитающего и способы лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Данная патентная заявка заявляет приоритет по первоначальной патентной заявке США № 62/565383, поданной 29 сентября 2017 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Утверждение относительно исследования или разработки, финансируемых из федерального бюджета

Данное изобретение было создано при поддержке правительства под номером проекта BC010985 национальными институтами здравоохранения, национальным институтом онкологии. Государство имеет определенные права в данном изобретении.

Включение посредством ссылки или материал, представленный в электронной форме

В данный документ посредством ссылки во всей своей полноте включен машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, поданный наряду с этим и идентифицированный следующим образом: один (текстовый) файл, размером 687555 байт ASCII, с названием "739980_ST25.txt", датированный 7 сентября 2018 г.

Предшествующий уровень техники

Некоторые виды рака могут иметь очень ограниченные варианты лечения, в частности, когда рак становится метастатическим и неоперабельным. Несмотря на прогресс в видах лечения, таких как, например, хирургическое вмешательство, химиотерапия и лучевая терапия, прогноз в случае многих видов рака, таких как, например, рак поджелудочной железы, колоректальных раков, рак легкого, рак эндометрия, рак яичника и рак предстательной железы, может быть неблагоприятным. Соответственно существует неудовлетворенная потребность в дополнительных видах лечения рака.

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно одному воплощению изобретения предложен выделенный или очищенный Т-клеточный рецептор (TCR - от англ. T cell receptor), обладающий антигенной специфичностью в отношении мутантного р53 человека.

Согласно другим воплощениям изобретения предложены родственные полипептиды и белки, а также родственные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы, клетки-хозяева, популяции клеток и фармацевтические композиции, относящиеся к TCR по изобретению.

Согласно еще одним воплощениям изобретения предложены способы выявления наличия рака у млекопитающего и способы лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

Краткое описание нескольких видов графических материалов

Фиг. 1 представляет собой график, показывающий концентрацию IFN- γ (от англ. interferon gamma - интерферон-гамма) (пг/мл), измеренную после совместного культивирования аутологичных PBL, трансдуцированных одним из указанных TCR от пациента 4127 после совместного культивирования с аутологичными дендритными клетками (DC - от англ. dendritic cell), в которые под действием импульсов вводили либо пептид WT р53-G245 (wt (от англ. wild type - дикий тип)) (незаштрихованные столбцы), либо мутантный пептид р53-G245S (mut) (заштрихованные столбцы) при указанных уменьшающихся концентрациях пептида (мкг/мл).

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1 ВВ позитивных клеток (% CD4+ mTCR β), выявленное после совместного культивирования аутологичных PBL (от англ. peripheral blood mononuclear - мононуклеарная клетка периферической крови), трансдуцируемых одним из указанных TCR от пациента 4127, с аутологичными DC, в которые под действием импульсов вводили или пептид WT р53-G245 (wt) (незаштрихованные столбцы) или мутантный пептид р53-G245S (mut) (заштрихованные столбцы) при указанных уменьшающихся концентрациях пептида (мкг/мл).

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1ВВ позитивных клеток (% CD4+ mTCR β), выявленное после совместного культивирования аутологичных PBL, трансдуцируемых одним из указанных TCR от пациента 4127, с аутологичными DC, в которые под действием импульсов вводили один из пептидов, показанных в табл. А.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий концентрацию IFN- γ (пг/мл), измеренную после совместного культивирования TIL (от англ. tumor-infiltrating lymphocyte - опухоль-инфильтрирующий лимфоцит) от пациента 4127 или Т-клеток, трансдуцированных одним из указанных TCR, с клетками COS7, трансдуцированными одной из указанных аллелей HLA (от англ. human leukocyte antigen - человеческий лейкоцитарный антиген), в которые под действием импульсов вводили ДМСО (диметилсульфоксид) или один из указанных пептидов.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1ВВ позитивных клеток (% CD4+ mTCR β), выявленное после совместного культивирования TIL от пациента 4127 или Т-клеток, которые трансдуцировали одним из указанных TCR, с клетками COS7, которые трансдуцировали одной из указанных аллелей HLA и в которые под действием импульсов вводили ДМСО или один из указанных пептидов.

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий число пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеренное после совместного культивирования TIL от пациента 4127 с аллогенными (DRB3*01:01:01 или DRB3*02:02:01) APC (от англ. antigen-presenting cell - антигенпрезентирующая клетка), которые (1) под-

вергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; левые заштрихованные незакрашенные столбцы), WT p53 (p53-WT; левые заштрихованные серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; серые столбцы) последовательности; или (2) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; правые заштрихованные незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ (Высокоэффективная жидкостная хроматография)) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-G245 (LP-p53-wt-G245; правые заштрихованные серые столбцы) или мутантной последовательности p53-G245S (LP-p53-mut-G245S; черные столбцы).

Фиг. 7 представляет собой график, показывающий число пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеренное после совместного культивирования клеток, экспрессирующих 4127-TCR1, с аллогенными (DRB3*01:01:01 или DRB3*02:02:01) APC, которые (1) подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; левые заштрихованные незакрашенные столбцы), p53 WT (p53-WT; левые заштрихованные серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; серые столбцы) последовательности; или (2) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; правые заштрихованные незакрашенные столбцы), или очищенные (выше 95%, посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-G245 (LP-p53-wt-G245; правые заштрихованные серые столбцы) или мутантной последовательности p53-G245S (LP-p53-mut-G245S; черные столбцы).

Фиг. 8А представляет собой график, показывающий секрецию IFN- γ (пятна/ 2×10^4 клеток), измеренную после совместного культивирования T1L из инфузионного пакета, используемого для лечения пациента 4196, с клетками Cos7, трансфицированными плазмидами для TMG1 и указанной аллелью HLA.

Фиг. 8В представляет собой график, показывающий секрецию IFN- γ (пятна/ 2×10^4 клеток), измеряемую после совместного культивирования T1L из инфузионного пакета, используемого для лечения пациента 4196, с аутологичными DC, в которые под действием импульсов вводили минимальный эпитоп-кандидат (HMTEVVRHC (SEQ ID NO: 530) или (SQHMTEVVRH (SEQ ID NO: 531)). Т-клетки, культивируемые отдельно, служили контролем.

Фиг. 9А-9Д представляют собой графики, демонстрирующие процентные содержания mTCR β +CD8+41BB+ клеток, выявляемые после совместного культивирования DC, в которые под действием импульсов вводили минимальный WT (круги) или мутантный (mut) (квадраты) эпитоп при указанных концентрациях (мкг/мл), с клетками, трансдуцированными одним из следующих TCR: AV12/BV6-1 (А), AV2/BV6-1 (В), AV6/BV11 (С) или AV38/BV10-3 (D). Совместное культивирование DC с введением под действием импульсов вышеуказанных эпитопов с нетрансдуцированными (UT) клетками (треугольники) служило контролем. Показанные результаты характеризуют два эксперимента.

Фиг. 10А, 10В представляют собой графики, показывающие секрецию IFN- γ (пг/мл) (А) и процентное содержание 4-1BB позитивных клеток (% , mTCR β +) (В), измеряемые после совместного культивирования клеток Т2, в которые под действием импульсов вводили минимальный мутантный эпитоп в указанных концентрациях, с клетками, трансдуцированными одним из следующих TCR: AV12/BV6-1 (закрашенные треугольники), AV6/BV11 (круги) или AV38/BV10-3 (квадраты). Совместная культивация клеток Т2, в которые под действием импульсов вводили минимальный мутантный эпитоп, с нетрансдуцированными (UT) клетками (незакрашенные треугольники) служила контролем.

Фиг. 11 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, выявляемое после совместного культивирования TCR-трансдуцированных клеток с указанными линиями клеток-мишеней. Эффекторные клетки трансдуцировали AV12/BV6-1 (черные столбцы), AV6/BV11 (полосатые столбцы) или AV38/BV10-3 (серые столбцы). HLA-A*02:01 - трансдуцированные клетки-мишени обозначены LS123-A2, CCRF-CEM-A2 и AU-565-A2. Клетки-мишени, в который под действием импульсов вводили пептид, обозначены (+). Клетки-мишени, которым не вводили под действием импульсов пептид, обозначены (-). Нетрансдуцированные эффекторные клетки (незаштрихованные столбцы), совместно культивируемые с линиями клеток-мишеней, использовали в качестве контроля.

Фиг. 12 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеряемое после совместного культивирования фрагментов T1L пациента 4238 F1-F24 (n равен 24) с аутологичными APC, которые подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; незакрашенные столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; черные столбцы) последовательности.

Фиг. 13 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеряемое после совместного культивирования фрагментов T1L пациента 4238 F1-F24 (n равен 24) с аутологичными APC, которым под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; незакрашенные столбцы) или очищенный (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептид из 25 аминокислот, состоящий из мутантной последовательности p53-R248Q (LP-p53-R248Q-MUT; черные столбцы).

Фиг. 14 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD8+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместной культивации фрагментов T1L пациента 4238 F1-F24 (n равен 24) с аутологичными APC, которые подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; неза-

крашенные столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; черные столбцы) последовательности.

Фиг. 15 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD8+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместной культивации фрагментов TIL пациента 4238 F1-F24 (n равен 24) с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO; незакрашенные столбцы) или очищенный (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептид из 25 аминокислот, состоящий из мутантной последовательности p53-R248Q (LP-p53-R248Q-MUT; черные столбцы).

Фиг. 16 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеряемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24; n равен 24) от пациента 4253 с аутологичными APC, (1) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO; незакрашенные столбцы); (2) в которые под действием импульсов вводили очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из мутантной p53-R248W (LP-p53-R248W-MUT; черные столбцы) последовательности; (3) которые подвергались электропорации нерелевантным TMG (TMG-IRR; серые заштрихованные столбцы); или (4) которые подвергались электропорации p53-mut-TMG, содержащим мутантную последовательность p53-R248W.

Фиг. 17 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеряемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4273 с аутологичными APC, которые подвергались электропорации TMG (TMG), состоящим из нерелевантной (IRR; незакрашенные столбцы), WT p53 (p53-WT; серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; черные столбцы) последовательности.

Фиг. 18 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместного культивирования фрагментов TIL пациента 4273 F1-F24 (n равен 24) с аутологичными APC, которые подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; незакрашенные столбцы) WT p53 (p53-WT; серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; черные столбцы) последовательности.

Фиг. 19 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеряемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4273 с аутологичными APC, которым под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 (LP-p53-R248-WT; серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R248W (LP-p53-R248W-MUT; черные столбцы).

Фиг. 20 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместной культивации фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4273 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 (LP-p53-R248-WT; серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R248W (LP-p53-R248W-MUT; черные столбцы).

Фиг. 21 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеренное после совместного культивирования аутологичных PBL от пациента 4149 (с переносом 4149-TCRa2b1 или 4149-TCRa2b2) с аутологичными APC, (1) которые подвергались электропорации TMG, состоящим их нерелевантной (IRR; правые заштрихованные черные столбцы), WT p53 (p53-wt-TMG; левые заштрихованные черные столбцы) или мутантной p53 (p53-mut-TMG; серые столбцы) последовательности; или (2) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO; открытые столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-Y220 (LP-p53-Y220-WT; черные столбцы с горизонтальной штриховкой) или мутантной последовательности p53-Y220C (LP-p53-Y220C-MUT; черные столбцы). Форбол 12-миристанат 13-ацетат (PMA - от англ. Phorbol-12-myristate-13-acetate) и иономицин (Iono) представлял собой положительный контроль (серые столбцы).

Фиг. 22 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместного культивирования аутологичных PBL от пациента 4149, в которые перенесли TCR (4149-TCRa2b1 или 4149-TCRa2b2), с аутологичными APC, которые (1) подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; правые заштрихованные черные столбцы), WT p53 (p53-wt-TMG; левые заштрихованные черные столбцы) или мутантной p53 (p53-mut-TMG; серые столбцы) последовательности; или которым (2) под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-Y220 (LP-p53-Y220-WT; черные столбцы с горизонтальной штриховкой) или мутантной последовательности p53-Y220C (LP-p53-Y220C-MUT; черные столбцы). PMA и Iono представлял собой положительный контроль (серые столбцы).

Фиг. 23 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1BB+ клеток (% CD4+ T клеток), выявляемое после совместного культивирования TIL от пациента 4149 с аутологичными DC, в которые под действием импульсов вводили один из пептидов табл. F.

Фиг. 24 представляет собой график, показывающий секрецию IFN- γ (пг/мл) после совместного

культивирования Т-клеток с переносом 4149-TCRa2b2 с клетками Cos7, совместно трансфицируемыми отдельными аллелями HLA±TMG. В клетки, не трансфицированные TMG, под действием импульсов вводили 15-мерный пептид p53Y220C. Клетки-мишени с ведением под действием импульсов обозначены заштрихованными столбцами.

Фиг. 25 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD8+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F2 и F24) от пациента 4213 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из мутантной последовательности p53-R248Q (LP-p53-R248Q-MUT; черные столбцы).

Фиг. 26 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеряемое после совместного культивирования CD4+ Т-клеток от пациента 4213 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из мутантной последовательности p53-R248Q (LP-p53-R248Q-MUT; черные столбцы). Секреция IFN- γ показана незакрашенными столбцами. Экспрессия 4-1BB показана закрашенными столбцами.

Фиг. 27 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеренное после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 с аутологичными APC, которые подвергались электропорации TMG, состоящими из нерелевантной (IRR; незакрашенные столбцы), WT p53 (p53-WT; серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; черные столбцы) последовательности.

Фиг. 28 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных клеток на 2×10^4 эффекторных клеток, измеренное после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25-аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 (LP-p53-R248-WT; серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R248Q (LP-p53-R248Q-MUT; черные столбцы).

Фиг. 29 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности p53-R248 WT (LP-p53-R248-WT; серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R248Q (LP-p53-R248Q-MUT; черные столбцы).

Фиг. 30 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD8+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 (LP-p53-R248-WT; серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R248Q (LP-p53-R248Q-MUT; черные столбцы).

Фиг. 31 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеренное после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4266 с аутологичными APC, подвергавшимся электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; незакрашенные столбцы), WT p53 (p53-WT; серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; черные столбцы) последовательности.

Фиг. 32 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD8+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4266 с аутологичными APC, подвергавшимся электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; незакрашенные столбцы), WT p53 (p53-WT; серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; черные столбцы) последовательности.

Фиг. 33 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеряемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4266 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 (LP-p53-R248-WT; серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R248W (LP-p53-R248W-MUT; черные столбцы).

Фиг. 34 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD8+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4266 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности p53-R248 WT (LP-p53-R248-WT; серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R248W (LP-p53-R248W-MUT; черные столбцы).

На фиг. 35 показано выравнивание аминокислотных последовательностей девяти вариантов сплайсинга

p53. SP|P04637|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 1); SP|P04637-2|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 535); SP|P04637-3|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 536); SP|P04637-4|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 537); SP|P04637-5|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 538); SP|P04637-6|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 539); SP|P04637-7|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 540); SP|P04637-8|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 541); и SP|P04637-9|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 542).

Фиг. 36 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1ВВ позитивных клеток (% mTCRβ+), выявляемое после совместного культивирования Т-клеток, трансдуцированных 4127-О37-TCR, с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили уменьшающиеся концентрации пептидов из 25 аминокислот, соответствующих WT (незакрашенные круги) или мутантной (закрашенные квадраты) p53-G245S последовательности.

Фиг. 37А-37С представляют собой графики, показывающие процентное содержание 4-1ВВ позитивных клеток (% mTCRβ+) (слева ось Y; заштрихованные столбцы) и IFN-γ (пг/мл) (справа ось Y; черные столбцы), измеряемое после совместного культивирования Т-клеток, трансдуцированных 4127-О37-TCR (А), 4127-TP53-G245S-TCR1 (В) или 4127-О102-TCR (С), с клетками COS7, совместно трансфицированными одной из указанных аллелей HLA и в которые под действием импульсов вводили пептид из 25 аминокислот p53-G245S.

Фиг. 38 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1ВВ позитивных клеток (% CD8+) (справа ось Y; черные столбцы) и IFN-γ (пг/мл/2×10⁴ клеток) (слева ось Y; заштрихованные столбцы), измеренное после совместного культивирования TIL от пациента 4141 (культура фрагмента 12) с аутологичными APC, трансфицированными TMG, кодирующим нерелевантные мутации (TMG-IRR), последовательность WT p53 (TP53-wt-TMG) или мутантную последовательность p53, включая R175H (TP53-mut-TMG). Только среды и PMA и иономицин представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно.

Фиг. 39 представляет собой график, показывающий количество IFN-γ-позитивных пятен на 2×10⁴ эффекторных клеток, измеряемое после совместного культивирования TIL от пациента 4141 (культура фрагмента 12) с клетками Cos7, совместно трансфицированными указанными аллелями HLA и либо без дополнительного гена (только HLA; незакрашенные столбцы), либо WT TP53 TMG (серые заштрихованные столбцы), либо мутантным (черные столбцы) TP53 TMG содержащим последовательность p53-R175H.

Фиг. 40 представляет собой график, показывающий концентрацию IFN-γ (пг/мл), измеренную после совместного культивирования Т-клеток, экспрессирующих имитацию (без TCR) или 4141-TCR1a2, с опухолевыми клетками T2 (экспрессирующими HLA-A*02:01). В клетки T2 под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO; серые столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды, состоящие из пептида WT p53-R175 (заштрихованные серые столбцы) или мутантного пептида p53-R175H (черные столбцы). Только среды (незакрашенные столбцы) и PMA и иономицин (решетчатые столбцы) представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно. Данные представляют собой среднее±SEM (от англ. Standard error of the mean - стандартная ошибка среднего) (n равен 3).

Фиг. 41 представляет собой график, показывающий процентное содержание клеток, позитивных в отношении экспрессии одного из указанных маркеров, после совместного культивирования Т-клеток, экспрессирующих 4141-TCR1a2, с клетками Saos2 (p53-NUL и HLA-A*02:01+), с которыми либо не проводили манипуляций (незаштрихованные столбцы), либо которых заставляли сверхэкспрессировать полноразмерный белок p53-R175H (заштрихованные столбцы). Данные представляют собой среднее±SEM (n равен 3). Двусторонние t-критерии Стьюдента осуществляли для каждого цитокина у двух клеточных линий для статистических анализов (***) р меньше 0,001).

Фиг. 42 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+4-1ВВ позитивных клеток, выявляемое после совместного культивирования TIL (культура фрагмента 6 от пациента 4259) с аутологичными APC или (1) подвергавшимися электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (TMG-IRR), WT p53 (TMG-p53-WT) или мутантной p53 (TMG-p53-MUT) последовательности; или (2) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-Y220 (LP-p53-Y220-WT) или мутантной последовательности p53-Y220C (LP-p53-Y220C-MUT).

Фиг. 43 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+4-1ВВ позитивных клеток, выявляемое после совместного культивирования культуры фрагмента TIL (№ 6) от пациента 4259 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили уменьшающиеся концентрации пептидов из 25 аминокислот, соответствующих последовательности WT p53 (незакрашенные кружки) или мутантной последовательности p53-Y220C (закрашенные кружки), в течение 2 ч при 37°C.

Фиг. 44 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+4-1ВВ позитивных клеток, выявляемое после совместного культивирования TIL от пациента 4259 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили DMCO, пептид WT p53-Y220 или мутантный пептид p53-Y220C.

Фиг. 45 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1ВВ позитивных клеток (% CD4+), выявленное после совместного культивирования культуры фрагмента TIL № 6 от пациен-

та 4259 с клетками Cos7, совместно трансфицированными указанными аллелями HLA от пациента 4259, и в которые под действием импульсов вводили ДМСО (незакрашенные столбцы) или пептид p53-Y220C (закрашенные столбцы).

Фиг. 46 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1BB+ клеток, выявляемое после совместного культивирования клеток-мишеней TC#4259 (эндогенно экспрессирующих p53-Y220C и HLA-DRB1*04:01:01) с эффекторными Т-клетками (10^5), экспрессирующими имитацию (без TCR; незакрашенные столбцы) или p53-Y220C-специфичный TCR (4259-F6-TCR; черные столбцы). Клетки TC#4259 либо инкубировали без всего, либо с W6/32 pan-HLA Класс-I-специфичным блокирующим антителом, либо с IVA12 pan-HLA Класс-II-специфичным блокирующим антителом, либо с мутантным пептидом p53-Y220C. Только среды (без TC) и PMA и иономицин представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно. Данные представляют собой среднее \pm SEM (n равен 3). Двусторонние t-критерии Стьюдента проводили у групп, как показано для статистических анализов (** p меньше 0,01 и *** p меньше 0,001).

Фиг. 47 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеряемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F22 и F24, n равен 23) от пациента 4285 аутологичными APC, подвергающимися электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; незакрашенные столбцы), WT p53 (p53-WT; серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; черные столбцы) последовательности.

Фиг. 48 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеряемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F22 и F24, n равен 23) от пациента 4285 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R175 (LP-p53-R175-WT; серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R175H (LP-p53-R175H-MUT; черные столбцы).

Фиг. 49 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+4-1BB клеток, выявляемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F22 и F24, n равен 23) от пациента 4285 с аутологичными APC, подвергаемыми электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; незакрашенные столбцы), p53 WT-типа (p53-WT; серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; черные столбцы) последовательности.

Фиг. 50 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F22 и F24, n равен 23) от пациента 4285 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R175 (LP-p53-R175-WT; серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R175H (LP-p53-R175H-MUT; черные столбцы).

Фиг. 51 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1BB+ клеток (% CD4+), выявляемое после совместного культивирования культур фрагментов TIL 4285-F6, 4285-F9 и 4285-F10 с клетками Cos7, трансфицируемыми указанными аллелями HLA и в которые под действием импульсов вводили ДМСО (носитель пептида; серые и черные заштрихованные столбцы) или мутантный пептид p53-R175H (серые, решетчатые и черные столбцы).

Фиг. 52 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1BB+ клеток (% CD4+), выявляемое после совместного культивирования Т-клеток, в которые осуществляли перенос 4285-TCR1, с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили уменьшающиеся концентрации пептидов из 25 или 15 аминокислот, соответствующих WT (незакрашенные кружки и квадраты) или мутантной (закрашенные кружки и квадраты) p53-R175H последовательности.

Фиг. 53 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1BB+ клеток (% CD8+), выявляемое после совместного культивирования TIL от пациента 4266 с клетками Cos7, которые совместно трансфицировали отдельными аллелями HLA от пациента 4266 и в которые под действием импульсов не вводили пептид (незакрашенные столбцы), вводили ДМСО (носитель пептида; серые столбцы), пептид дикого типа p53-R248 (серые заштрихованные столбцы) или мутантный пептид p53-R248W (черные столбцы). Данные представляют собой среднее \pm SEM (n равен 3).

Фиг. 54 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1BB+ клеток (% CD8+), выявляемое после совместного культивирования Т-клеток, экспрессирующих имитацию (без TCR), 4266-TCR1, 4266-TCR2, 4266-TCR3 или 4266-TCR4, с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; серые столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 (заштрихованные серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R248W (черные столбцы). Только среды (незакрашенные столбцы) и PMA и иономицин (решетчатые столбцы) представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно.

Фиг. 55 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1BB+ клеток (% CD8+), выявляемое после совместного культивирования Т-клеток, экспрессирующих имитацию (без

TCR) или p53-R248W-специфичные TCR (4266-TCR2, 4266-TCR3 или 4266-TCR4), с линией опухолевых клеток (TC), созданной из ксенотрансплантированного фрагмента опухоли, иссеченного у пациента 4266, затем серийно пропускаемого через мышей с ослабленным иммунитетом (TC#4266). Клетки TC#4266 или инкубировали без всего (черные столбцы), или с W6/32 pan-HLA класс-I-специфичным блокирующим антителом (правые серые заштрихованные столбцы), или с IVA12 pan-HLA класс-II-специфичным блокирующим антителом (серые столбцы) или мутантным пептидом p53-R248W (левые серые заштрихованные столбцы). Только среды (без TC; незакрашенные столбцы) и PMA и иономицин (серые решетчатые столбцы) представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно.

Фиг. 56 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+ 4-1BB+ клеток, выявленное после совместного культивирования TIL от пациента 4273 с аутологичными APC, которые трансфицировали TMG, кодирующими нерелевантные мутации (серые столбцы), последовательности p53 дикого типа (серые заштрихованные столбцы) или мутантные последовательности p53, включая p53-R248W (черные столбцы). Только среды (незакрашенные столбцы) и PMA и иономицин (решетчатые столбцы) представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно.

Фиг. 57 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+ 4-1BB+ клеток, выявленное после совместного культивирования TIL от пациента 4273 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили пептиды из 25 аминокислот, соответствующие дикому типу (незакрашенные кружки) или мутантному (закрашенные квадраты) из неоэпитопа p53-R248W. ДМСО представлял собой носитель пептида.

Фиг. 58 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+ 4-1BB+ клеток, выявленное после совместного культивирования TIL от пациента 4273 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили пептиды из 15 аминокислот из неоэпитопа p53-R248W (аминокислотная замена, выделенная жирным шрифтом) с перекрытием 14 аминокислот. ДМСО представлял собой носитель пептида, только среды (только Т-клетки) и PMA и иономицин представляли собой контроли. Пептиды из 25 аминокислот (wt p53-R248 и мутантный p53-R248W) представляли собой дополнительные контроли для пептидов из 15 аминокислот. Пептиды представляют собой

YMCNSSCMGGMNWRP (SEQ ID NO: 592); MCNSSCMGGMNWRPI (SEQ ID NO: 593);
CNSSCMGGMNWRPIL (SEQ ID NO: 594); NSSCMGGMNWRPILT (SEQ ID NO: 595);
SSCMGGMNWRPILTI (SEQ ID NO: 596); SCMGGMNWRPILTII (SEQ ID NO: 597);
CMGGMNWRPILTIIT (SEQ ID NO: 598); MGGMNWRPILTIITL (SEQ ID NO: 599);
GGMNWRPILTIITLE (SEQ ID NO: 600); GMNWRPILTIITLED (SEQ ID NO: 601) и
MNWRPILTIITLEDS (SEQ ID NO: 602).

Фиг. 59 представляет собой график, показывающий концентрацию IFN- γ (пг/мл), секретируемого после совместного культивирования TIL от пациента 4273 с клетками Cos7, совместно трансфицированными отдельными аллелями HLA от пациента 4273, и либо WT (незакрашенные столбцы), либо мутантным (черные столбцы) TP53 TMG с или без неоантигена p53-R248W соответственно.

Фиг. 60 представляет собой график, показывающий количество пятен IFN- γ на 2×10^4 клеток, измеряемое после совместного культивирования Т-клеток, экспрессирующих имитацию (без TCR) или 4273-TCR1a2, с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; серые столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 (заштрихованные серые столбцы) или мутантных последовательностей p53-R248W (черные столбцы). Только среды (незакрашенные столбцы) и PMA и иономицин (решетчатые столбцы) представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно.

Подробное описание изобретения

Опухолевый белок P53 (также называемый "TP53" или "p53") действует в качестве опухолевого супрессора посредством, например, регуляции деления клеток. Белок p53 локализован в ядре клетки, где он прямо связывается с ДНК. Когда ДНК повреждается, белок p53 включается в определение того, будет ли ДНК восстановлена, или же поврежденная клетка будет подвергаться апоптозу. Если ДНК может быть восстановлена, p53 активирует другие гены для устранения повреждения. Если ДНК не может быть восстановлена, белок p53 предотвращает деление клетки и сигнализирует о прохождении ею апоптоза. Останавливая деление клеток с мутантной или поврежденной ДНК, p53 помогает предотвратить развитие опухолей. Полноразмерный (нормальный) p53 дикого типа (WT) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Мутации в белке p53 могут снижать или устранять супрессорную функцию белка p53 в отношении опухоли. В качестве альтернативы или дополнительно мутация p53 может представлять собой мутацию с приобретением функции в результате влияния на p53 WT доминантным негативным образом. Мутантный белок p53 может экспрессироваться при любом из множества видов рака человека, таких как, например, холангиокарцинома, меланома, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак яичника, рак эндометрия, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC - от англ. non-small cell lung cancer), глиобластома, рак

шейки матки, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря.

Согласно одному воплощению изобретения предложен выделенный или очищенный Т-клеточный рецептор (TCR), обладающий антигенной специфичностью к мутантному p53 человека (далее в данном документе, "мутантному p53"). Далее в данном документе, ссылки на "TCR" также относятся к функциональным частям и функциональным вариантам TCR, если не указано иное. Мутации p53 определены в данном документе посредством ссылки на полноразмерную аминокислотную последовательность, p53 WT (SEQ ID NO: 1). Таким образом, мутации p53 описаны в данном документе посредством ссылки на аминокислотный остаток, находящийся в конкретном положении, за которым следует номер положения, за которым следует аминокислота, на которую был заменен данный остаток при конкретной рассматриваемой мутации. Например, когда положения представляют собой такие, как определено SEQ ID NO: 1, термин "R175" относится к аргинину, находящемуся в положении 175 SEQ ID NO: 1, "R175H" указывает на то, что аргинин, находящийся в положении 175 SEQ ID NO: 1, заменен гистидином, в то время как "G245S" указывает на то, что глицин, находящийся в положении 245 SEQ ID NO: 1, был заменен серином. P53 имеет девять известных вариантов сплайсинга. Мутации p53, описанные в данном документе, являются консервативными в случае всех девяти вариантов сплайсинга p53. Выравнивание девяти вариантов сплайсинга p53 показано на фиг. 35. Соответственно Т-клетки, выделенные способами по изобретению, могут обладать антигенной специфичностью в отношении любой мутантной аминокислотной последовательности p53, описанной в данном документе, кодируемой любым из девяти вариантов сплайсинга p53. Когда положения представляют собой такие, как определено SEQ ID NO: 1, тогда фактические положения аминокислотной последовательности определенного варианта сплайсинга p53 определяются относительно соответствующих положений SEQ ID NO: 1, и положения, как определено SEQ ID NO: 1, могут отличаться от фактических положений в конкретном варианте сплайсинга. Таким образом, например, мутации относятся к замене аминокислотного остатка в аминокислотной последовательности конкретного варианта сплайсинга p53 в соответствии с указанным положением 393-аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, исходя из предположения, что фактические положения в варианте сплайсинга могут отличаться.

В одном воплощении изобретения TCR обладает антигенной специфичностью к p53 человека с мутацией в положении 175, 220, 245, 248, 249, 273 или 282 SEQ ID NO: 1. TCR может обладать антигенной специфичностью к p53 человека с мутацией в положении 175, 220, 245 или 248 SEQ ID NO: 1. Мутация p53 может представлять собой любую миссенс-мутацию. Соответственно мутация в положении 175, 220, 245, 248, 249, 273 или 282 SEQ ID NO: 1 может представлять собой замену нативного (WT) аминокислотного остатка, находящегося в положении 175, 220, 245, 248, 249, 273 или 282 SEQ ID NO: 1, любым аминокислотным остатком, отличным от нативного (WT) аминокислотного остатка, находящегося в конкретном рассматриваемом положении. В одном воплощении изобретения TCR обладает антигенной специфичностью к p53 человека с одной из следующих мутаций p53 человека: R175H, Y220C, G245D, G245S, R248L, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273C, R273L или R282W. TCR может обладать антигенной специфичностью к человеческому p53 с одной из следующих мутаций человеческого p53: R175H, Y220C, G245S, R248Q или R248W. Например, TCR по изобретению может обладать антигенной специфичностью к мутантной аминокислотной последовательности p53, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-13.

В одном воплощении изобретения TCR по изобретению могут быть способны распознавать мутантный p53 HLA (человеческий лейкоцитарный антиген) молекулозависимым образом. Термин "HLA-молекулозависимым образом", в том виде, в котором он используется в данном документе, означает, что TCR вызывает иммунный ответ при связывании с мутантным p53 в рамках молекулы HLA, которая экспрессируется пациентом, у которого был выделен TCR. TCR по изобретению может быть способен распознавать мутантный p53, который презентируется применимой молекулой HLA, и может связываться с молекулой HLA, помимо мутантного p53.

TCR по изобретению предоставляют множество преимуществ, включая случаи, когда экспрессируются клетками, используемыми для адоптивного переноса клеток. Мутантный p53 экспрессируется раковыми клетками и не экспрессируется нормальными, нераковыми клетками. Без привязки к конкретной теории или механизму, полагают, что TCR по изобретению преимущественно нацелены на уничтожение раковых клеток при минимизации или исключении уничтожения нормальных, нераковых клеток, снижая, вследствие этого, например, минимизируя или исключая, токсичность. Кроме того, TCR по изобретению могут, преимущественно, успешно лечить или предупреждать мутантный p53-позитивные виды рака, которые не отвечают на другие типы лечения, такие как, например, химиотерапия, хирургическое вмешательство или лучевая терапия. Кроме того, TCR по изобретению могут обеспечивать высокоавидное распознавание мутантного p53, которое может обеспечивать способность распознавать неманипулированные опухолевые клетки (например, опухолевые клетки, которые не обрабатывали интерфероном (IFN)- γ , трансфицировали вектором, кодирующим одно или оба из мутантного p53 и применимой молекулы HLA, вводили под действием импульсов пептид p53 с мутацией p53, или их комбинация). Приблизительно половина всех опухолей несет мутацию в p53, примерно половина которых будет представлять

собой миссенс-мутацию и примерно 30% миссенс-мутаций встречается в следующих остатках-"горячих точках": R175H, Y220C, G245D, G245S, R248L, R248Q, R248W, R249S, R273C, R273L, R273H и R282W. Кроме того, те же мутации "горячих точек" в р53 (например, R175H, Y220C, G245D, G245S, R248L, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273C, R273L или R282W) часто встречаются (в совокупности примерно 30% миссенс-мутаций р53) в опухолях неродственных людей. Соответственно TCR по изобретению могут увеличивать число пациентов, которые могут быть допущены к лечению иммунотерапией.

Фраза "антигенная специфичность", в том виде, в котором она используется в данном документе, означает, что TCR может специфично связываться с и иммунологически распознавать мутантный р53 с высокой авидностью. Например, TCR можно считать обладающим "антигенной специфичностью" в отношении мутантного р53, если от примерно 1×10^4 до примерно 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих TCR, секретируют по меньшей мере примерно 200 пг/мл или более (например, 200 пг/мл или более, 300 пг/мл или более, 400 пг/мл или более, 500 пг/мл или более, 600 пг/мл или более, 700 пг/мл или более, 1000 пг/мл или более, 5000 пг/мл или более, 7000 пг/мл или более, 10000 пг/мл или более, 20000 пг/мл или более, или диапазон, определенный любыми двумя из приведенных выше значений) IFN- γ при совместном культивировании с

(а) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида р53 (например, от примерно 0,05 нг/мл до примерно 5, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 нг/мл или диапазон, определенный любыми двумя из приведенных выше значений); или

(b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный р53, таким образом, чтобы клетка-мишень экспрессировала мутантный р53.

Клетки, экспрессирующие TCR по изобретению, могут также секретировать IFN- γ при совместном культивировании с антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили более высокие концентрации мутантного пептида р53.

В качестве альтернативы или дополнительно TCR может считаться обладающим "антигенной специфичностью" в отношении мутантного р53, если Т-клетки, экспрессирующие TCR, секретируют по меньшей мере в два раза больше IFN- γ при совместном культивировании с

(а) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида р53; или

(b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный р53, таким образом, чтобы клетка-мишень экспрессировала мутантный р53, в сравнении с количеством IFN- γ , экспрессируемым отрицательным контролем.

Отрицательный контроль может представлять собой, например,

(i) Т-клетки, экспрессирующие TCR, совместно культивируемые с

(а) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили такую же концентрацию нерелевантного пептида (например, какой-то другой пептид с последовательностью, отличной от мутантного пептида р53), или

(b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую нерелевантный пептид; или

(ii) нетрансдуцированные Т-клетки (например, происходящие от PBMC (от англ. peripheral blood mononuclear cell - мононуклеарная клетка периферической крови), которые не экспрессируют TCR), совместно культивируемые с

(а) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили такую же концентрацию мутантного пептида р53, или

(b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный р53, таким образом, чтобы в клетке-мишени экспрессировался мутантный р53.

Секреция IFN- γ может измеряться способами, известными в данной области, такими как, например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA - от англ. enzyme-linked immunosorbent assay).

В качестве альтернативы или дополнительно TCR может считаться обладающим "антигенной специфичностью" в отношении мутантного р53, если по меньшей мере в два раза большее число Т-клеток, экспрессирующих TCR, секретируют IFN- γ при совместном культивировании с

(а) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида р53; или

(b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный р53, таким образом, чтобы в клетке-мишени экспрессировался мутантный р53, в сравнении с числом Т-клеток отрицательного контроля, которые секретируют IFN- γ .

Концентрация пептида и отрицательного контроля может представлять собой такую, как описано в данном документе, в отношении других аспектов изобретения. Число клеток, секретирующих IFN- γ , может быть измерено способами, известными в данной области, такими как, например, аналитический метод иммуноферментных пятен (ELISOT - от англ. Enzyme-Linked ImmunoSpot).

В качестве альтернативы или дополнительно TCR может считаться обладающим "антигенной специфичностью" в отношении мутантного p53, если по меньшей мере в два раза больше пятен выявляют посредством ELISPOT для Т-клеток, экспрессирующих TCR, при совместном культивировании с

(а) антиген-негативными, применимая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида p53; или

(б) антиген-негативными, применимая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный p53, таким образом, чтобы в клетке-мишени экспрессировался мутантный p53, в сравнении с числом пятен, выявляемым посредством ELISPOT для Т-клеток отрицательного контроля, совместно культивируемых с теми же клетками-мишенями.

Концентрация пептида и отрицательного контроля может представлять собой такую, как описано в данном документе, в отношении других аспектов изобретения.

В качестве альтернативы или дополнительно TCR может считаться обладающим "антигенной специфичностью" в отношении мутантного p53, если больше чем примерно 50 пятен выявляют посредством ELISPOT для Т-клеток, экспрессирующих TCR при совместном культивировании с

(а) антиген-негативными, применимая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида p53; или

(б) антиген-негативными, применимая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный p53, таким образом, чтобы в клетке-мишени экспрессировался мутантный p53.

Концентрация пептида может представлять собой такую, как описано в данном документе, в отношении других аспектов изобретения.

В качестве альтернативы или дополнительно TCR может считаться обладающим "антигенной специфичностью" в отношении мутантного p53, если Т-клетки, экспрессирующие TCR, осуществляют повышающую регуляцию экспрессии одного из или обоих 4-1BB и OX40, как измерено, например, посредством проточной цитометрии после стимуляции клетками-мишенями, экспрессирующими мутантный p53.

Согласно изобретению предложен TCR, содержащий два полипептида (т.е. полипептидные цепи), таких как цепь альфа (α) TCR, цепь бета (β) TCR, цепь гамма (γ) TCR, цепь дельта (δ) TCR, или их комбинацию. Полипептиды TCR по изобретению могут содержать любую аминокислотную последовательность, при условии, что TCR обладает антигенной специфичностью в отношении мутантного p53.

В одном воплощении изобретения TCR содержит две полипептидные цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, содержащую гипервариабельную область (CDR - от англ. complementarity determining region) 1, CDR2 и CDR3 TCR. В одном воплощении изобретения TCR содержит первую полипептидную цепь, содержащую CDR1 цепи α (CDR1 α), CDR2 цепи α (CDR2 α) и CDR3 цепи α (CDR α), и вторую полипептидную цепь, содержащую CDR1 цепи β (CDR1 β), CDR2 цепи β (CDR2 β) и CDR3 цепи β (CDR3 β). В одном воплощении изобретения TCR содержит следующие аминокислотные последовательности:

- (1) все из SEQ ID NO: 27-32;
- (2) все из SEQ ID NO: 37-42;
- (3) все из SEQ ID NO: 47-52;
- (4) все из SEQ ID NO: 57-62;
- (5) все из SEQ ID NO: 67-72;
- (6) все из SEQ ID NO: 77-82;
- (7) все из SEQ ID NO: 87-92;
- (8) все из SEQ ID NO: 97-102;
- (9) все из SEQ ID NO: 107-112;
- (10) все из SEQ ID NO: 117-122;
- (11) все из SEQ ID NO: 127-132;
- (12) все из SEQ ID NO: 137-142;
- (13) все из SEQ ID NO: 147-152;
- (14) все из SEQ ID NO: 157-162;
- (15) все из SEQ ID NO: 167-172;
- (16) все из SEQ ID NO: 177-182;
- (17) все из SEQ ID NO: 187-192;
- (18) все из SEQ ID NO: 197-202;
- (19) все из SEQ ID NO: 207-212;
- (20) все из SEQ ID NO: 217-222;

- (21) все из SEQ ID NO: 227-232;
- (22) все из SEQ ID NO: 237-242;
- (23) все из SEQ ID NO: 247-252;
- (24) все из SEQ ID NO: 257-262;
- (25) все из SEQ ID NO: 267-272;
- (26) все из SEQ ID NO: 277-282;
- (27) все из SEQ ID NO: 287-292;
- (28) все из SEQ ID NO: 297-302;
- (29) все из SEQ ID NO: 307-312;
- (30) все из SEQ ID NO: 317-322;
- (31) все из SEQ ID NO: 327-332;
- (32) все из SEQ ID NO: 337-342;
- (33) все из SEQ ID NO: 347-352;
- (34) все из SEQ ID NO: 357-362;
- (35) все из SEQ ID NO: 367-372;
- (36) все из SEQ ID NO: 377-382;
- (37) все из SEQ ID NO: 387-392;
- (38) все из SEQ ID NO: 397-402;
- (39) все из SEQ ID NO: 407-412;
- (40) все из SEQ ID NO: 417-422;
- (41) все из SEQ ID NO: 427-432;
- (42) все из SEQ ID NO: 437-442;
- (43) все из SEQ ID NO: 447-452;
- (44) все из SEQ ID NO: 457-462;
- (45) все из SEQ ID NO: 467-472;
- (46) все из SEQ ID NO: 477-482; или
- (47) все из SEQ ID NO: 487-492.

Каждая из приведенных выше 47 совокупностей аминокислотных последовательностей в данном абзаце устанавливает шесть CDR областей каждого из 47 разных TCR, обладающих антигенной специфичностью в отношении мутантного человеческого р53. Эти шесть аминокислотных последовательностей в каждой совокупности соответствуют CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β и CDR3 β TCR соответственно.

В одном воплощении изобретения TCR содержит аминокислотную последовательность вариабельной области цепи α и аминокислотную последовательность вариабельной области цепи β , которые вместе содержат одну из совокупностей CDR, установленных выше. В данном отношении TCR может содержать аминокислотные последовательности

- (1) обеих из SEQ ID NO: 33-34;
- (2) обеих из SEQ ID NO: 43-44;
- (3) обеих из SEQ ID NO: 53-54;
- (4) обеих из SEQ ID NO: 63-64;
- (5) обеих из SEQ ID NO: 73-74;
- (6) обеих из SEQ ID NO: 83-84;
- (7) обеих из SEQ ID NO: 93-94;
- (8) обеих из SEQ ID NO: 103-104;
- (9) обеих из SEQ ID NO: 113-114;
- (10) обеих из SEQ ID NO: 123-124;
- (11) обеих из SEQ ID NO: 133-134;
- (12) обеих из SEQ ID NO: 143-144;
- (13) обеих из SEQ ID NO: 153-154;
- (14) обеих из SEQ ID NO: 163-164;
- (15) обеих из SEQ ID NO: 173-174;
- (16) обеих из SEQ ID NO: 183-184;
- (17) обеих из SEQ ID NO: 193-194;
- (18) обеих из SEQ ID NO: 203-204;
- (19) обеих из SEQ ID NO: 213-214;
- (20) обеих из SEQ ID NO: 223-224;
- (21) обеих из SEQ ID NO: 233-234;
- (22) обеих из SEQ ID NO: 243-244;
- (23) обеих из SEQ ID NO: 253-254;
- (24) обеих из SEQ ID NO: 263-264;
- (25) обеих из SEQ ID NO: 273-274;

- (26) обеих из SEQ ID NO: 283-284;
- (27) обеих из SEQ ID NO: 293-294;
- (28) обеих из SEQ ID NO: 303-304;
- (29) обеих из SEQ ID NO: 313-314;
- (30) обеих из SEQ ID NO: 323-324;
- (31) обеих из SEQ ID NO: 333-334;
- (32) обеих из SEQ ID NO: 343-344;
- (33) обеих из SEQ ID NO: 353-354;
- (34) обеих из SEQ ID NO: 363-364;
- (35) обеих из SEQ ID NO: 373-374;
- (36) обеих из SEQ ID NO: 383-384;
- (37) обеих из SEQ ID NO: 393-394;
- (38) обеих из SEQ ID NO: 403-404;
- (39) обеих из SEQ ID NO: 413-414;
- (40) обеих из SEQ ID NO: 423-424;
- (41) обеих из SEQ ID NO: 433-434;
- (42) обеих из SEQ ID NO: 443-444;
- (43) обеих из SEQ ID NO: 453-454;
- (44) обеих из SEQ ID NO: 463-464;
- (45) обеих из SEQ ID NO: 473-474;
- (46) обеих из SEQ ID NO: 483-484; или
- (47) обеих из SEQ ID NO: 493-494.

Каждая из приведенных выше 47 совокупностей аминокислотных последовательностей в данном абзаце устанавливает две переменные области каждого из 47 разных TCR, обладающих антигенной специфичностью в отношении мутантного человеческого p53. Данные две аминокислотные последовательности в каждой совокупности соответствуют переменной области цепи α и переменной области цепи β TCR соответственно.

TCR по изобретению могут дополнительно содержать константную область. Константная область может происходить из любого подходящего вида, такого как, например, человек или мышь. В одном воплощении изобретения TCR дополнительно содержат мышиную константную область. В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "мышиный" или "человеческий", когда речь идет о TCR или любом компоненте TCR, описанном в данном документе (например, гиперпеременная область (CDR), переменная область, константная область, цепь альфа и/или цепь бета), означает TCR (или его компонент), который происходит из мыши или человека соответственно, т.е. TCR (или его компонент), который происходил из или, одновременно, экспрессировался мышиную T-клеткой или человеческой T-клеткой соответственно. В одном воплощении изобретения TCR может содержать мышиную константную область цепи α и мышиную константную область цепи β . Мышиная константная область цепи α может быть модифицирована или немодифицирована. Модифицированная мышиная константная область цепи α может быть, например, цистеин-замещенной, LVL-модифицированной или и цистеин-замещенной и LVL-модифицированной, как описано, например, в US 2017/0145070. Мышиная константная область цепи β может быть модифицирована или немодифицирована. Модифицированная мышиная константная область цепи β может быть, например, цистеин-замещенной, как описано, например, в US 2017/0145070. В одном воплощении изобретения TCR содержит цистеин-замещенную, LVL-модифицированную мышиную константную область цепи α , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или 24. В одном воплощении изобретения TCR содержит цистеин-замещенную мышиную константную область цепи β , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

В одном воплощении изобретения TCR по изобретению может содержать цепь α TCR и цепь β TCR. Цепь α TCR может содержать переменную область цепи α и константную область цепи α . Цепь α данного типа может составлять пару любой цепи β TCR. Цепь β может содержать переменную область цепи β и константную область цепи β . В одном воплощении изобретения TCR содержит аминокислотные последовательности

- (1) обеих SEQ ID NO: 35-36;
- (2) обеих SEQ ID NO: 45-46;
- (3) обеих SEQ ID NO: 55-56;
- (4) обеих SEQ ID NO: 65-66;
- (5) обеих SEQ ID NO: 75-76;
- (6) обеих SEQ ID NO: 85-86;
- (7) обеих SEQ ID NO: 95-96;
- (8) обеих SEQ ID NO: 105-106;
- (9) обеих SEQ ID NO: 115-116;
- (10) обеих SEQ ID NO: 125-126;

- (11) обеих SEQ ID NO: 135-136;
- (12) обеих SEQ ID NO: 145-146;
- (13) обеих SEQ ID NO: 155-156;
- (14) обеих SEQ ID NO: 165-166;
- (15) обеих SEQ ID NO: 175-176;
- (16) обеих SEQ ID NO: 185-186;
- (17) обеих SEQ ID NO: 195-196;
- (18) обеих SEQ ID NO: 205-206;
- (19) обеих SEQ ID NO: 215-216;
- (20) обеих SEQ ID NO: 225-226;
- (21) обеих SEQ ID NO: 235-236;
- (22) обеих SEQ ID NO: 245-246;
- (23) обеих SEQ ID NO: 255-256;
- (24) обеих SEQ ID NO: 265-266;
- (25) обеих SEQ ID NO: 275-276;
- (26) обеих SEQ ID NO: 285-286;
- (27) обеих SEQ ID NO: 295-296;
- (28) обеих SEQ ID NO: 305-306;
- (29) обеих SEQ ID NO: 315-316;
- (30) обеих SEQ ID NO: 325-326;
- (31) обеих SEQ ID NO: 335-336;
- (32) обеих SEQ ID NO: 345-346;
- (33) обеих SEQ ID NO: 355-356;
- (34) обеих SEQ ID NO: 365-366;
- (35) обеих SEQ ID NO: 375-376;
- (36) обеих SEQ ID NO: 385-386;
- (37) обеих SEQ ID NO: 395-396;
- (38) обеих SEQ ID NO: 405-406;
- (39) обеих SEQ ID NO: 415-416;
- (40) обеих SEQ ID NO: 425-426;
- (41) обеих SEQ ID NO: 435-436;
- (42) обеих SEQ ID NO: 445-446;
- (43) обеих SEQ ID NO: 455-456;
- (44) обеих SEQ ID NO: 465-466;
- (45) обеих SEQ ID NO: 475-476;
- (46) обеих SEQ ID NO: 485-486; или
- (47) обеих SEQ ID NO: 495-496.

Каждая из приведенных выше 47 совокупностей аминокислотных последовательностей в данном абзаце устанавливает цепь α и цепь β каждого из 47 разных TCR, обладающих антигенной специфичностью, в отношении мутантного человеческого p53. Данные две аминокислотные последовательности в каждой совокупности соответствуют цепи α и цепи β TCR соответственно.

В объем изобретения включены функциональные варианты TCR по изобретению, описанные в данном документе. Термин "функциональный вариант", в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к TCR, полипептиду или белку, обладающему существенной или значимой идентичностью или сходством последовательностей с исходным TCR, полипептидом или белком, чей функциональный вариант сохраняет биологическую активность TCR, полипептида или белка, чьим является вариант. Функциональные варианты охватывают, например, функциональные варианты TCR, полипептида или белка, описанных в данном документе (исходный TCR, полипептид или белок), которые сохраняют способность специфично связываться в мутантным p53, в отношении которого исходный TCR обладает антигенной специфичностью или с которым исходный полипептид или белок специфично связывается, в похожей степени, в такой же степени или в большей степени, чем исходный TCR, полипептид или белок. В отношении исходного TCR, полипептида или белка функциональный вариант может, например, быть по меньшей мере на примерно 30%, по меньшей мере на примерно 50%, по меньшей мере на примерно 75%, по меньшей мере на примерно 80%, по меньшей мере на примерно 90%, по меньшей мере на примерно 95%, по меньшей мере на примерно 96%, по меньшей мере на примерно 97%, по меньшей мере на примерно 98%, по меньшей мере на примерно 99% или более идентичным по аминокислотной последовательности исходному TCR, полипептиду или белку соответственно.

Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность исходного TCR, полипептида или белка с по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой. Консервативные аминокислотные замены хорошо известны в данной области и включают аминокислотные замены, в которых одна аминокислота, имеющая определенные физические и/или химические

свойства, заменяется на другую аминокислоту, которая имеет такие же химические или физические свойства. Например, консервативная аминокислотная замена может представлять собой кислотную аминокислоту, замещенную другой кислотной аминокислотой (например, Asp или Glu), аминокислоту с неполярной боковой цепью, замещенную другой аминокислотой с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val и т.д.), основную аминокислоту, замещенную другой основной аминокислотой (Lys, Arg и т.д.), аминокислоту с полярной боковой цепью, замещенную другой аминокислотой с полярной боковой цепью (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tug и т.д.), и т.д.

В качестве альтернативы или дополнительно функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность исходного TCR, полипептида или белка с по меньшей мере одной неконсервативной аминокислотной заменой. В данном случае предпочтительно, чтобы неконсервативная аминокислотная замена не препятствовала или не ингибировала биологическую активность функционального варианта. Предпочтительно неконсервативная аминокислотная замена усиливает биологическую активность функционального варианта, таким образом, чтобы биологическая активность функционального варианта повышалась, по сравнению с исходным TCR, полипептидом или белком.

TCR, полипептид или белок может по существу состоять из определенной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в данном документе, таким образом, что другие компоненты TCR, полипептида или белка, например, другие аминокислоты, существенно не меняют биологической активности TCR, полипептида или белка.

Также согласно изобретению предложен полипептид, содержащий функциональную часть любого из TCR, описанных в данном документе. Термин "полипептид", в том виде, в котором он используется в данном документе, включает олигопептиды и относится к одиночной цепи аминокислот, соединенных одной или более пептидными связями.

В отношении полипептидов по изобретению функциональная часть может представлять собой любую часть, содержащую прилежащие аминокислоты TCR, частью которого она является, при условии, что функциональная часть специфично связывается с мутантным p53. Термин "функциональная часть", при использовании в отношении TCR, относится к любой части или фрагменту TCR по изобретению, чья часть или фрагмент сохраняет биологическую активность TCR, частью которого они являются (исходный TCR). Функциональные части охватывают, например, такие части TCR, которые сохраняют способность к специфичному связыванию с мутантным p53 (например, путем, зависимым от применимой молекулы HLA), или выявлению, лечению или предупреждению рака, в похожей степени, в такой же степени или в большей степени, в сравнении с исходным TCR. В отношении исходного TCR, функциональная часть может содержать, например, примерно 10%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 50%, примерно 68%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95% или больше исходного TCR.

Функциональная часть может содержать дополнительные аминокислоты на N- или C-конце данной части или на обоих концах, где дополнительные аминокислоты не обнаруживаются в аминокислотной последовательности исходного TCR. Желательно, чтобы дополнительные аминокислоты не препятствовали биологической функции функциональной части, например, специфичному связыванию с мутантным p53; и/или обладанию способностью выявлять рак, лечить или предупреждать рак и т.д. Более желательно, чтобы дополнительные аминокислоты усиливали биологическую активность, по сравнению с биологической активностью исходного TCR.

Полипептид может содержать функциональную часть одной из или обеих цепей α и β TCR по изобретению, такую как функциональная часть, содержащая одну или более из CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной(ых) области(ей) цепи α и/или цепи β TCR по изобретению. В одном воплощении изобретения полипептид может содержать функциональную часть, содержащую аминокислотные последовательности

- (1) всех из SEQ ID NO: 27-32;
- (2) всех из SEQ ID NO: 37-42;
- (3) всех из SEQ ID NO: 47-52;
- (4) всех из SEQ ID NO: 57-62;
- (5) всех из SEQ ID NO: 67-72;
- (6) всех из SEQ ID NO: 77-82;
- (7) всех из SEQ ID NO: 87-92;
- (8) всех из SEQ ID NO: 97-102;
- (9) всех из SEQ ID NO: 107-112;
- (10) всех из SEQ ID NO: 117-122;
- (11) всех из SEQ ID NO: 127-132;
- (12) всех из SEQ ID NO: 137-142;
- (13) всех из SEQ ID NO: 147-152;
- (14) всех из SEQ ID NO: 157-162;
- (15) всех из SEQ ID NO: 167-172;
- (16) всех из SEQ ID NO: 177-182;
- (17) всех из SEQ ID NO: 187-192;

- (18) всех из SEQ ID NO: 197-202;
- (19) всех из SEQ ID NO: 207-212;
- (20) всех из SEQ ID NO: 217-222;
- (21) всех из SEQ ID NO: 227-232;
- (22) всех из SEQ ID NO: 237-242;
- (23) всех из SEQ ID NO: 247-252;
- (24) всех из SEQ ID NO: 257-262;
- (25) всех из SEQ ID NO: 267-272;
- (26) всех из SEQ ID NO: 277-282;
- (27) всех из SEQ ID NO: 287-292;
- (28) всех из SEQ ID NO: 297-302;
- (29) всех из SEQ ID NO: 307-312;
- (30) всех из SEQ ID NO: 317-322;
- (31) всех из SEQ ID NO: 327-332;
- (32) всех из SEQ ID NO: 337-342;
- (33) всех из SEQ ID NO: 347-352;
- (34) всех из SEQ ID NO: 357-362;
- (35) всех из SEQ ID NO: 367-372;
- (36) всех из SEQ ID NO: 377-382;
- (37) всех из SEQ ID NO: 387-392;
- (38) всех из SEQ ID NO: 397-402;
- (39) всех из SEQ ID NO: 407-412;
- (40) всех из SEQ ID NO: 417-422;
- (41) всех из SEQ ID NO: 427-432;
- (42) всех из SEQ ID NO: 437-442;
- (43) всех из SEQ ID NO: 447-452;
- (44) всех из SEQ ID NO: 457-462;
- (45) всех из SEQ ID NO: 467-472;
- (46) всех из SEQ ID NO: 477-482; или
- (47) всех из SEQ ID NO: 487-492.

В одном воплощении изобретения полипептид по изобретению может содержать, например, вариативную область TCR по изобретению, содержащую комбинацию CDR областей, установленную выше. В этом отношении полипептид может содержать следующие аминокислотные последовательности:

- (1) обе из SEQ ID NO: 33-34;
- (2) обе из SEQ ID NO: 43-44;
- (3) обе SEQ ID NO: 53-54;
- (4) обе SEQ ID NO: 63-64;
- (5) обе SEQ ID NO: 73-74;
- (6) обе из SEQ ID NO: 83-84;
- (7) обе из SEQ ID NO: 93-94;
- (8) обе из SEQ ID NO: 103-104;
- (9) обе из SEQ ID NO: 113-114;
- (10) обе из SEQ ID NO: 123-124;
- (11) обе из SEQ ID NO: 133-134;
- (12) обе из SEQ ID NO: 143-144;
- (13) обе из SEQ ID NO: 153-154;
- (14) обе из SEQ ID NO: 163-164;
- (15) обе из SEQ ID NO: 173-174;
- (16) обе из SEQ ID NO: 183-184;
- (17) обе из SEQ ID NO: 193-194;
- (18) обе из SEQ ID NO: 203-204;
- (19) обе из SEQ ID NO: 213-214;
- (20) обе из SEQ ID NO: 223-224;
- (21) обе из SEQ ID NO: 233-234;
- (22) обе из SEQ ID NO: 243-244;
- (23) обе из SEQ ID NO: 253-254;
- (24) обе из SEQ ID NO: 263-264;
- (25) обе из SEQ ID NO: 273-274;
- (26) обе из SEQ ID NO: 283-284;
- (27) обе из SEQ ID NO: 293-294;
- (28) обе из SEQ ID NO: 303-304;
- (29) обе из SEQ ID NO: 313-314;

- (30) обе из SEQ ID NO: 323-324;
- (31) обе из SEQ ID NO: 333-334;
- (32) обе из SEQ ID NO: 343-344;
- (33) обе из SEQ ID NO: 353-354;
- (34) обе из SEQ ID NO: 363-364;
- (35) обе из SEQ ID NO: 373-374;
- (36) обе из SEQ ID NO: 383-384;
- (37) обе из SEQ ID NO: 393-394;
- (38) обе из SEQ ID NO: 403-404;
- (39) обе из SEQ ID NO: 413-414;
- (40) обе из SEQ ID NO: 423-424;
- (41) обе из SEQ ID NO: 433-434;
- (42) обе из EQ ID NO: 443-444;
- (43) обе из SEQ ID NO: 453-454;
- (44) обе из SEQ ID NO: 463-464;
- (45) обе из SEQ ID NO: 473-474;
- (46) обе из SEQ ID NO: 483-484; или
- (47) обе из SEQ ID NO: 493-494.

В одном воплощении изобретения полипептид по изобретению может дополнительно содержать константную область TCR по изобретению, установленную выше. В этом отношении полипептид может содержать аминокислотную последовательность

- (i) одной из SEQ ID NO: 23-25; или
- (ii) SEQ ID NO: 25 и одной из SEQ ID NO: 23-24.

В одном воплощении изобретения полипептид по изобретению может содержать цепь α и цепь β TCR по изобретению. В этом отношении полипептид может содержать аминокислотные последовательности

- (1) обеих SEQ ID NO: 35-36;
- (2) обеих SEQ ID NO: 45-46;
- (3) обеих SEQ ID NO: 55-56;
- (4) обеих SEQ ID NO: 65-66;
- (5) обеих SEQ ID NO: 75-76;
- (6) обеих SEQ ID NO: 85-86;
- (7) обеих SEQ ID NO: 95-96;
- (8) обеих SEQ ID NO: 105-106;
- (9) обеих SEQ ID NO: 115-116;
- (10) обеих SEQ ID NO: 125-126;
- (11) обеих SEQ ID NO: 135-136;
- (12) обеих SEQ ID NO: 145-146;
- (13) обеих SEQ ID NO: 155-156;
- (14) обеих SEQ ID NO: 165-166;
- (15) обеих SEQ ID NO: 175-176;
- (16) обеих SEQ ID NO: 185-186;
- (17) обеих SEQ ID NO: 195-196;
- (18) обеих SEQ ID NO: 205-206;
- (19) обеих SEQ ID NO: 215-216;
- (20) обеих SEQ ID NO: 225-226;
- (21) обеих SEQ ID NO: 235-236;
- (22) обеих SEQ ID NO: 245-246;
- (23) обеих SEQ ID NO: 255-256;
- (24) обеих SEQ ID NO: 265-266;
- (25) обеих SEQ ID NO: 275-276;
- (26) обеих SEQ ID NO: 285-286;
- (27) обеих SEQ ID NO: 295-296;
- (28) обеих SEQ ID NO: 305-306;
- (29) обеих SEQ ID NO: 315-316;
- (30) обеих SEQ ID NO: 325-326;
- (31) обеих SEQ ID NO: 335-336;
- (32) обеих SEQ ID NO: 345-346;
- (33) обеих SEQ ID NO: 355-356;
- (34) обеих SEQ ID NO: 365-366;
- (35) обеих SEQ ID NO: 375-376;
- (36) обеих SEQ ID NO: 385-386;

- (37) обеих SEQ ID NO: 395-396;
- (38) обеих SEQ ID NO: 405-406;
- (39) обеих SEQ ID NO: 415-416;
- (40) обеих SEQ ID NO: 425-426;
- (41) обеих SEQ ID NO: 435-436;
- (42) обеих SEQ ID NO: 445-446;
- (43) обеих SEQ ID NO: 455-456;
- (44) обеих SEQ ID NO: 465-466;
- (45) обеих SEQ ID NO: 475-476;
- (46) обеих SEQ ID NO: 485-486; или
- (47) обеих SEQ ID NO: 495-496.

Согласно изобретению дополнительно предложен белок, содержащий по меньшей мере один из полипептидов, описанных в данном документе. Под термином "белок" подразумевается молекула, содержащая одну или более полипептидных цепей. В одном воплощении белок по изобретению может содержать

(1) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 27-29, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 30-32;

(2) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 37-39, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 40-42;

(3) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 47-49, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 50-52;

(4) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 57-59, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 60-62;

(5) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 67-69, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 70-72;

(6) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 77-79, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 80-82;

(7) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 87-89, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 90-92;

(8) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 97-99, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 100-102;

(9) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 107-109, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 110-112;

(10) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 117-119, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 120-122;

(11) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 127-129, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 130-132;

(12) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 137-139, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 140-142;

(13) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 147-149, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 150-152;

(14) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 157-159, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 160-162;

(15) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 167-169, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 170-172;

(16) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 177-179, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 180-182;

и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326;

(31) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 335, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 336;

(32) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 345, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 346;

(33) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 355, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 356;

(34) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 365, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 366;

(35) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 375, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 376;

(36) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 385, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 386;

(37) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 395, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 396;

(38) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 405, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 406;

(39) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 415, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 416;

(40) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 425, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426;

(41) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 435, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 436;

(42) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 445, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 446;

(43) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 455, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 456;

(44) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 465, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 466;

(45) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 475, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 476;

(46) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 485, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 486; или

(47) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 495, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 496.

Белок по изобретению может представлять собой TCR. В качестве альтернативы если первая и/или вторая полипептидная(ые) цепь(и) белка дополнительно содержит(ат) другие аминокислотные последовательности, например, аминокислотную последовательность, кодирующую иммуноглобулин или его часть, тогда белок по изобретению может представлять собой слитый белок. В этой связи согласно изобретению также предложен слитый белок, содержащий по меньшей мере один из полипептидов по изобретению, описанных в данном документе, вместе с по меньшей мере одним другим полипептидом. Другой полипептид может существовать в виде отдельного полипептида слитого белка или может существовать в виде полипептида, который экспрессируется внутри рамки (в тандеме) с одним из полипептидов по изобретению, описанных в данном документе. Другой полипептид может кодировать любую пептидную или белковую молекулу или ее часть, включая иммуноглобулин, CD3, CD4, CD8, молекулу MHC (от англ. major histocompatibility complex - главный комплекс гистосовместимости), молекулу CD1, например CD1a, CD1b, CD1c, CD1d и т.д., но не ограничиваясь ими.

Слитый белок может содержать одну или более копий полипептида по изобретению и/или одну или более копий другого полипептида. Например, слитый белок может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или более копий полипептида по изобретению и/или другого полипептида. Подходящие способы получения слитых белков известны в данной области и включают, например, способы генной инженерии.

В некоторых воплощениях изобретения TCR, полипептиды и белки по изобретению могут экспрессироваться в виде одиночного белка, содержащего линкерный пептид, связывающий цепь α и цепь β . В этой связи, TCR, полипептиды и белки по изобретению могут дополнительно содержать линкерный пептид. Линкерный пептид может преимущественно облегчать экспрессию рекомбинантного TCR, полипептида и/или белка в клетке-хозяине. Линкерный пептид может содержать любую подходящую аминокислотную последовательность. Например, линкерный пептид может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. При экспрессии конструкции, включающей линкерный пептид, клеткой-хозяином линкерный пептид может расщепляться, приводя к получению отдельных цепей α и β . В одном воплощении изобретения TCR, полипептид или белок могут содержать аминокислотную последовательность, содержащую полноразмерную цепь α , полноразмерную цепь β и линкерный пептид, расположен-

ный между данными цепями α и β .

Белок по изобретению может представлять собой рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее(ий) по меньшей мере один из полипептидов по изобретению, описанных в данном документе. В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "рекомбинантное антитело" относится к рекомбинантному (например, генетически модифицированному) белку, содержащему по меньшей мере один из полипептидов по изобретению и полипептидную цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Полипептид антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может представлять собой тяжелую цепь, легкую цепь, переменную или константную область тяжелой или легкой цепи, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv - от англ. single chain variable fragment) или Fc, Fab или F(ab)2' фрагмент антитела и т.д. Полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может существовать в виде отдельного полипептида рекомбинантного антитела. В качестве альтернативы полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может существовать в виде полипептида, который экспрессируется внутри рамки (в тандеме) с полипептидом по изобретению. Полипептид антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может представлять собой полипептид любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включая любые антитела и фрагменты антител, описанные в данном документе.

TCR, полипептиды и белки по изобретению могут быть любой длины, т.е. могут содержать любое число аминокислот, при условии, что TCR, полипептиды или белки сохраняют свою биологическую активность, например, способность специфично связываться с мутантным p53; выявлять рак у млекопитающего; или лечить или предупреждать рак у млекопитающего и т.д. Например, полипептид может находиться в интервале от примерно 50 аминокислот до примерно 5000 аминокислот в длину, как, например, 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более аминокислот в длину. В связи с этим полипептиды по изобретению также включают олигопептиды.

TCR, полипептиды и белки по изобретению могут содержать синтетические аминокислоты вместо одной или более встречающихся в природе аминокислот. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области и включают, например, аминокислоты циклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин, α -амино н-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометил-цистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, β -фенилсерин β -гидроксифенилаланин, фенилглицин, α -нафтилаланин, циклогексилаланил, циклогексилглицин, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты, N'-бензил-N'-метил-лизин, N',N'-дибензил-лизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α -аминоциклопентанкарбоновую кислоту, α -аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α -аминоциклогептанкарбоновую кислоту, α -(2-амино-2-норборнан)-карбоновую кислоту, α,γ -диаминомасляную кислоту, α,β -диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин и α -трет-бутилглицин.

TCR, полипептиды и белки по изобретению могут быть гликозилированы, амидированы, карбоксилированы, фосфорилированы, этерифицированы, N-ацилированы, циклизированы посредством, например, дисульфидного мостика или превращены в соль присоединения кислоты и/или возможно димеризованы или полимеризованы или конъюгированы.

TCR, полипептид и/или белок по изобретению может быть получен способами, известными в данной области, такими как, например, синтез de novo. Кроме того, полипептиды и белки могут быть рекомбинантно получены с использованием нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, с использованием стандартных способов генной инженерии. См., например, Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012). В качестве альтернативы TCR, полипептиды и/или белки, описанные в данном документе, могут быть коммерчески синтезированы компаниями, такими как Synper (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) и Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). В связи с этим, TCR, полипептиды и белки по изобретению могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

Согласно одному воплощению изобретения предложена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из TCR, полипептидов или белков, описанных в данном документе. Термин "нуклеиновая кислота", в том виде, в котором он используется в данном документе, включает "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "молекулу нуклеиновой кислоты" и обычно означает полимер ДНК или РНК, который может быть одноцепочечным или двуцепочечным, который может содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды, и который может содержать природную, неприродную или измененную межнуклеотидную связь, такую как фосфорамидатная связь или фосфоритоатная связь, вместо фосфодиэфирной связи, обнаруживаемой между нуклеотидами немодифицированного олигонуклеотида. В одном воплощении нуклеиновая кислота содержит комплементарную ДНК (кДНК). Обычно предпочтительно, чтобы нуклеиновая кислота не содержала каких-либо вставок, делеций, инверсий и/или замен. Однако, в некоторых примерах может быть подходящим, как обсуждается в данном документе, когда нуклеиновая кислота содержит одну или более вставок, делеций, инверсий и/или замен.

Предпочтительно нуклеиновые кислоты по изобретению являются рекомбинантными. В том виде, в

котором он используется в данном документе, термин "рекомбинантный" относится к

(i) молекулам, которые сконструированы вне живых клеток посредством соединения природных или синтетических сегментов нуклеиновой кислоты с молекулами нуклеиновой кислоты, которые могут реплицироваться в живой клетке; или

(ii) молекулам, которые получены в результате репликации молекул, описанных выше в (i).

В целях данного документа, репликация может представлять репликацию *in vitro* или репликацию *in vivo*.

Нуклеиновые кислоты могут быть сконструированы на основе химического синтеза и/или реакций ферментативного лигирования с использованием способов, известных в данной области. См., например, Green and Sambrook et al., выше. Например, нуклеиновая кислота может быть химически синтезирована с использованием встречающихся в природе нуклеотидов или различным образом модифицированных нуклеотидов, сконструированных для повышения биологической стабильности молекул или для повышения физической стабильности дуплекса, образующегося при гибридизации (например, производные фосфотиоатов и акридин-замещенные нуклеотиды). Примеры модифицированных нуклеотидов, которые могут быть использованы для получения нуклеиновых кислот, включают 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксихидроксиметил) урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N⁶-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N⁶-замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеозин, 5'-метокси-карбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N⁶-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метилов эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбокситрипропил) урацил и 2,6-диаминопурин, но не ограничиваются ими. В качестве альтернативы одну или более нуклеиновых кислот по изобретению можно приобрести у компаний, таких как Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) и SyntheGen (Houston, TX).

В одном воплощении изобретения нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность с оптимизированными кодонами, кодирующую любые из TCR, полипептидов или белков, описанных в данном документе. Без привязки к какой-либо конкретной теории или механизму, полагают, что оптимизация кодонов нуклеотидной последовательности увеличивает эффективность трансляции транскриптов мРНК (матричная РНК). Оптимизация кодонов нуклеотидной последовательности может включать замену нативного кодона другим кодоном, который кодирует ту же аминокислоту, но может транслироваться тРНК (транспортная РНК), которая более доступна в клетке, повышая, таким образом, эффективность трансляции. Оптимизация нуклеотидной последовательности может также сокращать вторичные структуры мРНК, которые могли бы препятствовать трансляции, повышая, таким образом, эффективность трансляции.

Согласно изобретению также предложена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, или нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Нуклеотидная последовательность, которая гибридизуется в жестких условиях, предпочтительно гибридизуется в условиях высокой жесткости. Под термином "условия высокой жесткости" подразумевается, что нуклеотидная последовательность специфично гибридизуется с целевой последовательностью (нуклеотидная последовательность любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе) в степени, которая заметно сильнее, чем при неспецифичной гибридизации. Условия высокой жесткости включают условия, которые будут различать полинуклеотид с точной комплементарной последовательностью или полинуклеотид, содержащий только несколько разрозненных ошибок спаривания, от случайной последовательности, которая, как оказалось, имеет несколько маленьких областей (например, 3-10 оснований), которые совпадают с нуклеотидной последовательностью. Такие маленькие области комплементарности легче плавятся, чем полноразмерный комплемент из 14-17 или более оснований, и гибридизация в условиях высокой жесткости делает их легко различаемыми. Условия относительно высокой жесткости будут включать, например, низкосолевые и/или высокотемпературные условия, такие, которые обеспечиваются примерно 0,02-0,1 M NaCl или эквивалентом, при температурах примерно 50-70°C. Такие условия высокой жесткости допускают мало, если вообще допускают, ошибок спаривания между нуклеотидной последовательностью и матрицей или целевой цепью, и особенно подходят для выявления экспрессии любого из TCR по изобретению. Обычно следует принимать во внимание, что условия могут становиться более жесткими в результате добавления увеличивающихся количеств формамида.

Согласно изобретению также предложена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 70% или более, например примерно 80%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%,

примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%, идентична любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. В связи с этим, нуклеиновая кислота может по существу состоять из любых нуклеотидных последовательностей, описанных в данном документе.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть включены в рекомбинантный экспрессионный вектор. В этом отношении, согласно изобретению предложен рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот по изобретению. В одном воплощении изобретения рекомбинантный экспрессионный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую цепь α , цепь β и линкер пептида.

В целях данного документа, термин "рекомбинантный экспрессионный вектор" обозначает конструкцию генетически модифицированного олигонуклеотида или полинуклеотида, которая делает возможной экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида клеткой-хозяином, когда конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мРНК, белок, полипептид или пептид, и вектор приводится в контакт с клеткой в условиях, достаточных для экспрессии мРНК, белка, полипептида или пептида в клетке. Векторы по изобретению не встречаются в природе как единое целое. Однако, части векторов могут встречаться в природе. Рекомбинантные экспрессионные векторы по изобретению могут содержать любой тип нуклеотида, включая, но, не ограничиваясь ДНК и РНК, которые являются одноцепочечными или двухцепочечными, синтезированными или полученными отчасти из природных источников, и которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды. Рекомбинантные экспрессионные векторы могут содержать встречающиеся в природе, не встречающиеся в природе межнуклеотидные связи или оба типа связей. Предпочтительно не встречающиеся в природе или измененные нуклеотиды или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или репликации вектора.

Рекомбинантный экспрессионный вектор по изобретению может представлять собой любой подходящий рекомбинантный экспрессионный вектор и может быть использован для трансформации или трансфекции любой подходящей клетки-хозяина. Подходящие векторы включают векторы, сконструированные для наработки и размножения или для экспрессии или и того и другого, такие как плазмиды и вирусы. Вектор может быть выбран из группы, состоящей из серии транспозон/транспозаза, серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), серии pET (Novagen, Madison, WI), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Швеция) и серии pEX (Clontech, Palo Alto, CA). Также можно использовать векторы на основе бактериофагов, такие как λ GT10, λ GT11, λ Zapll (Stratagene), λ EMBL4 и λ NM1149. Примеры экспрессионных векторов растений включают pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). Примеры экспрессионных векторов животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAM-neo (Clontech). Предпочтительно рекомбинантный экспрессионный вектор представляет собой транспозонный вектор или вирусный вектор, например, ретровирусный вектор.

Рекомбинантные экспрессионные векторы по изобретению могут быть получены, используя стандартные методики генной инженерии, описанные, например, в Green and Sambrook et al., см. выше. Конструкции экспрессионных векторов, которые являются кольцевыми или линейными, могут быть получены содержащими систему репликации, являющуюся функциональной в прокариотической и эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут происходить, например, из ColEI, 2 μ плазмиды, λ SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота и т.п.

Желательно, чтобы рекомбинантный экспрессионный вектор содержал регуляторные последовательности, такие как старт-кодон и стоп-кодон транскрипции и трансляции, которые специфичны в отношении типа клетки-хозяина (например, бактерия, гриб, растение или животное), в которую вектор должен быть введен, исходя из конкретного случая и принимая во внимание то, основан ли вектор на ДНК или РНК.

Рекомбинантный экспрессионный вектор может включать один или более маркерных генов, которые делают возможной селекцию трансформированных или трансфицированных клеток-хозяев. Маркерные гены включают устойчивость к биоциду, например, устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам и т.д., дополнение в ауксотрофной клетке-хозяине для обеспечения прототрофности и т.д. Подходящие маркерные гены для экспрессионных векторов по изобретению включают, например, гены устойчивости к неомицину/G418, гены устойчивости к гигромицину, гены устойчивости к гистидинолу, гены устойчивости к тетрациклину и гены устойчивости к ампициллину.

Рекомбинантный экспрессионный вектор может содержать нативный или ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR, полипептид или белок, или с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна или которая гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR, полипептид или белок. Селекция промоторов, например, сильных, слабых, индуцибельных, тканеспецифичных и специфичных в отношении стадии развития, находится в компетенции обычного специалиста в данной области. Аналогично, объединение нуклеотидной последовательности с промотором также находится в компетенции специалиста в данной области. Промотор может представлять собой невирусный промотор, например, промотор человеческого фактора элонгации-1a или вирусный промотор, например, промотор цитомегаловируса (CMV - от англ.

cytomegalovirus), промотор SV40, промотор RSV и промотор, обнаруженный в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мыши.

Рекомбинантные экспрессионные векторы по изобретению могут быть сконструированы или для временной экспрессии, или для стабильной экспрессии или для того и другого. Кроме того, рекомбинантные экспрессионные векторы могут быть сделаны для конститутивной экспрессии или для индуцибельной экспрессии.

Кроме того, рекомбинантные экспрессионные векторы могут быть сделаны таким образом, чтобы они включали ген самоубийства. В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "ген самоубийства" относится к гену, который вызывает гибель клетки, экспрессирующей данный ген самоубийства. Ген самоубийства может представлять собой ген, который придает клетке, в которой экспрессируется данный ген, чувствительность к агенту, например, лекарственному средству, и вызывает гибель клетки, когда клетка контактирует с или подвергается воздействию данного агента. Гены самоубийства известны в данной области и включают, например, ген тимидинкиназы (ТК - от англ. thymidine kinase) вируса простого герпеса (HSV - от англ. herpes simplex virus), цитозиндаминазы, пуридинуклеозидфосфорилазы и нитроредуктазы.

Согласно другому воплощению изобретения дополнительно предложена клетка-хозяин, содержащая любой из рекомбинантных экспрессионных векторов, описанных в данном документе. В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "клетка-хозяин" относится к любому типу клетки, которая может содержать рекомбинантный экспрессионный вектор по изобретению. Клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, например, растения, животного, грибов или водорослей, или может представлять собой прокариотическую клетку, например, бактерий или простейших. Клетка-хозяин может представлять собой культивируемую клетку или первичную клетку, т.е. выделенную непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может представлять собой адгезивную клетку или суспензионную клетку, т.е. клетку, которая растет в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в данной области и включают, например, клетки *E. coli* DH5 α , клетки яичника китайского хомяка, клетки VERO марышки, клетки COS, клетки HEK293 и т.п. В целях амплификации или репликации рекомбинантного экспрессионного вектора, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой прокариотическую клетку, например, клетку DH5 α . В целях получения рекомбинантного TCR, полипептида или белка, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой клетку млекопитающего. Наиболее предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку человека. В то время, как клетка-хозяин может быть клеткой любого типа клетки, может происходить из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой лимфоцит периферической крови (PBL - от англ. peripheral blood lymphocyte) или мононуклеарную клетку периферической крови (PBMC). Более предпочтительно клетка-хозяин представляет собой Т-клетку.

В целях данного документа Т-клетка может представлять собой любую Т-клетку, такую как культивируемая Т-клетка, например, первичная Т-клетка или Т-клетка из культивируемой линии Т-клеток, например Jurkat, SupT1 и т.д., или Т-клетка, полученная от млекопитающего. В случае получения от млекопитающего Т-клетка может быть получена из многих источников, включая, не, не ограничиваясь кровью, костным мозгом, лимфатическим узлом, тимусом или другими тканями или жидкостями. Т-клетки могут быть также обогащены или очищены. Предпочтительно Т-клетка представляет собой Т-клетку человека. Т-клетка может быть любого типа Т-клетки и может находиться на любой стадии развития, включая CD4⁺/CD8⁺ дважды позитивные Т-клетки, CD4⁺ Т-хелперы, например клетки Th₁ и Th₂, CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), Т-клетки памяти (например, центральные Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки памяти), интактные Т-клетки и т.п., но не ограничиваясь ими.

Также согласно изобретению предложена популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в данном документе. Популяция клеток может представлять собой гетерогенную популяцию, содержащую клетку-хозяина, содержащую любой из описанных рекомбинантных экспрессионных векторов, помимо по меньшей мере одной другой клетки, например, клетки-хозяина (например, Т-клетки), которая не содержит никакого рекомбинантного экспрессионного вектора, или клетки, отличной от Т-клетки, например, В-клетки, макрофага, нейтрофила, эритроцита, гепатоцита, эндотелиальной клетки, эпителиальной клетки, мышечной клетки, клетки головного мозга и т.д. В качестве альтернативы популяция клеток может представлять собой по существу гомогенную популяцию, где популяция содержит в основном клетки-хозяева (например, по существу состоящие из), содержащие рекомбинантный экспрессионный вектор. Популяция также может представлять собой клональную популяцию клеток, в которой все клетки популяции представляют собой клоны одной единственной клетки-хозяина, содержащей рекомбинантный экспрессионный вектор, таким образом, что все клетки популяции содержат рекомбинантный экспрессионный вектор. В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой клональную популяцию, содержащую клетки-хозяева, содержащие рекомбинантный экспрессионный вектор, как описано в данном документе.

В одном воплощении изобретения число клеток в популяции может быстро увеличиваться. Увели-

чение числа Т-клеток может осуществляться любым из целого ряда способов, известных в данной области, как описано, например, в патенте США 8034334; патенте США 8383099; публикации патентной заявки США № 2012/0244133; Dudley et al., J. Immunother., 26:332-42 (2003); и Riddell et al., J. Immunol. Methods, 128:189-201 (1990). В одном воплощении увеличение числа Т-клеток осуществляют посредством культивирования Т-клеток с антителом ОКТ3, IL-2 (от англ. interleukin 2 - интерлейкин 2) и фидерными РВМС (например, облученными аллогенными РВМС).

TCR, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева (включая их популяции) по изобретению могут быть выделены и/или очищены. Термин "выделенный", в том виде, в котором он используется в данном документе, означает удаленный из его природной окружающей среды. Термин "очищенный", в том виде, в котором он используется в данном документе, означает с повышенной чистотой, где "чистота" является относительным термином и не обязательно понимается как абсолютная чистота. Например, чистота может составлять по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или может составлять примерно 100%.

TCR, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева (включая их популяции), все из которых далее в данном документе в совокупности называются "TCR материалами по изобретению", могут быть приготовлены в композиции, такой как фармацевтическая композиция. В связи с этим, согласно изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая любой из TCR, полипептидов, белков, нуклеиновых кислот, экспрессионных векторов, и клеток-хозяев (включая их популяции), описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции по изобретению, содержащие любой из TCR материалов по изобретению, могут содержать более одного TCR материала по изобретению, например, полипептид и нуклеиновую кислоту, или два или более разных TCR. В качестве альтернативы фармацевтическая композиция может содержать TCR материал по изобретению в комбинации с другим(и) фармацевтически активным(и) агентом(ами) или лекарственным(и) средством(ами), таким(и) как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубин, доксорубин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д.

Предпочтительно носитель представляет собой фармацевтически приемлемый носитель. В отношении фармацевтических композиций носитель может представлять собой любой из носителей, традиционно используемых для конкретного рассматриваемого TCR материала по изобретению. Способы получения вводимых композиций известны или очевидны специалистам в данной области и описаны более подробно, например, в The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed., Pharmaceutical Press (2012). Предпочтительно, чтобы фармацевтически приемлемый носитель представлял собой носитель, который не имеет вредных побочных эффектов или токсичности в применяемых условиях.

Выбор носителя будет определяться отчасти конкретным TCR материалом по изобретению, а также конкретным способом, используемым для введения TCR материала по изобретению. Соответственно существует множество подходящих препаратов фармацевтической композиции по изобретению. Подходящие препараты могут включать любой из препаратов для парентерального, подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриартериального, интратекального, внутриопухолевого или внутрибрюшинного введения. Более чем один путь может быть использован для введения TCR материалов по изобретению, и в определенных примерах конкретный путь может обеспечивать более немедленную и более эффективную реакцию, чем в случае другого пути.

Предпочтительно TCR материал по изобретению вводят посредством инъекции, например, внутривенно. Когда TCR материал по изобретению представляет собой клетку-хозяина, экспрессирующую TCR по изобретению, фармацевтически приемлемый носитель для клеток для инъекции может включать любой изотонический носитель, такой как, например, нормальный физиологический раствор (примерно 0,90 мас./об.% NaCl в воде, примерно 300 мосмоль/л NaCl в воде или примерно 9,0 г NaCl на литр воды), раствор электролита NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL), примерно 5%-ную декстрозу в воде или Рингер-лактат. В одном воплощении фармацевтически приемлемый носитель дополняют человеческим сывороточным альбумином.

В целях изобретения вводимое количество или доза (например, число клеток, когда TCR материал по изобретению представляет собой одну или более клеток) вводимого TCR материала по изобретению должны быть достаточными для эффекта, например, терапевтического или профилактического ответа, у субъекта или животного за разумный период времени. Например, доза TCR материала по изобретению должна быть достаточной для связывания с раковым антигеном (например, мутантным p53) или выявления, лечения или предупреждения рака за период от примерно 2 ч или больше, например от 12 до 24 или более часов, с момента введения. В конкретных воплощениях период времени мог бы быть даже больше. Доза будет определяться эффективностью конкретного TCR материала по изобретению и состоянием животного (например, человека), а также массой тела данного животного (например, человека), подлежащего лечению.

Многие анализы для определения вводимой дозы известны в данной области. В целях изобретения анализ, который включает сравнение степени, до которой клетки-мишени лизируются или IFN- γ секретируется Т-клетками, экспрессирующими TCR, полипептид или белок по изобретению при введении данной дозы таких Т-клеток млекопитающему у целого ряда млекопитающих, каждому из которых дается разная доза Т-клеток, можно было бы использовать для определения исходной дозы, подлежащей введению млекопитающему. Степень, до которой лизируются клетки-мишени или секретируется IFN- γ при введении определенной дозы, можно анализировать способами, известными в данной области.

Доза TCR материала по изобретению также будет определяться существованием, природой и степенью любых вредных побочных эффектов, которые могут сопутствовать введению конкретного TCR материала по изобретению. Обычно, лечащий врач будет принимать решение относительно дозировки TCR материала по изобретению, посредством которой лечить каждого отдельного пациента, учитывая множество факторов, таких как возраст, масса тела, общее состояние здоровья, рацион, пол, TCR материал по изобретению, подлежащий введению, способ введения и тяжесть рака, подлежащего лечению. В одном воплощении, в котором TCR материал по изобретению представляет собой популяцию клеток, число клеток, вводимых за инфузию, может варьировать, например, от примерно 1×10^6 до примерно 1×10^{12} клеток или больше. В конкретных воплощениях можно вводить меньше чем 1×10^6 клеток.

Одному из обычных специалистов в данной области должно быть сразу понятно, что TCR материалы по изобретению могут быть модифицированы множеством путей, таким образом, чтобы терапевтическая и профилактическая эффективность TCR материалов по изобретению увеличивались посредством данной модификации. Например, TCR материалы по изобретению могут быть конъюгированы или прямо, или непрямо через мостик с химиотерапевтическим агентом. Практическое применение конъюгации соединений с химиотерапевтическим агентом известно в данной области. Один из обычных специалистов в данной области признает, что сайты на TCR материалах по изобретению, которые не являются необходимыми для функции TCR материалов по изобретению, являются идеальными сайтами для присоединения мостика и/или химиотерапевтического агента, при условии, что мостик и/или химиотерапевтический агент, будучи присоединенным к TCR материалам по изобретению, не препятствует(ют) функции TCR материалов по изобретению, т.е. способности связываться с мутантным p53 или выявлять, лечить или предупреждать рак.

Предполагается, что фармацевтические композиции, TCR, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы, клетки-хозяева или популяции клеток по изобретению могут быть использованы в способах лечения или предупреждения рака. Без привязки к конкретной теории, полагают, что TCR по изобретению специфично связываются с мутантным p53, таким образом, что TCR (или родственный полипептид или белок по изобретению), при экспрессии клеткой, способен опосредовать иммунный ответ на клетку-мишень, экспрессирующую мутантный p53. В этой связи, согласно одному воплощению изобретения предложен способ лечения или предупреждения рака у млекопитающего, включающий введение млекопитающему любой из фармацевтических композиций, TCR, полипептидов или белков, описанных в данном документе, любой нуклеиновой кислоты или рекомбинантного экспрессионного вектора, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из TCR, полипептидов, белков, описанных в данном документе, или любой клетки-хозяина или популяции клеток, содержащих рекомбинантный вектор, который кодирует любой из TCR, полипептидов или белков, описанных в данном документе, в количестве, эффективном для лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

Согласно одному воплощению изобретения предложена любая из фармацевтических композиций, TCR, полипептидов или белков, описанных в данном документе, любая нуклеиновая кислота или рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из TCR, полипептидов, белков, описанных в данном документе, или любая клетка-хозяин или популяция клеток, содержащих рекомбинантный вектор, который кодирует любой из TCR, полипептидов или белков, описанных в данном документе, для применения в лечении или предупреждении рака у млекопитающего.

Термины "лечить" и "предупреждать", а также слова, происходящие от них, в том виде, в котором они используются в данном документе, не обязательно подразумевают 100%-ное или полное вылечивание или предупреждение. Вернее, существуют варьирующие степени лечения или предупреждения, которые обычный специалист в данной области расценивает как приносящие возможную пользу или терапевтический эффект. В связи с этим способы по изобретению могут обеспечивать любое количество любого уровня лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

Кроме того, лечение или предупреждение, предложенные согласно способу по изобретению, могут включать лечение или предупреждение одного или более состояний или симптомов рака, подлежащего лечению или предупреждению. Например, лечение или предупреждение может включать стимулирование регрессии опухоли. Кроме того, в целях данного документа, термин "предупреждение" может охватывать задержку начала рака или его симптома или состояния. В качестве альтернативы или дополнительно термин "предупреждение" может охватывать предупреждение или задержку рецидива рака или

его симптома или состояния.

Также согласно одному воплощению изобретения предложен способ выявления наличия рака у млекопитающего. Способ включает (i) приведение в контакт образца, содержащего одну или более клеток от млекопитающего, с любым из TCR, полипептидов, белков, нуклеиновых кислот, рекомбинантных экспрессионных векторов, клеток-хозяев, популяций клеток или фармацевтических композиций по изобретению, описанных в данном документе, с образованием, вследствие этого, комплекса, и выявление данного комплекса, где выявление комплекса свидетельствует о наличии рака у млекопитающего.

Относительно способа выявления рака у млекопитающего по изобретению, образец клеток может представлять собой образец, содержащий цельные клетки, их лизаты или фракцию лизатов цельных клеток, например, ядерную или цитоплазматическую фракцию, фракцию общего белка или фракцию нуклеиновой кислоты.

В целях способа выявления по изобретению, приведение в контакт может происходить *in vitro* или *in vivo* относительно млекопитающего. Предпочтительно приведение в контакт происходит *in vitro*.

Кроме того, выявление комплекса может происходить посредством множества путей, известных в данной области. Например, TCR, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы, клетки-хозяева или популяции клеток по изобретению, описанные в данном документе, могут быть мечены выявляемой меткой, такой как, например, радиоизотоп, флуорофор (например, флуоресцеин изотиоцианат (FITC - от англ. fluorescein isothiocyanate), фикоэритрин (PE - от англ. phycoerythrin), фермент (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена) и элементарные частицы (например, частицы золота).

В целях способов по изобретению, в которых вводят клетки-хозяева или популяции клеток, клетки могут представлять собой клетки, которые являются аллогенными или аутологичными в отношении млекопитающего. Предпочтительно клетки являются аутологичными в отношении млекопитающего.

В отношении способов по изобретению рак может представлять собой любой рак, включая любой из следующих видов рака: острый лимфоцитарный рак, острый миелоидный лейкоз, альвеолярная рабдомиосаркома, рак кости, рак головного мозга, рак молочной железы, рак ануса и анального канала или прямой кишки, рак глаза, рак внутрипеченочного желчного протока, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, носовой полости или среднего уха, рак ротовой полости, рак влагалища, рак вульвы, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак шейки матки, карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта, глиома, лимфома Ходжкина, рак гортаноглотки, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легкого, злокачественная мезотелиома, меланома, множественная миелома, рак носоглотки, неходжкинская лимфома, рак ротоглотки, рак яичника, рак пениса, рак поджелудочной железы, брюшины, сальника и рак брыжейки тонкой кишки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почки, рак кожи, рак тонкой кишки, рак мягкой ткани, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки, рак мочеочника и рак мочевого пузыря. В предпочтительном воплощении рак представляет собой рак, при котором экспрессируется мутантный p53. При раке может экспрессироваться p53 с мутацией в любом одном или более из положений 175, 220, 245, 248, 249, 273 и 282 SEQ ID NO: 1. При раке может экспрессироваться p53 с любой одной или более из следующих мутаций человеческого p53: R175H, Y220C, G245D, G245S, R248L, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273C, R273L и R282W. Предпочтительно рак представляет собой эпителиальный рак или холангиокарциному, меланому, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак яичника, рак эндометрия, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиобластому, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря.

Млекопитающее, на которое ссылаются в способах по изобретению, может представлять собой любое млекопитающее. В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "млекопитающее" относится к любому млекопитающему, включая млекопитающих отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда Logomorpha, таких как кролики, но, не ограничиваясь ими. Предпочтительным является то, чтобы млекопитающие происходили из отряда Carnivora, включая Felines (кошки) и Canines (собаки). Более предпочтительно, чтобы млекопитающие происходили из отряда Artiodactyla, включая Bovines (коровы) и Swines (свиньи), или из отряда Perssodactyla, включая Equines (лошади). Наиболее предпочтительно, чтобы млекопитающие принадлежали к отряду Primates, Seboids или Simoids (обезьяны) или к отряду Anthropoids (человек и человекообразные обезьяны). Особенно предпочтительным млекопитающим является человек.

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но, конечно, никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие его объем.

Примеры

Аминокислотные последовательности, изложенные в табл. 1-3, использовали в экспериментах, описанных в следующих примерах. В табл. 1, 2 "LP" означает "длинный пептид". В табл. 3 "TMG" означает "тандемный миниген".

Таблица 1

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
2	LP-p53-R175H-MUT	YKQSQHMTEVVRHCPHHERCSDSDG
3	LP-p53-R273H-MUT	SGNLLGRNSFEVHVCACPGRRRTE
4	LP-p53-R248L-MUT	YMCNSSCMGGMNLRPILITILEDSS
5	LP-p53-R282W-MUT	FEVRVCACPGRDWRTEENLRKKGE
6	LP-p53-R273C-MUT	SGNLLGRNSFEVVCACPGRRRTE
7	LP-p53-G245S-MUT	HYNMCMNSSCMGSMNRRPILITITL
8	LP-p53-R248Q-MUT	YMCNSSCMGGMNQRPILITILEDSS
9	LP-p53-G245D-MUT	HYNMCMNSSCMGDMNRRPILITITL
10	LP-p53-R273L-MUT	SGNLLGRNSFEVLVCACPGRRRTE
11	LP-p53-R248W-MUT	YMCNSSCMGGMNRWRPILITILEDSS
12	LP-p53-Y220C-MUT	DRNTFRHSVVPPEPVEGSDCTTI
13	LP-p53-R249S-MUT	MCNSSCMGGMNRSPILITILEDSS

Версии WT пептидов табл. 1 изложены в табл. 2.

Таблица 2

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
15	LP-p53-R175-WT	YKQSQHMTEVVRCPHHERCSDSDG
16	LP-p53-R273-WT	SGNLLGRNSFEVVCACPGRRRTE
17	LP-p53-R248-WT	YMCNSSCMGGMNRRPILITILEDSS
18	LP-p53-R282-WT	FEVRVCACPGRRRTEENLRKKGE
19	LP-p53-G245-WT	HYNMCMNSSCMGGMNRRPILITITL
20	LP-p53-Y220-WT	DRNTFRHSVVPPEPVEGSDCTTI
21	LP-p53-R249-WT	MCNSSCMGGMNRRPILITILEDSS

Таблица 3

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
14	TMG-p53-MUT	YKQSQHMTEVVRHCPHHERCSDSDGSGNLLGRNSFEVHVCACPGRRRTEYMCNSSCMGGMNLRPILITILEDSSFEVRVCACPGRDWRTEENLRKKGESGNLLGRNSFEVVCACPGRRRTEHYNMCMNSSCMGSMNRRPILITITLYMCNSSCMGGMNQRPILITILEDSSHYNYMCNSSCMGDMNRRPILITITLSGNLLGRNSFEVLVCACPGRRRTEYMCNSSCMGGMNRWRPILITILEDSSDRNTFRHSVVPPEPVEGSDCTTMCNSSCMGGMNRSPILITILEDSS
22	TMG-p53-WT	YKQSQHMTEVVRCPHHERCSDSDGSGNLLGRNSFEVVCACPGRRRTEYMCNSSCMGGMNRRPILITILEDSSFEVRVCACPGRRRTEENLRKKGESGNLLGRNSFEVVCACPGRRRTEHYNMCMNSSCMGGMNRRPILITITLYMCNSSCMGGMNRRPILITILEDSSHYNYMCNSSCMGGMNRRPILITITLSGNLLGRNSFEVVCACPGRRRTEYMCNSSCMGGMNRRPILITILEDSSDRNTFRHSVVPPEPVEGSDCTTMCNSSCMGGMNRSPILITILEDSS

Пример 1.

Данный пример демонстрирует выделение и специфичную реактивность в четырех TCR против мутантного p53 от пациента 4127.

Эксперименты проводили, как описано для фиг. 1-7, 36 и 37A-37C для пациента 4127. Т-клетки, реактивные в отношении мутантного p53, для данного пациента идентифицировали способом, описанным в патентной заявке США № 2017/0224800 ("Способ Tran"). Способы выделения отдельных TCR изложены ниже.

Аутологичные PBL трансдуцировали одним из TCR, показанных на фиг. 1, и тестировали, спустя 2 недели. Аутологичные клетки DC высевали в количестве 3×10^4 клеток/лунка и в течение ночи под действием импульсов в них вводили или пептид WT p53-G245 (wt) или мутантный пептид p53-G245S (mut) при уменьшении концентраций пептидов. 3×10^4 трансдуцированных Т-клеток добавляли в лунку и со-

вместно культивировали в течение ночи при 37°C. Супернатанты собирали для ELISA IFN- γ . Результаты ELISA по IFN- γ показаны на фиг. 1. Экспрессию 4-1BB измеряли посредством гейтирования FACS (от англ. fluorescent-activated cell sorting - сортировка клеток с активированной флуоресценцией): лимфоциты\PI (от англ. propidium iodide - йодид пропидия) (негатив.)CD3⁺CD3⁺mTCR\CD8(негатив.)CD4⁺. Результаты FACS показаны на фиг. 2.

Аутологичные PBL трансдуцировали одним из TCR, показанных на фиг. 3, и совместно культивировали, как описано для эксперимента фиг. 2, за исключением того, что в DC под действием импульсов вводили ДМСО (носитель пептида) или один из 15-мерных пептидов p53-G245S с перекрытием 14 аминокислот, показанных в табл. А. Экспрессию 4-1BB осуществляли, как описано в случае фиг. 2. Результаты показаны на фиг. 3.

Таблица А

№ пептида по оси X Фиг. 3	Пептид	SEQ ID NO:
1	HNYMCNSSCMGSMN	497
2	YNYMCNSSCMGSMNR	498
3	NYMCNSSCMGSMNRR	499
4	YMCNSSCMGSMNRRP	500
5	MCNSSCMGSMNRRPI	501
6	CNSSCMGSMNRRPIL	502
7	NSSCMGSMNRRPILT	503
8	SSCMGSMNRRPILTI	504
9	SCMGSMNRRPILTII	505
10	CMGSMNRRPILTIIT	506
11	MGSMNRRPILTIITL	507

Клетки Cos7 ($2,5 \times 10^4$ на лунку) высевали в лунки плоскостенных 96-луночных планшетов. Спустя 20 ч, клетки совместно трансфицировали отдельными аллелями HLA. Спустя 20 ч в клетки под действием импульсов вводили 15-мерный пептид p53G245S на протяжении 3 ч при 37°C в количестве 10 мкг/мл. После промывки Т-клетки (10^5) добавляли в лунки и совместно культивировали в течение ночи (в течение 20 ч) при 37°C. Секрецию IFN- γ измеряли посредством ELISA; предсказание посредством NetMHCIIpan: cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/. Экспрессию 4-1BB измеряли посредством FACS. Гейтирование FACS: лимфоциты→живые клетки (PI-негативные)→CD3⁺ (Т-клетки)→CD4⁺ (4127-TIL) или CD4⁺mTCR⁺ (TCR-трансдуцированные Т-клетки). Результаты показаны на фиг. 4, 5 и в табл. В.

Таблица В

HLA	Пептид	Аффинность, нМ	Ранг
DRB3*02:02	HNYMCNSSCMGSMN SEQ ID NO: 497	533.4	21

DRB3*02 экспрессируется 1367 из 3719 (37%) DRB_типированных пациентов в базе данных HLA NCI и 5 из 9 (56%) пациентов с раком эндометрия и яичника в NCI-SB (Хирургическое отделение национального института онкологии). Сообщаемая частота аллели DRB3*02 является очень высокой в соответствии с веб-сайтом allelefrequencies.net. Например, на данном веб-сайте сообщается о том, что частота аллели DRB3*02 составляет 0,3447 популяции средневосточного или северного побережья Африки NMDP (от англ. National Marrow Donor Program - Национальная программа донорства костного мозга) США.

TIL от пациента 4127 совместно культивировали с аллогенными (DRB3*01:01:01 или DRB3*02:02:01) антигенпрезентирующими клетками (APC - от англ. antigen presenting cell), которые

(1) подвергали электропорации тандемными минигенами (TMG), состоящими из нерелевантной, WT p53 или мутантной p53 последовательности; или которым

(2) под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-G245 или мутантной последовательности p53-G245S.

Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 6.

Т-клетки, экспрессирующие 4127-TCR1, специфичный к p53-G245S, совместно культивировали с аллогенными APC, как описано в случае эксперимента фиг. 6. Результаты показаны на фиг. 7.

В аутологичные APC под действием импульсов вводили уменьшающиеся концентрации пептидов из 25 аминокислот, соответствующих WT p53-G245 или мутантной p53-G245S последовательности. Т-клетки, трансдуцированные 4127-037-TCR от пациента 4127, совместно культивировали в течение ночи при 37°C с APC, которым под действием импульсов вводили пептид. Экспрессию 4-1BB анализирова-

ли посредством проточной цитометрии после следующего гейтирования: лимфоциты→одиночные клетки→живые клетки→CD3+mTCR+. Результаты показаны на фиг. 36.

Клетки Cos7 ($2,5 \times 10^4$ на лунку) высевали в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов. На следующий день клетки совместно трансфицировали отдельными аллелями HLA от пациента 4127. На следующий день пептид p53-G245S из 25 аминокислот под действием импульсов вводили трансфицированным клеткам Cos7. Избыток пептида смывали. Т-клетки трансдуцировали одним из TCR от пациента 4127. Трансдуцированные Т-клетки добавляли (2×10^4 клеток/лунка) для совместной культивации с клетками Cos7. Сокультуры инкубировали в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали посредством ELISA. Экспрессию 4-1BB анализировали посредством проточной цитометрии после гейтирования: лимфоциты→одиночные клетки→живые клетки→CD3+mTCR+. Результаты показаны на фиг. 37А-37С.

Последовательность TCR 4127-TP53-G245S-TCR1, которую выделяли у пациента 4127, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 30), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 31), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 32), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 27), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 28) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 29). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23). Варибельная область бета цепи (SEQ ID NO: 34) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 33) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 36) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 35) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Реактивные в отношении опухоли Т-клетки идентифицировали, как описано ниже. TCR выделяли, как описано ниже.

Название TCR: 4127-TP53-G245S-TCR1.

Распознавание мутации p53: G245S.

Способ: способ Tran.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование фрагмента TIL 4127-F10 с длинным пептидом G245S, отсортированные CD4+41BB+ Т-клетки (только ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией на одной клетке)).

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке (ниже), адаптивный Pairseq (фрагмент 4127-F10), 5'RACE из клона TIL 071.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 31,3% (наблюдалось 5 раз из 16 пар).

Ориентация TCR: бета-альфа.

Экспрессионный вектор: гамма-ретровирус.

MATRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQ
ILGQGPKLLIQEQNNGVVDSSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASS
LVNTEAFFGQGTRLTVVEDLRNVTPPKVSLFEPKSAEJANKQKATLVCLARGFFPDHVEL
SWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFWHINPRNHFRQVQFHGLSEE
DKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQOGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVV
MAMVVRKNSRAKRSVSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLLIPVLGMIFALRDAR
AQSVSQHNHHVILSEAAASLELGCNYSYGGTVNLFWYVQYPGQHLQLLLKYFSGDPL
VKGIKGFEAEFIKSKFSNLRKPSVQWSDTAEBYFCAVKGDYKLSFGAGTTVTVRANI
QNPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGA
IAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPDATLTEKSFETDMNLFQNLVIVLRILLKVA
GFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO: 543)

Статистические данные по TCR 4127-TP53-G245S-TCR1 для пациента 4127 изложены ниже в табл. 4.

Таблица 4

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	6	6,3%
CDR3бета	13	13,5%
Пары 4127-TP53-G245S-TCR1	5	5,2%
Общее число спаренных TCR	16	16,7%

Последовательность TCR 4127-TP53-G245S-TCR4, которую выделяли из пациента 4127, установлена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 40),

вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 41), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 42), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 37), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 38) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 39). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23). Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 44) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 43) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся сразу перед началом константной области альфа цепи. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 46) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 45) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Реактивные в отношении опухоли Т-клетки идентифицировали, как описано ниже. TCR выделяли, как описано ниже.

Название TCR: 4127-TP53-G245S-TCR4.

Распознавание мутации p53: G245S.

Способ: способ Tran.

Совместная культивация для идентификации TCR: совместная культивация фрагмента TIL 4127-F10 с длинным пептидом G245S, отсортированные CD4+41BB+ Т-клетки (только ОТ-ПЦР на одной клетке).

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке (ниже) и адаптивный Pairseq (фрагмент 4127-F10).

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 12,5% (наблюдали 2 раза из 16 пар).

Ориентация TCR: бета-альфа.

Экспрессионный вектор: гамма-ретровирус.

MAPGLLHWMALCLLGTGHGDAMVIQNPYQVTQFGKPVTLSCSQTLNHNVMYWY
 QQKSSQAPKLLFHYYDKDFNNEADTPDNFQSRPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYLC
 TSRELRGNEQFFGPGTRTLVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPD
 HVLSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQVQFHG
 LSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVST

LVVMAMVKKRNSRAKRSRSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLTASLLRAVIASICVV
 SSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDCVYETRDITTYLFWYKQPPSGELVFLIRNSF
 DEQNEISGRYSWNFQKSTSSFNFTTASQVVDNAVYFCALSEGGSNYKLTFGKGTLLT
 VNPNIQNPEPAVYQLKDPQSODSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDS
 KSNGLAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDATLTKESFETDMNLFQNLVIVLRIL
 LKVVAGFNLLMTRLRWSS (SEQ ID NO: 544)

Статистические данные по TCR 4127-TP53-G245S-TCR4 для пациента 4127 изложены ниже в табл. 5.

Таблица 5

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	2	2,1%
CDR3бета	39	40,6%
Пары 4127-TP53-G245S-TCR4	2	2,1%
Общее число спаренных TCR	16	16,7%

Последовательность TCR 4127_0102_TCR, которую выделяли у пациента 4127, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 50), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 51), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 52), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 47), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 48) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 49). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23). Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 54) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 53) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 56) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмер-

ная цепь альфа (SEQ ID NO: 55) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Реактивные в отношении опухоли Т-клетки идентифицировали, как описано ниже. TCR выделяли, как описано ниже.

Название TCR: 4127_O102_TCR.

Распознавание мутации p53: G245S.

Способ: способ Тран.

Совместная культивация для идентификации TCR: не проводили. TCR прямо идентифицировали из РНК клона Т-клетки (O102), используя 5'RACE. Клон разрабатывали посредством сортировки OX40+ Т-клеток и получения клонов Т-клеток посредством предельного разведения. Осуществляли скрининг клонов Т-клеток с использованием способа Тран.

Способ идентификации TCR: 5'RACE из клона TIL O102.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 100% клона Т-клетки (нет данных).

Ориентация TCR: бета-альфа.

Экспрессионный вектор: гамма-ретровирус.

MAMSIGLLCCAALSLLWAGPYNAGVTQTPKFQVLKGTGQSM^TLQCAQDMNHEYMS
WYRQDPGMGLRLIHYSV^GAGITDQGEV^PNGYNVSRSTTE^DFLRLLSAAPSQTSVYF
CASSYRESHYGYTFGSG^TRLTVVEDLRNVT^PPKVSLFEP^SKA^EIAN^KQKATLVCLARGFF
PDHVELSWVYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHINPRNHFR^CQVQF
HGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQ^OGVLSATILYEILLGKATLYAVL
VSTLVY^MAMV^KRK^NSR^AK^RSGSGATN^FSLLKQAGDVEENPGPMWGVFLLYVSMK
MGGTTGQ^NIDQPT^EMTATEGAIVQINCTYQ^TSGENGLFWYQ^HAGEAPTFLSY^NVL
DGL^EE^KGRFSSFLSR^SKGYSYLLKELQMKDSASYLCAVKWTGG^FKTI^FGAGTRLFV
KANI^QNPEPAVYQLK^DPRSQDSTLCLFTDFDSQ^INV^PK^TMESGTFITDKCVLDMKAMDSK
SNGALAWSNQT^SFTCQ^DIF^KETNATYPSSDVPC^DATL^TE^KSFETDMN^LNFQ^NLLVIVLRILL
LKVAGFNLLM^TLRLWSS (SEQ ID NO: 545)

Последовательность TCR 4127-O37-TCR, которую выделяли у пациента 4127, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 460), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 461), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 462), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 457), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 458) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 459).

Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23). Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 464) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 463) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 466) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 465) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Реактивные в отношении опухоли Т-клетки идентифицировали, как описано ниже. TCR выделяли, как описано ниже.

Название TCR: 4127-O37-TCR.

Распознавание мутации p53: G245S.

Способ: Тран способ.

Совместная культивация для идентификации TCR: не проводили. TCR прямо идентифицировали из геномной ДНК клона Т-клетки (037) с использованием адаптивных TCRA и TCRB исследований (платформа секвенирования нового поколения (NGS - от англ. next-generation sequencing)). Клон 037 разрабатывали посредством сортировки OX40+ Т-клеток и получения клонов Т-клетки посредством предельного разведения. Осуществляли скрининг клонов Т-клетки, используя способ Тран.

Способ идентификации TCR: адаптивное секвенирование TCR (NGS) клона TIL 037.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 100% клона Т-клетки (н./д.).

Ориентация TCR: бета-альфа.

Экспрессионный вектор: гамма-ретровирус.

MALLLLLLLPGISLLLLPGSLAGSGLGAVVVSQHPSWVICKSGTSSVKIECRSLDFQATTM
 FWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSS
 FYICSAAGQANTEAFFGGQTRLTVVEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARG
 FFPDHLVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQV
 QFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYA
 VLVSTLVVMAMVKKNSRAKRSRSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMHSLRVLLVILW
 LQLSWVWSQKQVEEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIM
 FIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCVNDAGNMLTEGGGTR
 LMVKPNIQNPEPAVYQLKDPQSSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKA
 MDSKSNALAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLVIV
 LRLLLLKVAGFNLLMTRLRWSS (SEQ ID NO: 546)

Пример 2.

Данный пример демонстрирует выделение и специфичную реактивность трех TCR против мутантного p53 от пациента 4196.

Эксперименты проводили, как описано для фиг. 8-11 для пациента 4196. p53-Реактивные Т-клетки для данного пациента идентифицировали способом Tran, как описано в патентной заявке США № 2017/0224800. Способ Fluidigm использовали для выделения отдельных TCR. Статистические данные для пациента 4196 показаны в табл. D.

Характеристика p53-реактивных клеток: трудности с идентификацией минимального эпитопа; первый предсказанный пептид с мутантной аминокислотой p53 R175H показан в табл. С.

Таблица С

HLA	HLA-A0201
Пептид	HMTEVVRHC (SEQ ID NO:530)
Сердцевина	HMTEVVRHC (SEQ ID NO:530)
Аффинность (нМ)	7826,06
% ранг	13,00

TMG1 в сравнении с TIL 4196-Rx1. Клетки Cos7 трансфицировали плазмидами для TMG1 и HLA аллели. Клетки совместно культивировали с инфузионным пакетом TIL 4196 Rx1 в течение 20 ч. Результаты показаны на фиг. 8А.

Минимальный пептид P53-R175H в сравнении с TIL 4196-Rx1. В сутки 4 в аутологичные DC под действием импульсов вводили либо минимальный эпитоп-кандидат (HMTEVVRHC (SEQ ID NO: 530), либо (SQHMTEVVRH (SEQ ID NO: 531)) в течение 2 ч. Клетки промывали и совместно культивировали с инфузионным пакетом TIL 4196 Rx1 в течение 20 ч. Результаты показаны на фиг. 8В.

A*02:01-рестриктированный TP53 тетрамер можно использовать для выделения TP53-реактивных клеток из инфузионного пакета TIL: Выделение TP53-реактивных клеток с использованием 4-1BB+ сортировки после совместного культивирования с пептидом TP53 было технически ограничено. Для выделения TP53-реактивных клеток получали тетрамер A*02:01-TP53. Нерелевантный тетрамер (A*02:01-gp100) получали в качестве контроля. Анализ FACS проводили с гейтированием на живых клетках, CD3+, CD8+ клетках. В случае тетрамера A*02:01-TP53 выявляли 14,9% p53 тетрамер+клеток. В случае тетрамера A*02:01- gp100 выявляли 0,7% p53 тетрамер+клеток.

Выделение и характеристика TP53-реактивных клеток: стратегия выделения и характеристики TP53-реактивных клеток выглядела следующим образом:

- (1) отсортировать тетрамер-позитивные клетки с использованием FACS, как описано выше;
- (2) провести ПЦР на одной клетке;
- (3) провести глубокое секвенирование Vβ.

Несколько клонов-кандидатов идентифицировали в отношении TP53 TCR, используя ПЦР на одной клетке, как показано в табл. D. TCR-1a и TCR-1b представляли собой альтернативные клоны-кандидаты.

Таблица D

	Кандидат TCR	CDR3 (аминокислоты)	
TCR-1a	TRBV6-1	CASSEGLWQVGDEQYF (SEQ ID NO: 72)	63,3% от 120 пар
	TRAV12-1	CVVQPGGYQKVTF (SEQ ID NO: 69)	
TCR-1b	TRBV6-1	Не функциональные	
	TRAV2		
TCR-2	TRBV11-2	CASSLDPGDTGELFF (SEQ ID NO: 92)	25,8% от 120 пар
	TRAV6	CALDIYPHDMRF (SEQ ID NO: 89)	
TCR-3	TRBV10-3	CAISELVTGDSPLHF (SEQ ID NO: 82)	9,2% от 120 пар
	TRAV38-1	CAFMGYSGAGSYQLTF (SEQ ID NO: 79)	

Плазмиды, кодирующие TCR-кандидаты, клонировали с помощью векторов MSGV1. Ретровирусную трансдукцию использовали для введения TCR в донорские лимфоциты.

Минимальный эпитоп со степенью чистоты "для ВЭЖХ" вводили под действием импульсов в сутки 4 в A*02:01 DC в течение 2 ч. DC совместно культивировали с TCR-трансдуцированными клетками в течение 20 ч. Результаты показаны на фиг. 9A-9D. Идентифицировали три разных A*02:01 рестриктированных TP53 рецептора.

Осуществляли оттаивание T2-клеток и оставляли на 24 ч, затем в них вводили под действием импульсов уменьшающиеся концентрации минимального эпитопа со степенью чистоты "для ВЭЖХ" в течение 2 ч. Затем клетки промывали и совместно культивировали с TP53 TCR-трансдуцированными клетками на протяжении 17 ч. Результаты показаны на фиг. 10A, 10B.

Следующие линии исходных опухолевых клеток трансдуцировали HLA-A*02:01: линия клеток толстой кишки - LS123 (ATCC CCL-255) с R175H, но неизвестен статус HLA-A2. Линия клеток лейкоза: CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119, лейкоз) с R175H, но неизвестен статус HLA-A2. Линия клеток молочной железы: AU-565 (ATCC CRL-2351, аденокарцинома молочной железы) с R175H, но неизвестен статус HLA-A2. Линия клеток меланомы: MEL624; эндогенная экспрессия HLA-A2 и wt R175.

Трансдуцированные опухолевые клетки-мишени собирали и высевали на утро совместного культивирования (1×10^5 клеток/лунка). Минимальный эпитоп R175H вводили под действием импульсов в клетки-мишени (ВЭЖХ, 5 мкг/мл) в течение 2 ч. Клетки дважды промывали и совместно культивировали с 2×10^4 TP53 TCR-трансдуцированными клетками на протяжении 20 ч (пациент 4196). ELISPOT IFN- γ использовали для считывания ответа. Результаты показаны на фиг. 11. Дополнительные экспериментальные данные по экспрессии клеткой-мишенью HLA-A2 и TP53 и реактивности TCR данного примера представлены в примере 15.

Последовательность TCR 4196_AV12-1_with_BV6-1, которую выделяли у пациента 4196, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 70), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 71), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 72), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 67), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 68) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 69). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 24). Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 74) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 73) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 76) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 75) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Реактивные в отношении опухоли T-клетки идентифицировали, как описано ниже.

Название TCR: 4196_AV12-1_with_BV6-1.

Распознавание мутации p53: R175H.

Способ: Тран способ.

MAIGLLCCVAFSLLWASPVNAGVTQTPKFQVLKGTQSMTLQCAQDMNHNSMYWY
 RQDPGMGLRLIYYSASEGTTDKGEVPNGYNVSRNLNKRFLRLESAAPSQTSVYFCA
 SSEGLWQVGDQYFGPGTRTLVTE~~DLRNVTPPKVSLFEP~~SKAEIANKQKATLVCLARGF
 FPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP~~RNHFR~~CQVQF
 FHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAV
 LVSTLVVMAVYKRRKNSRAKRS~~SGS~~GATNFSLLKQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWL
 QLSWVWSQRKEVEQDPGFNVPEGATVAFNCTYSNSASQFFWYRQDCRKEPKLL
 MSVYSSGNEDGRFTAQLNRSQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVQPGGYQKVTFTGTGT
 KLQVIPDIQNPEPAVYQLKDP~~RSQ~~STLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKA
 MDSKSN~~GAL~~AWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLFQNL~~L~~VIV
 LRILLK~~VAG~~FNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO: 547)

Последовательность TCR 4196_AV38-1_with_BV10-3, которую выделяли у пациента 4196, установлена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнута область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 80), вторая подчеркнута область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 81), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 82), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 77), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 78) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 79). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 24). Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 84) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 83) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 86) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 85) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, как описано ниже.

Название TCR: 4196_AV38-1_with_BV10-3.

Распознавание мутации p53: R175H.

Способ: способ Tran.

MATRLFFVVALC~~LL~~WTGHMDAGITQSPRHKVTETGTPVTLRCHQTENHRYMYWYR
 QDPGHGLRLIHYSYG~~V~~KD~~TD~~KGEVSDGYSVSRKTEDFLLTLESATSSQTSVYFCAIS
 ELVTGDSPLH~~F~~GN~~G~~TRTLVTE~~DLRNVTPPKVSLFEP~~SKAEIANKQKATLVCLARGFFPDH
 VELS~~W~~WVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP~~RNHFR~~CQVQF~~F~~HGL
 SEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTL
 VVMAVYKRRKNSRAKRS~~SGS~~GATNFSLLKQAGDVEENPGPMTRVSLWAVVYSTCLE
 SGMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTL~~S~~CTYDTSEN~~N~~YLFWYKQPPSRQMILVIRQEA
 YKQONATENRFSVNFQKA~~A~~KSFSLKISDSQLGDTAMYFCAFMGYSGAGSYQLTFGK
 GTKLSVIPDIQNPEPAVYQLKDP~~RSQ~~STLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMK
 AMDSKSN~~GAL~~AWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLFQNL~~L~~VI
 VLRILLK~~VAG~~FNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO: 548)

Последовательность TCR 4196_AV6_with_BV11-2, которую выделяли у Пациента 4196, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 90), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 91), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 92), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 87), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 88) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 89). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 24). Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 94) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу после начала константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 93) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 96) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 95) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, как описано ниже.

Название TCR: 4196_AV6_with_BV11-2.

Распознавание мутации p53: R175H.

Способ: способ Tran.

MATRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIEKRSVAFWCNPISGHATLYWYQQ
 ILGQGPKLLIQFQNGVVDSDLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASS
 LDPGDTGELFFGEGSRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDH
 VELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCPVQFHGL
 SEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTL
 VVMAMVKKRNSRAKRSRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMESFLGGVLLILWLQVD
 WVKSQKIEQNSEALNIQEGKTATLTCNYTNYSPAYLQWYRQDPGRGPFVLLIRENE
 KEKRKERLKVTFDITLTKQSLFHITASQPADSATYLCALDIYPHDMRFGAGTRLTVKP
 DIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSSKN
 GAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDATLLEKSFETDMNLNFQNLVIVLRILLK
 VAGFNLLMTRLRWSS (SEQ ID NO: 549)

Пример 3.

Данный пример демонстрирует выделение одиннадцати TCR против мутантного p53 у пациента 4238. Эксперименты проводили, как описано для фиг. 12-15 для пациента 4238.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равно 24) от пациента 4238 совместно культивировали с аутологичными APC, подвергавшимися электропорации TMG, состоящими из нерелевантной или мутантной p53 последовательности. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 12. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов→живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на фиг. 14.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4238 совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO) или очищенный (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептид из 25 аминокислот, состоящий из мутантной последовательности p53-R248Q. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 13. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования для лимфоцитов→живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на фиг. 15.

Фрагменты TIL F10, F11 и F17 являются источниками TCR после сортировки CD8+41BB+ Т-клеток.

Последовательность TCR 4238-F10-TCR1, которую выделяли у пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 207), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 208), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 209), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 210), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 211) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 212). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 213) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся прямо перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 214) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 215) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 216) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Названием TCR: 4238-F10-TCR1.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4238-F10 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией на одной клетке (ОТ-ПЦР).

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 25,0% (наблюдали 3 раза из 12 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MATASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDVCVYETRDITTYLFW
 YKQPPSGELVFLIRRNSEFDEQNEISGRYSWNFQKSTSSFNFTITASQVVD~~SAVYFCALS~~
~~EVDSGNTPLVFGKGT~~RLSVIANIQNPEPAVYQLKDPKSTLCLFTDFDSQINVPKTE
 SGTFTDKCVLDMKAMDSKNGALAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTKESF
 ETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDV
EENPGPMHFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCS~~PRSGDLSV~~
 YWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSELELGD~~SALY~~
 FCASSVGS~~SSSTDTQYF~~GPGR~~TLTVLEDLRNVT~~PPK~~VSLF~~EP~~SKAEIANKQ~~KATLVCLAR
 GFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV~~SATFWHNP~~RNHFR~~CQ~~
 VQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQ~~QGVLSATILYEILLG~~KATLY
 AVLVSTLVVMAMV~~KRKNS~~ (SEQ ID NO: 550)

Статистические данные по TCR 4238-F10-TCR1 для пациента 4238 изложены ниже в табл. 6.

Таблица 6

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	4	4,2%
CDR3бета	4	4,2%
Пары 4238-F10-TCR1	3	3,1%
Общее число спаренных TCR	12	12,5%

Последовательность TCR 4238-F10-TCR2, которую выделяли у пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 217), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 218), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 219), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 220), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 221) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 222). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 223) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 224) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 225) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 226) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся C-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4238-F10-TCR2.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4238-F10 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 25,0% (наблюдали 3 раза из 12 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MATASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDVCVYETRDITTYLFW
 YKQPPSGELVFLIRRNSEFDEQNEISGRYSWNFQKSTSSFNFTITASQVVD~~SAVYFCALS~~
~~EVDSGNTPLVFGKGT~~RLSVIANIQNPEPAVYQLKDPKSTLCLFTDFDSQINVPKTE
 SGTFTDKCVLDMKAMDSKNGALAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTKESF
 ETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDV
EENPGPMHFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCS~~PRSGDLSV~~
 YWYQQSLDQGLQFLIHYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSELELGD~~SALY~~
 FCASSVGS~~SSSTDTQYF~~GPGR~~TLTVLEDLRNVT~~PPK~~VSLF~~EP~~SKAEIANKQ~~KATLVCLAR
 GFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV~~SATFWHNP~~RNHFR~~CQ~~
 VQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQ~~QGVLSATILYEILLG~~KATLY
 AVLVSTLVVMAMV~~KRKNS~~ (SEQ ID NO: 551)

Статистические данные по TCR 4238-F10-TCR2 для пациента 4238 изложены ниже в табл. 7.

Таблица 7

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	4	4,2%
CDR3бета	4	4,2%
Пары 4238-F10-TCR2	3	3,1%
Общее число спаренных TCR	12	12,5%

Последовательность TCR 4238-F10-TCR3, которую выделяли у пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 227), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 228), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 229), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 230), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 231) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 232). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 233) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 234) включает последовательность, начинающуюся прямо после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 235) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 236) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

T-клетки, реактивные в отношении опухоли, идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4238-F10-TCR3.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4238-F10 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+ T-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди спаренных TCR: 58,3% (наблюдали 7 раз из 12 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFM
WYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAM
TSPYNNNDMRFEGAGTRLTVKPNIQNPEPAVYQLKDPQSODSTLCLFTDFDSQINVPKTM
ESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLEKS
FETDMNLNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLKQAGD
VEENPGPMHLLLLLLGPGISLLLPGLAGSGLGAVVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSL

DFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTSTLTVT
SAHPEDSSFYICSGGLEEAARQFIGPGRTRTLVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKAT
LVCLARGFFPDHVELSWVYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHINPRN
HFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILL
GKATLYAVLVSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 552)

Статистические данные по TCR 4238-F10-TCR3 для пациента 4238 изложены ниже в табл. 8.

Таблица 8

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	16	16,7%
CDR3бета	26	27,1%
Пары 4238-F10-TCR3	7	7,3%
Общее число спаренных TCR	12	12,5%

Последовательность TCR 4238-F10-TCR4, которую выделяли у пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 237), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 238), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 239), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 240), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 241) и шестая под-

черкнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 242). Область, выделенная жирным шрифтом (SEQ ID NO: 26), представляет собой линкер. Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 243) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 244) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 245) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 246) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Т-клетки, реактивные в отношении опухоли, идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4238-F10-TCR4.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4238-F10 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+ Т-клетками.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 58,3% (наблюдалось 7 раз из 12 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFM
WYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAM
TSPYNNNDMRFEGAGTRTLTVKPNIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFDFDSDQINVPKTM
ESGTFITDKCVLDMKAMDSSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCD~~ATL~~TEKS
FETDMNLFQ~~NLLVIVLR~~ILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGD
VEENPGPMHLLLLLGPAGSGLGAVVVSQHPSRVICKSGTSVKIECRSL~~DFQAT~~TMFW
YRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYI
CSGGL~~EEAARQ~~FIGPGTRTLVLEDL~~RNVTPPKVSL~~FEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFP
DHVELS~~WWYNGKEVHSGVCTDPQ~~AYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP~~RNHFR~~CQVQFH
GLSEEDKWPEGSPK~~PVTQ~~NISAEAWGRADCGITSASYQ~~QGVLSATILYEILLG~~KATLYAVLV
STLVVMAMV~~KR~~KNS (SEQ ID NO: 553)

Статистические данные для TCR 4238-F10-TCR4 для пациента 4238 изложены ниже в табл. 9.

Таблица 9

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	16	16,7%
CDR3бета	26	27,1%
Пары 4238-F10-TCR4	7	7,3%
Общее число спаренных TCR	12	12,5%

Последовательность TCR 4238-F11-TCR1, которую выделяли у пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 247), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 248), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 249), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 250), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 251) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 252). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область альфа цепи (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 253) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 254) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 255) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная часть бета (SEQ ID NO: 256) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4238-F11-TCR1.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4238-F11 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 25,0% (наблюдали 3 раза из 12 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MALVARVTVFLTFGTIIDAKTTQPPSMDCAEGRAANLPCNHSTISGNEYVYVYRQIH
SQGPQYIIHGLKNNETNEMASLIHEDRKSSTLILPHATLRDTAVVYVCIVPNDYKLSFG
AGTTVTVRANIQNPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLD
MKAMDSKSNAGIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDATLTKESFETDMNINPQNL
LVIVLRILLKVAGFNLLMTRLRLWSSRAKRSRSGGATNFSLKQAGDVEENPGPMHIRL
LCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGL
GLRLIYFSYDVKMKKEKGDIPGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFGTGSJ
QETQYFEGPGRLLVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSW
WVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRIHFRQVQVHGLSEEDK
WPEGSPKPYTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMA
MVKRKNS (SEQ ID NO: 554)

Статистические данные по TCR 4238-F11-TCR1 для пациента 4238 изложены ниже в табл. 10.

Таблица 10

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	5	5,2%
CDR3бета	3	3,1%
Пары 4238-F11-TCR1	3	3,1%
Общее число спаренных TCR	12	12,5%

Последовательность TCR 4238-F11-TCR2, которую выделяли у пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 257), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 258), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 259), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 260), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 261) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 262). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 262). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 263) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 264) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области бета цепи. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 265) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 266) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Т-клетки, реактивные в отношении опухоли, идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4238-F11-TCR2.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4238-F11 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 25,0% (наблюдали 3 раза из 12 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAYSPGLVSLILLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEEAFLTINCTYATATGYPSLFWYVQ
YPGEGQLLLKATKADDKGSNKGFEATYRKETTFSHLEKGSVQVSDSAVYFCALNP
NAGGTSYGLTFEGQGTILT VHPNIQNPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKT
MESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDATLTK

*KSFETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAG
 DVEENPGPMHPRLFWALLCCLGTGPVEAGVTQSPHTLIKTRGQQATLRCSPISGHT
 SVYWYQQALGLGLQFLLWYDEGEERNRGNFPFRFSGRQFPNYSSSELNVNALELEDS
 ALYLCASSPGATSGGANTGELFFEGEGSRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQK
 ATLVLCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP
 RNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEI
 LLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 555)*

Статистические данные по TCR 4238-F11-TCR2 для пациента 4238 изложены ниже в табл. 11.

Таблица 11

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	5	5,2%
CDR3бета	8	8,3%
Пары 4238-F11-TCR2	3	3,1%
Общее число спаренных TCR	12	12,5%

Последовательность TCR 4238-F11-TCR3, которую выделяли у пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 267), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 268), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 269), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 270), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 271) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 272). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 273) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 274) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 275) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 276) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4238-F11-TCR3.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4238-F11 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦП на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 16,7% (наблюдали 2 раза из 12 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

*MATFAGFSFLFLWLQDCMSRGEDVEQSLFSLVREGDSSVINCTYTPDSSSTYLYWYK
 QEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEIP
 RDSGGGADGLTFGKGTLLIHPNIQNPEPAVYQLKDPKRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTM
 ESGTFTDKCVLDMKAMDSSKNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDADLLEKTS
 FETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGD
 VEENPGPMHLLLLLLGPGISLLLPGLAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSL
 DFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVKDKFLINHASLTLSTLTVT
 SAHPEDSSFYICARDLQRSYEQYFGPGTRTLVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQK
 ATLVLCLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP
 RNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEI
 LLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 556)*

Статистические данные по TCR 4238-F11-TCR3 для пациента 4238 изложены ниже в табл. 12.

Таблица 12

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	4	4,2%
CDR3бета	2	2,1%
Пары 4238-F11-TCR3	2	2,1%
Общее число спаренных TCR	12	12,5%

Последовательность TCR 4238-F11-TCR4, которую выделяли у пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 277), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 278), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 279), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 280), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 281) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 282). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 283) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 284) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 285) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 286) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4238-F11-TCR4.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4238-F11 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способы идентификации TCR: ОТ-ПЦП на одной клетке.

Распознавание TCR среди всех спаренных TCR: 16,7% (наблюдали 2 раза из 12 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MATFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYK
 QEPGAGLQLLTYIFSNMMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEIP
 RDSGGGADGLTFGKGTLLIIPNIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTM
 ESGFTITDKCVLDMKAMDSSKNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKS
 FETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGD
VEENPGPMHLLLLLLGPAAGSGLGAVVVSQHPSRVICKSGTSVKIECRSLDFQATMFWY
 YRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYI
 CSARDLQRSYEQYFGPGTRTLTVTEDLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFF
 PDHVELSWVYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQVQF
 HGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGHYSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL
 VSTLVVMAMVYKRKNS (SEQ ID NO: 557)

Статистические данные по TCR 4238-F11-TCR4 для пациента 4238 изложены ниже в табл. 13.

Таблица 13

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	4	4,2%
CDR3бета	2	2,1%
Пары 4238-F11-TCR4	2	2,1%
Общее число спаренных TCR	12	12,5%

Последовательность TCR 4238-F17-TCR1, которую выделяли у пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 287), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 288), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 289), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 290), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 291) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 292). Область, выделенная жирным шриф-

том, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 293) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 294) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 295) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 296) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4238-F17-TCR1.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4238-F17 с длинным пептидом R248Q, сортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 33,3% (наблюдали 2 раза из 6 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAGIRALFMYLWLQLDWVSRGESVGLHLPTLSVQEGDNSIINCAYSNSASDYFIWY
KQESGKGPQFIIDIRSNMDKROGQRVTVLLNKTVKHLSLQIAATQPGDSAVYFCAEP
YGGLNSGYALNEGKGTSLLVTPNQNPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKT
MESGTFITDKCVLDMKAMDSSKNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDADLLE
KSFETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMLRLWSSRAKRSGSGATNFSLKQAG
DVEENPGPMHPGLLCWVLLCCLGAGPVDAGVTQSPHILIKTRGQQVTLRCSPISGH
KSWSWYQQVVLGGPQFIFQYYEKEERGRGNFPDRFSARQFPNYSELNVNALLGDS
ALYLCASSGGRTSGAYEQFFGPGTRTLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLV
CLARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYCYLSSRLRVSATFWHNP
FRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGHITSASYQQGVLSATILYEILLG
KATLYAVLVSTLVMMAMVKRKN (SEQ ID NO: 558)

Статистические данные по TCR 4238-F17-TCR1 для пациента 4238 изложены ниже в табл. 14.

Таблица 14

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	3	3,1%
CDR3бета	2	2,1%
Пары 4238-F17-TCR1	2	2,1%
Общее число спаренных TCR	6	6,3%

Последовательность TCR 4238-F17-TCR2, которую выделяли у пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 297), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 298), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 299), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 300), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 301) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 302). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 303) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 304) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 305) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 306) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Т-клетки, реактивные в отношении опухоли, идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4238-F17-TCR2.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4238-F17 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+T-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 33,3% (наблюдали 2 раза из 6 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSP^{AK}EALRLQEGESSLNC^{SY}TVSGLRGLFW
 YRQDPGKGP^{EFL}FTLYSAGEEKEKERL^{KAT}LT^{TK}KESFLHITAPKPEDSATYLCAVTAH
 RGSTLGRLYEGRGTQLTVWPNIQNPEPAVYQLKDP^{RS}QDSTLCLFTDFDSQINVPK^{TME}
 SGTFTTDKCVLDMKAMDSKSN^{GA}I^{AW}SNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVP^{CD}ATL^{TE}KSF
 ETDMNLFQ^{NLL}VIVLRILLK^{VAG}FNLLMTLRLWSSRAK^{RS}SGGATNFSLLKQAGDV
 EENPGPMHPGLLCWALLCLL^{GAG}LYDAGVTQSPTHL^{IK}TRGQQT^{LR}CS^{PK}SGHDT
 VSWYQQALGQGPQFIFQY^{EEEE}RQRGNFPDRFSGHQFPNYSS^{EL}NVNALLLGD^{SAL}
 YLCASSRRGGAYNEOFFGPGTR^{LT}VLEDLRNVT^{PP}KVSLFEP^{SK}AEIANKQKATLVCLAR
 GFFPDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHINPRNHFR^{CQ}
 VQFHGLSEEDKWPEGSPK^{PVT}Q^{NI}SAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLY
 AVLSTLVVMAMV^{KR}KNS (SEQ ID NO: 559)

Статистические данные по TCR 4238-F17-TCR2 для пациента 4238 изложены ниже в табл. 15.

Таблица 15

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	6	6,3%
CDR3бета	2	2,1%
Пары 4238-F17-TCR2	2	2,1%
Общее число спаренных TCR	6	6,3%

Последовательность TCR 4238-F17-TCR3, которую выделяли у пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 307), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 308), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 309), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 310), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 311) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 312). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 313) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 314) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 315) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 316) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4238-F17-TCR3.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4238-F17 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+ T-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 33,3% (наблюдали 2 раза из 6 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAKNPLAAPLLILWFHLDVCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFPSSNFYALHWY
 RWETAKSPEALFVMTLNGDEKKGGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCASV
 GGGADGLTFGKGTHLIQPNIQNPEPAVYQLKDPKSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESG
 TFITDKCVLDMKAMDSSKNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLIEKSFET
 DMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEE
 NPGPMHTRLLFWVAFCLLGADHTGAGVVSQSPSNKVTEKGKDVLCRCDPISGHTALY
 WYRQSLGQGLEFLIYFQGNAPDKSGLPSDRFSAERTGGSVSTLTIQRTQQEDSAVYL
 CASTWDRGSYNEQFFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARG
 FFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQV
 QFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYA
 VLVSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 560)

Статистические данные по TCR 4238-F17-TCR3 для пациента 4238 изложены ниже в табл. 16.

Таблица 16

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	2	2,1%
CDR3бета	2	2,1%
Пары 4238-F17-TCR3	2	2,1%
Общее число спаренных TCR	6	6,3%

Пример 4.

В данном примере продемонстрировано выделение двух TCR против мутантного p53 у пациента 4253. Эксперимент проводили, как описано для фиг. 16 для пациента 4253.

Фрагменты TIL (F1-F24; n равен 24) от пациента 4253 совместно культивировали с аутологичными APC,

- (1) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО);
- (2) в которые под действием импульсов вводили очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из мутантной последовательности p53-R248W;
- (3) которые подвергались электропорации нерелевантным TMG; или
- (4) которые подвергались электропорации p53-mut-TMG, содержащим мутантную последовательность p53-R248W.

Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секретию IFN-γ оценивали посредством ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 16. F15 отбирали для сортировки TCR, поскольку он был реактивным в отношении и p53-mut-TMG и длинного пептида p53-R248W.

Последовательность TCR 4253-TIL-TCR1, которую выделяли у пациента 4253, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1α (SEQ ID NO: 187), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2α (SEQ ID NO: 188), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3α (SEQ ID NO: 189), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1β (SEQ ID NO: 190), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2β (SEQ ID NO: 191) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3β (SEQ ID NO: 192). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 193) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа.

Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 194) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 195) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 196) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4253-TIL-TCR1.

Распознавание мутации p53: R248W.

Способ: сокращенный универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53 (оценивали только мутантный TMG и длинный пептид R248W).

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4253-F15 с длинным пептидом p53-R248W, отсортированные CD3+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦП на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 5,6% (наблюдали 2 раза из 36 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAKCPQALLAIFWLLLSWVSSSEDKVVQSPLSLVVHEGDTVTLNCSYEVTNFRSLLW
 YKQEKKAPTFLFMLTSSGIEKKSGRLLSSILDKKELSSILNITATQTGDSAIYLCAGONY
 GGSQGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESG
 TFITDKCVLDMKAMDSKSNGALAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLLEKSFET
 DMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLKQAGDVEE
 NPGPMHTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFY
 WYRQILGQKVEFLVSFYNNSEIKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKRSTKLEDSAMYFC
 ASRDPAYEQYEGPGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPD
 HVLSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPVPRNHFRCCVQFHG
 LSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVST
 LVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 561)

Статистические данные по TCR 4253-TIL-TCR1 для пациента 4253 изложены ниже в табл. 17.

Таблица 17

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	55	100%
CDR3альфа	3	5,5%
CDR3бета	2	3,6%
Пары 4253-TIL-TCR1	2	3,6%
Общее число спаренных TCR	36	65,5%

Последовательность TCR 4253-TIL-TCR2, которую выделяли у пациента 4253, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 197), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 198), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 199), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 200), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 201) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 202). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 203) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 204) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 205) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 206) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4253-TIL-TCR2.

Распознавание мутации p53: R248W.

Способ: сокращенный универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53 (оценивали только мутантный TMG и R248W длинный пептид).

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4253-F15 с длинным пептидом p53-R248W, отсортированные CD3+41BB+Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦП на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 91,7% (наблюдали 33 раза из 36 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MASLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFW
 YRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIIRDSQPSDSATYLCAVNP
 PVKTSYDKVIFGPGTSLVIPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMES
 GTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLLEKSFET
 TDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLKQAGDVEE
 ENPGPMHTSLLCWVVLGFLGTDHTGAGVQSQSPRYKVTKRGQDVALRCDPISGHVSL
 YWYRQALGQGPEFLTYFNIEAQQDKSGLPNDRFSAERPEGSISTLTIQRTEQRDSAM
 YRCASSHREPHTGELFFEGESRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLAR
 GFFPDHVLSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPVPRNHFRCCV
 VQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLY
 AVLVSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 562)

Статистические данные по TCR 4253-TIL-TCR2 для пациента 4253 изложены ниже в табл. 18.

Таблица 18

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	55	100%
CDR3альфа	35	63,6%
CDR3бета	33	60,0%
Пары 4253-TIL-TCR2	33	60,0%
Общее число спаренных TCR	36	65,5%

Пример 5.

В данном примере продемонстрирована идентификация Т-клеток против мутантного р53 у пациента 4273 в результате совместного культивирования аутологичных APC, в которых была вызвана экспрессия мутантного р53, с аутологичными Т-клетками ("универсальный скрининг мутаций горячих точек р53"). В данном примере также продемонстрировано выделение двух TCR против мутантного р53 у пациента 4273.

Эксперименты проводили, как описано для фиг. 17-20 и 56-60 для пациента 4273.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4273 совместно культивировали с аутологичными APC, которые подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной, WT р53 или мутантной р53 последовательности. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секретию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 17. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам→живым клеткам (PI-негативным)→CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на фиг. 18.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4273 совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT р53-R248 или мутантной последовательности р53-R248W. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секретию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 19. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам→живым клеткам (PI-негативным)→CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на фиг. 20.

Для пациента 4273 F15 представлял собой наиболее реактивный фрагмент, и ответы F15 на LP и TMG были сопоставимы и в основном с CD4 Т-клетками. Таким образом, 4273-F15 совместно культивировали с APC, в которые под действием импульсов вводили LP R248W, и на следующий день CD4+41BB+ Т-клетки отсортировывали в виде одиночных клеток в лунки 96-луночного ПЦП-планшета в количестве одна клетка на лунку. В каждой лунке ПЦП-планшета имеется раствор для ОТ-ПЦП, где амплифицируются CDR3 области цепей альфа и бета TCR в одном и том же растворе. Затем лунки планшета разбивают на два 96-луночных ПЦП-планшета, и проводят второй раунд ПЦП для амплификации либо CDR3 α , либо CDR3 β в виде отдельных реакций. ПЦП-продукты из каждой лунки (всего 192 ПЦП-продукта, расположенных в каждой лунке - альфа или бета) секвенируют посредством секвенирования по Сэнгеру. Нуклеотидную последовательность вводят в IMGT/V-QUEST (imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanTcR), Ig-Blast (ncbi.nlm.nih.gov/igblast/igblast.cgi?CMD=Web&SEARCH_TYPE=TCR&LINK_LOC=igt) и транслируют посредством ExPasy (web.expasy.org/translate/). Определяют переменное семейство и сливают с CDR3 и соединением (J или DJ) из транслированной последовательности. Переменную последовательность сливают с мышинной константной последовательностью, и реконструированные TCR α и TCR β связываются посредством линкера фурин-гибкий-P2A (RAKR-SGSG-ATNFSLLKQAGDVEENPGP) (SEQ ID NO: 26). Затем последовательность синтезируют в ДНК de novo и клонируют в экспрессионный вектор (гамма-ретровирус или SLEEPING BEAUTY (SB) транспозон (Университет Миннесоты, Minneapolis, MN)). Затем Т-клетки заставляют экспрессировать TCR, используя стандартные протоколы вирусной трансдукции или невирусной транспозиции, и Т-клетки, экспрессирующие муринизированные TCR (как выявлено посредством константной цепи TCR β мыши), тестируют на предмет предполагаемого пептида.

Аутологичные APC трансфицировали TMG, кодирующим нерелевантные мутации, последовательности WT р53 или мутантные последовательности р53, включая р53-R248W. Только среды и РМА и иономицин представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно. TIL от пациента 4273 (культуры фрагментов 8 и 15) совместно культивировали в течение ночи при 37°C с TMG-трансфицированными APC. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования для лимфоцитов→живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на фиг. 56.

В аутологичные APC под действием импульсов вводили пептиды из 25 аминокислот, соответствующие WT или мутантному р53-R248W неопитопу, в течение 2 ч при 37°C. TIL от пациента 4273 (культура фрагмента 15) со специфичностью к р53-R248W совместно культивировали в течение ночи при 37°C с APC, в которые под действием импульсов вводили пептид APC. ДМСО являлся носителем пептида. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования для лимфоцитов → живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на фиг. 57.

В аутологичные APC под действием импульсов вводили пептиды из 15 аминокислот из неопитопа

p53-R248W с перекрыванием 14 аминокислот. TIL от пациента 4273 (культура фрагмента 15) со специфичностью к p53-R248W совместно культивировали в течение ночи при 37°C с APC, в которые под действием импульсов вводили пептид. ДМСО представлял собой носитель пептида, только среды (только Т-клетки) и PMA и иономицин представляли собой контроли. Пептиды из 25 аминокислот (wt p53-R248 и мутантный p53-R248W) представляли собой дополнительные контроли для пептидов из 15 аминокислот. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов→живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток)→CD4+CD8-. Результаты показаны на фиг. 58.

Клетки Cos7 ($2,5 \times 10^4$ /лунка) высевали в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов. На следующий день, клетки совместно трансфицировали индивидуальными аллелями HLA от пациента 4273 и либо TP53 TMG дикого типа, либо мутантным TP53 TMG, с или без неоантигена p53-R248W соответственно. На следующий день TIL со специфичностью к p53-R248W от пациента 4273 (культура фрагмента 15) совместно культивировали с трансфицированными клетками Cos7 в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали посредством ELISA. Результаты показаны на фиг. 59.

Т-клетки, экспрессирующие имитацию (без TCR) или 4273-TCR1a2, совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности дикого типа p53-R248 или мутантных последовательностей p53-R248W. Только среды и PMA и иономицин представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали посредством ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 60.

Последовательность TCR 4273-TP53-R248W-TCR1a1, которую выделяли у пациента 4273, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 437), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 438), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 439), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 440), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 441) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 442). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 443) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 444) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 445) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 446) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Название TCR: 4273-TP53-R248W-TCR1a1.

Распознавание мутации p53: R248W.

Способ: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

MASLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGQSOSFFW
YRQYSKGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCAVTL
CGGYNKLIFGAGTRLAVHPNIQNPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMES
GTFITDKCVLDMKAMDSKNGALAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPPCDATLLEKSF
TDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVE
ENPGPMHINQVLCVVLCCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCEQNLNHDA
MYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIVEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAF
YLCASSSRDYEQYFGPGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFF
PDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQF
HGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL
VSTLVVMAMVKKNS (SEQ ID NO: 563)

Последовательность TCR 4273-TP53-R248W-TCR1a2, которую выделяли из пациента 4273, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 447), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 448), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 449), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 450), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 451) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 452). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 453) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи

бета (SEQ ID NO: 454) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 455) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 456) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Название TCR: 4273-TP53-R248W-TCR1a2.

Распознавание мутации p53: R248W.

Способ: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

MASLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFW
YRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCAVTL
SGGYNKLIJEGAGTRLAVHPNIQNPEPAVYQLKDPKSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMES
GTFTTDKCVLDMKAMDSKSNAGALAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDATLTKESFE
TDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVE
ENPGPMHNQVLCVVLFCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCSEQNLNHDA
MYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIVEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAF
YLCASSSRDYEQYFPGPTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFF
PDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPVPRNHFRCQVQF
HGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL
VSTLVVMAMVVRKNS (SEQ ID NO: 564)

Статистические данные по TCR Пациента 4273 изложены ниже в табл. 19. В табл. 19 всего 96 лунок отсортировали с 41BB+ Т-клетками после совместного культивирования с мутантным белком p53 (TMG или пептид). В 77 лунках имелись продуктивные пары (а именно имелась (1) последовательность и (2) отсутствовали стоп-кодона в данной последовательности) с частотой образования пар 80,2%. 43 из тех пар представляли собой комбинацию CDR3A/CDR3B с получением 4273-TP53-R248W-TCR1a1 (55,8% продуктивных пар). 30 из тех пар представляли собой комбинацию CDR3A/CDR3B с получением 4273-TP53-R248W-TCR1a2 (39% продуктивных пар). В итоге CDR3A и CDR3B для 4273-TP53-R248W-TCR1a1 обнаруживались 50 и 83 раз соответственно из 96 лунок. В итоге, CDR3A и CDR3B для 4273-TP53-R248W-TCR1a2 обнаруживались 33 и 83 раза соответственно из 96 лунок.

Таблица 19

Название TCR	4273-TP53-R248W-TCR1a1	4273-TP53-R248W-TCR1a2
CDR3a	CAVTLCCGGYNKLIF (SEQ ID NO: 439)	CAVTLGGYNKLIF (SEQ ID NO: 449)
CDR3b	CASSSRDYEQYF (SEQ ID NO: 442)	CASSSRDYEQYF (SEQ ID NO: 452)
Общее число лунок	96	
Общее число пар CDR3a/CDR3b	77	
% спаренных	80,21%	
# раз CDR3a	50	33
# раз CDR3b	83	83
спаренные CDR3a/CDR3b	43	30
% спаренных CDR3a/CDR3b пар	55,84%	38,96%

Пример 6.

Данный пример демонстрирует идентификацию Т-клеток против мутантного p53 у пациента 4149. Данный пример также демонстрирует выделение и специфичную реактивность одного TCR против мутантного p53 у пациента 4149.

Эксперименты проводили, как описано для фиг. 21-24, для пациента 4149. TCR обнаруживали, используя способ Гран. TCR затем использовали для проверки способа "универсального скрининга мутаций горячих точек p53".

TCR (4149-TCRa2b1 или 4149-TCRa2b2) переносили в аутологичные PBL от пациента 4149 и совместно культивировали с аутологичными APC, которые (1) подвергали электропорации TMG, состоящим из нерелевантной, WT p53 или мутантной p53 последовательности, или (2) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-Y220 или мутантной последовательности p53-Y220C. Комбинация РМА и иономицина представляла собой положительный контроль. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секретию IFN-γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 21. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством цитометрии после гей-

тирования в отношении лимфоцитов→живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток)→CD4+ mTCR+ (Т-клеток с переносом TCR). Результаты показаны на фиг. 22.

Также определяли процентное содержание CD4+4-1BB+ клеток посредством глубокого секвенирования TCRAD и TCRB глубокого секвенирования. Результаты показаны в табл. E.

Таблица E

Название TCR	% CD4+41BB посредством глубокого секвенирования TCRAD	% CD4+41BB посредством глубокого секвенирования TCRB
4149-TCR-a2b1	20%	66%
4149-TCR-a2b2	20%	18%

Картирование предполагаемого минимального эпитопа p53^{Y220C}, распознаваемого 4149-F11: в аутологичные клетки DC под действием импульсов вводили пептид (10 мкг/мл) и оставляли на ночь в гранулоцитарно-макрофагальном колониестимулирующем факторе (GM-CSF - от англ. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) и IL-4. TIL оставляли на 2-3 суток в 500 CU/мл IL-2. 2×10^4 TIL и 10^5 клеток-мишеней совместно культивировали в течение ночи при 37°C. IFN- γ измеряли посредством ELISPOT. Результаты показаны в табл. F. Экспрессию 4-1BB измеряли посредством FACS со следующим гейтированием: лимфоциты/PI(негат.)CD3+/CD3+CD4+. Результаты показаны на фиг. 23.

Таблица F

№ Пептида	Результат ELISPOT, позитивный (+) или негативный (-) в отношении продукции IFN- γ	Пептид	SEQ ID NO:
0	-	Носитель	неприменимо
1	+	DRNTFRHSVVVPCEP	508
2	+	RNTFRHSVVVPCEPP	509
3	+	NTFRHSVVVPCEPPE	510
4	+	TFRHSVVVPCEPPEV	511
5	+(слабый)	FRHSVVVPCEPPEVG	512
6	-	RHSVVVPCEPPEVGS	513
7	-	HSVVVPCEPPEVGS	514
8	-	SVVVVPCEPPEVGS	515
9	-	VVVVPCEPPEVGS	516
10	-	VVVPCEPPEVGS	517
11	-	VVPCEPPEVGS	518

Клетки Cos7 (2,5×10 на лунку) высевали в лунки плоскостонных 96-луночных планшетов. Спустя 20 ч, клетки совместно трансфицировали индивидуальными аллелями HLA с или без TMG. Спустя 20 ч, параллельно аутологичные клетки DC трансфицировали TMG. Осуществляли совместную трансфекцию всеми аллелями HLA класса II в одном наборе лунок с или без TMG. В клетки, нетрансфицированные TMG, под действием импульсов вводили 15-мерный пептид p53-Y220C в течение 2-3 ч при 37°C в количестве 10 мкг/мл. После промывки Т-клетки с переносом 4149-TCRa2b2 (10^5) в сутки+14 второго REP добавляли в лунки и совместно культивировали в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ измеряли посредством ELISA. Результаты показаны на фиг. 24. Предсказание (табл. G) посредством NetMHCIIpan: cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/.

Таблица G

HLA	Пептид	Аффинность, нМ	Ранг
DRB3*02:02	NTFRHSVVVPCEPPE (SEQ ID NO: 510)	433,8	17

Экспрессию DRB3*02 выявляли у 1367 из 3719 (37%) DRB_типированных пациентов в базе данных HLA NCI и у 5 из 9 (56%) пациентов с раком эндометрия и яичника при NCI-SB. Сообщаемая частота аллели DRB3*02 является очень высокой, как описано в примере 1.

Последовательность TCR 4149TCRa2b2, которую выделяли у пациента 4149, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 57), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 58), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 59), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 60), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 61) и шестая подчерк-

нутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 62). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 63) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 64) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 65) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 66) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. р53-реактивные клетки для данного пациента идентифицировали способом транскриптинга, как описано в заявке США № 2017/0224800.

Название TCR: 4149TCRa2b2.

Распознавание мутации р53: Y220C.

Способ скрининга: Использовали для проверки универсального скрининга мутаций "горячих точек" р53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование фрагмента TIL 4149-F11 с длинным пептидом р53-Y220C, отсортированные CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: частота образования пар. CD4+41BB+ отсортированные Т-клетки размножали в REP (от англ. rapid expansion protocol - протокол быстрого размножения) и полученную культуру Т-клеток подвергали глубокому секвенированию TCRAD (альфа) и TCRB (бета) с помощью Adaptive Biotechnologies. Две верхние цепи альфа TCR спаривали с двумя верхними цепями бета TCR в матрице из 4 полных TCR. Вторая цепь альфа TCR и вторая цепь бета TCR представляла собой реактивный TCR, отсюда обозначение TCRa2b2.

Распространенность TCR среди всех TCR: как ниже.

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MASAPISMLAMLFTLSGLRAQSVAPQEDQVNVVAEGNPLTVKCTYSVSGNPYLFWVY
 QYPNRLQLFLKYITGDNLVYKGSYGFEAEFNKSTQSFHLKKPSALVSDSALYFC AVR
 VWQYKLSFGAGTTVTVRANIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESG
 TFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDATLLEKSFET
 DMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMLRLWSSRAKRSKSGATNFSLLKQAGDVEE
 NPGPMHNQVLCVVLCCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCQNLNHDAM
 YWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKEFPLTVTSAQKNPTAFY
 LCASSISAGGDGYTFEGSGRLTVVEDLRNVTTPPKVSLFEPKAEJANKQKATLVCLARGF
 FPDHVELSWVYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCCVQ
 FHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAV
 LVSTLVYVAMVKKRNS (SEQ ID NO: 565)

Статистические данные по TCR 4149TCRa2b2 пациента 4149 изложены ниже в табл. 20.

Таблица 20

CDR3	Ранг уникальных, продуктивных CDR3	Число CDR3	Частота CDR3
Альфа: CAVRVWDYKLSF (SEQ ID NO: 59)	2 из 4308	648707 из 3309400	19,6%
Бета: CASSISAGGDGYTF (SEQ ID NO: 62)	2 из 3176	104325 из 578948	18,0%

Пример 7.

Данный пример демонстрирует идентификацию Т-клеток против мутантного р53 у пациента 4213 посредством совместного культивирования аутологичных APC, в которых индуцировали экспрессию мутантного р53, с аутологичными Т-клетками ("универсальный скрининг мутаций "горячих точек" р53"). Данный пример также демонстрирует выделение двенадцати TCR против мутантного р53 у пациента 4213.

Эксперименты проводили, как описано для фиг. 25-26 для пациента 4213.

Фрагменты TIL (F2 и F24) от пациента 4213 совместно культивировали с аутологичными APC, в который под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из мутантной последовательности р53-R248Q. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов→живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на фиг. 25. CD8+4-1BB+ Т-клетки отсортировывали в лунках 96-луночных планшетов. TCR идентифицировали, используя ОТ-ПЦР на одной клетке.

CD4+ Т-клетки происходили из лимфоцитов периферической крови пациента 4213. CD4+ Т-клеточную культуру совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из мутантной последовательности p53-R248Q. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали посредством ELISPOT. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования для лимфоцитов → живых клеток (PI-негативных) CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на фиг. 26. CD4+41BB+ Т-клетки сортировали в лунках 96-луночных планшетов. TCR идентифицировали, используя ОТ-ПЦР на одной клетке.

Последовательность 4213-F2-TCR1, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 317), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 318), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 319), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 320), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 321) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 322). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 323) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 324) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 325) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 326) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-F2-TCR1.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4213-F2 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 8,3% (наблюдали 2 раза из 24 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

*MAMLLGASVLLILWLQPDWVNSQQKNDQVQKQNSPSSVQEGRISILNCDYTN^{SMF}
DYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS^{AKHLSLHIVPSQPGDSAVYF}
CAANTGNQFYFGTGTSLTVIPNIQNPEPAVYQLK^{DRS}QDSTLCLFTDFDSQINVPK^{TME}
SGTFTDKCVLDMKAMD^{SKS}NGALAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATL^{TEKSF}
ETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAK^{RS}SGSGATNFSLLKQAGDV
EENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYK^{HEKRQSVAFWCNPISGHATL}
YWYQQILGQGP^{KLLIQFQ}NGVYVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKI^{QPAKLEDSAV}
YLCASSHLAGEFYNEQFFGPGTRLTVLEDLRNVT^{PKVSLFEP}SKAEIANKQKATLVCLA
RGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSY^{CLSSRLRVSATFWHNPRNHFR}
CQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSAS^{YQQGVLSATILYEILLGKAT}
LYAVLVSTLVVMAMV^{KRKNS}* (SEQ ID NO: 566)

Статистические данные по TCR 4213-F2-TCR1 пациента 4213 изложены ниже в табл. 21.

Таблица 21

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	3	3,1%
CDR3бета	8	8,3%
Пары 4213-F2-TCR1	2	2,1%
Общее число спаренных TCR	24	25,0%

Последовательность 4213-F2-TCR2, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 327), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 328), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 329), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 330), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 331) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 332). Область, выделенная жирным шрифтом, представ-

ляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 333) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 334) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 335) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 336) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-F2-TCR2.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4213-F2 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 12,5% (наблюдали 3 раза из 24 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAGAFLLYVSMKMGGTAGQSLEQPSEVTAVEGAIVQINCTYQTSGFYGLSWYQQH
DGGAPTFLSYNALDGLLEETGRFSSFLSRSDSYGYLLLQELQMKDSASYFCAFAYGON
FVEFGPGTRLSVLPNIQNPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGFTTIDKC
VLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLF
QNLLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMH
FRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDL SVVWYQQSLD
QGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDALYFCASSPLGD
SGNTIYFEGESWLTVEEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS
WWYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCCQVQFHGLSEED
KWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVM
AMVKKRKN (SEQ ID NO: 567)

Статистические данные по TCR 4213-F2-TCR2 пациента 4213 изложены ниже в табл. 22.

Таблица 22

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	4	4,2%
CDR3бета	4	4,2%
Пары 4213-F2-TCR2	3	3,1%
Общее число спаренных TCR	24	25,0%

Последовательность 4213-F2-TCR3, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 337), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 338), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 339), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 340), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 341) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 342). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 343) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 344) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 345) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 346) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-F2-TCR3.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4213-F2 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 70,8% (наблюдали 17 раз из 24 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MATLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENATMNC SYKTSINNLQWYR
 QNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSLLITASRAADTASYFCATDAW
 NNDMRFGAGTRLTVKPNIQNPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTF
 ITDKCYLDMKAMD SKSNGAIAWSNQTSFTQCQDIFKETNATYPSSDVP CDATL TEKSFETD
 MNLNFNLLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRS GSGATNFSLLKQAGDVEEN
 PGP MHIGLLCCVAFSLLWASPVNAGVTQTPKFQV LKTGQSMTLQCAQDMNHNMSMY
 WYRQDPGMGLRLIYYSA SEGTTDKGEV PNGYNVSR LNKREFSLRLESAAPSQTSVYF
 CASSESQGNTEAFFGQGTRLTVVEDLRNVT PPKVSLFEP SKAEJANKQKATLVCLARGFF
 PDHVELSWWYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCQVQF
 HGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL
 VSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 568)

Статистические данные по TCR 4213-F2-TCR3 пациента 4213 изложены ниже в табл. 23.

Таблица 23

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	19	19,8%
CDR3бета	42	43,8%
Пары 4213-F2-TCR3	17	17,7%
Общее число спаренных TCR	24	25,0%

Последовательность 4213-F24-TCRa1, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 347), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 348), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 349), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 350), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 351) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 352). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 353) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 354) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 355) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 356) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-F24-TCRa1.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4213-F24 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 15,9% (наблюдали 7 раз из 44 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAKHLTTFVLVILWLYFYRGNKGNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNI.RWY
 KQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVS
 YKLIFGTGTRLHVFPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITD
 KCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL
 NFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGP
 MHTRLLFWVAFCLLGAYHTGAGVVSQSPSNKVTEKGGKDVLRCDPISGHTALYWYR
 QRLGQGLEFLIYFQGNSAPDKSGLPSDRFSAERTGESVSTLTIQRTQQEDSAVYLCAS
 SPIQGENSPLHFNGTRTLVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPD
 HVLSWVWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPVHFRFCQVQFHG
 LSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVST
 LVMAMVVKRKN (SEQ ID NO: 569)

Статистические данные по TCR 4213-F24-TCRa1 пациента 4213 изложены ниже в табл. 24.

Таблица 24

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	7	7,3%
CDR3бета	80	83,3%
Пары 4213-F24-TCRa1	7	7,3%
Общее число спаренных TCR	44	45,8%

Последовательность 4213-F24-TCRa2, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 357), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 358), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 359), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 360), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 361) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 362). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 363) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 364) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 365) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 366) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-F24-TCRa2.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4213-F24 с длинным пептидом R248Q, отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 84,1% (наблюдали 37 раз из 44 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAKHLTTFVLVILWLYFYRGNKGNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWY
 KQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVS
 YKLIFGTGTRLQVFPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITD
 KCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL
 NFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGP
 MHTRLLFWVAFCLLGAYHTGAGVVSQSPSNKVTEKGGKDVLRCDPISGHTALYWYR
 QRLGQGLEFLIYFQGNSAPDKSGLPSDRFSAERTGESVSTLTIQRTQQEDSAVYLCAS
 SPIQGENSPLHFNGTRTLVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPD
 HVLSWVWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPVHFRFCQVQFHG
 LSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVST
 LVMAMVVKRKN (SEQ ID NO: 570)

Статистические данные по TCR 4213-F24-TCRa2 пациента 4213 изложены ниже в табл. 25.

Таблица 25

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	39	40,6%
CDR3бета	80	83,3%
Пары 4213-F24-TCRa2	37	38,5%
Общее число спаренных TCR	44	45,8%

Последовательность 4213-PBL-TCR1, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 367), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 368), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 369), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 370), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 371) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 372). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 373) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 374) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 375) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 376) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-PBL-TCR1.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: CD4+ Т-клетки памяти после сенсibilизации *in vitro* длинным пептидом R248Q совместно культивировали с длинным пептидом R248Q и отсортировывали CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 9,5% (наблюдали 6 раз из 63 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон (Университет Миннесоты, Minneapolis, MN).

MALLLVPAFQVIFTLGGTRAQSVTQLDSQVPVFEEAPVELRCNYSSSVSVYLFWYVQ
 YPNQGLQLLLKYL~~SGSTLVESINGFEAEFNKSQTSFHLRKP~~SVHISDTAEYFC~~AVSKG~~
 TGAQKLVFQGQ~~GTRLTINPNIQNPEPAVYQLKDP~~RSQD~~STLCLFTDFDSQINVPK~~TMESGT
 FITDKCVLDMKAMDSKSN~~GAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPC~~ATLTKESFETD
 MNLNFQNL~~LIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKR~~SGSGATN~~FSLLKQAGDVEEN~~
 PGP~~MHNQVLC~~CVL~~CFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNV~~TLSC~~EQNLNHD~~AMY
 WYRQDPGQGLRLIYYSQIV~~NDFQKGDIAEGYSVSREK~~KESFPLIVTSAQKNPTASYLC
 ASEAEFGQ~~GTRLTVVEDLRNVT~~PPK~~VSLFEP~~SKAEIANKQ~~KATLVCLARGFFPDH~~VELSW
 WYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSY~~CLSSRLRVSATFWHNP~~RNHFR~~COVQFHGLSEEDK~~
 WPEGSPK~~PVTQ~~NISAEAWGRADCGITSASYQ~~QGVLSATILYEILLGKATLYAVL~~VSTLVMA
 MVK~~RKNS~~ (SEQ ID NO: 571)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR1 пациента 4213 изложены ниже в табл. 26.

Таблица 26

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	192	100%
CDR3альфа	9	4,7%
CDR3бета	6	3,1%
Пары 4213-PBL-TCR1	6	3,1%
Общее число спаренных TCR	63	32,8%

Последовательность 4213-PBL-TCR2, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 377), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 378), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 379), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 380), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 381) и шестая подчеркнутая об-

ласть представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 382). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 383) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 384) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 385) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 386) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-PBL-TCR2.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: CD4+ Т-клетки памяти после сенсibilизации *in vitro* длинным пептидом R248Q совместно культивировали с длинным пептидом R248Q и отсортировывали CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 7,9% (наблюдали 5 раз из 63 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MALVTSITVLLSLGIMGDAKTTQPNSMESNEEPPVHLPCHNHSTISGTDYIHWYRQLPS
 QGPEYVIHGLTNSVNNRMA SLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCILASGAGSYQ
 LIEGKGTKLSVIPNIQNPEPAVYQLKDRPSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKC
 VLDMKAMD SKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPPSSDVP CDATLLEKSFETDMNLF
 QNLLVIVLRLLLLKVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMH
 CRLLCCVVFCLLQAGPLDTAVSQTPKYLVYVQMGNDKSIKCEQNLGHDIMYWKQD
 SKKFLKIMFSYNNKELIINETVVPNRFSPKSPDKAHLNLHINSLELGDSAVYFCASRTIG
 YNTEAFFGGQGR LTVVEDLRNVT PPKVSLFEP SKAEIANKQKATLVCLARGFFPDIVELS
 WWWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCQVQFHGLSEED
 KWPEGSPKPVYQNISAEAWGRADCGITSASYOQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVM
 AMVKRKNS (SEQ ID NO: 572)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR2 пациента 4213 изложены ниже в табл. 27.

Таблица 27

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	192	100%
CDR3альфа	8	4,2%
CDR3бета	8	4,2%
Пары 4213-PBL-TCR2	5	2,6%
Общее число спаренных TCR	63	32,8%

Последовательность 4213-PBL-TCR3, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 387), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 388), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 389), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 390), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 391) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 392). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 393) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 394) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 395) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 396) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-PBL-TCR3.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: CD4+ Т-клетки памяти после сенсibilизации *in vitro* длинным пептидом R248Q совместно культивировали с длинным пептидом R248Q и отсортировывали CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 6,3% (наблюдали 4 раза из 63 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAKIRQFLLAILWLQLSCVSAAKNEVEQSPQNLTAEQEGEFITINCSYSVSGISALHWLQ
QHPPGGGIVSLFMLSSGKKKHGRLIATINIQEKHSSLHITASHPRDSAVYICAALSNTD
KLIFGTGTRLQVFPNIQNPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDK
CVLDMKAMDSSKNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATALTEKSFETDMNLN
FQNLIVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPM
HTRLCCWAALCLLGGADHTGAGVSTPSNKVTEKGKYVELRCDPISGHTALYWYRQS
LGQGPFLIYFQGTGAADDSGLPNDRFFAVRPEGSVSTLKIQRTERGDSAVYLCASSL
SGLLQETQYFGPGTRLLVLEDLRNVTTPPKVSLFEPSEAEIANKQKATLVCLARGFFPDHV
EESWVWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQVQFHGLS
EEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTL
VVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 573)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR3 пациента 4213 изложены ниже в табл. 28.

Таблица 28

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	192	100%
CDR3альфа	4	2,1%
CDR3бета	7	3,6%
Пары 4213-PBL-TCR3	4	2,1%
Общее число спаренных TCR	63	32,8%

Последовательность 4213-PBL-TCR4a1, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 397), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 398), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 399), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 400), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 401) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 402). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 403) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 404) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 405) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 406) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-PBL-TCR4a1.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: CD4+ Т-клетки памяти после сенсibilизации *in vitro* длинным пептидом R248Q совместно культивировали с длинным пептидом R248Q и отсортировывали CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 3,2% (наблюдали 2 раза из 63 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAYSPGLVSLILLLLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEEAFLTINCTYATGYPSTLFWYVQ
 YPGEGLQLLLKATKADDDKGSNKGFEATYRKETTSFHLEKGSVQVSDSAVYFCALSH
TGSSNTGKLIFGQGTRLQVKPNIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTM
SGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTKESF
 ETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSKSGGATNFSLLKQAGDV
EENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIKQRQSVAFWCNPISGHATL
 YWYQQILGQGPKLLIQFQNGVVDSDQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAV
 YLCASSTGGGRHQPHQHFQDGTLSILEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLAR
 GFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQ

VQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLY
 AVLSTLVVMAMVVKRKN (SEQ ID NO: 574)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR4a1 пациента 4213 изложены ниже в табл. 29.

Таблица 29

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	192	100%
CDR3альфа	2	1,0%
CDR3бета	36	18,8%
Пары 4213-PBL-TCR4a1	2	1,0%
Общее число спаренных TCR	63	32,8%

Последовательность 4213-PBL-TCR4a2, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 407), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 408), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 409), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 410), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 411) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 412). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 413) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 414) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 415) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 416) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-PBL-TCR4a2.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: CD4+ Т-клетки памяти после *in vitro* сенсбилизации длинным пептидом R248Q совместно культивировали с длинным пептидом R248Q и отсортировали CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 3,2% (наблюдали 2 раза из 63 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAYSPGLVSLILLLLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEEAFLTINCTYATGYPSTLFWYVQ
 YPGEGLQLLLKATKADDDKGSNKGFEATYRKETTSFHLEKGSVQVSDSAVYFCALSQ
TGSSNTGKLIFGQGTRLQVKPNIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTM
SGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTKESF
 ETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSKSGGATNFSLLKQAGDV
EENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIKQRQSVAFWCNPISGHATL
 YWYQQILGQGPKLLIQFQNGVVDSDQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAV
 YLCASSTGGGRHQPHQHFQDGTLSILEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLAR
 GFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQ
 VQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLY
 AVLSTLVVMAMVVKRKN (SEQ ID NO: 575)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR4a2 пациента 4213 изложены ниже в табл. 30.

Таблица 30

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	192	100%
CDR3альфа	2	1,0%
CDR3бета	36	18,8%
Пары 4213-PBL-TCR4a2	2	1,0%
Общее число спаренных TCR	63	32,8%

Последовательность 4213-PBL-TCR4a3, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 417), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 418), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 419), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 420), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 421) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 422). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 423) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 424) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 425) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 426) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-PBL-TCR4a3.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: CD4+ Т-клетки памяти после сенсibilизации *in vitro* длинным пептидом R248Q совместно культивировали с длинным пептидом R248Q и отсортировывали CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 4,8% (наблюдали 3 раза из 63 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAYSPGLVSLILLLLGRTRGNSVTVMEGVPVTLSEEAFLTINCTYATGYPSTLFWYVQ
 YPGEGQLLLKATKADDKGSNKGFATYRKETTSTFHLEKGSVQVSDSAVYFCALSQ
 TGSSNTGKLIFFGQGTRLQVKPNIQNPEPAVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTM
 SGTFTDKCVLDMKAMDSSKNGALAWSNQTSFTYQDIFKETNATYPSSDVPDATLTKESF
 ETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTRLRLWSSRAKRSRSGGATNFSLLKQAGDV
 EENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATL
 YWYQQILGQGPKLLIQFQNGVVDSDQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAV
 YLCASSTGGGRHQPHFGDGTLSILEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLAR
 GFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPAAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCC
 VQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTVQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATLYEILLGKATLY
 AVLVSTLVVMAMVVKRKN (SEQ ID NO: 576)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR4a3 пациента 4213 изложены ниже в табл. 31.

Таблица 31

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	192	100%
CDR3альфа	4	2,1%
CDR3бета	36	18,8%
Пары 4213-PBL-TCR4a3	3	1,6%
Общее число спаренных TCR	63	32,8%

Последовательность 4213-PBL-TCR4a4, которую выделяли у пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 427), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 428), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 429), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 430), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 431) и шестая

подчеркнутая область представляет собой CDR3β (SEQ ID NO: 432). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 433) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 434) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 435) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 436) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4213-PBL-TCR4a4.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: CD4+ Т-клетки памяти после *in vitro* сенсбилизации длинным пептидом R248Q совместно культивировали с длинным пептидом R248Q и отсортировывали CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 3,2% (наблюдали 2 раза из 63 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAYSPGLVSLILLLLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEEAFLTINCTYATATGYPPLFWYVQ
YPGEGQLLLKATKADDKGSNKGFEATYRKETTSFHLEKGSVQVSDSAVYFCALSTT
GSSNTGKLIFFGQGTTLQVKNPQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMES

GTFITDKCVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPDATLLEKSF
TDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGGATNFSLLKQAGDVE
ENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIEKRQSVAFWCNPISGHATLY
WYQQILGQGPKLLIQFQNGVVDSDQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVY
LCASSTGGGRHQPHFGDGTRLSILEDLRNVTPPKVSLFEPSKAELANKQKATLVCLARG
FFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFWHNPVPRNHFRQVY
QFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYA
VLVSTLVMMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 577)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR4a4 пациента 4213 изложены ниже в табл. 32.

Таблица 32

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	192	100%
CDR3альфа	2	1,0%
CDR3бета	36	18,8%
Пары 4213-PBL-TCR4a3	2	1,0%
Общее число спаренных TCR	63	32,8%

Пример 8.

Данный пример демонстрирует идентификацию Т-клеток против мутантного p53 у пациента 4268 посредством совместного культивирования аутологичных APC, в которых индуцировали экспрессию мутантного p53, с аутологичными Т-клетками ("универсальный скрининг мутаций горячих точек p53"). В данном примере также продемонстрировано выделение пяти TCR против мутантного p53 TCR у пациента 4268.

Эксперименты проводили, как описано для фиг. 27-30 для пациента 4268.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 совместно культивировали с аутологичными APC, которые подвергали электропорации TMG, состоящим из нерелевантной, WT p53 или мутантной p53 последовательности.

Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN-γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 27.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248Q или мутантной последовательности p53-R248Q. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN-γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 28.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO) или очищенные (выше

95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 или мутантной последовательности p53-R248Q. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Экспрессию 4-1 BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов→живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на фиг. 29. Фрагменты TIL F18 и F19 представляли собой источники TCR после осуществления сортировки CD4+41BB+ Т-клеток.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 совместно культивировали с аутологичными клетками APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 или мутантной последовательности p53-R248Q. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Экспрессию 4-1 BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования для лимфоцитов→живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на фиг. 30. Фрагменты TIL F7, F8 и F15 представляли собой источники TCR после осуществления сортировки CD8+4-1BB+ Т-клеток.

Последовательность 4268-TCR1, которую выделяли из пациента 4268, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 137), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 138), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 139), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 140), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 141) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 142). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 143) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 144) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 145) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 146) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4268-TCR1.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4268-F7 и 4268-F8 с длинным пептидом p53-R248Q, отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦП на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 78,7% (наблюдали 48 раз из 61 пары).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MASLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFW
 YRQYSYGKSPPELIMFIYNSGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCAYS
 WYSTLTFGKGTMLLVSPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGT
 FITDKCVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETD
 MNLNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEEN
PGPMHTRLFFYVALCLLWAGHRDAGITQSPRYKITETGRQVTLMCHQTWSHSYMF
 WYRQDLGHGLRLIYYSAAADITDKGEVPDGYVVSRSKTENFPLTLESATRSQTSVYF
 CASSGSRRTDQYEGPGTRTLVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFP
 DHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCQVQFH
 GLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV
 STLVVMMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 578)

Статистические данные по TCR 4268-TCR1 пациента 4268 изложены ниже в табл. 33.

Таблица 33

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	54	56,3%
CDR3бета	71	74,0%
Пары 4268-TCR1	48	50,0%
Общее число спаренных TCR	61	63,5%

Последовательность 4268-TCR2, которую выделяли у пациента 4268, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 147), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 148), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 149), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 150), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 151) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 152). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 153) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 154) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 155) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 156) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4268-TCR2.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4268-F7 и 4268-F8 с длинным пептидом p53-R248Q, отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦП на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 6,6% (наблюдали 4 раза из 61 пары).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MALKFSVSILWQLAWVSTQLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEPG
EGPVLLVTVVITGGEVKKLRLTFQFGDARKDSSLHITAAQPGDTGLYL**CAGEFAGN**
QFYFGTGTSLTVIPNIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDK
CVLDMKAMDSKSNGALAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVP**CDATL**TEKSFETDMNLN
FQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPM
HCRLLCCAVLCLLGAVPIDTEVTQTPKHLVMGMNTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYK
QKAKKPELMFVYSYEKLSINESVPSRFSPECPNSSLLNLHLHALQPEDSALYLCASS
QVGLTYEQYFGPGTRRLTVTEDLRNVT**PPKVS**LFEP**SKAEIANKQ**KATLVCLARGFFPDH
VELSWWYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV**SATFW**HNPRNHFR**CVQV**FHGL
SEEDKWPEGSPKPV**TQ**NISAEAWGRADCGITSASYQ**QGV**LSATLYEILLGKATLYAVLVSTL
VVMAMV**KRKN**S (SEQ ID NO: 579)

Статистические данные по TCR 4268-TCR2 пациента 4268 изложены ниже в табл. 34.

Таблица 34

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	6	6,3%
CDR3бета	4	4,2%
Пары 4268-TCR2	4	4,2%
Общее число спаренных TCR	61	63,5%

Последовательность 4268-TCR3, которую выделяли у пациента 4268, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 157), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 158), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 159), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 160), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 161) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 162). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 163) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 164) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 165) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмер-

ная цепь бета (SEQ ID NO: 166) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4268-TCR3.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4268-F15 с длинным пептидом p53-R248Q, отсортированные CD8+41BB+Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 88,6% (наблюдали 31 раз из 35 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MASAPISMLAMLFTLSGLRAQSVAPQEDQVNVAEGNPLTVKCTYSVSGNPYLFWYV
QYPNRGLQFLLKYITGDNLVKGSGYGFEEFNKQSQTSLFKKPSALVSDSALYFCAYR
DNSGGSNYKLTFGKGTLLTVNPNIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKT
MESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDADLLE
KSFETDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSKSGATNFSLLKQAG
DVEENPGPMHTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIEKRQSVAFWCNPISEH
ATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNGVVDSDQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLED
SAVYLCASSLGGQGTQYFEGPGRLLVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCL
ARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRIHFR
CQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKA
TLVAVLVSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 580)

Статистические данные по TCR 4268-TCR3 пациента 4268 изложены ниже в табл. 35.

Таблица 35

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	42	43,8%
CDR3бета	37	38,5%
Пары 4268-TCR3	31	32,3%
Общее число спаренных TCR	35	36,5%

Последовательность 4268-TCR4, которую выделяли у пациента 4268, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 167), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 168), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 169), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 170), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 171) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 172). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 173) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 174) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 175) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 176) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4268-TCR4.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4268-F18 с длинным пептидом p53-R248Q, отсортированные CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 95,2% (наблюдали 40 раз из 42 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MALLLVPAFQVIFTLGGTRAQSVTQLDSQVPVFEEAPVELRCNYSSSVSVYLFWYVQ
 YPNQGLQLLLKYL~~SGSTLY~~ESINGFEAEFNKSQTSFHLRKP~~SVHISDTAEYFCAV~~RGSS
~~GTYKYIF~~GTGTR~~LKVLANIQNPEPAVYQLK~~DPRS~~QDSTLCLF~~TD~~FDSQIN~~VPK~~TMESGTF~~
~~ITDKCVLDMKAM~~DSK~~SNGAIAWSN~~QTS~~SFTCQDIF~~KET~~NATYPSSD~~VPC~~DATL~~TEK~~SFETD~~
~~MNLNFQNL~~L~~VIVLRILL~~LK~~VAGFN~~L~~MTLRLWSSRAKRS~~GS~~GATNF~~S~~LLKQAGD~~VEEN
PGPMHIRLLCRVAF~~CF~~LA~~VGLVDV~~KVTQSSRYLVKRTGK~~EVFLEC~~VQDMDHENMF
 WYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP~~EGYSVSREK~~KERFSLILE~~SASTN~~QTSMYL
~~CASKGDQNT~~EAFFGQGT~~RLTVVEDLRNV~~TPPKVSLFEP~~SKAEIANKQ~~KATLVCLARG~~FF~~
~~PDHVELS~~WWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV~~SATFWH~~NPRNH~~FRCQVQF~~
~~HGLSEED~~KWPEGSPK~~PVTQ~~NISAEAWGRADCGITSASYQ~~QGVLSATILYEILLG~~KATLYAVL
 VSTLVVMAMV~~KRKNS~~ (SEQ ID NO: 581)

Статистические данные по TCR 4268-TCR4 пациента 4268 изложены ниже в табл. 36.

Таблица 36

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	43	44,8%
CDR3бета	53	55,2%
Пары 4268-TCR4	40	41,7%
Общее число спаренных TCR	42	43,8%

Последовательность 4268-TCR5, которую выделяли у пациента 4268, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 177), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 178), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 179), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 180), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 181) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 182). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 183) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 184) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 185) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 186) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4268-TCR5.

Распознавание мутации p53: R248Q.

Способ: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4268-F19 с p53-mut-TMG, отсортированные CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦП на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 11,8% (наблюдали 2 раза из 17 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAGVFLLYVSMKMG~~TTGQ~~NIDQPT~~EMTATE~~GAI~~VQIN~~CTYQ~~TSGFN~~GLFWYQ~~QH~~
 AGEAPTFLSY~~NVLDGLEEKGR~~FSSFLSR~~SGYSYLL~~LKELQMKDSASYLCA~~V~~RD~~LQT~~
~~GANNLFF~~GTGTR~~LTVIPNIQNPEPAVYQLK~~DPRS~~QDSTLCLF~~TD~~FDSQIN~~VPK~~TMESGTFI~~
~~TDKCVLDMKAM~~DSK~~SNGAIAWSN~~QTS~~SFTCQDIF~~KET~~NATYPSSD~~VPC~~DATL~~TEK~~SFETDM~~
~~NLNFQNL~~L~~VIVLRILL~~LK~~VAGFN~~L~~MTLRLWSSRAKRS~~GS~~GATNF~~S~~LLKQAGD~~VEENP
GPMHIRLLCRVAF~~CF~~LA~~VGLVDV~~KVTQSSRYLVKRTGK~~EVFLEC~~VQDMDHENMF
 YRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP~~EGYSVSREK~~KERFSLILE~~SASTN~~QTSMYLCA
~~SSLTFGTTEAFFGQGT~~RLTVVEDLRNVTPPKVSLFEP~~SKAEIANKQ~~KATLVCLARG~~FFPD~~
~~HVELS~~WWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV~~SATFWH~~NPRNH~~FRCQVQFHG~~
~~LSEED~~KWPEGSPK~~PVTQ~~NISAEAWGRADCGITSASYQ~~QGVLSATILYEILLG~~KATLYAVL~~VST~~
 LVVMAMV~~KRKNS~~ (SEQ ID NO: 582)

Статистические данные по TCR 4268-TCR5 пациента 4268 изложены ниже в табл. 37.

Таблица 37

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	2	2,1%
CDR3бета	87	90,6%
Пары 4268-TCR5	2	2,1%
Общее число спаренных TCR	17	17,7%

Пример 9.

В данном примере продемонстрирована идентификация Т-клеток против мутантного р53 у пациента 4266 посредством совместного культивирования аутологичных APC, в которых вызывали экспрессию мутантного р53, с аутологичными Т-клетками ("универсальный скрининг мутаций горячих точек р53"). В данном примере также продемонстрировано выделение четырех TCR против мутантного р53 у пациента 4266.

Эксперименты проводили, как описано для фиг. 31-34 и 53-55 для пациента 4266.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4266 совместно культивировали с аутологичными APC, которые подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной, WT р53 или мутантной р53 последовательности. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 31. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов→живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на фиг. 32.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4266 совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT р53-R248 или мутантной последовательности р53-R248W. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 33. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам→живым клеткам (PI-негативным)→CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на фиг. 34.

Клетки Cos7 ($2,5 \times 10^4$ на лунку) высевали в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов. На следующий день клетки совместно трансфицировали индивидуальными аллелями HLA от пациента 4266. На следующий день в клетки под действием импульсов не вводили пептид, вводили ДМСО, пептид дикого типа р53-R248 SSCMGGMNRR (SEQ ID NO: 590) или мутантный пептид р53-R248W SSCMGGMNWR (SEQ ID NO: 591) в течение 2 ч при 37°C в количестве 1 мкг/мл. Культуры TIL от пациента 4266 (10^5) добавляли в лунки и совместно культивировали в течение ночи при 37°C. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов→живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток)→CD4-CD8+. Результаты показаны на фиг. 53.

Т-клетки, экспрессирующие имитацию (без TCR), 4266-TCR1, 4266-TCR2, 4266-TCR3 или 4266-TCR4 с предполагаемой специфичностью к р53-R248W, идентифицируемой у 4266-TIL, совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT р53-R248 или мутантной последовательности р53-R248W. Только среды и РМА и иономицин представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Экспрессию 4-1 BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам→живым клеткам (PI-негативным)→CD3+ (Т-клеткам)→CD4-CD8+. Результаты показаны на фиг. 54.

Линию опухолевых клеток (ТС - от англ. tumor cell) создавали из ксенотрансплантированного фрагмента опухоли, иссеченного у пациента 4266, затем серийно пропускаемого через мышей с ослабленным иммунитетом (ТС#4266). ТС#4266 совместно культивировали с Т-клетками (10^5), экспрессирующими имитацию (без TCR) или р53-R248W-специфичные TCR (4266-TCR2, 4266-TCR3 или 4266-TCR4) в течение ночи при 37°C. Клетки ТС#4266 или инкубировали без всего, или с W6/32 pan-HLA Класс-I-специфичным блокирующим антителом, или с IVA12 pan-HLA Класс-II-специфичным блокирующим антителом или с мутантным пептидом P53-R248W SSCMGGMNWR (SEQ ID NO: 591) в течение 2 ч при 37°C. Антитела содержались в совместной культуре в конечной концентрации 5 мкг/мл. Пептид инкубировали в количестве 1 мкг/мл, и избыток пептида смывали после инкубации. Только среды (без ТС) и РМА и иономицин представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов→живых клеток (PI-негативных)→CD3+ (Т-клеток)→CD4-CD8+. Результаты показаны на фиг. 55.

Последовательность 4266-TCR1, которую выделяли у пациента 4266, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 97), вторая подчеркнутая

область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 98), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 99), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 100), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 101) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 102). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 103) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 104) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 105) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 106) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4266-TCR1.

Распознавание мутации p53: R248W.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4266-F1, 4266-F3, 4266-F5 и 4266-F6 с p53mutTMG или длинным пептидом R248W (обе сокультуры выявляли один и тот же TCR), отсортированные CD8+41BB+Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦП на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 17,0% (наблюдали 9 раз из 53 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MALLLVPAPQVIFTLGGTRAQSVTQLDSQVPVFEEAPVELRCNYSSSVSVYLFWYVQ
 YPNQGLQLLLKYL~~SGSTLVESINGFEAEFNKSQTSFHLRKP~~SVHISDTAEYFCAVSDL
 VRDDKHF~~GK~~GTRLHILPNIQ~~NP~~EP~~AVYQLK~~DRS~~QD~~STLCLFTDFDSQINVPKTMESGTF
 ITDKCVLDMKAMD~~SKSNGA~~IAWSN~~QTS~~F~~TCQD~~IFKETNATYPSSD~~VPC~~DATLLEKSFETD
 MNLNFQ~~NLLV~~IVLRILL~~LKV~~AGFNLLMTLRLWSSRA~~KR~~SGSGATNFSLLKQAGDVEEN
 PGP~~M~~HIGLLCCVAFSLLWASPVNAGVTQTPKFQVLK~~TG~~QSM~~TLQ~~CAQDMNHNSMY
 WYRQDPGMGLRLIYYSASEGTTDKGEV~~PNGYN~~VSRLNKREFSLRLESAA~~PSQ~~TSVYF
 CASIGGFEAFEGQGT~~RLTV~~VEDLRN~~VTP~~PKVSLFEP~~S~~KAELANKQKATLVCLARGFFPDH
 VELS~~W~~VNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNH~~FRCQVQ~~FHGL
 SEEDKWPEGSPK~~PVTQ~~NISAEAWGRADCGITSASYQOGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTL
 VVMAMV~~K~~RKNS (SEQ ID NO: 583)

Статистические данные по TCR 4266-TCR1 пациента 4266 изложены ниже в тал. 38.

Таблица 38

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	9	9,4%
CDR3бета	10	10,4%
Пары 4266-TCR1	9	9,1%
Общее число спаренных TCR	53	55,2%

Последовательность 4266-TCR2, которую выделяли у пациента 4266, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 107), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 108), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 109), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 110), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 111) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 112). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 113) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 114) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 115) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 116) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и

заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4266-TCR2.

Распознавание мутации p53: R248W.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4266-F1, 4266-F3, 4266-F5 и 4266-F6 с p53mutTMG или длинным пептидом R248W (обе сокультуры выявляли один и тот же TCR), отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 24,5% (наблюдали 13 раз из 53 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAGVFLLYVSMKMGGTTGQNIQPTMTATEGAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQH
AGEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSSFLSRKGYSYLLKELQMKDSASYLCAYVTGGF
KTFEGAGTRFLVKANIQNPEPAVYQLKDPKSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITD
KCVLDMKAMDSKSNAGIWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL
NFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSKSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
MHTRLLCWAALCCLLGAELTEAGVAQSPRYKHEKRSQVAFWCNPIGHSATLYWYQQ
ILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCAS
NLGGGSTDTQYFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFP
DHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQVQFH
GLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQOGVLSATLYEILLGKATLYAVLV
STLVVMMAMVYKRKNS (SEQ ID NO: 584)

Статистические данные по TCR 4266-TCR2 пациента 4266 изложены ниже в табл. 39.

Таблица 39

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	21	21,9%
CDR3бета	18	18,8%
Пары 4266-TCR2	13	13,5%
Общее число спаренных TCR	53	55,2%

Последовательность 4266-TCR3, которую выделяли из пациента 4266, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 117), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 118), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 119), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 120), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 121) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 122). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 123) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 124) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 125) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 126) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4266-TCR3.

Распознавание мутации p53: R248W.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4266-F1, 4266-F3, 4266-F5 и 4266-F6 с p53mutTMG или длинным пептидом R248W (обе сокультуры выявляли один и тот же TCR), отсортированные CD8+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 34,0% (наблюдали 18 раз из 53 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAGVFLLYVSMKMGTTGQNIDQPTMTATEGAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQH
 AGEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSSFLSRSKGYSYLLKELQMKDSASYLCAFYGGG
 QGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFIT

DKCVLDMKAMD~~SKS~~NGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMN
 LNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRS~~SG~~GATNFSLKQAGDVEENPG
 PMHTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVSPRYKVAKRQGDVALRCDPI~~SGH~~VSLFWY
 QQALGQGPEFLTYEQNEAQLDKSGLPDRFFAERPEGSVSTLKIQRTOQEDSAVYLC
 ASSEFGSGSTDTQYFPGTRTLVLEDLRNVTPPKVSLFEP~~SKAE~~IANKQKATLVCLARGFF
 PDHVELSWVYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP~~RNH~~FRCQVQF
 HGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL
 VSTLVVMAMV~~KR~~KNS (SEQ ID NO: 585)

Статистические данные по TCR 4266-TCR3 пациента 4266 изложены ниже в табл. 40.

Таблица 40

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	19	19,8%
CDR3бета	26	27,1%
Пары 4266-TCR3	18	18,8%
Общее число спаренных TCR	53	55,2%

Последовательность 4266-TCR4, которую выделяли из пациента 4266, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 127), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 128), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 129), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 130), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 131) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 132). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 133) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 134) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 135) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 136) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. Способ, используемый для выделения TCR, изложен ниже.

Название TCR: 4266-TCR4.

Распознавание мутации p53: R248W.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4266-F1, 4266-F3, 4266-F5 и 4266-F6 с p53mutTMG или длинным пептидом R248W (обе сокультуры выявляли один и тот же TCR), отсортированные CD8+41BB+T-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦП на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 9,4% (наблюдали 5 раз из 53 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAGVFLLYVSMKMGTTGQNIDQPTMTATEGAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQH
 AGEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSSFLSRSKGYSYLLKELQMKDSASYLCAVYGGG
 QGNLIFGKGTKLSVKPNIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFIT
 DKCVLDMKAMD~~SKS~~NGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMN
 LNFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRS~~SG~~GATNFSLKQAGDVEENPG
 PMHTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKII~~EKR~~QSVAFWCNPI~~SGH~~ATLYWYQ
 QILGQGP~~KL~~LIQFQNGVVDSDQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLC
 SSLGTGSDTQYFPGTRTLVLEDLRNVTPPKVSLFEP~~SKAE~~IANKQKATLVCLARGFF
 DHVELSWVYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP~~RNH~~FRCQVQFH
 GLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL
 STLVVMAMV~~KR~~KNS (SEQ ID NO: 586)

Статистические данные по TCR 4266-TCR4 пациента 4266 изложены ниже в табл. 41.

Таблица 41

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	5	5,2%
CDR3бета	13	13,5%
Пары 4266-TCR3	5	5,2%
Общее число спаренных TCR	53	55,2%

Пример 10.

В данном примере продемонстрирована краткая информация об ответах Т-клеток на мутации "горячих точек" p53.

В табл. 42 предоставлена краткая информация об ответах Т-клеток на мутации "горячих точек" p53. Номера 1-15 табл. 42 представляли собой ретроспективное исследование. Номера 16-33 табл. 42 представляли собой перспективное исследование.

Таблица 42

#	Тип опухоли	Пациент	P53 mut	Скрининг Т-клеток	HLA
1	Опухоль желудка	3446	G245S	н./д.	н./д.
2	Желудочно-пищеводная опухоль	3788	Y220C	N	н./д.
3	Опухоль прямой кишки	3942	R273C	н./д.	н./д.
4	Опухоль толстой кишки	4023	R282W	Y	Класс-II
5	Опухоль толстой кишки	4095	R282W	н./д.	н./д.
6	Опухоль яичника	4127	G245S	Y	DRB3*02:02
7	Опухоль молочной железы	4130	R273H	Y	Класс II
8	Опухоль толстой кишки	4141	R175H	Y	A*02:01
9	Опухоль яичника	4149	Y220C	Y	DRB3*02:02
10	Опухоль толстой кишки	4160	R273H	N	н./д.
11	Меланома	4165	G245D	N	н./д.
12	Опухоль толстой кишки	4166	R248W	н./д.	н./д.
13	Опухоль прямой кишки	4171	R248Q	N	н./д.
14	Меланома	4187	R273H	N	н./д.
15	Опухоль толстой кишки	4196	R175H	Y	A*02:01
16	Опухоль толстой кишки	4213	R248Q	Y	оба

17	Опухоль толстой кишки	4217	R175H	N	н./д.
18	Холангиокарцинома	4220	R248Q	N	н./д.
19	Опухоль прямой кишки	4235	R273C	N	н./д.
20	Опухоль толстой кишки	4238	R248Q	Y	Класс-I
21	Опухоль толстой кишки	4244	R282W	N	н./д.
22	Опухоль толстой кишки	4245	R248Q	N	н./д.
23	Опухоль толстой кишки	4252	R175H	N	н./д.
24	Меланома	4253	R248W	Y	неизвестно
25	Опухоль толстой кишки	4254	R273H	N	н./д.
26	Опухоль толстой кишки	4257	R248W	N	н./д.
27	Опухоль эндометрия	4258	R273H	N	н./д.
28	Опухоль толстой кишки	4259	Y220C	Y	A*0,2:01, DRB1*04
29	Опухоль толстой кишки	4266	R248W	Y	A*68:01
30	Опухоль толстой кишки	4268	R248Q	Y	оба
31	Опухоль поджелудочной железы	4270	R282W	Y	неизвестно
32	Опухоль прямой кишки	4273	R248W	Y	DPB1*02:01
33	Опухоль прямой кишки	4274	R175H	н./д.	
34	Опухоль толстой кишки	4283	R175H	N	н./д.
35	Опухоль толстой кишки	4285	R175H	Y	DRB1*13:01
36	Опухоль толстой кишки	4287	R248W	N	н./д.
37	Опухоль толстой кишки	4312	R175H	N	н./д.

н./д. обозначает нет данных;

N обозначает негативные;

Y обозначает подтвержденные реактивные;

TBS обозначает подлежит скринингу.

Пример 11.

В данном примере продемонстрировано лечение пациентов T1L, реактивными в отношении мутации p53.

Краткая информация о лечении пациентов T1L, реактивными в отношении мутации p53, представлена в табл. 43.

Таблица 43

#	Тип опухоли	Пациент	p53mut	Скрининг инфузионного пакета	Общее # клеток ($\times 10^5$)	% p53-реактивных TIL	# p53-реактивных TIL ($\times 10^5$)	Ответ	Продолжительность (месяцы)
1	Опухоль яичника	4127	G245S	Y	143	2,8	4,0	P.R	4
2	Опухоль толстой кишки	4141	R175H	Y	69	0,8	0,6	N.R	-
3	Опухоль толстой кишки	4196	R175H	Y	92	3,3	3,0	N.R	-
4	Опухоль яичника	4149	Y220C	Y	37	11,1	4,1	N.R	-
5	Опухоль толстой кишки	4213	R248Q	TBS	33			P.R	4
6	Опухоль толстой кишки	4238	R248Q	TBS	57			N.R	
7	Опухоль толстой кишки	4266	R248W	Y	104	50,8	52,8		
8	Опухоль толстой кишки	4268	R248Q	**TBS					
9	Опухоль прямой кишки	4273	R248W	**Y	117	6,8	8,0	N.R	-
10	Толстой кишки	4285	R175H	Y	69,6	2,4	1,7	N.R	-

NT обозначает не проходящий лечение;
TBS обозначает подлежащий скринингу;
N.R. обозначает нет ответа;
P.R. обозначает частичный ответ;
** Пациент, еще не проходивший лечение.

Пример 12.

В данном примере продемонстрировано выделение и специфичная реактивность TCR от пациента 4141.

Аутологичные APC трансфицировали TMG, кодирующим нерелевантные мутации, последовательность WT p53 или мутантную последовательность p53, включающую R175H. Только среды и PMA и иономицин представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно. На следующий день TIL от пациента 4141 (культура фрагмента 12) совместно культивировали в течение ночи при 37°C с TMG-трансфицированными APC. Секрецию IFN- γ оценивали посредством ELISPOT. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам \rightarrow живым клеткам (PI-негативным) \rightarrow CD3+ (T-клеткам) \rightarrow CD4-CD8+. Результаты показаны на фиг. 38.

Клетки Cos7 ($2,5 \times 10^4$ на лунку) высевали в лунки плоскостонных 96-луночных планшетов. На следующий день клетки совместно трансфицировали индивидуальными аллелями HLA от пациента 4141 и или без дополнительного гена, или TP53 WT TMG или мутантным TP53 TMG, содержащим последовательность p53-R175H. TIL со специфичностью к p53-R175H от Пациента 4141 (культура фрагмента 12) совместно культивировали на следующий день с трансфицированными клетками Cos7 и инкубировали в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали посредством ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 39.

T-клетки, экспрессирующие имитацию (без TCR) или 4141-TCR1a2, совместно культивировали с

опухолевыми клетками T2 (экспрессирующими HLA-A*02:01). В T2-клетки под действием импульсов в течение 2 ч при 37°C вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды, состоящие из пептида WT p53-R175 HMTEVVRRRC (SEQ ID NO: 532) или мутантного пептида p53-R175H HMTEVVRRHC (SEQ ID NO: 530). Только среды и РМА и иономицин представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали посредством ELISA. Результаты показаны на фиг. 40.

T-клетки, экспрессирующие 4141-TCR1a2, совместно культивировали в течение ночи при 37°C с клетками Saos2 (p53-NUL и HLA-A*02:01+), которые либо являлись неманипулированными, либо которых создавали сверхэкспрессирующими полноразмерный белок p53-R175H. Ингибиторы секреции (монензин и брэфелдин А) добавляли в сокультуры для захвата цитокинов в T-клетках. После 6 ч совместного культивирования клетки фиксировали и осуществляли пермеабиллизацию, затем окрашивали на IL-2, CD 107a, IFN- γ и фактор некроза опухоли-альфа (TNF α - от англ. tumor necrosis factor-alpha). Проточную цитометрию использовали для анализа сокультур на основе гейтирования по лимфоцитам. Результаты показаны на фиг. 41.

Последовательность 4141-TCR1a2, которую выделяли у пациента 4141, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 467), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 468), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 469), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 470), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 471) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 472). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 473) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 474) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 475) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 476) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Опухоль-реактивные T-клетки идентифицировали, как описано ниже. TCR выделяли, как описано ниже.

Название TCR: 4141-TCR1a 2.

Распознавание мутации p53: R175H.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование TIL инфузионного пакета 4141 с p53mutTMG и отсортированные CD8+41BB+T-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке, затем набор для клонирования TA TOPO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) для цепи альфа.

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MASIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYS~~DSASNYFPWYKQ~~
 ELGKGPQLIIDIRSNVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAASKSAI
 MVV~~LQTSSSLELALCLLSSQVNIQNPEPAVYQLKDP~~RSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTME
 SGTFTTDKCVLDMKAMD~~SKSNGAIAWSNQT~~SFTCDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSF
 ETDMNLFQNLVIVLRILLKVAGFNLLMTLRLWSSRAKRS~~SGS~~GATNFSLLKQAGDV
EENPGPMHPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTCSQNMNHEY
 MSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKVS~~RKEKRN~~FPLILESPSPNQTSL
 YFCASSIQOGADTQYFGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEP~~SKAEIANKQ~~KATLVCLARG
 FFPD~~HVELS~~WWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV~~SATFWH~~NPRNHFRQV
 QFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQ~~QGVLSATILYEILLG~~KATLYA
 VLVSTLVVMAMV~~KR~~KNS (SEQ ID NO: 587)

Статистические данные по 4141-TCR1a2 от пациента 4141 изложены ниже в табл. 44.

Таблица 44

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	Неизвестно (клонирование TA TOPO)	нет данных
CDR3бета	58	60,4%

Пример 13.

Данный пример демонстрирует выделение и специфичную реактивность TCR, выделенного у пациента 4259.

Культуру фрагмента TIL (№ 6) от пациента 4259 совместно культивировали с аутологичными APC, которые или (1) подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной, WT p53 или мутантной p53 последовательности, или (2) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-Y220 или мутантной последовательности p53-Y220C. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам→живым клеткам (PI-негативным)→CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на фиг. 42.

В аутологичные APC под действием импульсов вводили уменьшающиеся концентрации пептидов из 25 аминокислот, соответствующих WT p53-Y220 или мутантной p53-Y220C последовательности, на протяжении 2 ч при 37°C. Культуру фрагмента TIL (№ 6) от пациента 4259 совместно культивировали с APC, в которые под действием импульсов вводили пептид. Экспрессию 4-1BB анализировали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам→живым клеткам (PI-негативным)→CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на фиг. 43.

В аутологичные антиген-презентирующие клетки под действием импульсов вводили DMCO, пептид WT p53-Y220 RNTFRHSVVVPYE (SEQ ID NO: 533) или мутантный пептид p53-Y220C RNTFRHSVVVPCE (SEQ ID NO: 534) в течение 2 ч при 37°C. Избыток пептида смывали. TIL от пациента 4259 (культура фрагмента 6) со специфичностью к p53-Y220C совместно культивировали в течение ночи при 37°C с APC, в которые под действием импульсов вводили пептид. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам→живым клеткам (PI-негативным)→CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на фиг. 44.

Клетки Cos7 ($2,5 \times 10^4$ на лунку) высевали в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов. На следующий день клетки совместно трансфицировали индивидуальными аллелями HLA от пациента 4259. На следующий день DMCO или пептид p53-Y220C RNTFRHSVVVPCE (SEQ ID NO: 534) под действием импульсов вводили в течение 2 ч в трансфицированные клетки Cos7. Избыток пептида смывали. Добавляли культуру фрагмента TIL № 6 от пациента 4259 (10^5 клеток/лунка). Сокультуры инкубировали в течение ночи при 37°C. Экспрессию 4-1 BB анализировали посредством проточной цитометрии после гейтирования лимфоцитов→живых клеток→CD3+ (Т-клеток)→CD8-CD4+. Результаты показаны на фиг. 45.

В APC, аутологичные в отношении Пациента 4259, под действием импульсов вводили пептиды из 25 аминокислот, соответствующие WT p53-Y220 или мутантной p53-Y220C последовательности, на протяжении 2 ч при 37°C. Избыток пептида смывали. Т-клетки, экспрессирующие 4259-F6-TCR, совместно культивировали в течение ночи при 37°C с APC, в которые под действием импульсов вводили пептид. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам→живым клеткам (PI-негативным)→CD3+ (Т-клеткам). Вводимый TCR измеряли по TCR β мыши (mTCR). Результаты показаны в табл. 45.

Таблица 45

	WT p53-Y220	Mut p53-Y220C
4-1BB+/mTCR+	0,27	5,22
4-1BB-/mTCR-	68,5	73,7
4-1BB+/mTCR-	0,18	1,59
4-1BB-/mTCR+	31,0	19,5

Линию опухолевых клеток (ТС) создавали из ксенотрансплантированного опухолевого фрагмента, иссеченного у пациента 4259, и затем серийно пропускаемого через мышей с ослабленным иммунитетом (ТС#4259). ТС#4259 совместно культивировали с Т-клетками (10^5), экспрессирующими имитацию (без TCR) или p53-Y220C-специфичный TCR (4259-F6-TCR), в течение ночи при 37°C.

Клетки ТС#4259 либо инкубировали без всего, либо с W6/32 pan-HLA Класс-I-специфичным блокирующим антителом, либо с IVA12 pan-HLA Класс-II-специфичным блокирующим антителом или с мутантным пептидом p53-Y220C RNTFRHSVVVPCE (SEQ ID NO: 534) в течение 2 ч при 37°C. Антитела держали в сокультуре в конечной концентрации 5 мкг/мл. Пептид инкубировали при 10 мкг/мл, и избыток пептида смывали после инкубации. Только среды (без ТС) и PMA и иономицин представляли собой отрицательный и положительный контроли соответственно. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам→живым клеткам (PI-негативным)→CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на фиг. 46.

Последовательность TCR 4259-F6-TCR, которую выделяли у пациента 4259, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 477), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 478), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 479), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β

(SEQ ID NO: 480), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 481) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 482). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 483) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 484) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 485) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 486) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, как описано ниже. TCR выделяли, как описано ниже.

Название TCR: 4259-F6-TCR.

Распознавание мутации p53: Y220C.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4259-F6 с пептидом p53-Y220C и отсортированные CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 81,1% (наблюдали 36 раз из 44 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MASLRVLLVILWLQLSWVWSQKQVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSF
 YRQYS β GKSP β ELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPDSATYLC β AWN
SGGSNYKLTEGKGTLLTVNPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMES
 GTFITDKCVLDMKAMDSKNGALAWSNQTSFTCDIFKETNATYPSSDVPCDATLLEKSF
 TDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVE
 ENPGPMHLGLLCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKGTGQSM β TLLCAQDMNHEY
 MYWYRQDPGMGLRLIHYSVGE β TTAKGEVPDGYNVSRLLKQNFLLGLESAAPSQTS
 VYFCASSYSQAWGQPHFGDGTRLSILEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCL
 ARGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP β RNHF
 CQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQOGVLSATILYEILLGKA
 TLYAVLVSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 588)

Статистические данные по 4259-F6-TCR от пациента 4259 изложены ниже в табл. 46.

Таблица 46

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	41	42,7%
CDR3бета	47	49,0%
Пары 4259- F6-TCR	36	37,5%
Общее число спаренных TCR	44	45,8%

Пример 14.

Данный пример демонстрирует выделение и специфичную реактивность TCR от пациента 4285.

Фрагменты TIL (F1-F22 и F24, n равен 23) от пациента 4285 совместно культивировали с аутологичными APC, которые подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной, WT p53 или мутантной p53 последовательности. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 47.

Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам \rightarrow живым клеткам (PI-негативным) \rightarrow CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на фиг. 49.

Фрагменты TIL (F1-F22 и F24, n равен 23) от пациента 4285 совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R175 или мутантной последовательности p53-R175H. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на фиг. 48. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов \rightarrow живых клеток (PI-негативных) \rightarrow CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на фиг. 50. Фрагмент TIL F6 представлял собой источник 4285-TCR1 после сортировки CD4+41BB+ Т-клеток.

В аутологичные APC под действием импульсов вводили пептиды из 15 аминокислот из последовательности p53-R175H (аминокислотная замена, подчеркнутая в табл. 45) с перекрытием 14 аминокислот. TIL от пациента 4285 (культуры фрагментов 10, 6 и 9) со специфичностью к p53-R175H совместно

культивировали в течение ночи при 37°C с APC, в которые под действием импульсов вводили пептид. ДМСО представлял собой носитель пептида. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны в табл. 47.

Таблица 47

Пептид	SEQ ID NO:	Результат ELISPOT, положительный (+) или отрицательный (-) в отношении продукции IFN- γ		
		4285-F10	4285-F6	4285-F9
Отсутствие (носитель)	Неприменимо	-	-	-
YKQSQNHMTEVVRHCP	519	-	-	-
KQSQNHMTEVVRHCPH	520	-	-	+
QSQNHMTEVVRHCPHH	521	-	+	+
SQNHMTEVVRHCPHNE	522	+	+	+
QNHMTEVVRHCPHNER	523	+	+	+
NHMTTEVVRHCPHNERC	524	+	+	+
MTEVVRHCPHNERCS	525	+	+	+
TEVVRHCPHNERCSD	526	+	+	+
EVVRHCPHNERCSDS	527	+	+	+
VVRHCPHNERCSDSD	528	+	+	-
VRHCPHNERCSDSDG	529	+	+	-

Клетки Cos7 ($2,5 \times 10^4$ на лунку) высевали в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов. На следующий день клетки совместно трансфицировали индивидуальными аллелями HLA от пациента 4285. На следующий день в клетки под действием импульсов вводили ДМСО или мутантный пептид p53-R175H YKQSQNHMTEVVRHCPHNERCSDSDG (SEQ ID NO: 2) на протяжении 2 ч при 37°C в количестве 10 мкг/мл. Отобранные культуры фрагментов TIL со специфичностью к p53-R175H от пациента 4285 (4285-F6, 4285-F9 и 4285-F10) совместно культивировали с трансфицированными клетками Cos7 в течение ночи при 37°C.

Экспрессию 4-1BB анализировали посредством проточной цитометрии после гейтирования лимфоцитов → живых клеток → CD3+ (Т-клеток) → CD8-CD4+. Результаты показаны на фиг. 51.

В аутологичные APC под действием импульсов вводили уменьшающиеся концентрации пептидов из 25 или 15 аминокислот, соответствующих WT или мутантной p53-R175H последовательности, на протяжении 2 ч при 37°C. Т-клетки, в которые осуществляли перенос 4285-TCR1 от пациента 4285, совместно культивировали в течение ночи при 37°C с APC, в которые под действием импульсов вводили пептид. Экспрессию 4-1BB анализировали посредством проточной цитометрии после гейтирования для лимфоцитов → живых клеток → CD3+ (Т-клеток) → CD8-CD4+. Результаты показаны на фиг. 52.

Последовательность 4285-TCR1, которую выделяли у пациента 4285, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1 α (SEQ ID NO: 487), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2 α (SEQ ID NO: 488), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3 α (SEQ ID NO: 489), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1 β (SEQ ID NO: 490), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2 β (SEQ ID NO: 491) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3 β (SEQ ID NO: 492). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 493) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 494) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 495) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 496) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, как описано ниже. TCR выделяли, как описано ниже.

Название TCR: 4285-TCR1.

Распознавание мутации p53: R175H.

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций "горячих точек" p53.

Совместное культивирование для идентификации TCR: совместное культивирование 4285-F6 с пептидом p53-R175H и отсортированные CD4+41BB+ Т-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке.

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 81,8% (наблюдали 36 раз из 44 пар).

Ориентация TCR: альфа-бета.

Экспрессионный вектор: SB транспозон.

MAKNPLAAPLLILWFHLDVCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFPSSNFYALHWY
RWETAKSPEALFVMTLNGDEKKKGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCALI
TGGGNKLTFGTGTQLKVELNIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMES
GTFITDKCVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPDADTLTEKSFE
TDMNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSRSGGATNFSLLKQAGDVE
ENPGPMHLGLLCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQSMTLLCAQDMNHEY
MYWYRQDPGMGLRLIHYSYGEGETTAKGEVDPDGYNVSRLLKQNFLLGLESAAPSQTS
VYFCAARLQGWNSPLHFGNGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLA
RGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHINPRNHFR
QVQVHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKAT
LYAVLVSTLVVMMAMVYKRKNS (SEQ ID NO: 589)

Статистические данные по 4285-TCR1 от пациента 4285 изложены ниже в табл. 48.

Таблица 48

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	37	39,8%
CDR3бета	39	40,6%
Пары 4285-TCR1	36	37,5%
Общее число спаренных TCR	44	45,8%

Пример 15.

Данный пример демонстрирует специфичную реактивность трех TCR против мутантного p53 от пациента 4196 примера 2.

Экспрессия HLA-A*0201 и p53 R175H разными линиями клеток-мишеней представлена в табл. 49.

Таблица 49

Линия клеток	HLA-A*0201, сообщен.	HLA-A2 согласно FACS MFI (изотип MFI)	P53 R175H, сообщен.	Оценка # копий P53 R175H на 1e5 GAPDH
KLE	+	+ 46733 (2038)	+	167
SKUT1	+	- 1009 (1009)	+	308
TYKNU	+	+ 6556 (1537)	+	175
TYKNU CpR	+	+ 8611 (1511)	+	179
VMRCLCD	+	+ 8340 (949)	+	43
SKBR3	+	Слабый 3414 (2546)	+	99
CEM/C1	-	- 387 (330)	+	138
HCC1395	-	- 1743 (1537)	+	105
KMS26	+	+ 57284 (679)	+	87
AU565	+	Слабый 3839 (1870)	+	80
LS123	-	- 1916 (2009)	+	190
CCRF CEM	+	- 253 (177)	+	149
SAOS2 R175H	+	+ 51049 (1417)	+	н.п.
SAOS исходн.	+	+ 40003 (1272)	-	22 (предел обнаружения)
среды	Неприменимо (н.п.)	н.п.	н.п.	н.п.
PMA/ю	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.

Клетки-мишени табл. 49 совместно культивировали с клетками, которые были трансдуцированы одним из TCR примера 2. Клетки, трансдуцированные имитацией (без TCR), использовали в качестве контрольных эффекторных клеток. Измеряли секрецию IFN- γ (пг/мл) (табл. 50) и экспрессию 4-1BB (% 4-1BB (mTCR β +) (табл. 51).

Таблица 50

Линия клеток	TP53 TCR AV38/BV10 CD8+	TP53 TCR AV12/BV6 CD8+	TP53 TCR AV6/BV11 CD8+	Имитация TCR
KLE	<u>741</u>	110	<u>71</u>	51
SKUT1	28	24	26	38
ТΥКNU	196	41	27	33
ТΥКNU CpR	<u>298</u>	65	34	24
VMRCLCD	23	22	23	23
SKBR3	26	23	24	26
CEM/C1	26	23	22	28
HCC1395	25	23	26	24
KMS26	<u>472</u>	<u>168</u>	<u>95</u>	23
AU565	21	30	25	28
LS123	25	23	25	26
CCRF CEM	23	23	30	30
SAOS2 R175H	<u>>2000</u>	<u>1064</u>	<u>190</u>	24
SAOS исходн. среды	29	26	26	25
РМА/ю	<u>1166</u>	<u>485</u>	<u>98</u>	<u>161</u>

Таблица 51

Линия клеток	TP53 TCR AV38/BV10 CD8+	TP53 TCR AV12/BV6 CD8+	TP53 TCR AV6/BV11 CD8+	Имитация TCR
KLE	<u>91,5</u>	<u>80,9</u>	<u>84,3</u>	2,2
SKUT1	2,6	2,5	2,5	8,3
ТΥКNU	<u>70,4</u>	<u>67,3</u>	<u>56,4</u>	2,7
ТΥКNU CpR	<u>87,7</u>	<u>78,5</u>	<u>74,7</u>	2,8
VMRCLCD	3,0	2,8	8,0	6,3
SKBR3	1,5	2,4	2,1	5,2
CEM/C1	2,6	3,5	5,0	4,1
HCC1395	1,5	2,3	3,4	2,6
KMS26	<u>65,7</u>	<u>58,7</u>	<u>61,5</u>	6,9
AU565	2,0	2,0	2,3	5,6
LS123	2,0	2,7	3,2	4,6
CCRF CEM	3,9	5,6	6,2	2,4
SAOS2 R175H	<u>89,3</u>	<u>88,4</u>	<u>88,5</u>	5,5
SAOS исходн.	2,3	0,0	11,0	5,2

Пример16.

Данный пример демонстрирует краткую информацию о реактивности TCR примеров 1-15.

TCR табл. 52 выделяли, экспрессировали в Т-клетках и тестировали в отношении релевантного антигена. Обобщенные результаты показаны в табл. 52.

Таблица 52

Название TCR	Аминокислотная замена p53	тестируемый TCR?	Реактивность в отношении мутации p53?
4127-TP53-G245S-TCR1	G245S	да	да
4127-TP53-G245S-TCR4	G245S	да	да
4127_O102_TCR	G245S	да	да
4149TCRa2b2	Y220C	да	да
4196_AV12-1_with_BV6-1	R175H	да	да
4196_AV38-1_with_BV10-3	R175H	да	да
4196_AV6_with_BV11-2	R175H	да	нет
4253-TIL-TCR1	R248W	да	нет
4253-TIL-TCR2	R248W	да	нет
4266-TCR1	R248W	да	нет
4266-TCR2	R248W	да	да
4266-TCR3	R248W	да	да
4266-TCR4	R248W	да	да
4268-TCR1	R248Q	да	нет
4268-TCR2	R248Q	да	нет
4268-TCR3	R248Q	да	нет
4268-TCR4	R248Q	да	нет
4268-TCR5	R248Q	да	нет
4273-TP53-R248W-TCR1a1	R248W	да	нет
4273-TP53-R248W-TCR1a2	R248W	да	Да
4141-TCR1a2	R175H	да	да
4285-TCR1	R175H	да	да
4259-F6-TCR	Y220C	да	да
4127-O37-TCR	G245S	да	да

Все ссылки, включая публикации, патентные заявки и патенты, процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в равной мере, как если бы каждая ссылка была отдельно и конкретно указана включенной посредством ссылки и была изложена в данном документе во всей своей полноте.

Применение терминов в единственном числе и "по меньшей мере один" и похожих объектов ссылки в контексте описания данного изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее и термины в единственном числе и термины во множественном числе, если в данном документе не указано иное или оно явно не противоречит контексту. Применение термина "по меньшей мере один" с последующим перечислением одного или более пунктов (например, "по меньшей мере один из А и В") следует истолковывать как означающее один пункт, выбранный из перечисленных пунктов (А или В), или любую комбинацию двух или более из перечисленных пунктов (А или В), если в данном документе не указано иное или оно явно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует истолковывать как открытые термины (т.е. означающие "включающий, но не ограниченный"), если не указано иное. Раскрытие диапазонов значений в данном документе только предназначено для того, чтобы служить в качестве сокращенного способа ссылки отдельно на каждое отдельное значение, попадающее в данный диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание изобретения, как если бы оно было по отдельности перечислено в данном документе. Все способы, описанные в данном документе, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное или иначе нет явных противоречий контексту. Применение всех возможных примеров или вводных слов перед примером (например, "такой как"), предоставленных в данном документе, предназначено

только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Язык в описании изобретения не следует истолковывать как указывающий на какой-либо незаявленный элемент в качестве существенного для практического осуществления данного изобретения.

Предпочтительные воплощения данного изобретения описаны в данном документе, включая наилучший способ, известный авторам изобретения, для осуществления изобретения. Изменения данных предпочтительных воплощений могут стать очевидными обычным специалистам в данной области при чтении изложенного выше описания. Авторы изобретения ожидают, что специалисты в данной области будут использовать такие изменения в соответствующих случаях, и авторы изобретения намерены осуществлять на практике данное изобретение иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно данное изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета, перечисленные в формуле изобретения, приложенной к данному документу, как разрешено применяемым законом. Кроме того, любая комбинация описанных выше элементов во всех их возможных вариантах охвачена изобретением, если в данном документе не указано иное или она иначе явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный или очищенный Т-клеточный рецептор (TCR), обладающий антигенной специфичностью к человеческому р53 с мутацией R175H, где мутация R175H определена ссылкой на SEQ ID NO: 1 и где TCR содержит первую полипептидную цепь, содержащую CDR1 α с SEQ ID NO: 87, CDR2 α с SEQ ID NO: 88 и CDR3 α с SEQ ID NO: 89, и вторую полипептидную цепь, содержащую CDR1 β с SEQ ID NO: 90, CDR2 β с SEQ ID NO: 91 и CDR3 β с SEQ ID NO: 92.

2. TCR по п.1, где TCR содержит аминокислотные последовательности обе из SEQ ID NO: 93-94.

3. TCR по п.1 или 2, где TCR содержит аминокислотные последовательности обе из SEQ ID NO: 95-96.

4. Выделенный или очищенный полипептид, содержащий функциональную часть TCR по любому из пп.1-3, где функциональная часть содержит CDR1 α с SEQ ID NO: 87, CDR2 α с SEQ ID NO: 88, CDR3 α с SEQ ID NO: 89, CDR1 β с SEQ ID NO: 90, CDR2 β с SEQ ID NO: 91 и CDR3 β с SEQ ID NO: 92.

5. Полипептид по п.4, где полипептид содержит аминокислотные последовательности обе из SEQ ID NO: 93-94.

6. Полипептид по п.4 или 5, где полипептид содержит аминокислотные последовательности обе из SEQ ID NO: 95-96.

7. Выделенный или очищенный белок, содержащий цепь TCR α , содержащую CDR1 α с SEQ ID NO: 87, CDR2 α с SEQ ID NO: 88 и CDR3 α с SEQ ID NO: 89, и цепь TCR β , содержащую CDR1 β с SEQ ID NO: 90, CDR2 β с SEQ ID NO: 91 и CDR3 β с SEQ ID NO: 92.

8. Белок по п.7, где белок содержит цепь TCR α , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и цепь TCR β , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94.

9. Белок по п.7 или 8, где белок содержит цепь TCR α , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и цепь TCR β , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

10. Выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую TCR по любому из пп.1-3.

11. Выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид по любому из пп.4-6.

12. Выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок по любому из пп.7-9.

13. Рекombинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.10-12.

14. Выделенная или очищенная клетка-хозяин, содержащая рекombинантный экспрессионный вектор по п.13.

15. Выделенная или очищенная популяция клеток, содержащая клетку-хозяина по п.14.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая

(a) TCR по любому из пп.1-3, полипептид по любому из пп.4-6, белок по любому из пп.7-9, нуклеиновую кислоту по любому из пп.10-12, рекombинантный экспрессионный вектор по п.13, клетку-хозяина по п.14 или популяцию клеток по п.15; и

(b) фармацевтически приемлемый носитель.

17. Способ выявления наличия рака у млекопитающего, включающий

(a) приведение в контакт образца, содержащего раковые клетки, с TCR по любому из пп.1-3, полипептидом по любому из пп.4-6, белком по любому из пп.7-9, нуклеиновой кислотой по любому из пп.10-12, рекombинантным экспрессионным вектором по п.13, клеткой-хозяином по п.14, популяцией клеток по п.15 или фармацевтической композицией по п.16 с образованием вследствие этого комплекса; и

(b) выявление данного комплекса,

где выявление комплекса указывает на наличие рака у млекопитающего,

где рак экспрессирует человеческий p53 с мутацией R175H, где мутация R175H определена ссылкой на SEQ ID NO: 1.

18. Способ по п.17, где рак представляет собой эпителиальный рак.

19. Способ по п.17, где рак представляет собой холангиокарциному, меланому, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак яичника, рак эндометрия, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиобластома, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря.

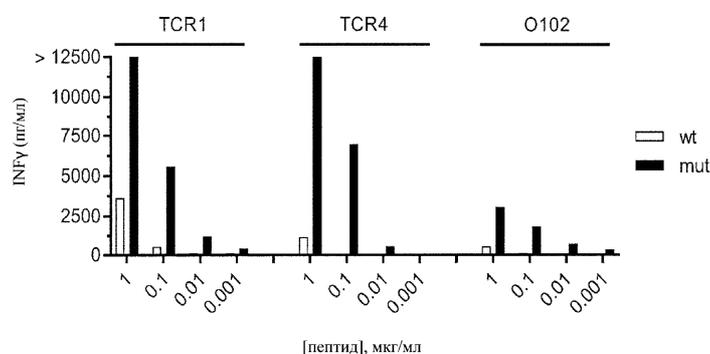
20. Применение TCR по любому из пп.1-3, полипептида по любому из пп.4-6, белка по любому из пп.7-9, нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-12, рекомбинантного экспрессионного вектора по п.13, клетки-хозяина по п.14, популяции клеток по п.15 или фармацевтической композиции по п.16 в производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения рака у млекопитающего, где рак экспрессирует человеческий p53 с мутацией R175H, где мутация R175H определена ссылкой на SEQ ID NO: 1.

21. Применение по п.20, где популяция клеток является аутологичной в отношении млекопитающего.

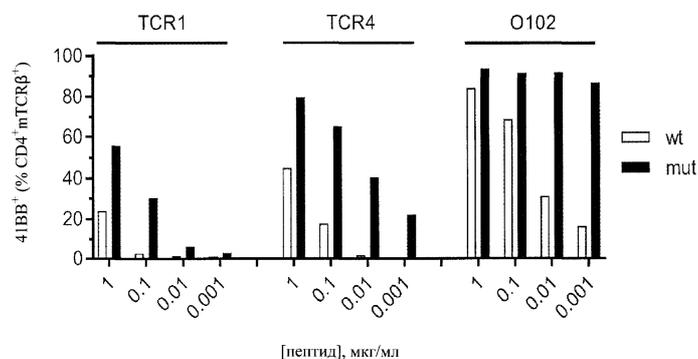
22. Применение по п.20, где популяция клеток является аллогенной в отношении млекопитающего.

23. Применение по любому из пп.20-22, где рак представляет собой эпителиальный рак.

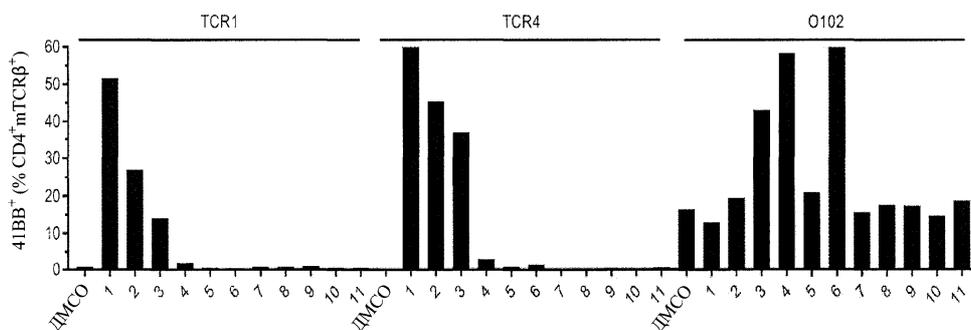
24. Применение по любому из пп.20-22, где рак представляет собой холангиокарциному, меланому, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак яичника, рак эндометрия, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиобластома, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря.



Фиг. 1

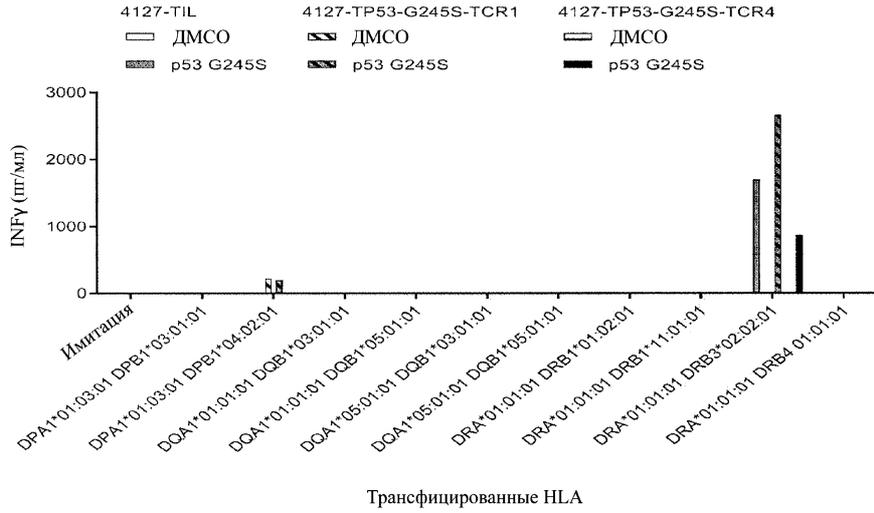


Фиг. 2



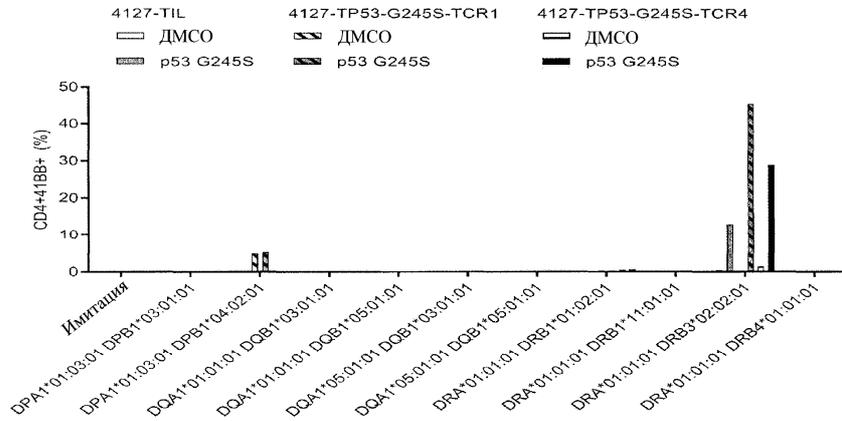
15-мерный пептид TP53-G245S

Фиг. 3



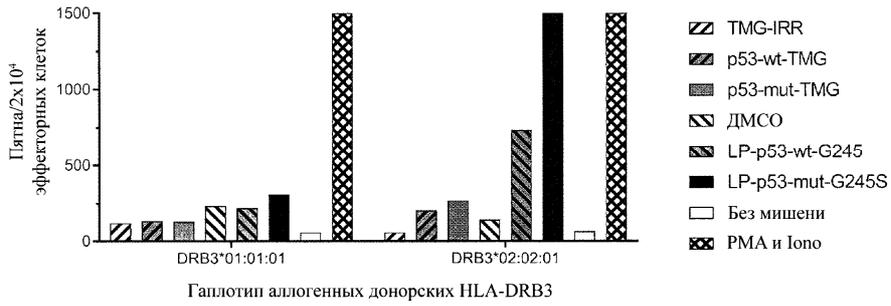
Трансфицированные HLA

Фиг. 4

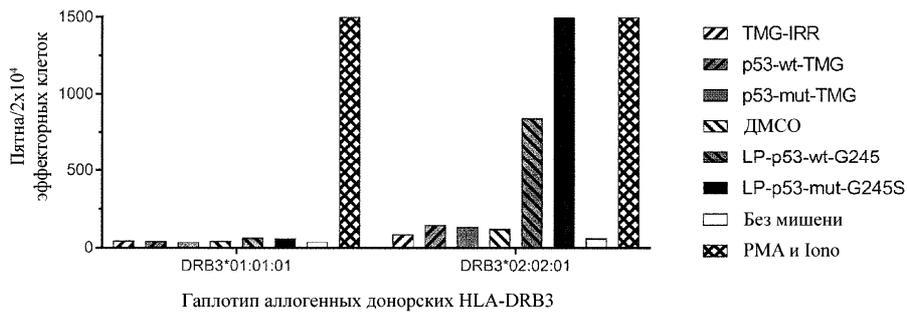


Трансфицированные HLA

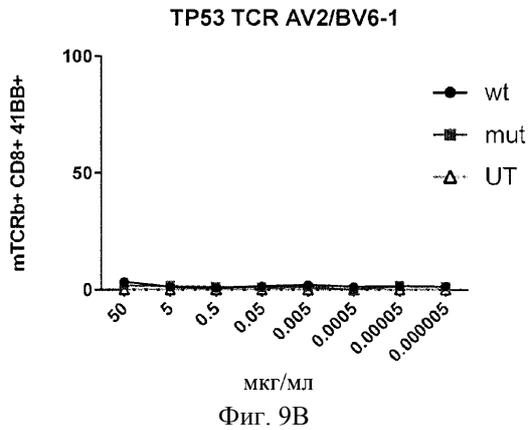
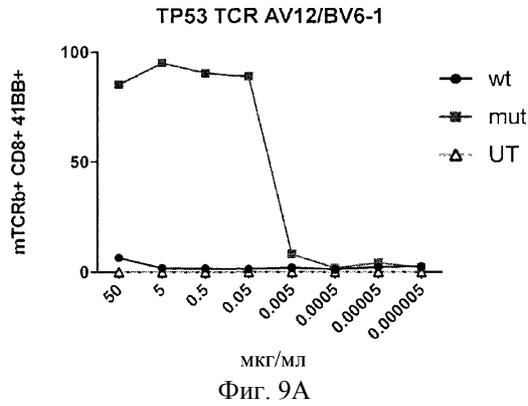
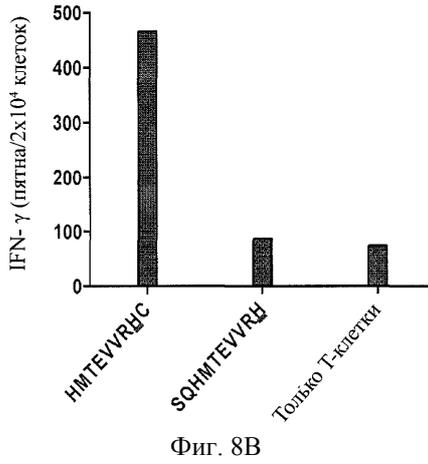
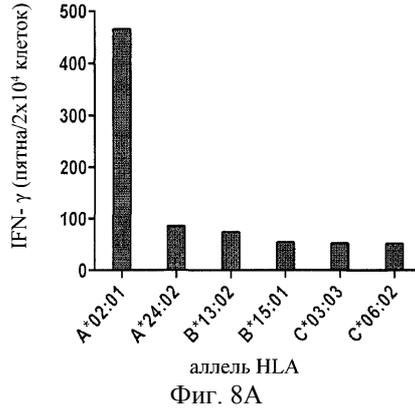
Фиг. 5

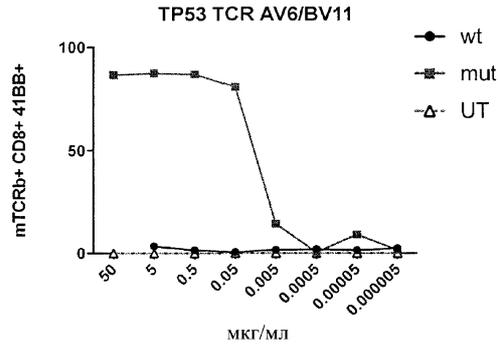


Фиг. 6

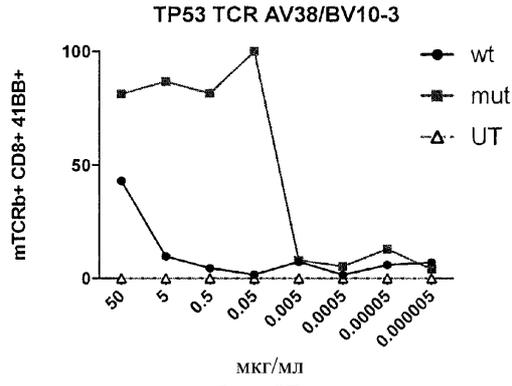


Фиг. 7

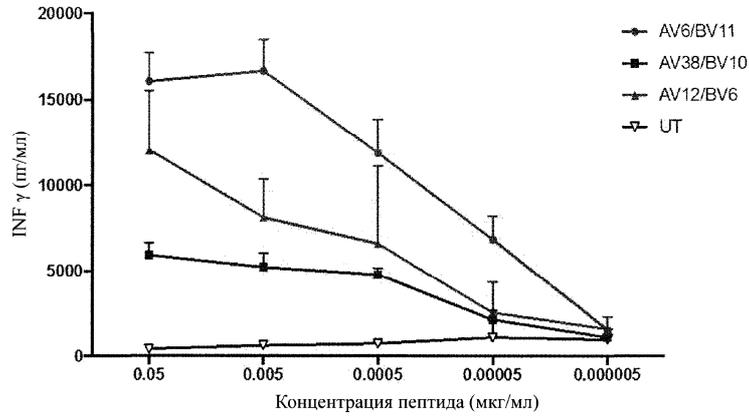




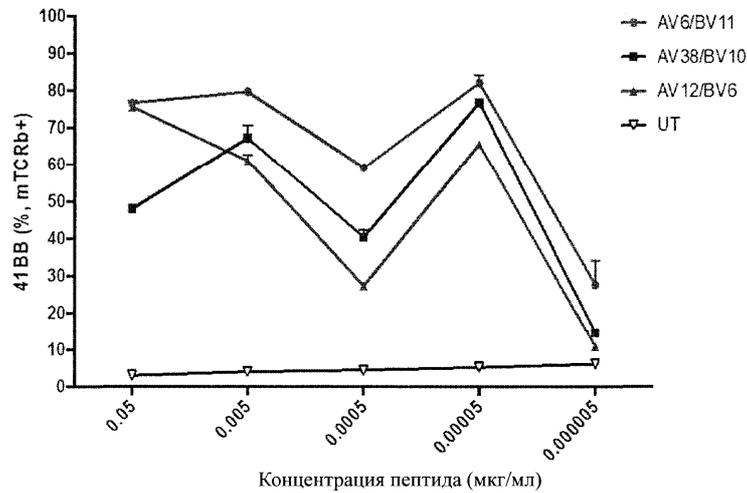
Фиг. 9С



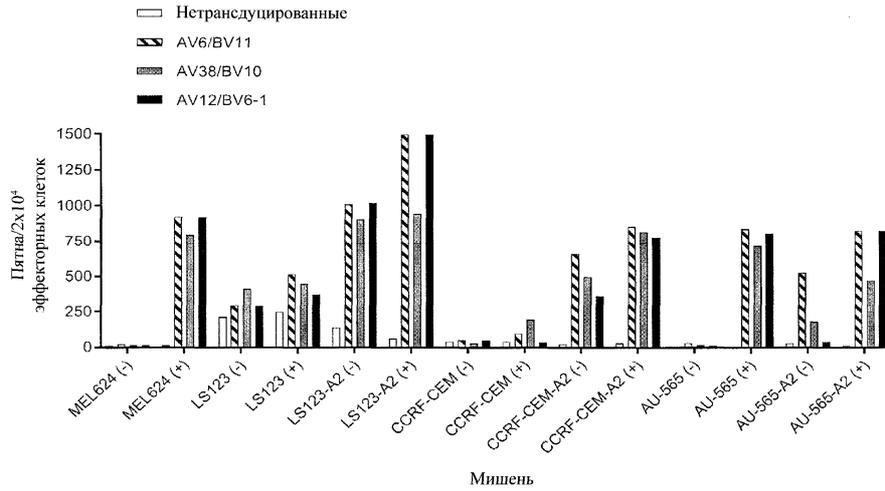
Фиг. 9D



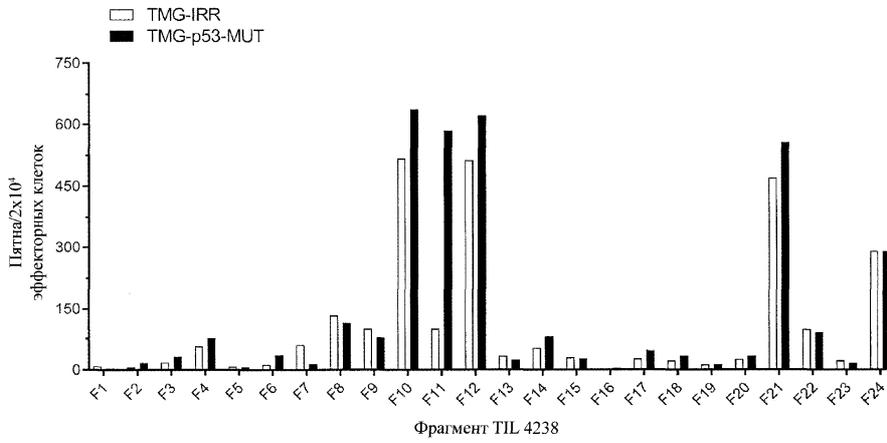
Фиг. 10А



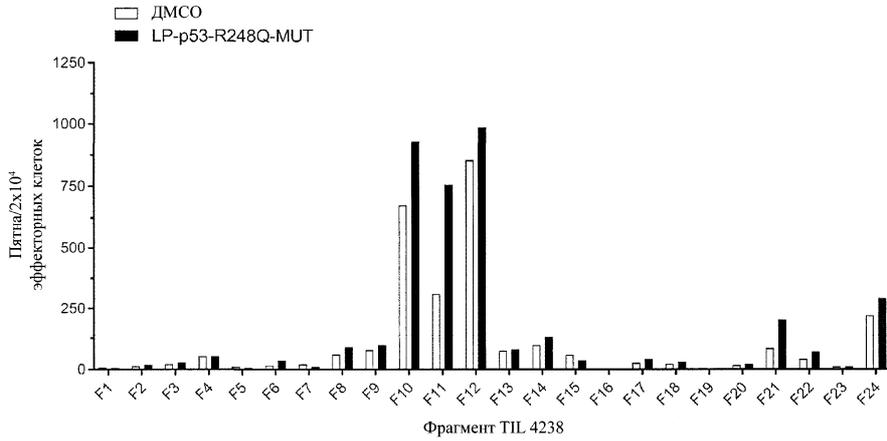
Фиг. 10В



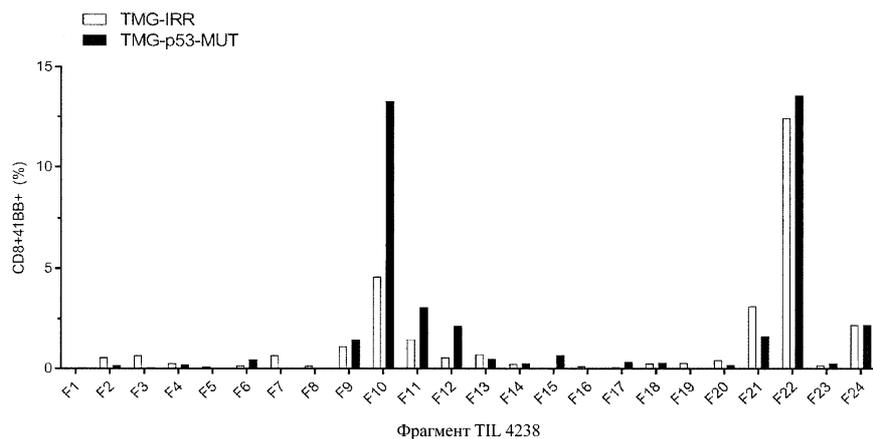
Мишень
 Фиг. 11



Фрагмент TIL 4238
 Фиг. 12

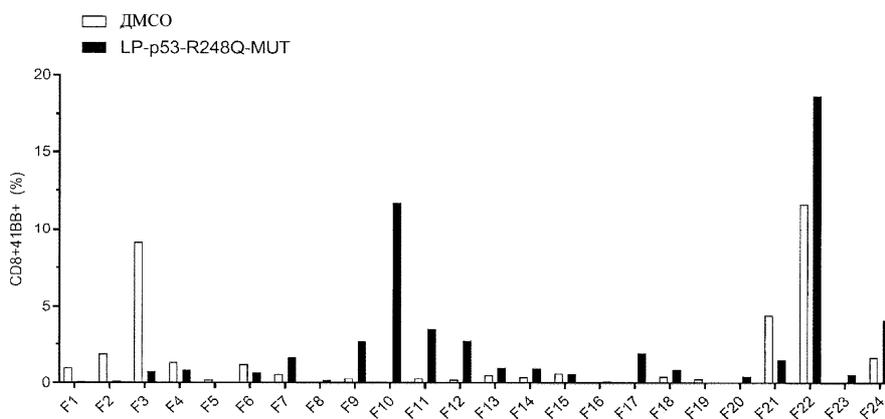


Фрагмент TIL 4238
 Фиг. 13



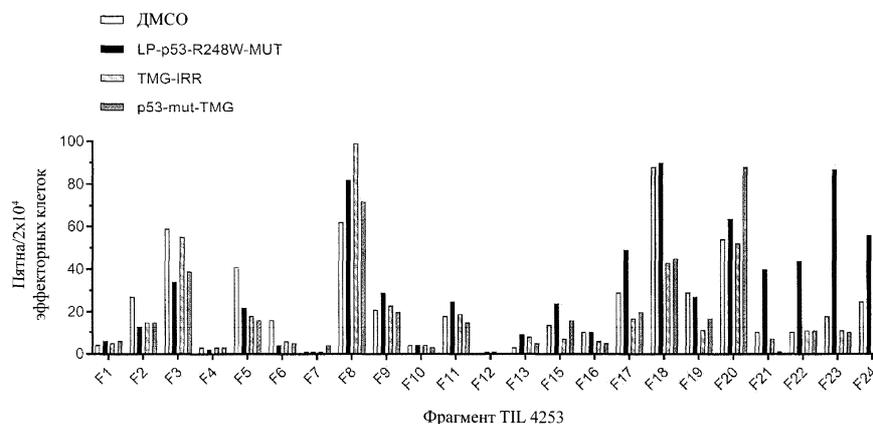
Фрагмент TIL 4238

Фиг. 14



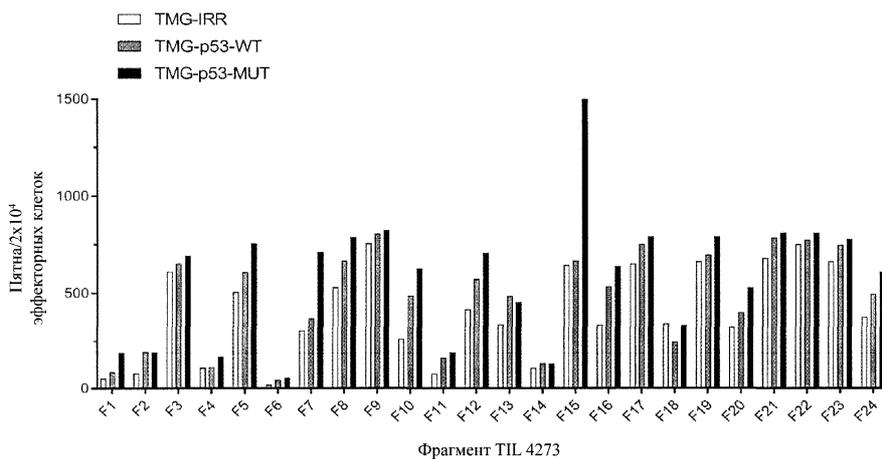
Фрагмент TIL 4238

Фиг. 15

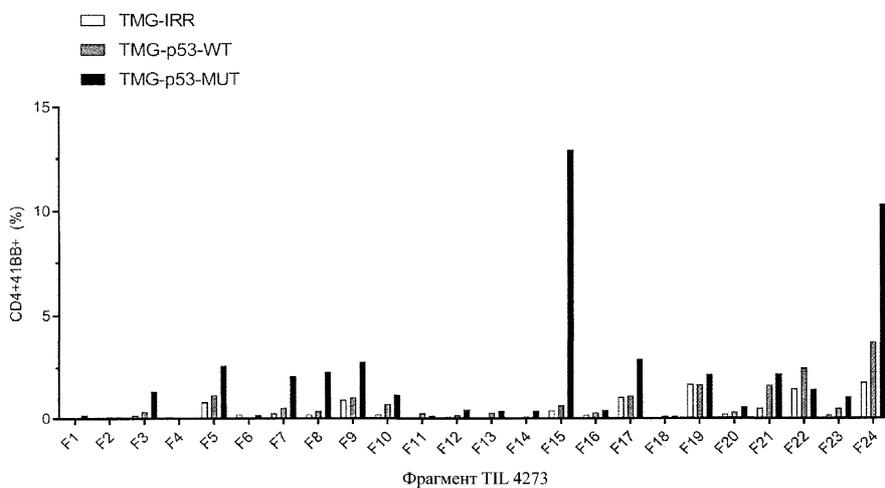


Фрагмент TIL 4253

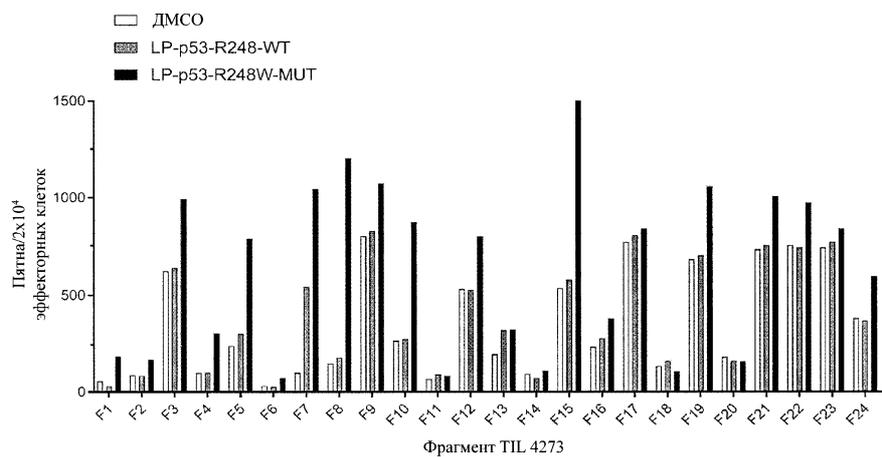
Фиг. 16



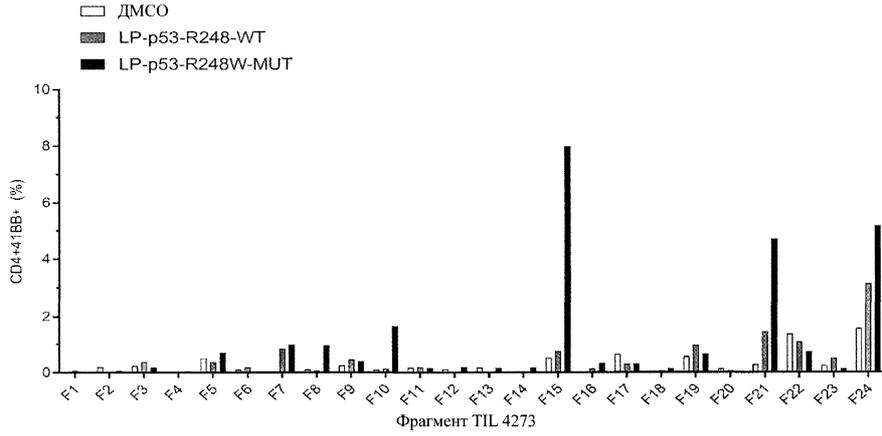
Фиг. 17



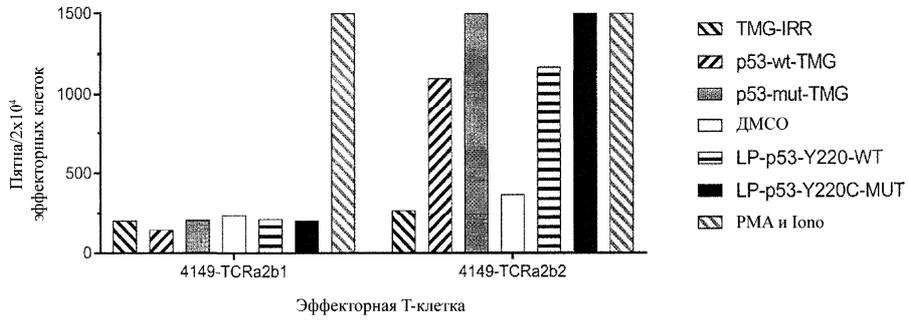
Фиг. 18



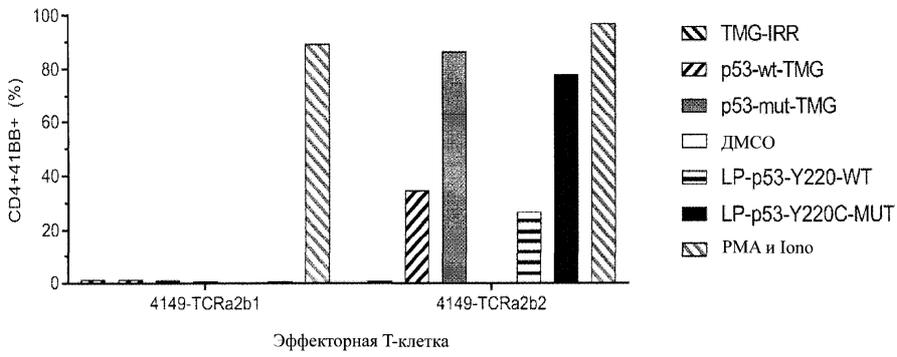
Фиг. 19



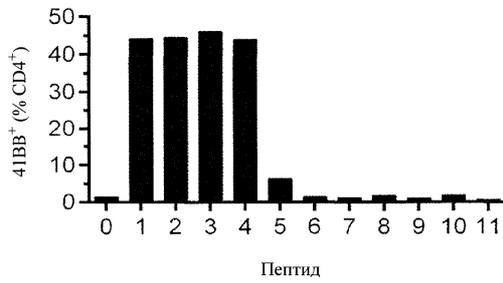
Фиг. 20



Фиг. 21

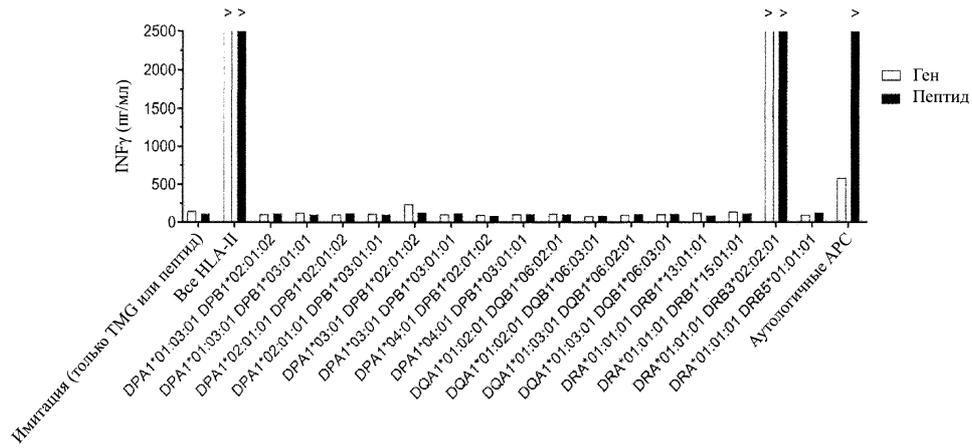


Фиг. 22

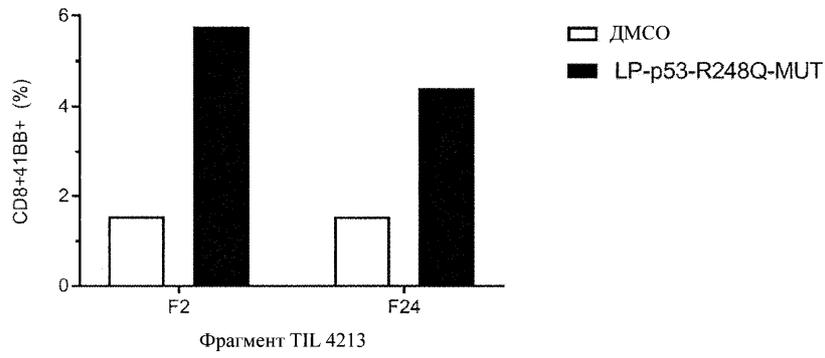


Фиг. 23

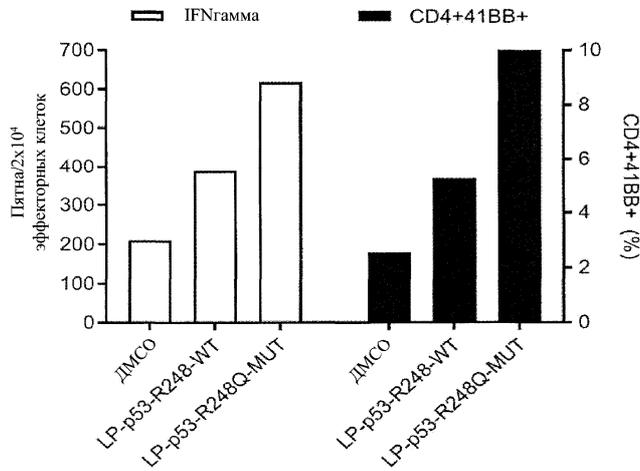
045595



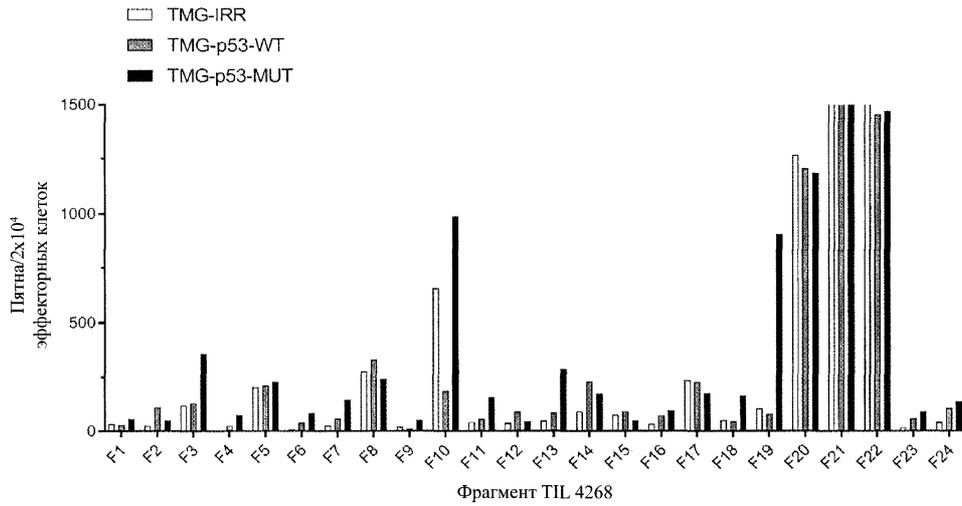
Фиг. 24



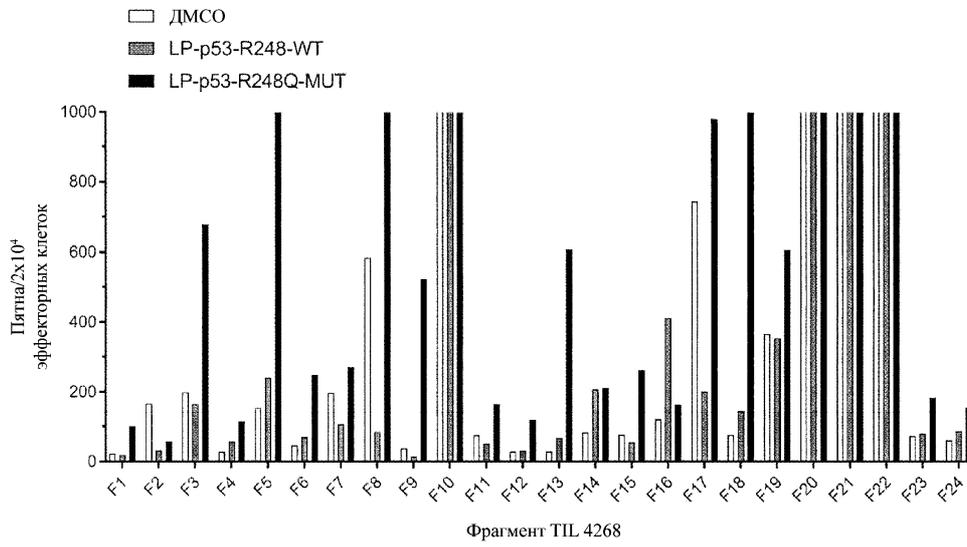
Фиг. 25



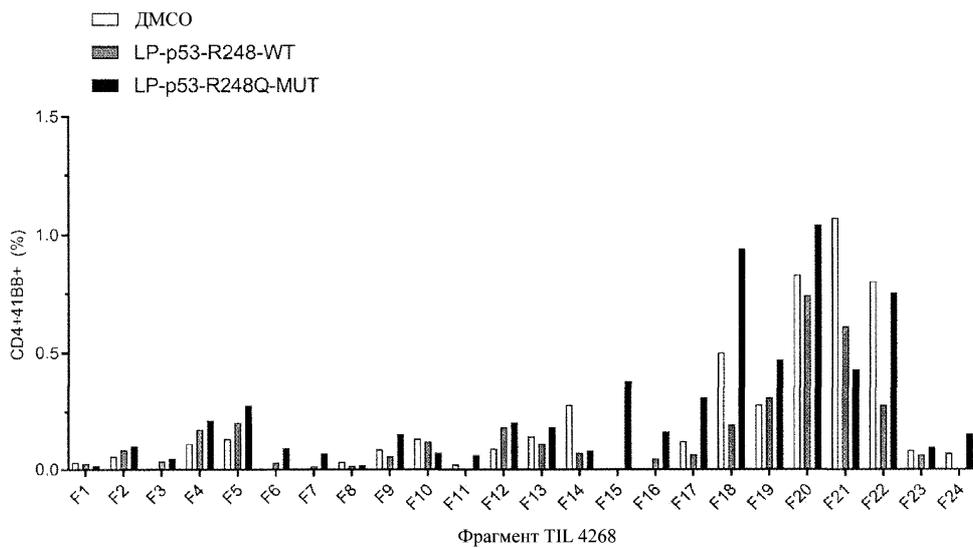
Фиг. 26



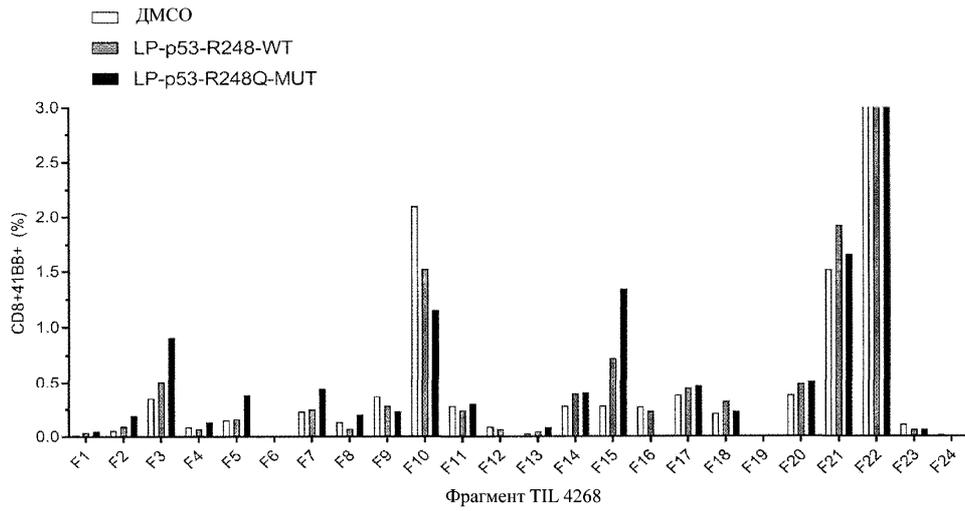
Фиг. 27



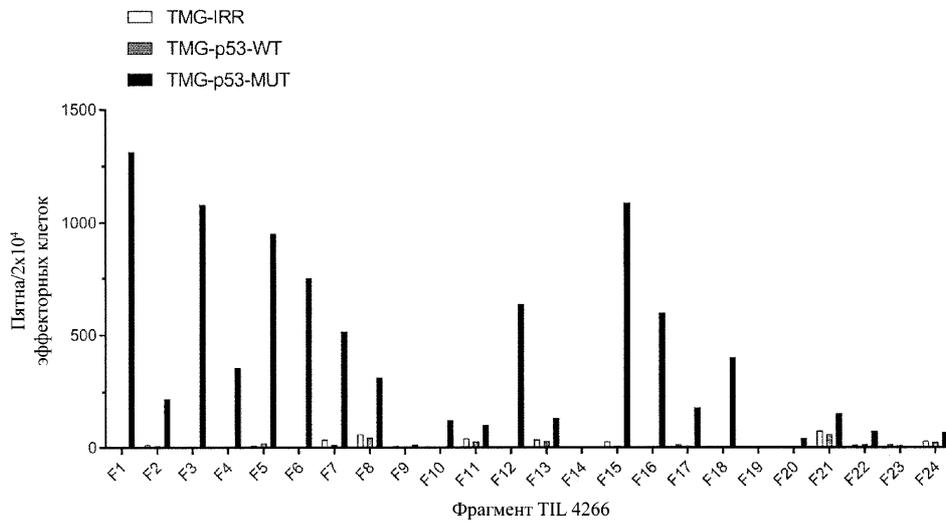
Фиг. 28



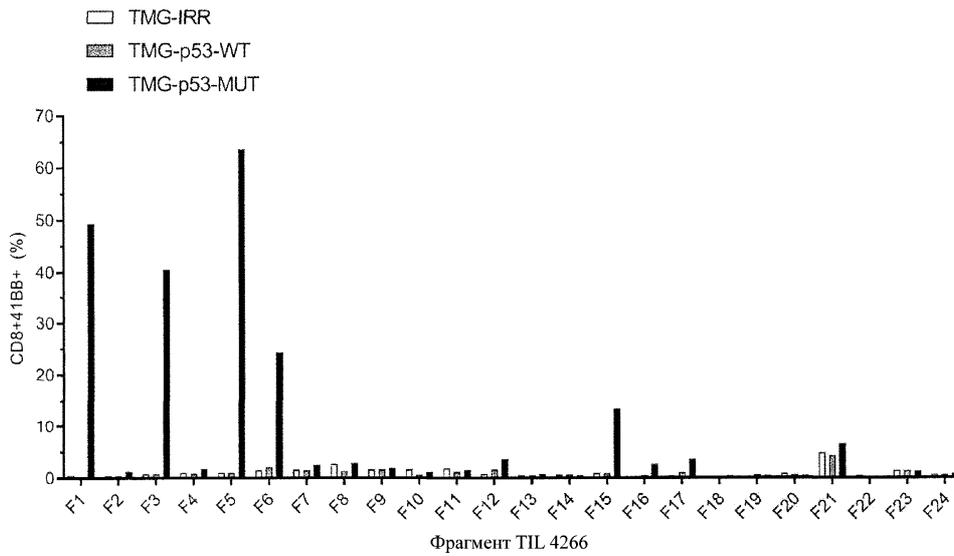
Фиг. 29



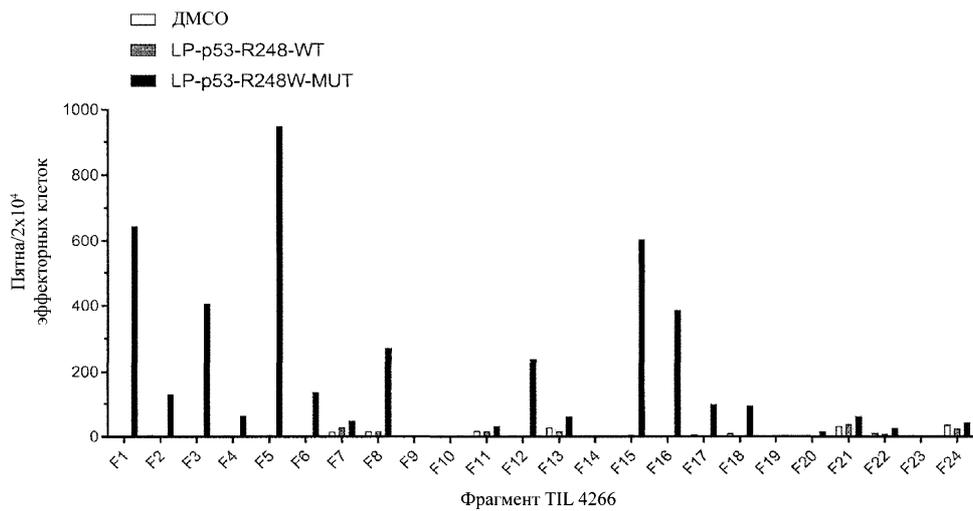
Фиг. 30



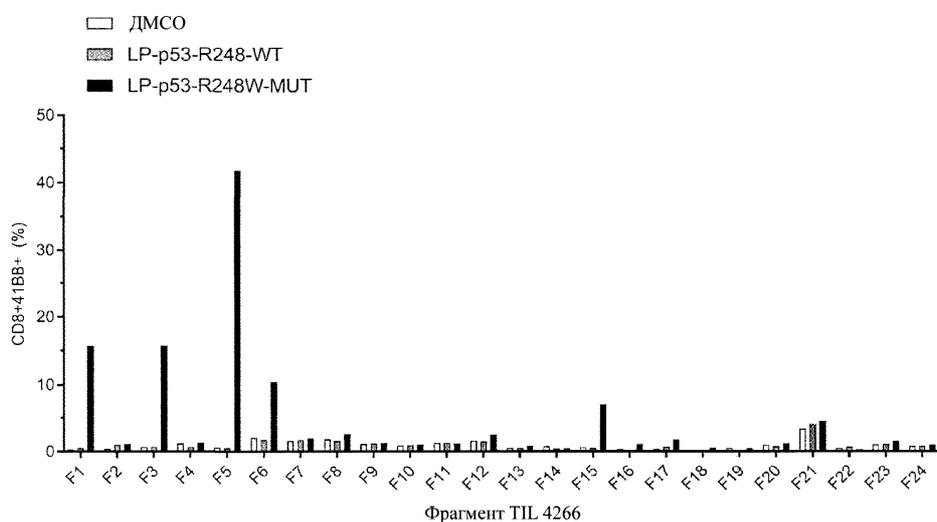
Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33



Фиг. 34

CLUSTAL 0(1.2.4) множественное выравнивание последовательностей

```

SP|P04637|P53_HUMAN  MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLENVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP 60
SP|P04637-2|P53_HUMAN  MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLENVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP 60
SP|P04637-3|P53_HUMAN  MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLENVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP 60
SP|P04637-4|P53_HUMAN  -----MDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP 21
SP|P04637-5|P53_HUMAN  -----MDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP 21
SP|P04637-6|P53_HUMAN  -----MDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP 21
SP|P04637-7|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-8|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-9|P53_HUMAN  -----

SP|P04637|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAK 120
SP|P04637-2|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAK 120
SP|P04637-3|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAK 120
SP|P04637-4|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAK 81
SP|P04637-5|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAK 81
SP|P04637-6|P53_HUMAN  DEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAK 81
SP|P04637-7|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-8|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-9|P53_HUMAN  -----

SP|P04637|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDS TPPPGTRVRAMAIYKQSQHMT EVVRRCPHHE 180
SP|P04637-2|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDS TPPPGTRVRAMAIYKQSQHMT EVVRRCPHHE 180
SP|P04637-3|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDS TPPPGTRVRAMAIYKQSQHMT EVVRRCPHHE 180
SP|P04637-4|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDS TPPPGTRVRAMAIYKQSQHMT EVVRRCPHHE 141
SP|P04637-5|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDS TPPPGTRVRAMAIYKQSQHMT EVVRRCPHHE 141
SP|P04637-6|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDS TPPPGTRVRAMAIYKQSQHMT EVVRRCPHHE 141
SP|P04637-7|P53_HUMAN  -----MFCQLAKTCPVQLWVDS TPPPGTRVRAMAIYKQSQHMT EVVRRCPHHE 48
SP|P04637-8|P53_HUMAN  -----MFCQLAKTCPVQLWVDS TPPPGTRVRAMAIYKQSQHMT EVVRRCPHHE 48
SP|P04637-9|P53_HUMAN  -----MFCQLAKTCPVQLWVDS TPPPGTRVRAMAIYKQSQHMT EVVRRCPHHE 48
*****

SP|P04637|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDORNTFRHSVWVPYEPPEVGSQDCTIIHYNMCMNS 240
SP|P04637-2|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDORNTFRHSVWVPYEPPEVGSQDCTIIHYNMCMNS 240
SP|P04637-3|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDORNTFRHSVWVPYEPPEVGSQDCTIIHYNMCMNS 240
SP|P04637-4|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDORNTFRHSVWVPYEPPEVGSQDCTIIHYNMCMNS 201
SP|P04637-5|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDORNTFRHSVWVPYEPPEVGSQDCTIIHYNMCMNS 201
SP|P04637-6|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDORNTFRHSVWVPYEPPEVGSQDCTIIHYNMCMNS 201
SP|P04637-7|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDORNTFRHSVWVPYEPPEVGSQDCTIIHYNMCMNS 108
SP|P04637-8|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDORNTFRHSVWVPYEPPEVGSQDCTIIHYNMCMNS 108
SP|P04637-9|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDORNTFRHSVWVPYEPPEVGSQDCTIIHYNMCMNS 108
*****

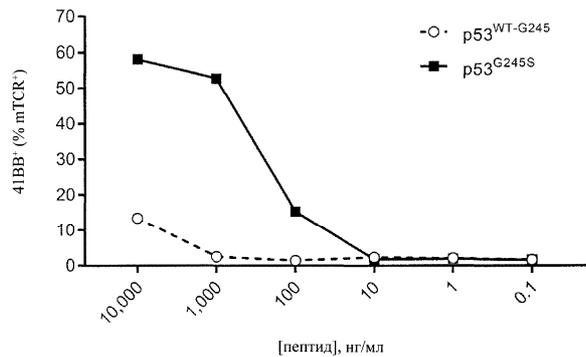
SP|P04637|P53_HUMAN  SCMGGMNRRLITIIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRRTEENLRKKGEPHHELP 300
SP|P04637-2|P53_HUMAN  SCMGGMNRRLITIIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRRTEENLRKKGEPHHELP 300
SP|P04637-3|P53_HUMAN  SCMGGMNRRLITIIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRRTEENLRKKGEPHHELP 300
SP|P04637-4|P53_HUMAN  SCMGGMNRRLITIIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRRTEENLRKKGEPHHELP 261
SP|P04637-5|P53_HUMAN  SCMGGMNRRLITIIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRRTEENLRKKGEPHHELP 261
SP|P04637-6|P53_HUMAN  SCMGGMNRRLITIIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRRTEENLRKKGEPHHELP 261
SP|P04637-7|P53_HUMAN  SCMGGMNRRLITIIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRRTEENLRKKGEPHHELP 168
SP|P04637-8|P53_HUMAN  SCMGGMNRRLITIIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRRTEENLRKKGEPHHELP 168
SP|P04637-9|P53_HUMAN  SCMGGMNRRLITIIITLEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRRTEENLRKKGEPHHELP 168
*****

SP|P04637|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDQAQKKEPG 360
SP|P04637-2|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQKKKPLDGEYFTLQDQTSFQKENC----- 341
SP|P04637-3|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQKKKPLDGEYFTLQMLDLRWYFLINSS----- 346
SP|P04637-4|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDQAQKKEPG 321
SP|P04637-5|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQKKKPLDGEYFTLQDQTSFQKENC----- 302
SP|P04637-6|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQKKKPLDGEYFTLQMLDLRWYFLINSS----- 307
SP|P04637-7|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDQAQKKEPG 228
SP|P04637-8|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQKKKPLDGEYFTLQDQTSFQKENC----- 209
SP|P04637-9|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQKKKPLDGEYFTLQMLDLRWYFLINSS----- 214
*****

SP|P04637|P53_HUMAN  GSRHSHSLKSKKGQSTRHKLMFKTEGPDS 393
SP|P04637-2|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-3|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-4|P53_HUMAN  GSRHSHSLKSKKGQSTRHKLMFKTEGPDS 354
SP|P04637-5|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-6|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-7|P53_HUMAN  GSRHSHSLKSKKGQSTRHKLMFKTEGPDS 261
SP|P04637-8|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-9|P53_HUMAN  -----
    
```

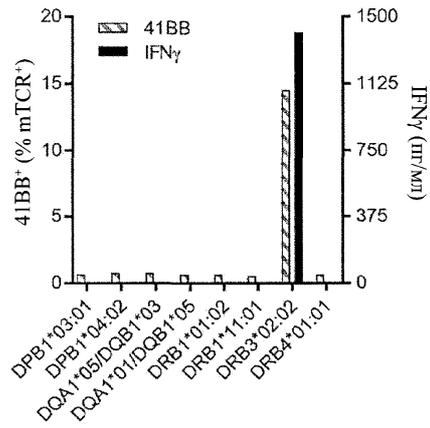
Фиг. 35

4127-O37-TCR



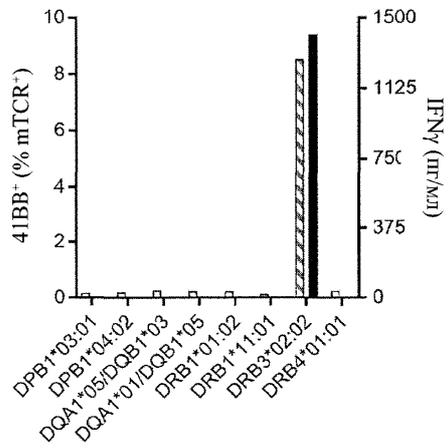
Фиг. 36

4127-O37-TCR



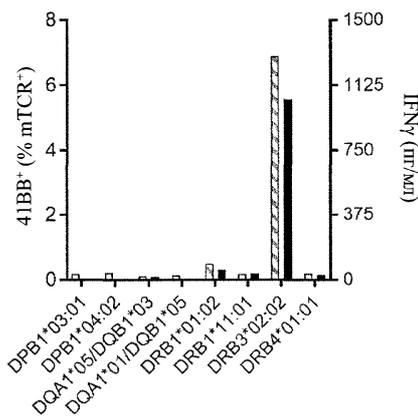
Фиг. 37А

4127-TP53-G245S-TCR1



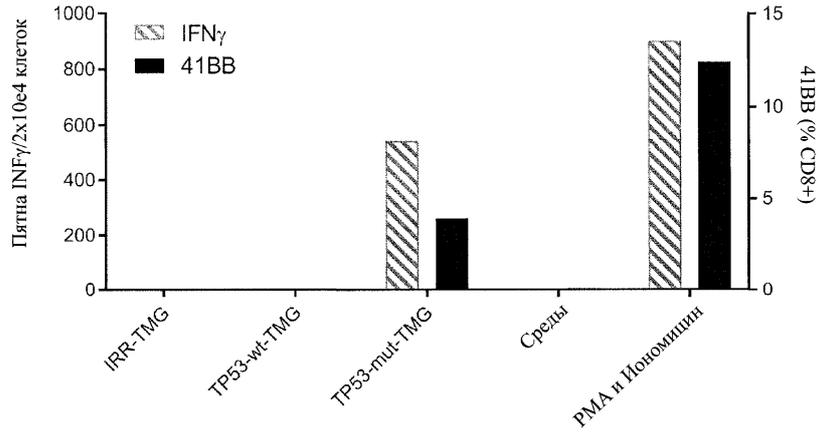
Фиг. 37В

4127-O102-TCR

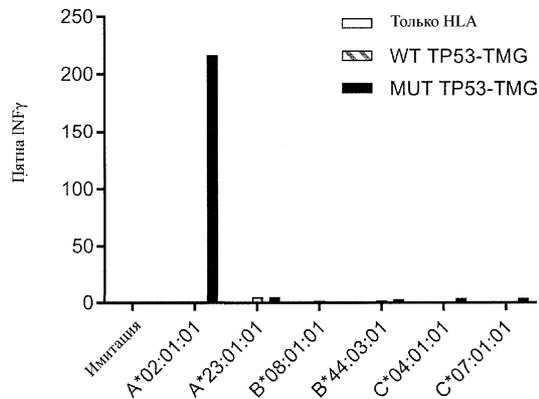


Фиг. 37С

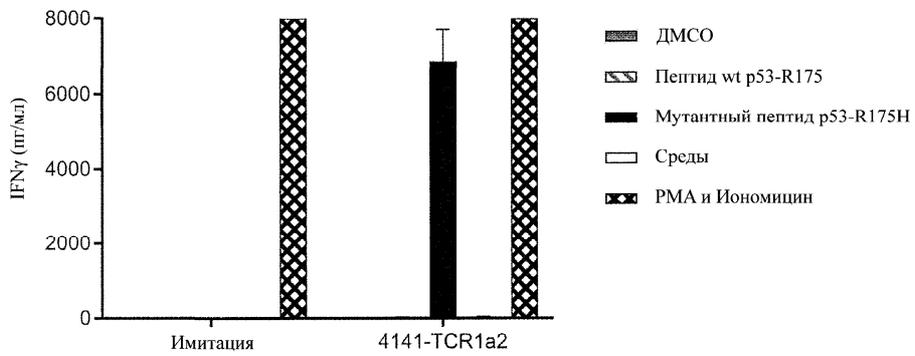
045595



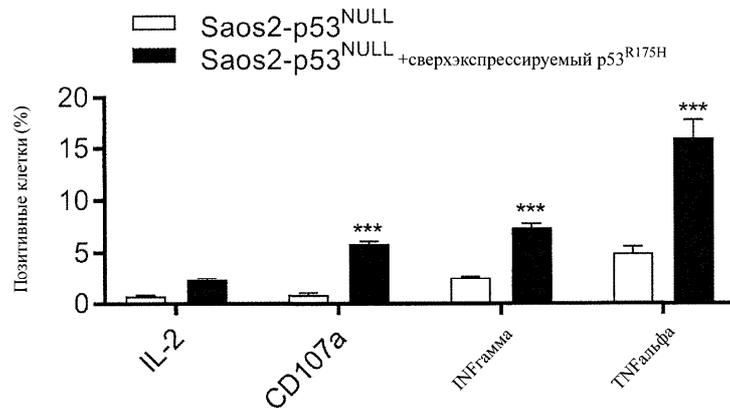
Фиг. 38



Фиг. 39

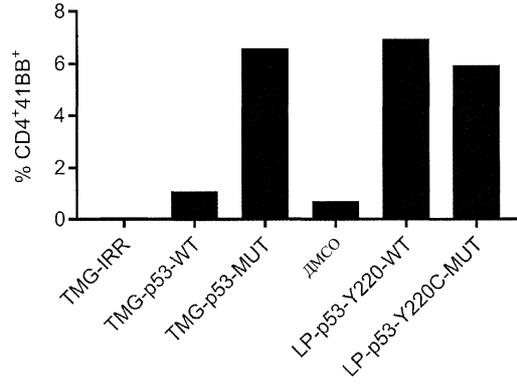


Фиг. 40

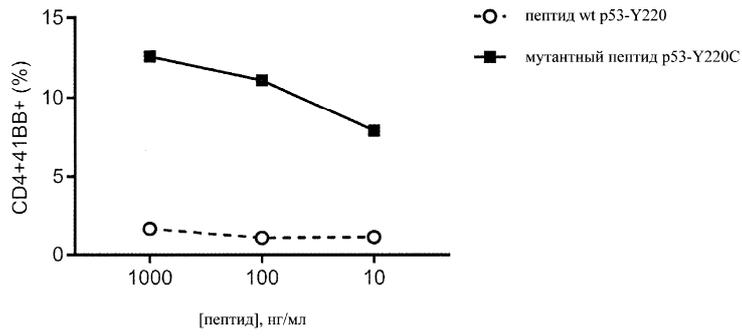


Фиг. 41

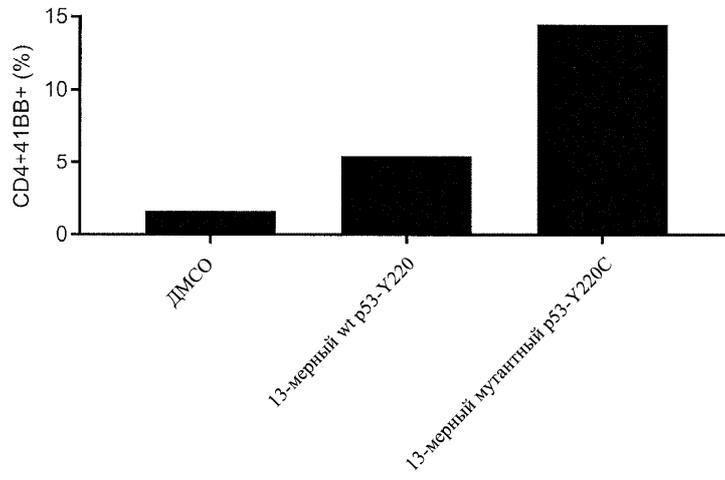
045595



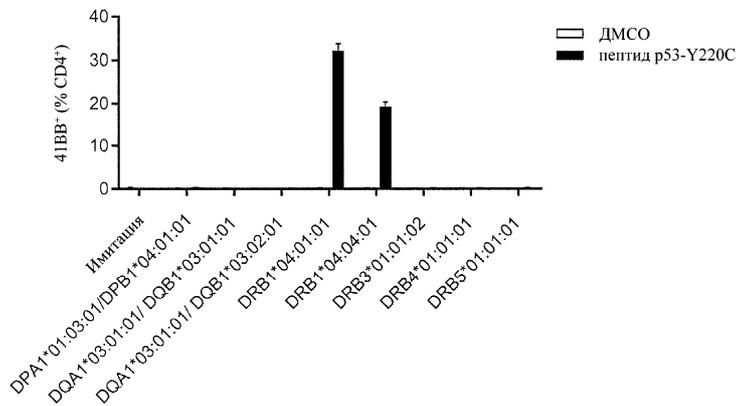
Фиг. 42



Фиг. 43

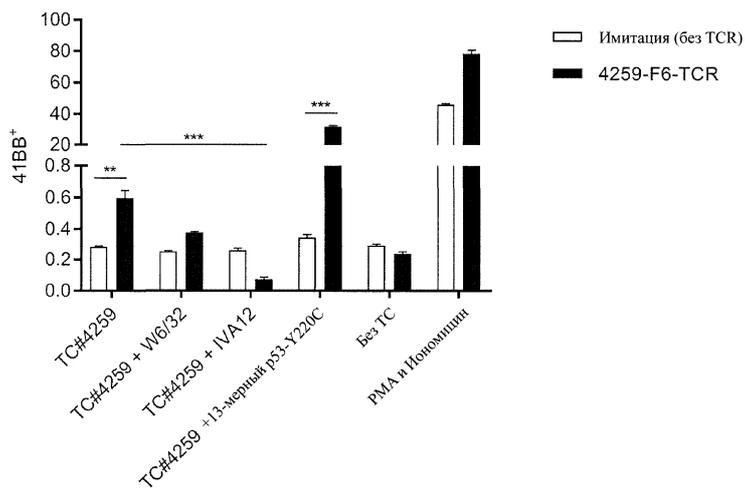


Фиг. 44

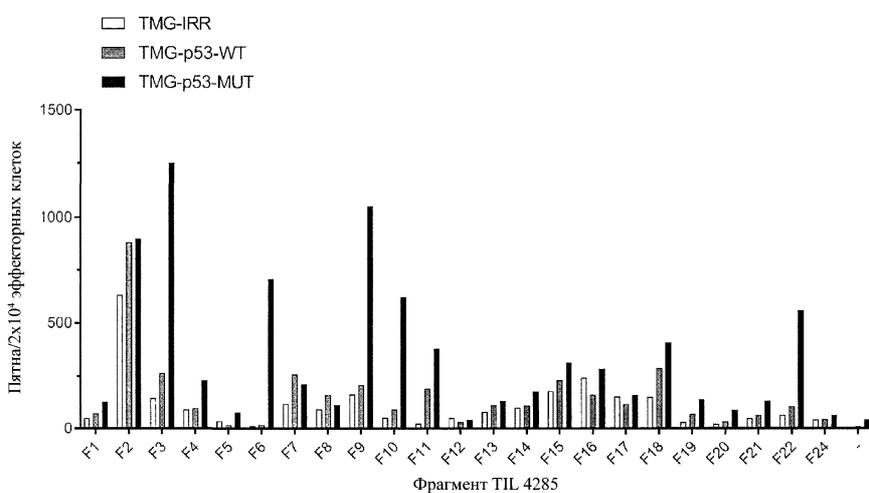


Фиг. 45

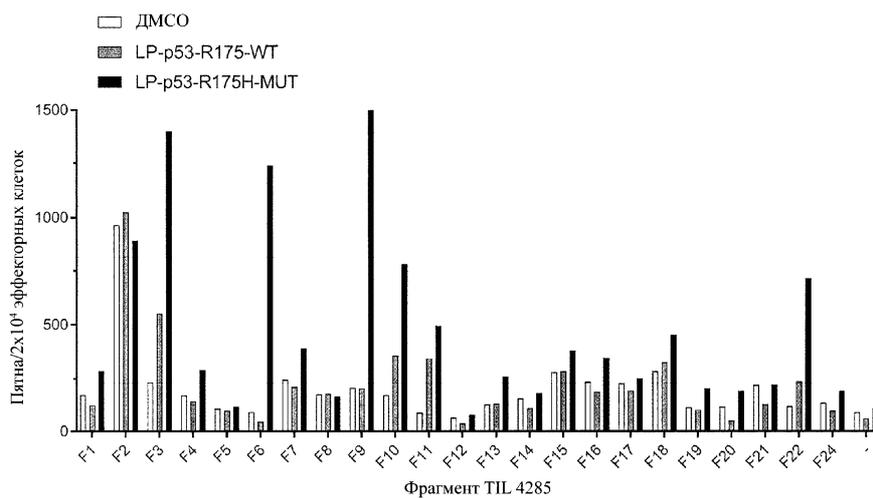
045595



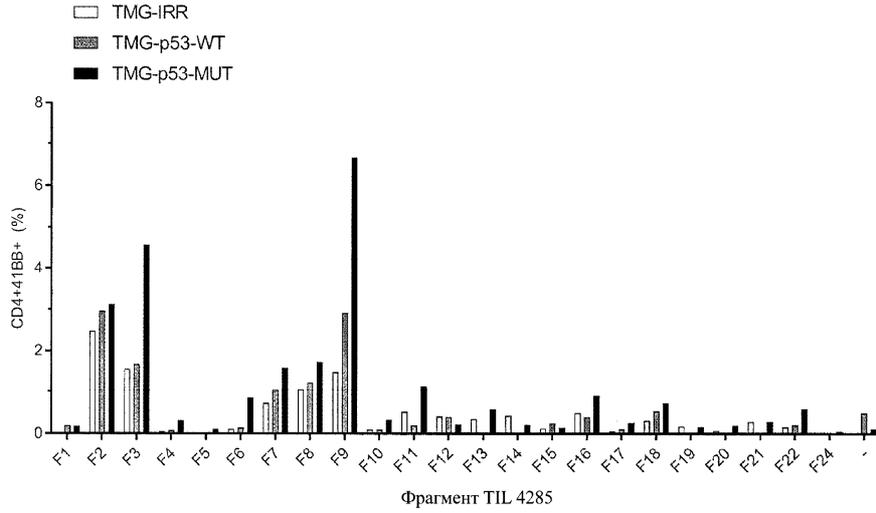
Фиг. 46



Фиг. 47

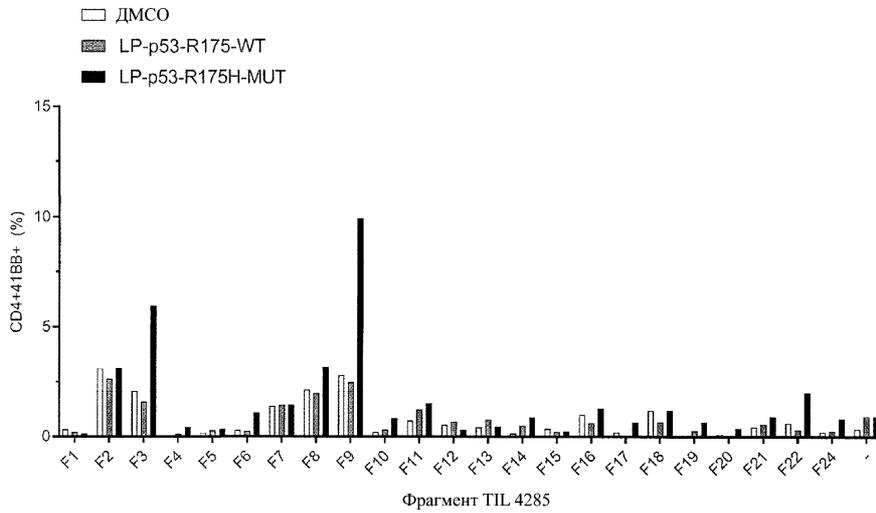


Фиг. 48



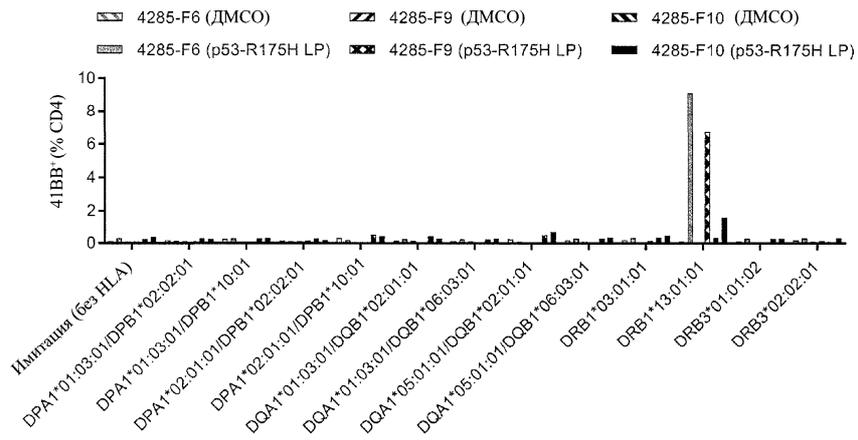
Фрагмент TIL 4285

Фиг. 49

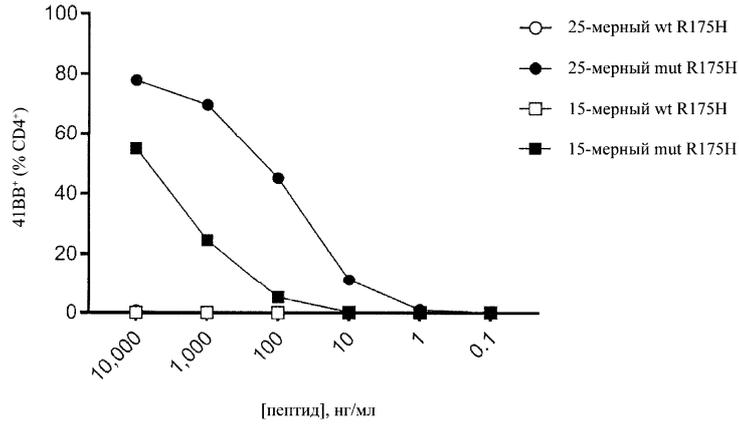


Фрагмент TIL 4285

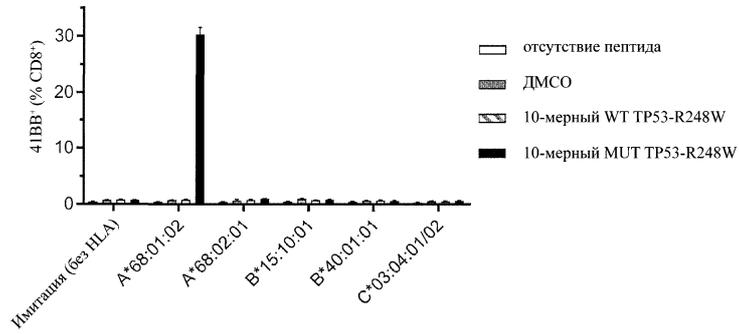
Фиг. 50



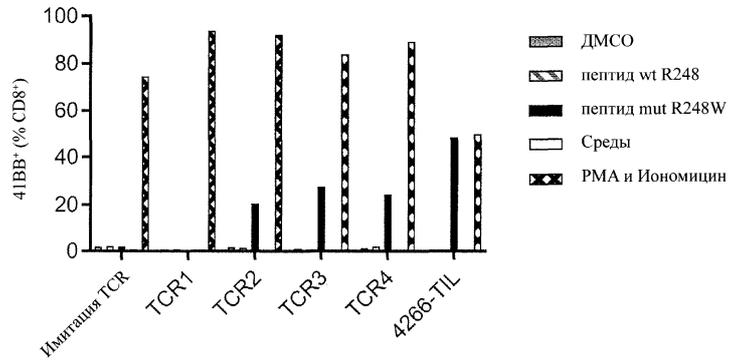
Фиг. 51



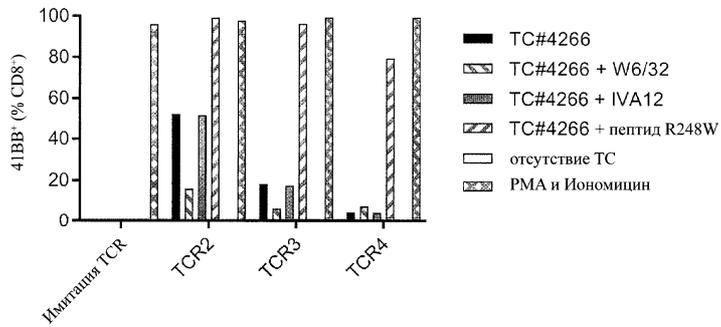
Фиг. 52



Фиг. 53

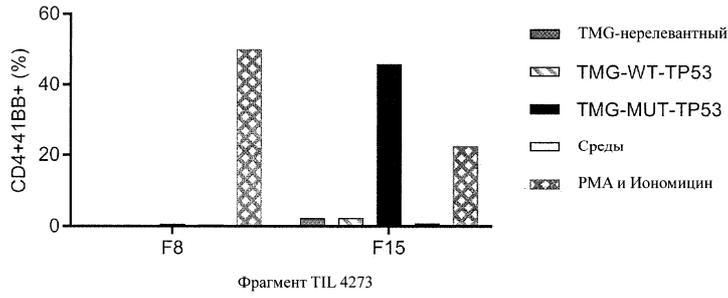


Фиг. 54

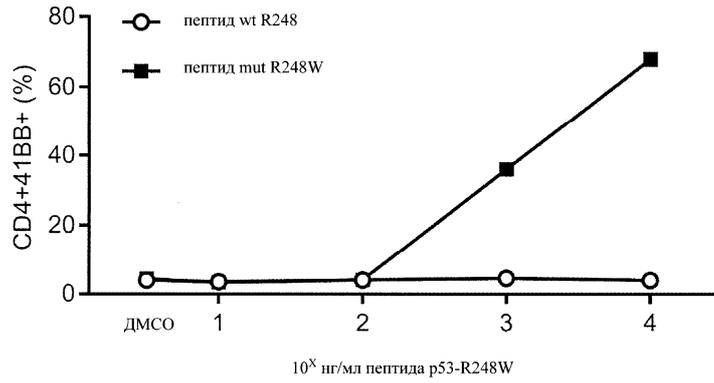


Фиг. 55

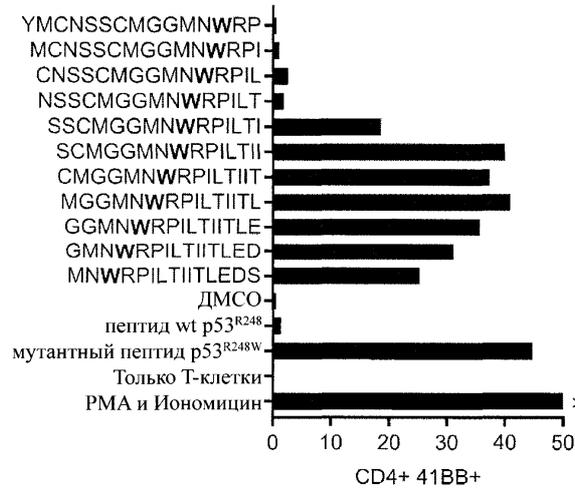
045595



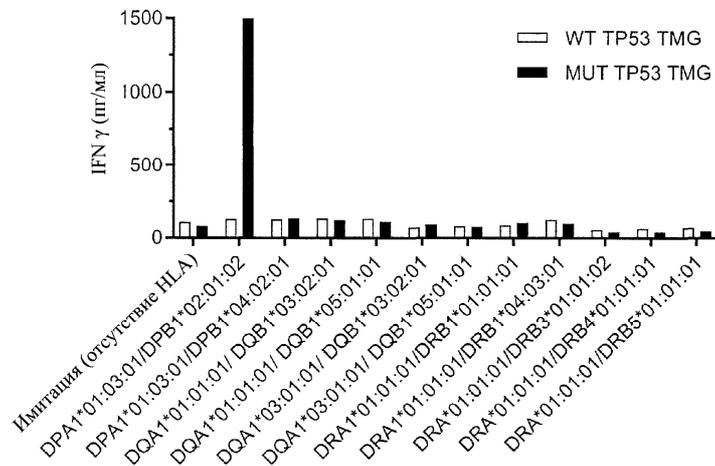
Фиг. 56



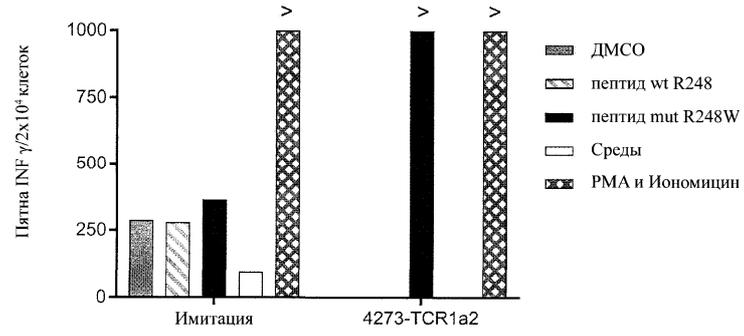
Фиг. 57



Фиг. 58



Фиг. 59



Фиг. 60