

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045621**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.12

(51) Int. Cl. **C07K 14/725** (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)

(21) Номер заявки
202090652

(22) Дата подачи заявки
2018.09.19

(54) Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, РЕСТРИКТИРОВАННЫЕ ПО АНТИГЕНУ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА КЛАССА II, ПРОТИВ МУТАНТНОГО RAS

(31) **62/560,930**

(56) WO-A1-2016085904

(32) **2017.09.20**

WO-A1-2017048593

(33) **US**

E. TRAN ET AL. "Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers", SCIENCE, vol. 350, no. 6266, 11 December 2015 (2015-12-11), pages 1387-1390, XP055314157, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aad1253, abstract

(43) **2020.08.21**

WO-A2-2005056595

(86) **PCT/US2018/051641**

NIKOLICH-ZUGICH J. ET AL. "THE MANY IMPORTANT FACETS OF T-CELL REPERTOIRE DIVERSITY", NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY, NATURE PUB. GROUP, GB, vol. 4, no. 2, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 123-132, XP008044821, ISSN: 1474-1733, DOI: 10.1038/NRI1292, the whole document

(87) **WO 2019/060349 2019.03.28**

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

(72) Изобретатель:
**Йозеф Рами, Кафри Гал, Роббинс
Пол Ф., Розенберг Стивен А. (US)**

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к выделенному или очищенному Т-клеточному рецептору (TCR), где TCR обладает антигенной специфичностью по отношению к мутантному гомологу вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (KRAS), презентуемому молекулой Класса II антигена лейкоцитов человека (HLA). Изобретение также относится к соответствующим полипептидам и белкам, а также к соответствующим нуклеиновым кислотам, рекомбинантным векторам экспрессии, клеткам-хозяевам, популяциям клеток и фармацевтическим композициям. Изобретение также относится к способам обнаружения наличия рака у млекопитающего и способам лечения или предупреждения развития рака у млекопитающего.

B1

045621

045621 B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая патентная заявка претендует на полезный эффект предварительной патентной заявки US 62/560930, поданной 20 сентября 2017 г., содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Информация о финансировании исследования или разработки из федерального бюджета

Настоящее изобретение было создано в Национальных институтах здравоохранения США (англ. National Institutes of Health) Национальным институтом онкологии США (англ. National Cancer Institute) при поддержке государства, проект BC010984. Государство имеет определенные права на настоящее изобретение.

Включение посредством ссылки материала, предоставляемого в электронной форме

В настоящее описание полностью включено посредством ссылки машиночитаемое представление последовательности нуклеотидов/аминокислот, поданное одновременно с настоящей заявкой и имеющее следующую идентификацию: Один файл ASCII (Text) размером 59753 байт, озаглавленный "739664_ST25.txt," от 5 сентября 2018 года.

Область техники

Для некоторых раковых заболеваний имеется лишь ограниченное количество возможных вариантов лечения, в частности, в тех случаях, когда рак переходит в стадию метастазирования и становится неоперабельным. Несмотря на прогрессивные способы лечения, такие как, например, хирургические вмешательства, химиотерапия и лучевая терапия, прогноз для многих раковых заболеваний, таких как, например, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак эндометрия, рак яичников и рак простаты, может быть весьма пессимистичным. Соответственно, существует острая необходимость изыскания дополнительных способов лечения раковых заболеваний.

Сущность изобретения

Один из вариантов осуществления изобретения относится к выделенному или очищенному Т-клеточному рецептору (англ. T-cell receptor, сокращенно TCR), где TCR обладает антигенной специфичностью по отношению к мутантной аминокислотной последовательности RAS человека, презентуемой (экспонируемой) молекулой антигена лейкоцитов человека (англ. human leukocyte antigen, сокращенно HLA) класса II, где мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой аминокислотную последовательность мутантного человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (англ. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, сокращенно KRAS), мутантного человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Харви (англ. Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, сокращенно HRAS) или мутантного человеческого гомолога вирусного онкогена нейробластомы крысиной саркомы (англ. Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog, сокращенно NRAS).

Еще один вариант осуществления изобретения относится к выделенному или очищенному полипептиду, включающему функциональную часть TCR согласно изобретению, где функциональная часть включает следующие аминокислотные последовательности: (a) все последовательности SEQ ID NO: 1-3, (b) все последовательности SEQ ID NO: 4-6, (c) все последовательности SEQ ID NO: 7-9, (d) все последовательности SEQ ID NO: 10-12, (e) все последовательности SEQ ID NO: 1-6 или (f) все последовательности SEQ ID NO: 7-12.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к выделенному или очищенному белку, включающему по меньшей мере один из полипептидов согласно изобретению.

Варианты осуществления изобретения дополнительно относятся к нуклеиновым кислотам, рекомбинантным векторам экспрессии, клеткам-хозяевам, популяциям клеток и фармацевтическим композициям, связанным с TCR, полипептидами и белками согласно изобретению.

Примеры осуществления изобретения дополнительно относятся к способам обнаружения наличия рака у млекопитающего и способам лечения или предупреждения развития рака у млекопитающего.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлены экспериментальные данные (точечные графики), показывающие обнаружение способом проточной цитометрии клеток, окрашенных по изотипу (контроль), или клеток, окрашенных по экспрессии PD-1 и/или OX40. Цифры на гистограммах показывают процентное содержание клеток, экспрессирующих PD-1.

На фиг. 2 представлена диаграмма, на которой показано количество положительных пятен окрашивания интерферона-гамма (IFN γ) в одной лунке, обнаруженное при совместном культивировании собранных в пулы культур эффекторных аутологических Т-клеток (культуры номеров W1-W16) с целевыми дендритными клетками (англ. dendritic cell, сокращенно DC), которые кратковременно обрабатывали указанными пулами 25-мерных пептидов (PP) или пулами пептида, кодируемого 25-мерными тандемными минигенами (TMG), включающими различные опухоль-специфические мутации. В качестве контроля применяли аутологичные Т-клетки, которые культивировали как таковые, с диметилсульфоксидом (англ. dimethyl sulfoxide, сокращенно DMSO) или антителом ОКТ3. Заключенным в рамочку символом (▼) показаны объединенные в пул культуры (7 и 8), из которых выделяли TCR.

На фиг. 3 представлена диаграмма, на которой показано количество положительных пятен окрашивания IFN γ на 2×10^4 клеток (обозначенные как 2E4), обнаруживаемое при совместном культивировании

аутологичных Т-клеток культуры 7 (W7) с аутологичными DC, которые кратковременно обрабатывали каждым из пептидов 1-17 (P1-P17) из пептидного пула 1 (PP1). В качестве контроля применяли аутологичные Т-клетки, которые культивировали с диметилсульфоксидом (DMSO) или ОКТ3 антителом.

На фиг. 4 представлена диаграмма, на которой показано процентное содержание эффекторных Т-клеток, трансдуцированных TCR, полученным в примере 2, которые экспрессировали 4-1BB при совместном культивировании с целевыми аутологичными антиген-презентующими клетками (англ. antigen presenting cell, сокращенно APC), кратковременно обработанными пептидом KRAS G12V (1 нг/мл) в присутствии HLA-блокирующего антитела W6/32 (анти-HLA-A, -B, -C), IVA12 (pan-специфическое, анти-HLA Класс II), B7/21 (анти-HLA-DP), HB55 (анти-HLA-DR) или SPV-L3 (HLA-DQ) (клетка-мишень). Эффекторные трансдуцированные клетки культивировали как таковые, с DMSO или с фоболмиристат-ацетатом (англ. phorbol myristate acetate, сокращенно PMA) в качестве контроля. Другим контролем служили эффекторные клетки, трансдуцированные пустым вектором (имитация), культивируемые совместно с целевыми аутологичными APC, кратковременно обработанными 1 нг/мл пептида KRAS G12V.

На фиг. 5 представлена диаграмма, на которой показано (i) количество IFN- γ на 2×10^4 клеток, определенное способом ELISPOT, и (ii) процентное содержание клеток mTCR β +CD8+4-1BB+, определенное способом проточной цитометрии, при совместном культивировании Т-клеток, трансдуцированных TCR, полученным в примере 2, с аутологичными APC (4148 MB) или APC, полученными от доноров, имеющих гаплотип DRB1 01:01 или DRB1 07:01, которые кратковременно обрабатывали пептидом KRAS^{G12V} или пептидом KRAS дикого типа (англ. wild-type, сокращенно WT). Эффекторные клетки культивировали совместно с APC, полученными от донора, положительного по HLA-DRB1 ("DRB несоответствие") в качестве контроля. В качестве дополнительного контроля применяли эффекторные клетки, которые культивировали как таковые, с DMSO или с фоболмиристатацетатом-иономицином (PMA:Iono).

На фиг. 6 представлена диаграмма, на которой показано (i) количество IFN- γ на 2×10^4 клеток, определенное способом ELISPOT (заштрихованные столбики), и (ii) процентное содержание клеток, экспрессирующих 4-1BB и/или OX40, определенное способом проточной цитометрии (черные столбики), при совместном культивировании Т-клеток, трансдуцированных TCR, полученным в примере 2, с аутологичными дендритными клетками (DC), которые кратковременно обрабатывали клеточными лизатами клеточных линий опухоли, экспрессирующих одну из следующих мутаций G12 KRAS: G12R, G12C, G12D или G12V. В качестве контроля использовали трансдуцированные клетки, которые культивировали совместно с аутологичными DC, которые кратковременно обрабатывали клеточным лизатом клеточной линии опухоли, экспрессирующей KRAS WT. В качестве дополнительного контроля использовали трансдуцированные клетки, которые культивировали как таковые или с PMA или DMSO.

На фиг. 7 представлена диаграмма, на которой показано процентное содержание клеток mTCR β +CD8+4-1BB+, определенное способом проточной цитометрии при культивировании Т-клеток, трансдуцированных TCR, полученным в примере 2, в течение ночи совместно с аутологичными клетками DC, подвергнутыми кратковременной обработке пептидом KRAS^{G12V} (треугольники) или пептидом KRAS WT (квадраты) в указанных концентрациях.

На фиг. 8 представлена диаграмма, на которой показано количество IFN- γ на 2×10^4 клеток, определенное способом ELISPOT при совместном культивировании Т-клеток, трансдуцированных TCR, полученным в примере 2, с аутологичными DC, которые кратковременно обрабатывали пептидами, представленными в табл. 9, имеющими указанные концентрации.

На фиг. 9 представлены экспериментальные данные (точечные графики), показывающие процентное содержание клеток, экспрессирующих бета-цепь мышинового TCR и 4-1BB после совместной культивации клеток, трансдуцированных MSGV-1-ретровирусом, кодирующим KRAS^{G12C} TCR, с DMSO (контроль) или DC, обработанными указанными KRAS WT или пептидом KRAS^{G12C}, имеющими указанные концентрации. Процентное содержание клеток показано на точечных графиках: mTCR β +4-1BB- (верхний левый сектор (Q1)); mTCR β +4-1BB+ (верхний правый сектор (Q2)); mTCR β -4-1BB+ (нижний правый сектор (Q3)); mTCR β -4-1BB- (нижний левый сектор (Q4)), следующим образом (процентное содержание указано в скобках): DMSO: Q1 (71,0), Q2 (0,96), Q3 (0,20), Q4 (27,9). WT 10 мкг/мл: Q1 (64,5), Q2 (4,27), Q3 (0,43), Q4 (30,8). WT 1 мкг/мл: Q1 (70,6), Q2 (1,13), Q3 (0,20), Q4 (28,1). G12C 10 мкг/мл: Q1 (13,6), Q2 (51,7), Q3 (1,61), Q4 (33,0). G12C 1 мкг/мл: Q1 (19,7), Q2 (46,9), Q3 (1,67), Q4 (31,7).

На фиг. 10 представлена диаграмма, на которой показано процентное содержание клеток, экспрессирующих CD3 и 4-1BB после совместного культивирования Т-клеток, трансдуцированных KRAS^{G12C} TCR, с аутологичными дендритными клетками (DC) или аллогенными DC, совместимыми с одним аллелем HLA-DRB15:01 или HLA-DRB11:01, после кратковременной обработки дендритных клеток 24-мерным пептидом KRAS^{G12C} с последующей блокировкой их мембранных молекул MHC-II антителами к HLA-DQ, DR, DP, или антителом ко всем указанным белкам: HLA-DP, DR и DQ. В качестве контроля использовали трансдуцированные клетки, которые культивировали с DC, кратковременно обработанными пептидом KRAS WT. В качестве дополнительного контроля использовали трансдуцированные клетки, которые культивировали совместно с PMA/иономицином.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Семейство белков RAS относится к большому семейству небольших ГТФаз. Не придерживаясь какой-либо теории или механизма, предполагают, что мутировавшие белки RAS могут участвовать в передаче сигнала на ранних стадиях онкогенеза при развитии ряда раковых заболеваний человека. Этот белок может быть активирован заменой одной аминокислоты. Продукт мутации белка RAS может быть активирован конститутивно (постоянно). Мутантные белки RAS могут экспрессироваться при любом из множества раковых заболеваний человека, таких как, например, рак поджелудочной железы (например, карцинома поджелудочной железы), колоректальный рак, рак легких (например, аденокарцинома легких), рак эндометрия, яичников (например, рак эпителия яичников) и рак простаты. Семейство белков RAS человека включает гомолог вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (KRAS), гомолог вирусного онкогена крысиной саркомы Харви (HRAS) и гомолог вирусного онкогена крысиной саркомы нейробластомы (NRAS).

KRAS также может быть назван ГТФазой KRas, вирусным онкогеном крысиной саркомы Кирстена V-Ki-Ras2 или KRAS2. Существует два варианта транскрипта KRAS: вариант А KRAS и вариант В KRAS. Вариант А KRAS дикого типа (англ. wild-type, сокращенно WT) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. Вариант В KRAS дикого типа (WT) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. Далее в тексте, если не указано иное, упоминание "KRAS" (мутантного или немутантного (WT)) относится как к варианту А, так и к варианту В. После активации мутантный KRAS связывается с гуанозин-5'-трифосфатом (ГТФ) и превращает ГТФ в гуанозин-5'-дифосфат (ГДФ).

HRAS представляет собой другой член белкового семейства RAS. HRAS также называют онкобелком вирусного онкогена крысиной саркомы Харви, гомологом вирусного онкогена крысиной саркомы Харви V-Ha-Ras или небольшим ГТФ-связывающим белком H-Ras семейства Ras. HRAS WT содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

NRAS представляет собой еще один член белкового семейства RAS. NRAS также называется ГТФазой NRas, V-Ras гомологом вирусного онкогена нейробластомы RAS или NRAS1. NRAS WT содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления изобретения относится к выделенному или очищенному TCR, обладающему антигенной специфичностью в отношении мутантной аминокислотной последовательности RAS человека (далее "мутантный RAS"), презентруемой молекулой антигена лейкоцитов человека (HLA) класса II, где мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой человеческую мутантную аминокислотную последовательность KRAS, человеческую мутантную аминокислотную последовательность HRAS или человеческую мутантную аминокислотную последовательность NRAS. Если не указано иное, последующие упоминания "TCR" также относятся к функциональным частям и функциональным вариантам TCR.

TCR согласно изобретению может обладать антигенной специфичностью в отношении любого мутантного человеческого белка, полипептида или пептидной аминокислотной последовательности RAS. В одном из примеров осуществления изобретения мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой мутантную человеческую аминокислотную последовательность KRAS, мутантную человеческую аминокислотную последовательность HRAS или мутантную человеческую аминокислотную последовательность NRAS. Каждая из аминокислотных последовательностей WT белков KRAS, NRAS и HRAS человека имеет длину, составляющую 188-189 аминокислотных остатков, и имеет высокую степень идентичности по отношению к остальным названным последовательностям. Например, аминокислотная последовательность человеческого белка NRAS WT на 86,8% идентична последовательности человеческого белка KRAS WT. Аминокислотные остатки 1-86 белка NRAS WT человека и белка KRAS WT человека идентичны на 100%. Аминокислотная последовательность человеческого белка HRAS WT на 86,3% идентична последовательности человеческого белка KRAS WT. Аминокислотные остатки 1-94 человеческого белка HRAS WT и человеческого белка KRAS WT идентичны на 100%. Далее, если не указано иное упоминание "RAS" (мутантного или немутантного (WT)) относится совокупно к KRAS, HRAS и NRAS.

В одном из вариантов осуществления изобретения мутантная аминокислотная последовательность RAS человека включает аминокислотную последовательность RAS WT, содержащую замену глицина в положении 12, где положение 12 определено в сравнении с белком RAS WT, соответственно. Белок RAS WT может представлять собой любой из следующих белков: белок KRAS WT (SEQ ID NO: 17 или 18), белок HRAS WT (SEQ ID NO: 19) или белок NRAS WT (SEQ ID NO: 20), поскольку, как указано выше, аминокислотные остатки 1-86 белка NRAS WT человека и белка KRAS WT человека идентичны на 100%, и аминокислотные остатки 1-94 белка HRAS WT человека и белка KRAS WT человека идентичны на 100%. Соответственно, аминокислотный остаток в положении 12 каждого из белков KRAS WT, HRAS WT и NRAS WT представляет собой один и тот же остаток, а именно, глицин.

Глицин в положении 12 аминокислотной последовательности RAS WT может быть заменен любым аминокислотным остатком, отличающимся от глицина. В одном из примеров осуществления изобретения замена представляет собой замену глицина в положении 12 аминокислотной последовательности RAS WT валином или цистеином. Таким образом, варианты осуществления изобретения относятся к ре-

цепторам TCR, имеющим антигенную специфичность в отношении любого белка, полипептида или пептидной аминокислотной последовательности RAS WT с мутацией G12V или мутацией G12C.

В настоящей работе мутации и замещения RAS определяют относительно аминокислотной последовательности белка RAS WT. Таким образом, в настоящей работе мутации и замещения RAS соотносятся с аминокислотным остатком, имеющимся в конкретном положении белка RAS WT, затем следует номер положения, затем следует наименование аминокислотного остатка, которым замещен указанный остаток в результате имеющейся конкретной мутации или замещения. Аминокислотная последовательность RAS (например, пептид RAS) может включать меньшее количество аминокислотных остатков, чем количество, включаемое в полную длину белка RAS WT. Соответственно, положение 12 определяют в настоящей работе в соответствии с белком RAS WT полной длины (а именно, в соответствии с любой из последовательностей SEQ ID NO: 17-20), учитывая, что реальное положение соответствующего остатка в конкретном примере аминокислотной последовательности RAS может быть иным. Если положения определяются любой из последовательностей SEQ ID NO: 17-20, то термин "G12" означает глицин, обычно присутствующий в положении 12 любой из последовательностей SEQ ID NO: 17-20, и "G12V" указывает на то, что глицин, обычно присутствующий в положении 12 любой из последовательностей SEQ ID NO: 17-20, замещен валином. Например, если конкретный пример аминокислотной последовательности RAS представляет собой, например, TEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI (SEQ ID NO: 29) (пример пептида KRAS WT, соответствующий последовательно расположенным аминокислотным остаткам со 2 по 24 в SEQ ID NO: 17), то "G12V" означает замену подчеркнутого глицина в последовательности SEQ ID NO: 29 валином, несмотря на то, что реальное положение подчеркнутого глицина в последовательности SEQ ID NO: 29 - это 11.

Примеры белков RAS полной длины, содержащих мутацию G12V или G12C, представлены ниже в табл. 1.

Таблица 1

Мутантный белок RAS полной длины	SEQ ID NO:
KRAS G12V вариант A	21
KRAS G12V вариант B	22
G12V HRAS	23
G12V NRAS	24
G12C KRAS вариант A	25
G12C KRAS вариант B	26
G12C HRAS	27
G12C NRAS	28

В одном из вариантов осуществления изобретения TCR обладает антигенной специфичностью в отношении пептида RAS, содержащего мутацию G12V или мутацию G12C, рассмотренные выше, где мутантный пептид RAS имеет любую длину. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный пептид RAS имеет любую длину, подходящую для связывания с любыми молекулами HLA класса II, рассмотренными в настоящей работе. Например, TCR может обладать антигенной специфичностью в отношении пептида RAS, содержащего мутацию G12V или мутацию G12C, где пептид RAS имеет длину, составляющую от приблизительно 11 до приблизительно 30 аминокислотных остатков, от приблизительно 12 до приблизительно 24 аминокислотных остатков или от приблизительно 18 до приблизительно 20 аминокислотных остатков. Мутантный пептид RAS может включать любые последовательно расположенные аминокислотные остатки мутантного белка RAS, которые включают мутацию G12V или мутацию G12C. В одном из вариантов осуществления изобретения TCR может обладать антигенной специфичностью в отношении пептида RAS, содержащего мутацию G12V или мутацию G12C, мутантного пептида RAS, длина которого составляет приблизительно 30 аминокислотных остатков, приблизительно 29 аминокислотных остатков, приблизительно 28 аминокислотных остатков, приблизительно 27 аминокислотных остатков, приблизительно 26 аминокислотных остатков, приблизительно 25 аминокислотных остатков, приблизительно 24 аминокислотных остатков, приблизительно 23 аминокислотных остатков, приблизительно 22 аминокислотных остатков, приблизительно 21 аминокислотных остатков, приблизительно 20 аминокислотных остатков, приблизительно 19 аминокислотных остатков, приблизительно 18 аминокислотных остатков, приблизительно 17 аминокислотных остатков, приблизительно 16 аминокислотных остатков, приблизительно 15 аминокислотных остатков, приблизительно 14 аминокислотных остатков, приблизительно 13 аминокислотных остатков, приблизительно 12 аминокислотных остатков, приблизительно 11 аминокислотных остатков или находится в диапазоне между любыми двумя приведенными выше значениями. Примеры конкретных пептидов, каждый из которых имеет мутацию G12V, которая может быть распознана G12V TCR согласно изобретению, представлены в табл. 9.

В одном из примеров осуществления изобретения рецепторы TCR согласно изобретению способны распознавать мутантный RAS, презентированный молекулой HLA класса II. Таким образом, TCR может вызывать иммунный ответ при связывании с мутантным RAS в контексте молекулы HLA класса II. Рецепторы TCR согласно изобретению способны распознавать мутантный RAS, презентированный молекулой HLA класса II и, кроме мутантного RAS, могут связываться с молекулой HLA класса II.

В одном из вариантов осуществления изобретения молекула HLA класса II представляет собой мо-

лекулу HLA-DR. Молекула HLA-DR представляет собой гетеродимер α -цепи и β -цепи. α -Цепь HLA-DR может кодироваться геном HLA-DRA. β -Цепь HLA-DR может кодироваться геном HLA-DRB1, геном HLA-DRB3, геном HLA-DRB4 или геном HLA-DRB5. Молекула HLA-DR может представлять собой любую молекулу HLA-DR. Примеры молекул HLA-DR могут включать, без ограничений, HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR6, HLA-DR7, HLA-DR8, HLA-DR9, HLA-DR10, HLA-DR11, HLA-DR12, HLA-DR13, HLA-DR14, HLA-DR15 и HLA-DR16. Предпочтительно молекула HLA-DR представляет собой HLA-DR7 или HLA-DR11.

В одном из вариантов осуществления изобретения молекула HLA класса II представляет собой HLA-DRB1 молекулу. Молекула HLA-DRB1 может представлять собой любую молекулу HLA-DRB1. Примеры молекул HLA-DRB1 могут включать, без ограничений, HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*01:02, HLA-DRB1*01:03, HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:02, HLA-DRB1*04:03, HLA-DRB1*04:04, HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*04:07, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*08:01, HLA-DRB1*08:03, HLA-DRB1*09:01, HLA-DRB1*10:01, HLA-DRB1*11:01, HLA-DRB1*11:03, HLA-DRB1*11:04, HLA-DRB1*12:01, HLA-DRB1*13:01, HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB1*13:03, HLA-DRB1*14:01, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*15:02 и HLA-DRB1*16:01. Предпочтительно, молекула HLA класса II представляет собой молекулу HLA-DRB1*07:01 или молекулу HLA-DRB1*11:01.

Рецепторы TCR согласно изобретению могут обеспечить наличие одного или более различных преимуществ, включая случаи, когда они экспрессируются клетками, применяемыми для адоптивного переноса клеток. Мутантный RAS экспрессируется раковыми клетками и не экспрессируется нормальными, нераковыми клетками. Не придерживаясь какой-либо теории или механизма, предполагают, что рецепторы TCR согласно изобретению преимущественно нацелены на разрушение раковых клеток, но при этом минимально разрушают или не разрушают нормальные, нераковые клетки, что означает снижение, например, минимизацию или устранение токсичности. Кроме того, TCR согласно изобретению предпочтительно могут быть с успехом применены в лечении или профилактике мутантный RAS-положительных раковых заболеваний, не реагирующих на терапию других типов, такую как, например, химиотерапия, операция или облучение. Например, мутация KRAS G12V экспрессируется у приблизительно 27% и приблизительно 8% пациентов с раком поджелудочной железы и различными видами колоректального рака, соответственно, и мутация G12C KRAS экспрессируется у приблизительно 15% пациентов с раком легких. Кроме того, TCR согласно изобретению могут обеспечивать высокоавидное (высокоспецифичное) распознавание мутантного RAS, что может обеспечивать возможность распознавания неманипулированных опухолевых клеток (например, опухолевых клеток, которые не были обработаны интерфероном (IFN)- γ , не были трансфицированы вектором, кодирующим один или оба названных белка: мутантный RAS и HLA-DRB1*07:01, один или оба названных белка: мутантный RAS и HLA-DRB1*11:01, не были кратковременно обработаны пептидом RAS с мутацией G12V, не были кратковременно обработаны пептидом RAS с мутацией G12C или не подверглись комбинации указанных воздействий). Кроме того, аллели HLA-DRB1*07:01 и HLA-DRB1*11:01 экспрессируются у приблизительно 25% и приблизительно 10,5%, соответственно, европеоидных индивидуумов в США. Соответственно, TCR согласно изобретению могут повышать количество отвечающих на иммунотерапию раковых пациентов, охватывая тех пациентов, у которых экспрессируется один или оба аллеля HLA-DRB1*07:01 и HLA-DRB1*11:01, которые не отвечают на иммунотерапию TCR, которые распознают RAS, представленные другими молекулами главного комплекса гистосовместимости (сокращенно КТС, англ. major histocompatibility complex, сокращенно MHC).

Употребляемое в настоящем описании понятие "антигенная специфичность" означает, что TCR может специфически связываться с и иммунологически распознавать мутантный RAS с высокой авидностью. Например, можно считать, что TCR обладает "антигенной специфичностью" к мутантному RAS, если от приблизительно 1×10^4 до приблизительно 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих TCR, выделяют по меньшей мере приблизительно 200 пг/мл (пикограммов/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 величину, находящуюся в диапазоне, ограниченном любыми двумя из предыдущих значений) IFN- γ при совместном культивировании с (а) антиген-отрицательными, положительными по молекулам HLA класса II клетками-мишенями, которые кратковременно обрабатывали низкой концентрацией мутантного пептида RAS (например, приблизительно 0,05 нг/мл до приблизительно 10 нг/мл, 1 нг/мл, 2 нг/мл, 5 нг/мл, 8 нг/мл, 10 нг/мл или величину, находящуюся в диапазоне, ограниченном любыми двумя из предыдущих значений), или (б) с антиген-отрицательными, положительными по молекулам HLA класса II клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный RAS, чтобы клетка-мишень экспрессировала мутантный RAS. Клетки, экспрессирующие рецепторы TCR согласно изобретению, также могут секретировать IFN- γ при совместном культивировании с антиген-отрицательными, положительными по молекулам HLA класса II клетками-мишенями, которые кратковременно обрабатывали повышенными концентрациями мутантного пептида RAS. Молекула HLA класса II может представлять собой любую молекулу HLA класса II, рассмотренную в настоящей работе

(например, молекулу HLA-DRB1*07:01 или молекулу HLA-DRB1*11:01).

В альтернативном варианте или дополнительно можно полагать, что TCR может обладать "антигенной специфичностью" в отношении мутантного RAS, если Т-клетки, экспрессирующие TCR, выделяют по меньшей мере в два раза больше IFN- γ при совместном культивировании с (а) антиген-отрицательными, положительными по молекулам HLA класса II клетками-мишенями, которые кратковременно обрабатывали низкой концентрацией мутантного пептида RAS, или (b) антиген-отрицательными, положительными по молекулам HLA класса II клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный RAS, чтобы клетка-мишень экспрессировала мутантный RAS, по сравнению с количеством IFN- γ , экспрессированным в эксперименте с отрицательным контролем. Отрицательным контролем могут являться, например, (i) Т-клетки, экспрессирующие TCR, культивируемые совместно с (а) антиген-отрицательными, положительными по молекулам HLA класса II клетками-мишенями, которые кратковременно обрабатывали той же концентрацией нерелевантного пептида (например, некоторого другого пептида, последовательность которого отличается от последовательности мутантного пептида RAS), или с (b) антиген-отрицательными, положительными по молекулам HLA класса II клетками-мишенями, в которые была введена нуклеотидная последовательность, кодирующая нерелевантный пептид, в результате чего клетка-мишень экспрессирует нерелевантный пептид, или (ii) нетрансдуцированные Т-клетки (например, полученные из мононуклеарных клеток периферической крови (сокращенно МКПК; англ. peripheral blood mononuclear cell, сокращенно PBMC), которые не экспрессируют TCR), культивируемые совместно с (а) антиген-отрицательными, положительными по молекулам HLA класса II клетками-мишенями, которые кратковременно обрабатывали той же концентрацией мутантного пептида RAS, или с (b) антиген-отрицательными, положительными по молекулам HLA класса II клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный RAS, в результате чего клетка-мишень экспрессирует мутантный RAS. Молекула HLA класса II, экспрессированная клетками-мишенями отрицательного контроля, будет представлять собой ту же молекулу HLA класса II, экспрессированную клетками-мишенями, которые культивируют совместно с испытуемыми Т-клетками. Молекула HLA класса II может представлять собой любую молекулу из молекул HLA класса II, рассмотренных в настоящей работе (например, молекулу HLA-DRB1*07:01 или молекулу HLA-DRB1*11:01). Секреция IFN- γ может быть измерена способами, известными в данной области техники, такими как, например, твердофазный иммуноферментный анализ (англ. enzyme-linked immunosorbent assay, сокращенно ELISA).

В альтернативном варианте или дополнительно можно полагать, что TCR обладает "антигенной специфичностью" по отношению к мутантному RAS, если по меньшей мере двукратное количество Т-клеток, экспрессирующих TCR, вырабатывают IFN- γ при совместном культивировании с (а) антиген-отрицательными, положительными по молекулам HLA класса II клетками-мишенями, которые кратковременно обрабатывали низкой концентрацией мутантного пептида RAS, или с (b) антиген-отрицательными, положительными по молекулам HLA класса II клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный RAS, в результате чего клетка-мишень экспрессирует мутантный RAS, по сравнению с количеством Т-клеток отрицательного контроля, которые вырабатывают IFN- γ . Молекула HLA класса II, концентрация пептида и отрицательный контроль могут соответствовать рассмотренным в настоящей работе при описании других аспектов изобретения. Количество клеток, секретирующих IFN- γ , может быть определено способами, известными в данной области техники, такими как, например, способ иммуноферментных пятен (англ. enzyme-linked immunospot, сокр. ELISPOT).

В альтернативном варианте или дополнительно можно полагать, что TCR обладает "антигенной специфичностью" по отношению к мутантному RAS, если Т-клетки, экспрессирующие TCR, вызывают повышение экспрессии одного или более маркеров активации Т-клеток, которое определяют, например, способом проточной цитометрии, после стимуляции клетками-мишенями, экспрессирующими мутантный RAS. Примеры маркеров активации Т-клеток включают 4-1BB, OX40, CD107a, CD69 и цитокины, которые вырабатываются в повышенных количествах при антигенной стимуляции (например, фактор некроза опухоли (англ. tumor necrosis factor, сокращенно TNF), интерлейкин (IL)-2 и т.д.).

Один из вариантов осуществления изобретения относится к TCR, включающему два полипептида (т.е. полипептидные цепи), такие как альфа (α) цепь TCR, бета (β) цепь TCR, гамма (γ) цепь TCR, дельта (δ) цепь TCR или их комбинацию. Полипептиды TCR согласно изобретению могут включать любую аминокислотную последовательность, при условии, что TCR обладает антигенной специфичностью к мутантному RAS.

В одном из вариантов осуществления изобретения TCR включает две полипептидные цепи, каждая из которых включает варируемую область, включающую область, определяющую комплементарность (англ. complementarity determining region, сокращенно CDR) CDR1, CDR2 и CDR3 рецептора TCR. В одном из вариантов осуществления изобретения TCR включает первую полипептидную цепь, включающую CDR1, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (CDR1 α -цепи), CDR2, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (CDR2 α -цепи), и CDR3,

которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (CDR3 α -цепи), и вторую полипептидную цепь, включающую CDR1, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (CDR1 β -цепи), CDR2, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (CDR2 β -цепи), и CDR3, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (CDR3 β -цепи).

В другом варианте осуществления изобретения TCR включает первую полипептидную цепь, включающую CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (CDR1 α -цепи), CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (CDR2 α -цепи), и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (CDR3 α -цепи), и вторую полипептидную цепь, включающую CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (CDR1 β -цепи), CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (CDR2 β -цепи), и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (CDR3 β -цепи).

Таким образом, TCR согласно изобретению может включать одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-12. В одном из примеров осуществления изобретения TCR включает следующие аминокислотные последовательности: (a) все последовательности SEQ ID NO: 1-3, (b) все последовательности SEQ ID NO: 4-6, (c) все последовательности SEQ ID NO: 7-9, (d) все последовательности SEQ ID NO: 10-12, (e) все последовательности SEQ ID NO: 1-6 или (f) все последовательности SEQ ID NO: 7-12. В одном из особенно предпочтительных примеров осуществления TCR включает следующие аминокислотные последовательности: (i) все последовательности SEQ ID NO: 1-6 или (ii) все последовательности SEQ ID NO: 7-12.

В одном из вариантов осуществления изобретения TCR включает аминокислотную последовательность варибельной области рецептора TCR, которая включает области CDR, перечисленные выше. Таким образом, TCR может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 (варибельная область α -цепи); SEQ ID NO: 14 (варибельная область β -цепи); SEQ ID NO: 15 (варибельная область α -цепи); SEQ ID NO: 16 (варибельная область β -цепи); обе последовательности SEQ ID NO: 13 и 14 или обе последовательности SEQ ID NO: 15 и 16. Предпочтительно TCR включает следующие аминокислотные последовательности (i) обе последовательности SEQ ID NO: 13 и 14 или (ii) обе последовательности SEQ ID NO: 15 и 16.

Рецепторы TCR согласно изобретению могут дополнительно включать константную область α -цепи и константную область β -цепи. Константная область может быть выделена из материала, полученного от любого подходящего биологического вида, такого как, например, человек или мышь. В одном из вариантов осуществления изобретения TCR дополнительно включают константные области α - и β -цепей мыши или константные области α - и β -цепей человека. Термин "мышинный (мышь)" или "человеческий (человека)", употребляемый в настоящем описании при рассмотрении TCR или любого компонента TCR согласно изобретению (например, области, определяющей комплементарность (CDR), варибельной области, константной области, α -цепи и/или β -цепи), относится к TCR (или его компоненту), полученному, соответственно, из организма мыши или человека, т.е. к TCR (или его компоненту), который происходит из или был экспрессирован Т-клеткой мыши или Т-клеткой человека, соответственно.

Один из вариантов осуществления изобретения относится к химерному TCR, включающему человеческую варибельную область и мышиную константную область, причем TCR обладает антигенной специфичностью в отношении мутантной аминокислотной последовательности RAS человека, презентруемой молекулой Класса II HLA. Мышиная константная область может давать одно или более преимуществ. Например, мышинная константная область может снижать ошибочное спаривание TCR согласно изобретению с эндогенными рецепторами TCR клетки-хозяина, в которую вводят TCR согласно изобретению. В альтернативном варианте или дополнительно мышинная константная область может повышать экспрессию TCR согласно изобретению по сравнению с тем же TCR, содержащим человеческую константную область. Химерный TCR может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 (мышиную константную область α -цепи дикого типа (WT)), SEQ ID NO: 33 (мышиную константную область β -цепи WT) или обе последовательности SEQ ID NO: 32 и 33. Предпочтительно TCR согласно изобретению включает обе аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32 и 33. Химерный TCR может включать любую из мышинных константных областей, рассмотренных в настоящей работе, в комбинации с любыми из областей CDR, рассмотренных в настоящей работе при описании других аспектов изобретения. Таким образом, TCR может включать следующие аминокислотные последовательности: (a) все последовательности SEQ ID NO: 1-3 и 32; (b) все последовательности SEQ ID NO: 4-6 и 33; (c) все последовательности SEQ ID NO: 7-9 и 32; (d) все последовательности SEQ ID NO: 10-12 и 33; (e) все последовательности SEQ ID NO: 1-6 и 32-33 или (f) все последовательности SEQ ID NO: 7-12 и 32-33. В другом варианте осуществления изобретения химерный TCR может включать любые мышинные константные области, рассмотренные в настоящей работе, в комбинации с любыми варибельными областями, рассмотренными в настоящей работе при описании других аспектов изобретения. Таким образом, TCR может включать следующие аминокислотные последовательности: (i) обе последовательности SEQ

ID NO: 13 и 32; (ii) обе последовательности SEQ ID NO: 14 и 33; (iii) обе последовательности SEQ ID NO: 15 и 32; (iv) обе последовательности SEQ ID NO: 16 и 33; (v) все последовательности SEQ ID NO: 13-14 и 32-33 или (vi) все последовательности SEQ ID NO: 15-16 и 32-33.

В другом варианте осуществления изобретения TCR включает аминокислотную последовательность (аминокислотные последовательности): SEQ ID NO: 38 (α -цепь, содержащую мышиную константную область WT), SEQ ID NO: 39 (β -цепь, содержащую мышиную константную область WT), SEQ ID NO: 40 (α -цепь, содержащую мышиную константную область WT), SEQ ID NO: 41 (β -цепь, содержащую мышиную константную область WT), обе последовательности SEQ ID NO: 38-39 или обе последовательности SEQ ID NO: 40-41.

В одном из вариантов осуществления изобретения TCR включает α -цепь, включающую варируемую область и константную область, и β -цепь, включающую варируемую область и константную область. Таким образом, TCR может включать (a) α -цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 34, где: (i) X в положении 179 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Thr или Cys; (ii) X в положении 243 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (iii) X в положении 245 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp; и (iv) X в положении 246 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (b) β -цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, где X в положении 189 в SEQ ID NO: 35 представляет собой Ser или Cys; (c) α -цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, где: (i) X в положении 180 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Thr или Cys; (ii) X в положении 244 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (iii) X в положении 246 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp; и (iv) X в положении 247 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (d) β -цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, где X в положении 194 в SEQ ID NO: 37 представляет собой Ser или Cys; (e) как (a), так и (b); или (f) как (c), так и (d).

В одном из вариантов осуществления изобретения TCR включает замещенную константную область. Таким образом, TCR может включать аминокислотную последовательность любого TCR, рассмотренного в настоящей работе, содержащую одну, две, три или четыре замены аминокислот в константной области одной из цепей α и β или обеих цепей α и β . Предпочтительно TCR включает мышиную константную область, содержащую одну, две, три или четыре замены (также называемые замещениями) аминокислот в мышиную константную область одной из цепей α и β или обеих цепей α и β . В одном из особенно предпочтительных вариантов осуществления TCR включает мышиную константную область, содержащую одну, две, три или четыре замены аминокислот в мышиную константную область α -цепи и замену одной аминокислоты в мышиную константную область β -цепи. В некоторых вариантах осуществления TCR, включающие замещенную константную область, предпочтительно обеспечивают один или более из следующих эффектов: улучшение распознавания мутантных RAS⁺ мишеней, повышение экспрессии клеткой-хозяином, снижение ошибочного спаривания с эндогенными TCR и увеличение противоопухолевой активности по сравнению с исходным TCR, включающим незамещенную константную область (дикого типа). В общем, замещенные аминокислотные последовательности мышинных константных областей α - и β -цепей TCR, SEQ ID NO: 30 и 31, соответственно, соответствуют всем или частям аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 32 и 33, соответственно, незамещенной мышиную константной области, где последовательность SEQ ID NO: 30 имеет одно, два, три или четыре замещения аминокислот по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 32, и последовательность SEQ ID NO: 31 имеет одно замещение аминокислоты по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 33. Таким образом, вариант осуществления изобретения относится к рецептору TCR, включающему следующие аминокислотные последовательности: (a) SEQ ID NO: 30 (константная область α -цепи), где (i) X в положении 48 представляет собой Thr или Cys; (ii) X в положении 112 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (iii) X в положении 114 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp; и (iv) X в положении 115 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (b) SEQ ID NO: 31 (константная область β -цепи), где X в положении 57 представляет собой Ser или Cys; или (c) обе последовательности SEQ ID NO: 30 и 31. В одном из вариантов осуществления изобретения TCR, включающий SEQ ID NO: 30, не включает SEQ ID NO: 32 (незамещенная мышинная константная область α -цепи). В одном из вариантов осуществления изобретения TCR, включающий SEQ ID NO: 31, не включает SEQ ID NO: 33 (незамещенная мышинная константная область β -цепи).

В одном из вариантов осуществления изобретения замещенная константная область включает замещения цистеином в константной области одной из цепей α и β или обеих цепей α и β , в результате чего образуется замещенный цистеином TCR. Расположение цистеиновых остатков напротив друг друга в α - и β -цепях обеспечивает образование дисульфидной связи, которая связывает константные области α - и β -цепей замещенного TCR друг с другом и которая отсутствует в TCR, включающем незамещенные мышинные константные области. Таким образом, TCR может представлять собой замещенный цистеином TCR, в котором один или оба нативных Thr в положении 48 (Thr48) в SEQ ID NO: 32 и нативный Ser в

положении 57 (Ser57) в SEQ ID NO: 33 могут быть замещены Cys. Предпочтительно оба нативных Thr48 в SEQ ID NO: 32 и нативный Ser57 в SEQ ID NO: 33 замещены Cys. Примеры замещенных цистеином последовательностей константных областей TCR представлены в табл. 2. В одном из вариантов осуществления изобретения замещенный цистеином TCR включает (i) SEQ ID NO: 30, (ii) SEQ ID NO: 31 или (iii) обе последовательности SEQ ID NO: 30 и 31, где обе последовательности SEQ ID NO: 30 и 31 представлены в табл. 2. Замещенные цистеином рецепторы TCR согласно изобретению могут включать замещенные константные области наряду с любыми областями CDR или переменными областями, рассмотренными в настоящей работе.

В одном из вариантов осуществления изобретения замещенный цистеином химерный TCR включает альфа-цепь полной длины и бета-цепь полной длины. Примеры последовательностей альфа-цепи и бета-цепи замещенного цистеином химерного TCR представлены в табл. 2. В одном из примеров осуществления изобретения TCR включает (i) SEQ ID NO: 34, (ii) SEQ ID NO: 35, (iii) SEQ ID NO: 36, (iv) SEQ ID NO: 37, (v) обе последовательности SEQ ID NO: 34 и 35 или (vi) обе последовательности SEQ ID NO: 36 и 37, где все последовательности SEQ ID NO: 34-37 представлены в табл. 2.

Таблица 2

SEQ ID NO:	Определение "X"
SEQ ID NO: 30 (константная область α-цепи)	X в положении 48 представляет собой Cys, X в положении 112 представляет собой Ser, X в положении 114 представляет собой Met и X в положении 115 представляет собой Gly.
SEQ ID NO: 31 (константная область β-цепи)	X в положении 57 представляет собой Cys
SEQ ID NO: 34 (RAS ^{G12V} - HLA-DRB1*07:01 α-цепь)	X в положении 179 представляет собой Cys, X в положении 243 представляет собой Ser, X в положении 245 представляет собой Met и X в положении 246 представляет собой Gly.
SEQ ID NO: 35 (RAS ^{G12V} - HLA-DRB1*07:01 β-цепь)	X в положении 189 представляет собой Cys
SEQ ID NO: 36 (RAS ^{G12C} - HLA-DRB1*11:01 α-цепь)	X в положении 180 Cys, X в положении 244 представляет собой Ser, X в положении 246 представляет собой Met и X в положении 247 представляет собой Gly.
SEQ ID NO: 37 (RAS ^{G12C} - HLA-DRB1*11:01 β-цепь)	X в положении 194 представляет собой Cys

В одном из вариантов осуществления изобретения замещенная аминокислотная последовательность включает замену одной, двух или трех аминокислот в трансмембранном (англ. transmembrane, сокращенно TM) домене константной области одной из цепей α и β или обеих цепей α и β гидрофобной аминокислотой, что приводит к образованию замещенного гидрофобной аминокислотой TCR (также называемого "LVL-модифицированным TCR"). Замещение (замещения) гидрофобной аминокислотой в TM домене TCR может повышать гидрофобность TM домена TCR по сравнению с TCR, не имеющим замещения (замещений) гидрофобной аминокислотой в TM домене. Таким образом, TCR представляет собой LVL-модифицированный TCR, в котором один, два или три нативных Ser112, Met114 и Gly115, имеющиеся в последовательности SEQ ID NO: 32, могут быть независимо замещены остатками Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; предпочтительно остатками Leu, Ile или Val. Предпочтительно все три нативных Ser112, Met114 и Gly115 в последовательности SEQ ID NO: 32 могут быть независимо замещены остатками Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; предпочтительно Leu, Ile или Val. В одном из примеров осуществления изобретения LVL-модифицированный TCR включает (i) SEQ ID NO: 30, (ii) SEQ ID NO: 31 или (iii) обе последовательности SEQ ID NO: 30 и 31, где обе последовательности SEQ ID NO: 30 и 31 представлены в табл. 3. LVL-модифицированные TCR согласно изобретению могут включать замещенную константную область, наряду с любыми областями CDR или переменными областями, рассмотренными в настоящей работе.

В одном из вариантов осуществления изобретения LVL-модифицированный TCR включает альфа-цепь полной длины и бета-цепь полной длины. Примеры последовательностей альфа-цепи и бета-цепи LVL-модифицированного TCR представлены в табл. 3. В одном из примеров осуществления изобретения

LVL-модифицированный TCR включает (i) SEQ ID NO: 34, (ii) SEQ ID NO: 35, (iii) SEQ ID NO: 36, (iv) SEQ ID NO: 37, (v) обе последовательности SEQ ID NO: 34 и 35 или (vi) обе последовательности SEQ ID NO: 36 и 37, где все последовательности SEQ ID NO: 34-37 представлены в табл. 3.

Таблица 3

SEQ ID NO:	Определения "X"
SEQ ID NO: 30 (константная область α-цепи)	<p>X в положении 48 представляет собой Thr;</p> <p>X в положении 112 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;</p> <p>где предпочтительно X в положении 112 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно X в положении 112 представляет собой Leu;</p> <p>X в положении 114 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;</p> <p>где предпочтительно X в положении 114 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно X в положении 114 представляет собой Ile; и</p> <p>X в положении 115 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;</p>

045621

	<p>где предпочтительно X в положении 115 представляет собой Leu, Ile или Val; особенно предпочтительно X в положении 115 представляет собой Val;</p> <p>Где SEQ ID NO: 30 не включает SEQ ID NO: 32 (незамещенную константную область альфа-цепи)</p>
SEQ ID NO: 31 (константная область β-цепи)	X в положении 57 представляет собой Ser
SEQ ID NO: 34 (RAS ^{G12V} - HLA-DRB1*07:01 α-цепь)	<p>X в положении 179 представляет собой Thr;</p> <p>X в положении 243 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;</p> <p>где предпочтительно X в положении 243 представляет собой Leu, Ile или Val; особенно предпочтительно X в положении 243 представляет собой Leu;</p> <p>X в положении 245 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;</p> <p>где предпочтительно X в положении 245 представляет собой Leu, Ile или Val; особенно предпочтительно X в положении 245 представляет собой Ile; и</p> <p>X в положении 246 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;</p> <p>где предпочтительно X в положении 246 представляет собой Leu, Ile или Val; особенно предпочтительно X в положении 246 представляет собой Val;</p> <p>Где SEQ ID NO: 34 не включает SEQ ID NO: 38 (незамещенную альфа-цепь)</p>
SEQ ID NO: 35 (RAS ^{G12V} - HLA-DRB1*07:01 β-цепь)	X в положении 189 представляет собой Ser
SEQ ID NO: 36	X в положении 180 представляет собой Thr;

(RAS ^{G12C} - HLA-DRB1*11:01 α-цепь)	<p>X в положении 244 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;</p> <p>где предпочтительно X в положении 244 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно X в положении 244 представляет собой Leu;</p> <p>X в положении 246 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;</p> <p>где предпочтительно X в положении 246 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно X в положении 246 представляет собой Ile; и</p> <p>X в положении 247 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; где предпочтительно X в положении 247 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно X в положении 247 представляет собой Val;</p> <p>Где SEQ ID NO: 36 не включает SEQ ID NO: 40 (незамещенная альфа-цепь)</p>
SEQ ID NO: 37 (RAS ^{G12C} - HLA-DRB1*11:01 β-цепь)	X в положении 194 представляет собой Ser

В одном из вариантов осуществления изобретения замещенная аминокислотная последовательность включает замены цистеином в константной области одной из цепей α и β или обеих цепей α и β в комбинации с замещением (замещениями) одной, двух или трех аминокислот в трансмембранном (ТМ) домене константной области одной из цепей α и β или обеих цепей α и β гидрофобной аминокислотой (также называемая в настоящей работе "замещенным цистеином LVL-модифицированным TCR"). Таким образом, TCR представляет собой замещенный цистеином LVL-модифицированный химерный TCR, в котором нативный Thr48 в последовательности SEQ ID NO: 32 замещен Cys; один, два или три нативных Ser112, Met114 и Gly115 в последовательности SEQ ID NO: 32 независимо замещены Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; предпочтительно Leu, Ile или Val; и нативный Ser57 в последовательности SEQ ID NO: 33 замещен Cys. Предпочтительно все три нативных Ser112, Met114 и Gly115 последовательности SEQ ID NO: 32 независимо могут быть замещены Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; предпочтительно Leu, Ile или Val. В одном из вариантов осуществления изобретения замещенный цистеином LVL-модифицированный TCR включает (i) SEQ ID NO: 30, (ii) SEQ ID NO: 31, или (iii) обе последовательности SEQ ID NO: 30 и 31, где обе последовательности SEQ ID NO: 30 и 31 представлены в табл. 4. Замещенные цистеином LVL-модифицированные TCR согласно изобретению могут включать, наряду с любыми областями CDR или переменными областями, рассмотренными в настоящей работе, замещенную константную область.

В одном из вариантов осуществления изобретения замещенный цистеином LVL-модифицированный TCR включает альфа-цепь полной длины и бета-цепь полной длины. В одном из вариантов осуществления изобретения замещенный цистеином LVL-модифицированный TCR включает (i) SEQ ID NO: 34, (ii) SEQ ID NO: 35, (iii) SEQ ID NO: 36, (iv) SEQ ID NO: 37, (v) обе последовательности SEQ ID NO: 34 и 35 или (vi) обе последовательности SEQ ID NO: 36 и 37, где все последовательности SEQ ID NO: 34-37 представлены в табл. 4.

Таблица 4

SEQ ID NO:	Определения "X"
SEQ ID NO: 30 (константная область α -цепи)	<p>X в положении 48 представляет собой Cys;</p> <p>X в положении 112 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Tгр;</p> <p>где предпочтительно X в положении 112 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно X в положении 112 представляет собой Leu;</p> <p>X в положении 114 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Tгр;</p> <p>где предпочтительно X в положении 114 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно X в положении 114 представляет собой Ile; и</p> <p>X в положении 115 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Tгр;</p>

045621

	<p>где предпочтительно X в положении 115 представляет собой Leu, Ile или Val; и особенно предпочтительно X в положении 115 представляет собой Val,</p> <p>где SEQ ID NO: 30 не включает одновременно все следующие позиции: Ser в положении 112, Met в положении 114 и Gly в положении 115.</p>
SEQ ID NO: 31 (константная область β-цепи)	X в положении 57 представляет собой Cys
SEQ ID NO: 34 (RAS ^{G12V} - HLA-DRB1*07:01 α-цепь)	<p>X в положении 179 представляет собой Cys;</p> <p>X в положении 243 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Tгр;</p> <p>где предпочтительно X в положении 243 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно X в положении 243 представляет собой Leu;</p> <p>X в положении 245 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Tгр;</p> <p>где предпочтительно X в положении 245 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно X в положении 245 представляет собой Ile; и</p> <p>X в положении 246 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Tгр;</p> <p>где предпочтительно X в положении 246 представляет собой Leu, Ile или Val; и особенно предпочтительно X в положении 246 представляет собой Val,</p> <p>где SEQ ID NO: 34 не включает одновременно все следующие позиции: Ser в положении 243, Met в положении 245 и Gly в положении 246.</p>
SEQ ID NO: 35 (RAS ^{G12V} - HLA-DRB1*07:01 β-цепь)	X в положении 189 представляет собой Cys
SEQ ID NO: 36	X в положении 180 представляет собой Cys;

(RAS ^{G12C} - HLA-DRB1*11:01 α-цепь)	<p>X в положении 244 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;</p> <p>где предпочтительно X в положении 244 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно X в положении 244 представляет собой Leu;</p> <p>X в положении 246 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;</p> <p>где предпочтительно X в положении 246 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно X в положении 246 представляет собой Ile; и</p> <p>X в положении 247 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;</p> <p>где предпочтительно X в положении 247 представляет собой Leu, Ile или Val; и особенно предпочтительно X в положении 247 представляет собой Val,</p> <p>где SEQ ID NO: 36 не включает одновременно все следующие позиции: Ser в положении 244, Met в положении 246 и Gly в положении 247.</p>
SEQ ID NO: 37 (RAS ^{G12C} - HLA-DRB1*11:01 β-цепь)	X в положении 194 представляет собой Cys

Изобретение также относится к полипептиду, включающему функциональную часть любого из TCR, рассмотренных в настоящей работе. Употребляемый в настоящем описании термин "полипептид" включает олигопептиды и относится к одиночной цепочке аминокислот, соединенных одной или более пептидными связями.

В полипептидах согласно изобретению функциональная часть может представлять собой любую часть, включающую последовательно расположенные аминокислоты TCR, частью которого она является, при условии, что функциональная часть специфически связывается с мутантным RAS. Термин "функциональная часть" при употреблении в отношении TCR, означает любую часть или фрагмент TCR согласно изобретению, где упомянутая часть или фрагмент сохраняет биологическую активность TCR, частью которого она является (исходного TCR). Функциональные части включают, например, те части TCR, которые сохраняют способность к специфическому связыванию с мутантным RAS (например, в контексте с молекулой HLA-DRB1*07:01 или молекулой HLA-DRB1*11:01) или сохраняют способность обнаруживать, лечить или предотвращать раковое заболевание в аналогичной степени, той же степени, или более высокой степени, что и исходный TCR. По отношению к исходному TCR функциональная часть может включать, например, приблизительно 10%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 50%, приблизительно 68%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или более исходного TCR.

За концевой аминогруппой или карбоксигруппой или за обеими концевыми группами функциональной части могут следовать дополнительные аминокислоты, которых не было в аминокислотной последовательности исходного TCR. Желательно, чтобы дополнительные аминокислоты не влияли на биологическую функцию функциональной части, например, на специфическое связывание с мутантным RAS и/или на способность к обнаружению рака, лечению или предупреждению рака и т.д. Более желательно, чтобы дополнительные аминокислоты усиливали биологическую активность по сравнению с биологической активностью исходного TCR.

Полипептид может включать функциональную часть любой из или обеих α- и β-цепей TCR согласно изобретению, такую как функциональная часть, включающая одну или более областей CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области (областей) α-цепи и/или β-цепи TCR согласно изобретению. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (CDR1 α-цепи), SEQ ID NO: 2 (CDR2 α-цепи), SEQ ID NO: 3 (CDR3 α-цепи), SEQ ID NO: 4 (CDR1 β-цепи), SEQ ID NO: 5 (CDR2 β-цепи), SEQ ID NO: 6 (CDR3 β-цепи) или их комбинацию. В другом примере осуществления изобретения полипептид может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (CDR1 α-цепи), SEQ ID NO: 8 (CDR2 α-цепи), SEQ ID NO: 9 (CDR3 α-цепи), SEQ ID NO: 10 (CDR1 β-цепи), SEQ ID NO: 11 (CDR2 β-цепи), SEQ ID NO: 12 (CDR3 β-цепи) или их

комбинацию.

Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-12. В одном из вариантов осуществления изобретения TCR включает следующие аминокислотные последовательности: (a) все последовательности SEQ ID NO: 1-3, (b) все последовательности SEQ ID NO: 4-6, (c) все последовательности SEQ ID NO: 7-9, (d) все последовательности SEQ ID NO: 10-12, (e) все последовательности SEQ ID NO: 1-6 или (f) все последовательности SEQ ID NO: 7-12. В одном из предпочтительных вариантов осуществления полипептид включает следующие аминокислотные последовательности: (i) все последовательности SEQ ID NO: 1-6 или (ii) все последовательности SEQ ID NO: 7-12.

В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид согласно изобретению может включать, например, вариабельную область TCR согласно изобретению, включающую комбинацию областей CDR, описанных выше. Таким образом, полипептид может включать следующую аминокислотную последовательность: (i) SEQ ID NO: 13 (вариабельная область α -цепи), (ii) SEQ ID NO: 14 (вариабельная область β -цепи), (iii) обе последовательности SEQ ID NO: 13 и 14, (iv) SEQ ID NO: 15 (вариабельная область α -цепи), (v) SEQ ID NO: 16 (вариабельная область β -цепи), или (vi) обе последовательности SEQ ID NO: 15 и 16. Предпочтительно полипептид включает следующие аминокислотные последовательности (i) обе последовательности SEQ ID NO: 13 и 14 или (ii) обе последовательности SEQ ID NO: 15 и 16.

В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид согласно изобретению может дополнительно включать константную область TCR согласно изобретению, рассмотренную выше. Таким образом, полипептид может дополнительно включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 (мышиную константную область α -цепи WT), SEQ ID NO: 33 (мышиную константную область β -цепи WT), SEQ ID NO: 30 (замещенную мышиную константную область α -цепи), SEQ ID NO: 31 (замещенную мышиную константную область β -цепи), обе последовательности SEQ ID NO: 32 и 33 или обе последовательности SEQ ID NO: 30 и 31. Предпочтительно полипептид дополнительно включает следующие аминокислотные последовательности: обе последовательности SEQ ID NO: 30 и 31 или обе последовательности SEQ ID NO: 32 и 33 в комбинации с любой из областей CDR или вариабельных областей, рассмотренных в настоящей работе при описании других аспектов изобретения. В одном из примеров осуществления изобретения одна или обе последовательности SEQ ID NO: 30 и 31 полипептида представляют собой последовательности, представленные в любой из табл. 2-4.

В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид согласно изобретению может включать всю длину α - или β -цепи TCR, рассмотренного в настоящей работе. Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37. В альтернативном варианте полипептид согласно изобретению может включать обе цепи TCR, рассмотренных в настоящей работе.

Например, полипептид согласно изобретению может включать (a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, в которой: (i) X в положении 179 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Thr или Cys; (ii) X в положении 243 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (iii) X в положении 245 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp; и (iv) X в положении 246 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, в которой X в положении 189 в SEQ ID NO: 35 представляет собой Ser или Cys; (c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, в которой: (i) X в положении 180 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Thr или Cys; (ii) X в положении 244 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (iii) X в положении 246 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp; и (iv) X в положении 247 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (d) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, в которой X в положении 194 в SEQ ID NO: 37 представляет собой Ser или Cys; (e) обе последовательности (a) и (b); или (f) обе последовательности (c) и (d). В одном из примеров осуществления изобретения одна или более из последовательностей SEQ ID NO: 34-37 полипептида представляют собой последовательности, представленные в любой из табл. 2-4.

Изобретение дополнительно относится к белку, включающему по меньшей мере один из полипептидов, рассмотренных в настоящей работе. Термин "белок" означает молекулу, включающую одну или более полипептидных цепочек.

В одном из вариантов осуществления белок согласно изобретению может включать (a) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-3, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4-6; или (b) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-9, и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10-12.

В другом примере осуществления изобретения белок может включать (i) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14; или (ii) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15, и вторую полипептидную

цепь, включающую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16.

Белок согласно изобретению может дополнительно включать любые из константных областей, рассмотренных в настоящей работе при описании других аспектов изобретения. Таким образом, в одном из примеров осуществления изобретения первая полипептидная цепь может дополнительно включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 32, и вторая полипептидная цепь может дополнительно включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 33. В одном из примеров осуществления изобретения одна или обе последовательности SEQ ID NO: 30 и 31 белка представляют собой последовательности, представленные в любой из табл. 2-4.

В альтернативном варианте или дополнительно белок согласно одному из вариантов осуществления изобретения может включать (a) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, в которой: (i) X в положении 179 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Thr или Cys; (ii) X в положении 243 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (iii) X в положении 245 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp; и (iv) X в положении 246 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (b) вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, в которой X в положении 189 в SEQ ID NO: 35 представляет собой Ser или Cys; (c) первую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, в которой: (i) X в положении 180 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Thr или Cys; (ii) X в положении 244 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (iii) X в положении 246 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp; и (iv) X в положении 247 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; (d) вторую полипептидную цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, в которой X в положении 194 в SEQ ID NO: 37 представляет собой Ser или Cys; (e) обе последовательности (a) и (b); или (f) обе последовательности (c) и (d). В одном из примеров осуществления изобретения одна или более последовательностей SEQ ID NO: 34-37 представляют собой последовательности, представленные в любой из табл. 2-4.

Белок согласно изобретению может представлять собой TCR. В альтернативном варианте, если, например, белок включает одну полипептидную цепь, включающую обе аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 35, обе аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36 и 37, или если первая и/или вторая полипептидная цепь (цепи) белка дополнительно включает (включают) другие аминокислотные последовательности, например, аминокислотную последовательность, кодирующую иммуноглобулин или его часть, то белок согласно изобретению может представлять собой слитый белок. Таким образом, изобретение также относится к слитому белку, включающему по меньшей мере один из полипептидов согласно изобретению, рассмотренных в настоящей работе, наряду с по меньшей мере одним отличающимся от него 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 согласно изобретению, рассмотренных в настоящей работе. Другой полипептид может кодировать любую пептидную или белковоподобную молекулу или ее часть, примеры которых включают, без ограничений, иммуноглобулин, CD3, CD4, CD8, молекулу MHC, молекулу CD1, например, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d и т.д.

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения TCR, полипептиды и белки согласно изобретению могут экспрессироваться в виде одного белка, включающего линкерный пептид, соединяющий α -цепь и β -цепь. Таким образом, TCR, полипептиды и белки согласно изобретению могут дополнительно включать линкерный пептид. Линкерный пептид может предпочтительно усиливать экспрессию рекомбинантного TCR, полипептида и/или белка в клетке-хозяине. Линкерный пептид может включать любую подходящую аминокислотную последовательность. Например, линкерный пептид может представлять собой линкер фуриин-SGSG-P2A, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. При экспрессии клеткой-хозяином конструктора, включающего линкерный пептид, линкерный пептид может быть расщеплен, что приводит к разделению α - и β -цепей. В одном из примеров осуществления изобретения TCR, полипептид или белок может включать аминокислотную последовательность, включающую α -цепь полной длины, β -цепь полной длины и линкерный пептид, расположенный между α - и β -цепями.

Белок согласно изобретению может представлять собой рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающую часть, которая включает по меньшей мере один из полипептидов согласно изобретению, рассмотренных в настоящей работе. Употребляемый в настоящем описании термин "рекомбинантное антитело" относится к рекомбинантному (например, полученному с помощью генетической инженерии) белку, включающему по меньшей мере один из полипептидов согласно изобретению и полипептидную цепь антитела или его антигенсвязывающей части. Полипептид антитела или его антигенсвязывающей части может представлять собой тяжелую цепь, легкую цепь, вариабельную или константную область

тяжелой или легкой цепи, одноцепочечный переменный фрагмент (англ. single chain variable fragment, сокращенно scFv) или фрагмент антитела Fc, Fab или F(ab)₂' и т.д. Полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающей части может существовать в виде отдельного полипептида рекомбинантного антитела. В альтернативном варианте полипептидная цепочка антитела или его антигенсвязывающей части может существовать в виде полипептида, который экспрессируется внутри рамки (в тандеме) с полипептидом согласно изобретению. Полипептид антитела или его антигенсвязывающей части может представлять собой полипептид любого антитела или любого фрагмента антитела, которые включают любые антитела и фрагменты антител, рассмотренных в настоящей работе.

В объем изобретения включены функциональные варианты TCR согласно изобретению, полипептиды или белки, рассмотренные в настоящей работе. Употребляемый в настоящем описании термин "функциональный вариант" относится к TCR, полипептиду или белку, имеющему существенную или значительную идентичность или схожесть последовательности с последовательностью исходного TCR, полипептида или белка, причем функциональный вариант сохраняет биологическую активность TCR, полипептида или белка, вариантом которого он является. Функциональные варианты включают, например, те варианты TCR, полипептида или белка, рассмотренные в настоящей работе (исходный TCR, полипептид или белок), которые сохраняют способность к специфическому связыванию мутантного RAS, к которому исходный TCR имеет антигенную специфичность или с которым исходный полипептид или белок специфически связывается в аналогичной степени, той же степени или более высокой степени, что и исходный TCR, полипептид или белок. Относительно исходного TCR, полипептида или белка, аминокислотная последовательность функционального варианта может, например, по меньшей мере на приблизительно 30%, приблизительно 50%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более быть идентична аминокислотной последовательности исходного TCR, полипептида или белка, соответственно.

Функциональный вариант может включать, например, аминокислотную последовательность исходного TCR, полипептида или белка, включающую по меньшей мере одно консервативное аминокислотное замещение. Консервативные аминокислотные замещения известны в данной области техники и включают замещения аминокислот, в которых одна аминокислота, имеющая определенные физические и/или химические свойства, заменена другой аминокислотой, которая имеет такие же химические или физические свойства. Например, консервативное аминокислотное замещение может представлять собой замену кислотной аминокислоты другой кислотной аминокислотой (например, Asp или Glu), замену аминокислоты, содержащей неполярную боковую цепь, другой аминокислотой, содержащей неполярную боковую цепь (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val и т.д.), замену основной аминокислоты другой основной аминокислотой (Lys, Arg и т.д.), замену аминокислоты, содержащей полярную боковую цепь, другой аминокислотой, содержащей полярную боковую цепь (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr и т.д.), и т.д.

В альтернативном варианте или дополнительно функциональные варианты могут включать аминокислотную последовательность исходного TCR, полипептида или белка, имеющую по меньшей мере одно неконсервативное аминокислотное замещение. В этом случае неконсервативное аминокислотное замещение предпочтительно не влияет на биологическую активность или не ингибирует биологическую активность функционального варианта. Предпочтительно неконсервативное аминокислотное замещение усиливает биологическую активность функционального варианта, в результате чего биологическая активность функционального варианта превышает биологическую активность исходного TCR, полипептида или белка.

TCR, полипептид или белок может по существу состоять из указанной аминокислотной последовательности или последовательностей, рассмотренных в настоящей работе, и при этом другие компоненты TCR, полипептида или белка, например, другие аминокислоты, не оказывают существенного влияния на биологическую активность TCR, полипептида или белка. Таким образом, TCR, полипептид или белок согласно изобретению может, например, по существу состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, обеих последовательностей SEQ ID NO: 34-35 или обеих последовательностей SEQ ID NO: 36-37. Также, например, TCR, полипептиды или белки согласно изобретению могут по существу состоять из следующей аминокислотной последовательности (аминокислотных последовательностей) (i) SEQ ID NO: 13, (ii) SEQ ID NO: 14, (iii) SEQ ID NO: 15, (iv) SEQ ID NO: 16, (v) обеих последовательностей SEQ ID NO: 13 и 14 или (vi) обеих последовательностей SEQ ID NO: 15 и 16. Кроме того, TCR, полипептиды или белки согласно изобретению могут по существу состоять из следующих аминокислотных последовательностей: (a) одной или более последовательностей SEQ ID NO: 1-12; (b) всех последовательностей SEQ ID NO: 1-3; (c) всех последовательностей SEQ ID NO: 4-6; (d) всех последовательностей SEQ ID NO: 7-9; (e) всех последовательностей SEQ ID NO: 10-12; (f) всех последовательностей SEQ ID NO: 1-6; или (g) всех последовательностей SEQ ID NO: 7-12.

TCR, полипептиды или белки согласно изобретению могут иметь любую длину, т.е. могут включать любое количество аминокислот, при условии, что TCR, полипептиды или белки сохраняют свою биологическую активность, например, способность специфически связываться с мутантным RAS, обеспечи-

вать обнаружение ракового заболевания у млекопитающего или обеспечивать лечение или предупреждение ракового заболевания у млекопитающего и т.д. Например, диапазон длины полипептида может составлять от приблизительно 50 до приблизительно 5000 аминокислот, то есть составлять приблизительно 50, приблизительно 70, приблизительно 75, приблизительно 100, приблизительно 125, приблизительно 150, приблизительно 175, приблизительно 200, приблизительно 300, приблизительно 400, приблизительно 500, приблизительно 600, приблизительно 700, приблизительно 800, приблизительно 900, приблизительно 1000 или более аминокислот. Таким образом, полипептид согласно изобретению также включают олигопептиды.

Вместо одной или более встречающихся в природе аминокислот TCR, полипептиды или белки согласно изобретению могут включать синтетические аминокислоты. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области техники и включают, например, аминокислоты циклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин, α -амино-н-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинотимотионин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, β -фенилсерин, β -гидроксифенилаланин, фенилглицин, α -нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты, N'-бензил-N'-метиллизин, N,N-дибензиллизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α -аминоциклопентанкарбоновую кислоту, α -аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α -аминоциклопептанкарбоновую кислоту, α -(2-амино-2-норборнан)-карбоновую кислоту, α,γ -диаминомасляную кислоту, α,β -диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин и α -трет-бутилглицин.

TCR, полипептиды или белки согласно изобретению могут быть подвергнуты гликозилированию, амидированию, карбоксилированию, фосфорилированию, этерификации, N-ацилированию, циклизации, например, через дисульфидный мостик, или превращены в соль присоединения кислоты и/или необязательно подвергнуты димеризации или полимеризации или конъюгированию.

TCR, полипептид и/или белок согласно изобретению может быть получен способами, известными в данной области техники, такими как, например, предлагаемый новый синтез. Кроме того, полипептиды и белки могут быть получены рекомбинацией из нуклеиновых кислот, рассмотренных в настоящей работе, стандартными рекомбинантными способами. См., например, Green, Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4-е изд., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012). В альтернативном варианте TCR, полипептиды и/или белки, рассмотренные в настоящей работе, могут быть синтезированы коммерческой основе такими организациями, как Synper (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) и Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). Таким образом, TCR, полипептиды и белки согласно изобретению могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

В объем изобретения также включены конъюгаты, например, биоконъюгаты, включающие любые TCR, полипептиды или белки согласно изобретению (включающие любые их функциональные части или варианты), нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева, популяции клеток-хозяев или антитела или их антигенсвязывающие части. В общем, конъюгаты, а также способы синтеза конъюгатов известны в данной области техники.

Один из вариантов осуществления изобретения относится к нуклеиновой кислоте, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из TCR, полипептидов или белков, рассмотренных в настоящей работе. Употребляемый в настоящем описании термин "нуклеиновая кислота" включает термины "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "молекула нуклеиновой кислоты" и обычно означает полимер ДНК или РНК, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным, который может содержать природные, не встречающиеся в природе или измененные нуклеотиды и который может содержать природные, не встречающиеся в природе или измененные межнуклеотидные связи, такие как фосфоамидатные связи или фосфоротиоатные связи, вместо фосфодиэфирных связей, образующихся между нуклеотидами в немодифицированном олигонуклеотиде. В одном из примеров осуществления нуклеиновая кислота включает комплементарную ДНК (кДНК). Обычно предпочтительно, если нуклеиновая кислота не включает каких-либо вставок, делеций, инверсий и/или замещений. Однако, в некоторых примерах, рассмотренных в настоящей работе, может быть желательным, чтобы нуклеиновая кислота включала одну или более вставок, делеций, инверсий и/или замещений.

Предпочтительно нуклеиновые кислоты согласно изобретению представляют собой рекомбинантные кислоты. Употребляемый в настоящем описании термин "рекомбинантный" относится к (i) молекулам, сконструированным вне живых клеток посредством присоединения сегментов природных или синтетических нуклеиновых кислот к молекулам нуклеиновых кислот, которые могут реплицироваться в живой клетке, или к (ii) молекулам, получаемым в результате репликации молекул, рассмотренных в приведенном выше пункте (i). Согласно изобретению, репликация может представлять собой репликацию *in vitro* или репликацию *in vivo*.

Нуклеиновые кислоты могут быть сконструированы способами химического синтеза и/или в результате реакций ферментативного лигирования в соответствии с процедурами, известными в данной

области техники. См., например, работу Green, Sambrook с соавт, упомянутую выше. Например, нуклеиновая кислота может быть синтезирована химическим способом из встречающихся в природе нуклеотидов или нуклеотидов, модифицированных различными способами с целью повышения биологической стабильности молекул или повышения физической стабильности дуплекса, образующегося в результате гибридизации (например, фосфоротиоатных производных и нуклеотидов, замещенных акридином). Примеры модифицированных нуклеотидов, которые могут быть применены для получения нуклеиновых кислот, включают, без ограничений, 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'-метоксикарбоксиметилурацил, 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, сложный метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксихипропил)урацил и 2,6-диаминопурин. В альтернативном варианте одна или более нуклеиновых кислот согласно изобретению могут быть приобретены у таких организаций, как Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) и SyntheGen (Houston, TX).

Нуклеиновая кислота может включать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует любой из TCR, полипептидов или белков, рассмотренных в настоящей работе. В одном из примеров осуществления изобретения нуклеиновая кислота может включать нуклеотидные последовательности, имеющие любую из последовательностей SEQ ID NO: 42-45 (табл. 5). В одном из примеров осуществления изобретения нуклеиновая кислота включает нуклеотидные последовательности обеих последовательностей SEQ ID NO: 42-43 или обеих последовательностей SEQ ID NO: 44-45.

Таблица 5

Наименование TCR	Цепь TCR	Нуклеотидная последовательность
RAS ^{G12V} -HLA-RB1*07:01	Альфа (TRAV13-1)	SEQ ID NO: 42
	Бета (TRBV20-1)	SEQ ID NO: 43
RAS ^{G12C} -HLA-RB1*11:01	Альфа (TRAV24)	SEQ ID NO: 44
	Бета (TRBV12-4)	SEQ ID NO: 45

В одном из вариантов осуществления изобретения нуклеиновая кислота включает кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из TCR, полипептидов или белков, рассмотренных в настоящей работе. Не прибегая к какой-либо конкретной теории или механизму, предполагают, что оптимизация кодонов нуклеотидной последовательности повышает эффективность трансляции транскриптов мРНК (матричной РНК). Оптимизация кодонов нуклеотидной последовательности может включать замену нативного кодона другим кодоном, который кодирует ту же самую аминокислоту, но может транслироваться транспортной РНК, которая более доступна внутри клетки, что, таким образом, повышает эффективность трансляции. Оптимизация нуклеотидной последовательности также может снижать появление вторичных структур мРНК, которые могут мешать трансляции, и, таким образом, оптимизация повышает эффективность трансляции.

Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, включающей нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности любой из нуклеиновых кислот, рассмотренных в настоящей работе, или нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, рассмотренных в настоящей работе.

Нуклеотидная последовательность, которая гибридизуется в жестких условиях, предпочтительно гибридизуется в условиях высокой жесткости. "Условия высокой жесткости" означают, что нуклеотидная последовательность специфически гибридизуется с целевой последовательностью (нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, рассмотренных в настоящей работе) в обнаруживаемом большем количестве по сравнению с неспецифической гибридизацией. Условия высокой жесткости включают условия, которые позволяют отличать полинуклеотид с точной комплементарной последовательностью или полинуклеотид, содержащий лишь несколько разрозненных некомплементарностей, от случайной последовательности, которая имеет несколько небольших областей (например, 3-10 оснований), которые комплементарны с этой нуклеотидной последовательностью. Такие небольшие области комплементарности сплавляются с большей легкостью, чем комплемент полной длины, содержащий 14-17 или более оснований, и высокая жесткость гибридизации позволяет их успешно различать. Условия относительно высокой жесткости включают, например, низкую концентрацию соли и/или высокую тем-

пературу, например, создаваемые при приблизительно 0,02-0,1 М NaCl или эквивалентной концентрации, при температурах, приблизительно составляющих 50-70°C. Такие условия высокой жесткости допускают очень небольшую некомплементарность между нуклеотидной последовательностью и матрицей или целевой цепочкой или вовсе ее не допускают и особенно подходят для обнаружения экспрессии любых TCR согласно изобретению. Общеизвестно, что обычно условия могут быть ужесточены посредством добавления повышенных количеств формамида.

Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, включающей нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 70% или более, например, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99% идентична любой из нуклеиновых кислот, рассмотренных в настоящей работе. Таким образом, нуклеиновая кислота может по существу состоять из любой из нуклеотидных последовательностей, рассмотренных в настоящей работе.

Нуклеиновые кислоты согласно изобретению могут быть введены в рекомбинантный вектор экспрессии. Таким образом, изобретение относится к рекомбинантному вектору экспрессии, включающему любые из нуклеиновых кислот согласно изобретению. В одном из примеров осуществления изобретения рекомбинантный вектор экспрессии включает нуклеотидную последовательность, кодирующую α -цепь, β -цепь и линкерный пептид.

Согласно изобретению, термин "рекомбинантный вектор экспрессии" означает генетически модифицированный олигонуклеотидный или полинуклеотидный конструкт, который обеспечивает экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида клеткой-хозяином, если этот конструкт включает нуклеотидную последовательность, кодирующую соответствующую мРНК, белок, полипептид или пептид, и вектор контактирует с клеткой в условиях, подходящих для того, чтобы внутри клетки экспрессировалась мРНК, белок, полипептид или пептид. Векторы согласно изобретению целиком в природе не встречаются. Однако, в природе могут встречаться части таких векторов. Рекомбинантные векторы экспрессии согласно изобретению могут включать нуклеотид любого типа, включающий, без ограничений ДНК и РНК, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным, синтезированным или частично полученным из природных источников, и который может содержать природные, не встречающиеся в природе или измененные нуклеотиды. Рекомбинантные векторы экспрессии могут включать встречающиеся в природе, не встречающиеся в природе межнуклеотидные связи или связи обоих указанных типов. Предпочтительно, не встречающиеся в природе или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не затрудняют транскрипцию или репликацию вектора.

Рекомбинантный вектор экспрессии согласно изобретению может представлять собой любой подходящий рекомбинантный вектор экспрессии и может быть применен для трансформации или трансфицирования любой подходящей клетки-хозяина. Подходящие векторы включают векторы, предназначенные для размножения и экспансии или для экспрессии или для обеих указанных целей, такие как плазмиды и вирусы. Вектор может быть выбран из группы, состоящей из серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), серии pET (Novagen, Madison, WI), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) и серии pEX (Clontech, Palo Alto, CA). Также могут быть применены бактериофаговые векторы, такие как λ GT10, λ GT11, λ Zapll (Stratagene), λ EMBL4 и λ NM1149. Примеры векторов экспрессии для растений включают pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии для животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech). Предпочтительно рекомбинантный вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор, например, ретровирусный вектор. В одном из особенно предпочтительных примеров осуществления рекомбинантным вектором экспрессии является вектор MSGV1.

Рекомбинантные векторы экспрессии согласно изобретению могут быть получены стандартными методиками получения рекомбинантных ДНК, которые рассмотрены, например, в упоминаемой выше публикации Green, Sambrook с соавт. Из векторов экспрессии могут быть получены кольцевые или линейные конструкты, которые содержат систему репликации, которая функционирует в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColEI, 2 μ плазмиды, λ , SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота и подобных систем.

Желательно, чтобы рекомбинантный вектор экспрессии включал регуляторные последовательности, такие как кодоны иницирования и терминации транскрипции и трансляции, которые специфичны для типа клетки-хозяина (например, клеток бактерий, грибов, растений или животных), в которую вводят вектор, которые подходят для вектора с учетом того, получен вектор на основе ДНК или РНК.

Рекомбинантный вектор экспрессии может включать один или более маркерных генов, которые позволяют отбирать трансформированные или трансфицированные клетки-хозяева. Маркерные гены отвечают за биоцидную резистентность, например, резистентность к антибиотикам, тяжелым металлам и т.д., комплементарность в ауксотрофной клетке-хозяине для создания прототрофности и подобные явления. Маркерные гены, подходящие для векторов экспрессии согласно изобретению, включают, например, гены резистентности к неомичину/G418, гены резистентности к гигромицину, гены резистентности к

гистидинолу, гены резистентности к тетрациклину и гены резистентности к ампициллину.

Рекомбинантный вектор экспрессии может включать 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. Специалист в данной области техники способен сделать правильный выбор промоторов, например, из сильных, слабых, индуцируемых, ткань-специфических промоторов и промоторов, специфических в отношении стадии развития. Аналогично, специалисту в данной области техники также известны способы комбинирования нуклеотидной последовательности с промотором. Промотор может быть невирусным промотором или вирусным промотором, например, цитомегаловирусным (англ. cytomegalovirus, сокр. CMV) промотором, промотор SV40, промотор RSV (сокр. от англ. respiratory syncytial virus, т.е. респираторно-синцитиальный вирус) и промотором, находящимся в длинном концевом повторе вируса мышинных стволовых клеток.

Рекомбинантные векторы экспрессии согласно изобретению могут быть сконструированы либо для транзientной экспрессии, либо для стабильной экспрессии, либо для обоих этих видов экспрессии. Кроме того, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть сконструированы для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии.

Кроме того, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть сконструированы таким образом, чтобы они включали суицидальный ген. Употребляемый в настоящем описании термин "суицидальный ген" относится к гену, который вызывает гибель клетки, экспрессирующей суицидальный ген. Суицидальный ген может представлять собой ген, который придает чувствительность агенту, например, лекарственному средству, по отношению к клетке, в которой экспрессируется ген, и вызывает гибель клетки при ее контакте с агентом или при воздействии на нее агента. Суицидальные гены известны в данной области техники и включают, например, ген тимидинкиназы (англ. thymidine kinase, сокращенно ТК) вируса простого герпеса (англ. Herpes Simplex Virus, сокращенно HSV) и генные системы цитозиндеаминазы, пуриннуклеозидфосфорилазы, нитроредуктазы и индуцируемой каспазы 9.

Другой пример осуществления изобретения дополнительно относится к клетке-хозяину, включающей любой из рекомбинантных векторов экспрессии, рассмотренных в настоящей работе. Употребляемый в настоящем описании термин "клетка-хозяин" относится к любому типу клеток, которые могут содержать рекомбинантный вектор экспрессии согласно изобретению. Клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, например, клетку растения, животного, грибка или водорослей, или может представлять собой прокариотическую клетку, например, клетку бактерии или простейшее. Клетка-хозяин может представлять собой культивируемую клетку или первичную клетку, т.е. выделенную непосредственно из организма, например, организма человека. Клетка-хозяин может представлять собой адгезивную клетку или суспендированную клетку, т.е. клетку, выращиваемую в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в данной области техники и включают, например, клетки DH5 α E.coli, клетки яичников китайских хомяков, клетки обезьян VERO, клетки COS, клетки HEK293 и подобные клетки. Для размножения или репликации рекомбинантного вектора экспрессии клетка-хозяин предпочтительно представляет собой прокариотическую клетку, например, клетку DH5 α . Для получения рекомбинантного TCR, полипептида или белка клетка-хозяин предпочтительно представляет собой млекопитающего. Наиболее предпочтительно, клетка-хозяин представляет собой человеческую клетку. Несмотря на то, что клетка-хозяин может представлять собой клетку любого типа, может быть отобрана от тканей любого типа и может находиться на любой стадии развития, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой лимфоцит периферической крови (англ. peripheral blood lymphocyte, сокращенно PBL) или мононуклеарную клетку периферической крови (PBMC). Более предпочтительно клетка-хозяин представляет собой Т-клетку.

Согласно изобретению, 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-клетку, полученную из организма млекопитающего. Если Т-клетка получена из организма млекопитающего, то Т-клетка может быть получена из различных источников, примеры которых включают, без ограничений, кровь, костный мозг, лимфатический узел, тимус или другие ткани или физиологические жидкости. Т-клетки также могут быть обогащены или очищены. Предпочтительно Т-клетка представляет собой Т-клетку человека. Т-клетка может представлять собой Т-клетку любого типа и может находиться на любой стадии развития, включая, без ограничений, двойные положительные Т-клетки CD4⁺/CD8⁺, хелперные Т-клетки CD4⁺, например, клетки Th₁ и Th₂, Т-клетки CD4⁺, Т-клетки CD8⁺ (например, цитотоксичные Т-клетки), лимфоциты, инфильтрующие опухоль (англ. tumor infiltrating lymphocyte, сокращенно TIL), Т-клетки памяти (например, центральные Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки памяти), необученные Т-клетки и подобные клетки.

Изобретение также относится к популяции клеток, включающей по меньшей мере одну клетку-хозяина, рассмотренную в настоящей работе. Популяция клеток может быть гетерогенной популяцией, включающей клетку-хозяина, содержащую любой из рассмотренных рекомбинантных векторов экспрессии, наряду с по меньшей мере одной другой клеткой, например, клеткой-хозяином (например, Т-

клеткой), которая не включает каких-либо рекомбинантных векторов экспрессии, или клеткой, отличной от Т-клетки, например, В клеткой, макрофагом, нейтрофилом, эритроцитом, гепатоцитом, клеткой эндотелия, клетками эпителия, мускульной клеткой, клеткой мозга и т.д. В альтернативном варианте популяция клеток может быть по существу гомогенной популяцией, где популяция в основном включает клетки-хозяева (например, по существу состоит из клеток-хозяев), включающие рекомбинантный вектор экспрессии. Популяция также может быть клональной популяцией клеток, в которой все клетки популяции представляют собой клоны одной клетки-хозяина, включающей рекомбинантный вектор экспрессии, то есть все клетки популяции включают рекомбинантный вектор экспрессии. В одном из примеров осуществления изобретения популяция клеток представляет собой клональную популяцию, включающую клетки-хозяева, содержащие рекомбинантный вектор экспрессии, рассмотренный в настоящей работе.

В одном из примеров осуществления изобретения количество клеток в популяции может быть быстро увеличено. Количество Т-клеток может быть увеличено любыми из множества способов, известных в данной области техники и рассмотренных, например, в патентах US 8034334, US 8383099, в патентной заявке US 2012/0244133, в публикациях Dudley с соавт, J. Immunother., 26:332-42 (2003) и Riddell с соавт, J. Immunol. Methods, 128:189-201 (1990). В одном из примеров осуществления увеличения количества Т-клеток выполняют культивированием Т-клеток с антителом ОКТ3, IL-2 и фидером мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC, например, облученными аллогенными PBMC).

TCR, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии и клетки-хозяева (включая их популяции) согласно изобретению могут быть выделены и/или очищены. Употребляемый в настоящем описании термин "выделенный" означает "извлеченный из своей природной окружающей среды". Употребляемый в настоящем описании термин "очищенный" определяет объект, чистота которого была повышена, где "чистота" представляет собой относительный термин и не обязательно является абсолютной чистотой. Например, чистота может составлять по меньшей мере приблизительно 50%, может превышать приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или может составлять приблизительно 100%.

TCR, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии и клетки-хозяева (включая их популяции) согласно изобретению, которые далее совокупно называются "материалами TCR согласно изобретению", могут быть предоставлены в виде композиции, такой как фармацевтическая композиция. Таким образом, изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей любые TCR, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии и клетки-хозяева (включая их популяции), рассмотренные в настоящей работе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции согласно изобретению, содержащие любые из материалов TCR согласно изобретению, могут включать более одного материала TCR согласно изобретению, например, полипептид и нуклеиновую кислоту или два или более различных TCR. В альтернативном варианте фармацевтическая композиция может включать материал TCR согласно изобретению в комбинации с другим фармацевтически активным агентом (агентами) или лекарственным средством (средствами), таким как химиотерапевтический агент, например, аспарагиназа, бисульфат, карбоплатин, цисплатин, даунорубин, доксорубин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д.

Предпочтительно носитель представляет собой фармацевтически приемлемый носитель. В фармацевтических композициях носитель может представлять собой любой из носителей, традиционно применяемый для конкретного рассматриваемого материала TCR согласно изобретению. Способы получения вводимых композиций известны или очевидны для специалистов в данной области техники и более подробно рассмотрены, например, в публикации: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22-е изд., Pharmaceutical Press (2012). Предпочтительно, чтобы фармацевтически приемлемый носитель представлял собой носитель, который не имеет негативных побочных эффектов или токсичности в тех условиях, в которых его применяют.

Выбор носителя частично определяется особенностями конкретного материала TCR согласно изобретению, а также особенностями конкретного способа, применяемого для введения материала TCR согласно изобретению. Соответственно, существует множество подходящих препаратов, включающих фармацевтические композиции согласно изобретению. Подходящие препараты могут включать любые препараты для парентерального, подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриартериального, внутриоболочечного, внутриопухолевого или внутрибрюшинного введения. Для введения материалов TCR согласно изобретению может быть применено более одного пути введения, и в некоторых примерах определенный путь введения может обеспечивать быстрейшую и более эффективную ответную реакцию, чем другой путь введения.

Предпочтительно, материал TCR согласно изобретению вводят посредством инъекции, например, внутривенно. Если материал TCR согласно изобретению представляет собой клетку-хозяина (или их популяцию), экспрессирующую TCR согласно изобретению, то фармацевтически приемлемый носитель для инъекции для клеток может включать любой изотонический носитель, такой как, например, нормальный солевой раствор (приблизительно 0,90% мас./об. NaCl в воде, приблизительно 300 миллиосмоль/л NaCl в воде или приблизительно 9,0 г NaCl на литр воды), раствор электролита NORMOSOL R

(Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL), приблизительно 5% декстрозы в воде или лактат Рингера. В одном из примеров осуществления фармацевтически приемлемый носитель дополнен альбумином сыворотки крови человека.

Для целей изобретения количество или дозировка (например, количество клеток, если материал TCR согласно изобретению состоит из одной или более клеток) вводимого материала TCR согласно изобретению должно быть достаточным для того, чтобы вызвать, например, терапевтический или профилактический ответ у субъекта или животного в течение разумного периода времени. Например, дозировка материала TCR согласно изобретению должна быть достаточной для связывания с раковым антигеном (например, мутантным RAS) или для обнаружения, лечения или предупреждения ракового заболевания в течение периода, составляющего приблизительно 2 часа или более, например, от 12 до 24 или более часов с момента введения. В некоторых примерах осуществления период времени может быть даже больше. Дозировка определяется эффективностью конкретного материала TCR согласно изобретению и состоянием животного (например, человека), а также массой тела животного (например, человека), которому вводят препарат.

В данной области техники известны различные аналитические способы для определения вводимой дозировки. Согласно настоящему изобретению для определения начальной дозировки, которую вводят млекопитающему, может быть применен анализ, который включает сравнение степени лизиса клеток-мишеней или интенсивность выработки IFN- γ T-клетками, экспрессирующими TCR, полипептид или белок согласно изобретению, при введении заданной дозировки таких T-клеток млекопитающему, находящемуся в выборке млекопитающих, каждому из которых вводят отличающуюся от других дозировку T-клеток. Степень лизиса клеток-мишеней или интенсивность выработки IFN- γ при введении определенной дозировки может быть оценена способами, известными в данной области техники.

Дозировка материала TCR согласно изобретению также определяется наличием, природой и выраженностью каких-либо негативных побочных эффектов, которыми может сопровождаться введение конкретного материала TCR согласно изобретению. Обычно дозировку материала TCR согласно изобретению, которую прописывают для лечения каждого индивидуального пациента, определяет лечащий врач, который учитывает ряд факторов, таких как возраст, масса тела, общее состояние здоровья, диета, пол, тип вводимого материала TCR согласно изобретению, путь введения и тяжесть подвергаемого лечению ракового заболевания. В том примере осуществления, в котором материал TCR согласно изобретению представляет собой популяцию клеток, количество клеток, вводимых за одно вливание, может быть различным, например, от приблизительно 1×10^6 до приблизительно 1×10^{12} клеток или более. В некоторых примерах осуществления может быть введено менее 1×10^6 клеток.

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что материалы TCR согласно изобретению могут быть различным образом модифицированы с целью повышения терапевтической или профилактической эффективности материалов TCR согласно изобретению. Например, материалы TCR согласно изобретению могут быть представлены в виде конъюгата, образуемого либо непосредственно, либо опосредованно, через мостик, с химиотерапевтическим агентом. Практика конъюгирования соединений с химиотерапевтическим агентом известна в данной области техники. Специалисту в данной области техники должно быть известно, что сайты, имеющиеся на материалах TCR согласно изобретению, которые не обязательны для функционирования материалов TCR согласно изобретению, подходят для присоединения мостика и/или химиотерапевтического агента, при условии, что после присоединения материалов TCR согласно изобретению мостик и/или химиотерапевтический агент не оказывает влияния на функционирование материалов TCR согласно изобретению, т.е. их способность связываться с мутантным RAS или их способность обнаруживать, лечить или предотвращать раковое заболевание.

Настоящее изобретение включает применение фармацевтических композиций, TCR, полипептидов, белков, нуклеиновых кислот, рекомбинантных векторов экспрессии, клеток-хозяев и популяций клеток согласно изобретению в способах лечения или предупреждения раковых заболеваний. Не прибегая к какой-либо конкретной теории, полагают, что TCR согласно изобретению специфически связываются с мутантным RAS, в результате чего при экспрессии TCR (или соответствующего полипептида или белка согласно изобретению) в клетках, TCR (или соответствующий полипептид или белок согласно изобретению) может служить медиатором иммунного ответа на клетку-мишень, экспрессирующую мутантный RAS. Таким образом, изобретение относится к способу лечения или предупреждения ракового заболевания у млекопитающего, где способ включает введение млекопитающему любых из следующих веществ: фармацевтических композиций, TCR, полипептидов или белков, рассмотренных в настоящей работе, любой нуклеиновой кислоты или рекомбинантного вектора экспрессии, включающих нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из TCR, полипептидов, белков, рассмотренных в настоящей работе, или любой клетки-хозяина или популяции клеток, включающих рекомбинантный вектор, который кодирует любой из TCR, полипептидов или белков, рассмотренных в настоящей работе, в количестве, достаточном для лечения или предупреждения ракового заболевания у млекопитающего.

Один из вариантов осуществления изобретения относится к любым из следующих объектов: фармацевтическим композициям, рецепторам TCR, полипептидам или белкам, рассмотренным в настоящей

работе, к любой нуклеиновой кислоте или рекомбинантному вектору экспрессии, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из TCR, полипептидов и белков, рассмотренных в настоящей работе, или к любой клетке-хозяину или популяции клеток, включающих рекомбинантный вектор, который кодирует любой из TCR, полипептидов или белков, рассмотренных в настоящей работе, для применения в лечении или предупреждении ракового заболевания у млекопитающего.

Употребляемые в настоящем описании термины "лечение (терапия)" и "предупреждение (профилактика)", а также их грамматические производные, не обязательно означают 100% или полное излечение или предупреждение. Напротив, существуют различные степени лечения или предупреждения, которые, как известно специалистам в данной области техники, имеют потенциальный полезный эффект или терапевтический эффект. В этом отношении способы согласно изобретению могут обеспечивать любую степень любого уровня лечения или предупреждения ракового заболевания у млекопитающего. Кроме того, лечение или предупреждение, обеспечиваемое способом согласно изобретению, может включать лечение или предупреждение одного или более состояний или симптомов ракового заболевания, подвергаемого терапии или профилактике. Например, лечение или предупреждение может включать содействие уменьшению опухолей. Кроме того, согласно изобретению, "предупреждение" может включать отсрочку начала развития ракового заболевания или его симптома или состояния. В альтернативном варианте или дополнительно "предупреждение" может включать предупреждение или отсрочку повторного развития ракового заболевания или его симптома или состояния.

Изобретение также относится к способу обнаружения наличия ракового заболевания у млекопитающего. Способ включает (i) приведение в контакт образца, включающего одну или более клеток, полученных из организма млекопитающего, с любыми из TCR, полипептидов, белков, нуклеиновых кислот, рекомбинантных векторов экспрессии, клеток-хозяев, популяций клеток или фармацевтических композиций согласно изобретению, рассмотренных в настоящей работе, что приводит к образованию комплекса, и обнаружение комплекса, где обнаружение комплекса указывает на наличие у млекопитающего ракового заболевания.

В способе согласно изобретению обнаружения рака у млекопитающего образец клеток может представлять собой образец, включающий цельные клетки, их лизаты или фракцию лизатов цельных клеток, например, ядерную или цитоплазматическую фракцию, фракцию цельного белка или фракцию нуклеиновой кислоты.

В способах обнаружения рака согласно изобретению контакт может происходить *in vitro* или *in vivo* по отношению к млекопитающему. Предпочтительно контакт производят *in vitro*.

Кроме того, обнаружение комплекса может быть произведено любым из множества способов, известных в данной области техники. Например, TCR, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева или популяции клеток согласно изобретению, рассмотренные в настоящей работе, могут быть помечены обнаруживаемой меткой, такой как, например, радиоизотоп, флуорофор (например, флуоресцеин изотиоцианат (англ. fluorescein isothiocyanate, сокращенно FITC), фикоэритрин (англ. phycoerythrin, сокращенно PE)), фермент (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена) и частицы элемента (например, частицы золота).

Для осуществления способов согласно изобретению, в которых производят введение клеток-хозяев или популяций клеток-хозяев, клетки могут быть аллогенными (отличающимися) или аутологичными (собственными) по отношению к клеткам млекопитающего. Предпочтительно клетки представляют собой аутологичные клетки млекопитающего.

Для способов согласно изобретению рак может представлять собой любое раковое заболевание, включающее любое из следующих заболеваний: острый лимфоцитарный рак, острую миелоидную лейкемию, альвеолярную рабдомиосаркому, костный рак, рак мозга, рак груди, рак ануса, анального канала или аноректальный рак, рак глаз, рак внутрипеченочного желчного протока, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, носовой полости или среднего уха, рак ротовой полости, вагинальный рак, рак вульвы, хроническую лимфоцитарную лейкемию, хронический миелоидный рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак шейки матки, плоскоклеточную карциному желудочно-кишечного тракта, глиому, лимфому Ходжкина, рак гортаноглотки, рак почек, рак гортани, рак печени, рак легких, злокачественную мезотелиому, меланому, множественную миелому, рак носоглотки, неходжкинскую лимфому, рак ротовой части глотки, рак яичников, рак пениса, рак поджелудочной железы, брюшной полости, сальника и брыжейки, рак зева, рак простаты, ректальный рак, почечный рак, рак кожи, рак тонкого кишечника, рак мягких тканей, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки, рак уретры и рак мочевого пузыря. Предпочтительно рак представляет собой рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак эндометрия, рак яичников и рак простаты. Предпочтительно рак легких представляет собой аденокарциному легких, рак яичников представляет собой рак эпителия яичников, и рак поджелудочной железы представляет собой аденокарциному поджелудочной железы. В одном из примеров осуществления изобретения рак экспрессирует мутантную аминокислотную последовательность RAS человека, где мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой мутантную аминокислотную последовательность KRAS человека, мутантную аминокислотную последовательность HRAS человека или мутантную аминокислотную последовательность

довательность NRAS человека. Мутантная последовательность KRAS человека, мутантная последовательность HRAS человека и мутантная последовательность NRAS человека, экспрессируемая при раковом заболевании, может представлять собой последовательность, рассмотренную в настоящей работе при описании других аспектов изобретения.

Млекопитающее, упоминаемое при описании способов согласно изобретению, может представлять собой любое млекопитающее. Употребляемый в настоящем описании термин "млекопитающее" относится к любому млекопитающему и включает, без ограничений, млекопитающих отряда грызунов, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда зайцеобразных, таких как кролики. Предпочтительно млекопитающие относятся к отряду хищников и включают семейство кошачьих (кошки) и собачьих (собаки). Более предпочтительно млекопитающие относятся к отряду парнокопытных и включают крупный рогатый скот (коров) и свиней (свиней) или к отряду непарнокопытных и включают семейство лошадиных (лошадей). Наиболее предпочтительно млекопитающие относятся к отряду приматов, капуцинообразных обезьян или Simoids (обезьян) или к отряду высших приматов (люди и человекообразные обезьяны). Особенно предпочтительным млекопитающим является человек.

Ниже для дополнительной иллюстрации изобретения приведены примеры, которые никоим образом не ограничивают объем изобретения.

Описание примеров осуществления изобретения

Пример 1.

В этом примере описано выделение TCR, обладающего антигенной специфичностью в отношении человеческого KRAS, содержащего мутацию G12V, который презентуется молекулой HLA-DRB1*07:01.

TCR с антигенной специфичностью в отношении презентуемого молекулой HLA-DRB1*07:01 человеческого KRAS, имеющего мутацию G12V, был выделен из образца опухоли эндометрия, отобранного из организма пациентки. Вкратце, образец опухоли измельчали, расщепляли (ферментировали) и замораживали. Перед сортировкой клеток расщепленную опухоль размораживали и выдерживали в течение ночи в отсутствие цитокинов. Т-клетки расщепленной опухоли сортировали на основе экспрессии PD-1 и/или OX40 (Пропускание по PI (живые клетки) > CD3+) способом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (англ. Fluorescence-Activated Cell Sorting, сокращенно FACS). Результаты анализа FACS представлены на фиг. 1. В качестве контроля использовали клетки, окрашенные по изотипу.

Количества отсортированных клеток увеличивали в соответствии с протоколом быстрого размножения (англ. rapid expansion protocol, сокращенно REP) в течение 3,5 недель. При проведении REP Т-клетки культивировали в микролитровых 96-луночных планшетах (3 клетки/луночка) в присутствии антигенов ОКТ3, IL-2 и облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

Увеличенные количества клеток собирали в пулы, и исследовали их реактивность в отношении аутологических дендритных клеток (англ. dendritic cell, сокращенно DC), которые кратковременно обрабатывали пулом 25-мерных пептидов или пептидов, кодируемых 25-мерными тандемными минигенами (англ. tandem minigene, сокр. TMG), включающими различные опухоль-специфические мутации, которые были обнаружены в опухоли пациентки. Каждый пул содержал 17-21 пептидов или минигенов TMG. Секретию интерферона-гамма (IFN- γ) определяли способом иммуноферментных пятен (ELISPOT). Результаты представлены на фиг. 2. Как показано на фиг. 2, собранные в пул эффекторные аутологичные Т-клетки в культурах 7 и 8 распознавали целевые DC, кратковременно обработанные пептидным пулом 1 (PP1, сокр. от "peptide pool") и пептидным пулом 2 (PP2).

Исследовали воздействие культур Т-клеток, реактивных по отношению к мутациям, на аутологичные DC, обработанные каждым из отдельных пептидов соответствующего пептидного пула. На фиг. 3 представлены результаты, полученные при совместном культивировании культуры номер 7 (W7) аутологичных Т-клеток с аутологичными DC, обработанными каждым из пептидов 1-17 (P1-P17) из пептидного пула 1 (PP1). Как показано на фиг. 3, Т-клетки культуры номер 7 проявляли высокую специфичность в отношении пептида P17. Пептид 17 (P17) кодирует мутацию G12V в KRAS.

Из клеток культуры номер 7 (W7) аутологичных Т-клеток была выделена суммарная РНК. Затем производили быструю амплификацию 5' комплементарных ДНК концов (5' RACE, сокр. от Rapid Amplification Of Complementary Deoxyribonucleic Acid Ends) суммарной РНК с использованием константных праймеров альфа- и бета-цепей TCR. Затем продукты ПЦР рецепторов TCR выделяли с помощью стандартных методик электрофореза в агарозном геле и экстракции из геля. Продукт секвенировали непосредственно. Нуклеотидными последовательностями переменных областей альфа- и бета-цепей TCR были SEQ ID NO: 42 и 43, соответственно. Аминокислотные последовательности переменных областей альфа- и бета-цепей TCR представлены в табл. 6. Области, определяющие комплементарность (CDR), подчеркнуты.

Таблица 6

Наименование TCR	TCR цепь	Подчеркнуты области, определяющие комплементарность (CDR) аминокислотных последовательностей
KRAS ^{G12V} - HLA- DRB1*07:01	Альфа (TRAV13-1)	MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGD ^S SAV ^I KCTYS ^D SA SNYFPWYKQELGKGPQLIIDIRSNVGEKKDQRIAVTLNKTA ^K HN ^F SL ^H IT ETQPEDSAVYFCAASTGGGNKLTFGTGTQLKVEL (SEQ ID NO: 13)
	Бета (TRBV20-1)	MLLLLLLLGPAGSGLGAVVSQHP ^S RVICKSGT ^S SVKIECRSLDFQATTM FWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGV ^E KDKFLINHASLTLSTLT V ^T SAHPEDSSFYIC ^S AREGAGGMGTQYFGPGTRLLVL (SEQ ID NO: 14)

Пример 2.

В этом примере показано, что TCR, выделенный в примере 1, распознает антиген к пептиду KRAS G12V, презентуемому в контексте молекулы HLA-DR.

Последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую выделенный в примере 1 G12V-реактивный TCR (включающую нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43) и включающую LVL-модифицированную мышиную константную область с цистеиновым замещением, клонировали в ретровирусные векторы экспрессии. α -Цепь мышиной константной области включала аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, где X в положении 48 представлял собой Cys, X в положении 112 представлял собой Leu, X в положении 114 представлял собой Ile, и X в положении 115 представлял собой Val. Константная область β -цепи включала аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, где X в положении 57 представлял собой Cys. Между константной областью α -цепи и вариабельной областью β -цепи был расположен линкер, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. Аллогенные Т-клетки трансдуцировали ретровирусными векторами экспрессии.

Трансдуцированные клетки (эффекторные клетки) культивировали совместно с целевыми аутологичными антиген-презентирующими клетками (англ. antigen presenting cell, сокращенно APC), которые кратковременно обрабатывали пептидом KRAS^{G12V} (1 нг/мл) с HLA-блокирующим антителом W6/32 (анти-HLA-A, -B, -C), IVA12 (рап-специфическое, анти-HLA Класс II), B7/21 (анти-HLA-DP), HB55 (анти-HLA-DR) или SPV-L3 (HLA-DQ) (клетка-мишень). Эффекторные трансдуцированные клетки культивировали как таковые, с DMSO или с форболмиристатацетатом (англ. phorbol myristate acetate, сокращенно PMA) в качестве контроля. Другим контролем служили эффекторные клетки, трансдуцированные пустым вектором (имитация), культивируемые совместно с целевыми аутологичными APC, кратковременно обработанными 1 нг/мл пептида KRAS G12V (SEQ ID NO: 53).

Реактивность эффекторных клеток в отношении клеток-мишеней определяли по экспрессии 4-1BB, обнаруживаемой способом проточной цитометрии (пропускание: клетки CD3+ mTCR бета-цепь+). Результаты представлены на фиг. 4. Как показано на фиг. 4, антитела IVA12 и HB55 блокировали реактивность эффекторных клеток в отношении клеток-мишеней, что указывало на то, что трансдуцированные эффекторные клетки распознавали антиген к пептиду KRAS G12V, презентуемый в контексте молекулы HLA-DR.

Пример 3.

В этом примере показано, что TCR, полученный в примере 2, распознает антиген к пептиду KRAS G12V, презентуемый в контексте молекулы HLA-DRB1*07:01.

Аллогенные Т-клетки, трансдуцированные TCR, полученным в примере 2 (эффекторные клетки), культивировали совместно с APC, аутологичными для пациентки примера 1, или APC, отобранными из организмов доноров, имеющих гаплотип DRB1 01:01 или DRB1 07:01 (клетки-мишени). Клетки-мишени кратковременно обрабатывали пептидом KRAS^{G12V} (SEQ ID NO: 53) или пептидом KRAS WT (SEQ ID NO: 55). Эффекторные клетки культивировали совместно с APC, полученными от донора, положительного по HLA-DRB1 (для которого один, но не оба аллеля донора представляет собой DRB1*07:01) ("DRB несоответствие") в качестве контроля. Эффекторные клетки культивировали как таковые, с DMSO или с PMA-иономицином в качестве дополнительного контроля. Секрецию IFN- γ определяли способом ELISPOT. Считали количество положительных лунок. Результаты представлены в табл. 7 и на фиг. 5. В табл. 7 "СМДП" означает "слишком много для подсчета". Процентное содержание клеток, экспрессирующих mTCR, которые экспрессировали 4-1BB, также определяли способом проточной цитометрии. Результаты представлены на фиг. 5. Результаты показывают, что TCR обладают специфической реактивностью в отношении мутантного KRAS, презентуемого HLA-DRB1*07:01.

Таблица 7

	Аутологичные	Донор DRB1	Донор DRB1	Донор с
	(Пациент 4148)	01:01	07:01	несоответствием HLA-DRB1
KRAS WT	Приблизительно (~) 354	2	~291	58
KRAS G12V	СМДП	27	СМДП	41
DMSO	102	2	123	~180
Только клетки	12	3	1	1
ОКТ3	~1122	~1019	~1007	~983

Пример 4.

В этом примере представлено выделение TCR, обладающего антигенной специфичностью в отношении человеческого KRAS с мутацией G12C, презентруемого молекулой HLA-DRB1*11:01.

KRAS^{G12C}-реактивный TCR идентифицировали способом повторной сенсibilизации in-vitro (англ. repeated in-vitro sensitization, сокр. IVS) субпопуляций Т-клеток периферической крови, полученных из раковых клеток яичников пациентки, имеющей KRAS^{G12C}-экспрессирующую опухоль.

Аутологичные DC подвергали кратковременной обработке мутантным пептидом G12C (SEQ ID NO: 56) и культивировали совместно с субпопуляциями отсортированных Т-клеток в течение 10 суток, после чего определяли реактивность, как описано в примере 1.

Для дополнительного обогащения реактивными клетками, фракцию, реактивную в отношении мутантного пептида KRAS, сортировали в соответствии с экспрессией 4-1BB/OX40 и вновь стимулировали мутантным пептидом. Реактивные Т-клетки сортировали в соответствии с экспрессией 4-1BB/OX40 и проводили секвенирование.

Из клеток выделяли суммарную РНК. Затем суммарную РНК подвергали быстрой амплификации 5' комплементарных ДНК концов (5' RACE) с использованием константных праймеров альфа- и бета-цепей TCR. Затем продукты ПЦР рецепторов TCR выделяли с помощью стандартных методик электрофореза в агарозном геле и экстракции из геля. Продукт секвенировали непосредственно. Нуклеотидными последовательностями переменных областей альфа- и бета-цепей TCR были SEQ ID NO: 44 и 45, соответственно. Аминокислотные последовательности переменных областей альфа- и бета-цепей TCR представлены в табл. 8. Области, определяющие комплементарность (CDR), подчеркнуты.

Таблица 8

Наименование TCR	TCR цепь	Подчеркнуты области, определяющие комплементарность (CDR) аминокислотных последовательностей
KRAS ^{G12C} - HLA- DRB1*11:01	Альфа (TRAV24)	MEKNPLAAPLLILWFHLDVCSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFP SSNFYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGDEKKGGRISATLNTKEGYS YLYIKGSPEDSATYLCAFTTGNQFYFGTGTSLTVIP (SEQ ID NO: 15)
	Бета (TRBV12-4)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISG HDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSKMPNASFS TLKIQPSEPRDSAVYFCASSSYGGYSNQPQHFGDGTRLSILED (SEQ ID NO: 16)

Пример 5.

В этом примере показано, что TCR, выделенный в примере 4, распознает антиген к пептиду KRAS G12C, презентруемый в контексте молекулы HLA-DR.

Последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую выделенный в примере 4 G12C-реактивный TCR (включающий нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45) и включающую LVL-модифицированную мышиную константную область, имеющую цистеиновую замену, клонировали в ретровирусные векторы экспрессии. Мышиная константная область α-цепи включала аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, в которой X в положении 48 представлял собой Cys, X в положении 112 представлял собой Leu, X в положении 114 представлял собой Ile и X в положении 115 представлял собой Val. Константная область β-цепи включала аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, в которой X в положении 57 представлял собой Cys. Между константной областью α-цепи и переменной областью β-цепи был расположен линкер, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. Аллогенные Т-клетки были трансдуцированы ретровирусными векторами экспрессии.

Трансдуцированные клетки (эффektorные клетки) культивировали совместно с целевыми аутологичными дендритными клетками (DC) или аллогенными DC, совместимыми с (matching with) одним аллелем HLA-DRB15:01 или HLA-DRB11:01, после кратковременной обработки дендритных клеток 24-мерным пептидом KRAS^{G12C} (SEQ ID NO: 56) с последующей блокировкой их мембранных молекул МНС Класса II антителами против HLA-DQ, HLA-DR или HLA-DP или рап-специфическим антителом против всех указанных белков: HLA-DP, HLA-DR и HLA-DQ. В качестве контроля использовали эффektorные трансдуцированные клетки, которые культивировали с форболмиристатацетатом (PMA) или

KRAS WT (SEQ ID NO: 55).

Реактивность эффекторных клеток против клеток-мишеней определяли по экспрессии 4-1BB, обнаруживаемой способом проточной цитометрии (пропускание: клетки CD3+ mTCR бета-цепь+). Результаты представлены на фиг. 10. Как показано на фиг. 10, TCR обладает специфической реактивностью против KRAS^{G12C}, презентруемого HLA-DRB*11:01.

Пример 6.

В этом примере показано, что мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), трансдуцированные KRAS^{G12C} TCR, полученным в примере 5, распознают аутологичные дендритные клетки (DC), кратковременно обработанные пептидами KRAS^{G12C}.

Аллогенные Т-клетки были получены генной инженерией с использованием MSGV-1-ретровируса, кодирующего KRAS^{G12C} TCR примера 5. Аутологичные DC были обработаны KRAS WT (SEQ ID NO: 55) или пептидом KRAS^{G12C} (SEQ ID NO: 56), и их культивировали совместно с клетками, трансдуцированными TCR, в течение 18 ч, после чего анализировали способом проточной цитометрии с целью определения повышенной экспрессии 4-1BB. Результаты представлены на фиг. 9. Как показано на фиг. 9, клетки PBMC, трансдуцированные KRAS^{G12C} TCR примера 5, распознавали аутологичные DC, обработанные пептидом KRAS^{G12C}.

Пример 7.

В этом примере показано, что мутантный белок KRAS G12V обрабатывается и презентруется DC и распознается TCR примера 2.

Аллогенные Т-клетки примера 2, трансдуцированные G12V-DRB1*07:01, культивировали в течение ночи совместно с аутологичными DC, кратковременно обработанными клеточными лизатами клеточных линий опухоли, экспрессирующих одну из следующих мутаций G12 KRAS: G12R, G12C, G12D или G12V. В качестве контроля использовали трансдуцированные клетки, которые культивировали совместно с аутологичными DC, кратковременно обработанными клеточными лизатами клеточной линии опухоли, которая экспрессировала KRAS WT. В качестве дополнительного контроля использовали трансдуцированные клетки, которые культивировали как таковые или с PMA или DMSO. Процентное содержание клеток, экспрессирующих повышенное количество 4-1BB и/или OX40, определяли способом проточной цитометрии. Количество клеток, экспрессирующих IFN γ (пятен на 2×10^4 клеток) определяли способом ELISPOT. Результаты представлены на фиг. 6. Как показано на фиг. 6, мутантный белок KRAS G12V обрабатывается и презентруется DC и распознается TCR примера 2.

Пример 8.

В этом примере показано, что клетки, трансдуцированные G12V-DRB1*07:01 TCR примера 2, специфически распознают пептид KRAS^{G12V}.

Аллогенные Т-клетки примера 2, трансдуцированные G12V-DRB1*07:01 TCR, культивировали в течение ночи совместно с аутологичными DC, которые кратковременно обрабатывали 24-мерными пептидами KRAS^{G12V} (SEQ ID NO: 53) или KRAS WT (SEQ ID NO: 55), имеющими различные концентрации. Процентное содержание клеток mTCR β +CD8+4-1BB+ определяли способом проточной цитометрии. Результаты представлены на фиг. 7. Как показано на фиг. 7, клетки, трансдуцированные G12V-DRB1*07:01 TCR примера 2, специфически распознают пептид KRAS^{G12V}.

Пример 9.

Клетки, трансдуцированные G12V-DRB1*07:01 TCR примера 2, специфически распознают различные пептиды KRAS^{G12V}.

Аллогенные Т-клетки примера 2, трансдуцированные G12V-DRB1*07:01 TCR, культивировали в течение ночи совместно с аутологичными DC, кратковременно обработанными различными концентрациями пептидов, перечисленных ниже в табл. 9. Секретию IFN γ измеряли способом ELISPOT. Результаты представлены на фиг. 8. Как показано на фиг. 8, несмотря на то, что клетки, трансдуцированные G12V-DRB1*07:01 TCR примера 2, специфически распознавали все пептиды KRAS^{G12V}, наилучшее распознавание наблюдали для SEQ ID NO: 52.

Таблица 9

Наименование	Последовательность	SEQ ID NO:
KRAS G12V 11мер	LVVVGAVGVGK	46
KRAS G12V 12мер_1	KLVVVGAVGVGK	47
KRAS G12V 12мер_2	LVVVGAVGVGKS	48
KRAS G12V 13мер_1	YKLVVVGAVGVGK	49
KRAS G12V 13мер_2	KLVVVGAVGVGKS	50
KRAS G12V 13мер_3	LVVVGAVGVGKSA	51
KRAS G12V 15мер_3	EYKLVVVGAVGVGKS	52
KRAS G12V 24мер	MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLI	53

Вся цитируемая литература, включая публикации, патентные заявки и патенты, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящее описание посредством ссылки, как если бы о каждой из цитируемых работ было специально и конкретно указано, что она полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

Упоминание единственного числа и указательных местоимений, а также указания "по меньшей мере один" и аналогичные определения при раскрытии изобретения (в частности, в контексте приведенных ниже пунктов формулы изобретения) включает как единственное, так и множественное число, если не указано иное или если из контекста ясно не следует иное. Если не указано иное или если из контекста ясно не следует иное, то следует понимать, что употребление термина "по меньшей мере один" перед перечнем, состоящим из одного или более объектов (например, "по меньшей мере один из А и В"), означает один объект, выбранный из перечисленных объектов (А или В) или любую комбинацию двух или более из перечисленных объектов (А и В). Если не указано иное, то термины "включающий", "имеющий" и "содержащий" должны рассматриваться как неограничивающие (т.е. означающие "включающий без ограничений"). Если не указано иное, то упоминание диапазонов значений служит для более удобного обозначения каждого из индивидуальных значений, входящих в указанный диапазон, и каждое отдельное значение включено в настоящее описание, как если бы оно было конкретно указано в описании. Все способы, рассмотренные в настоящей работе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если в настоящей работе не указано иное или иное ясно следует из контекста. Каждый и все приведенные примеры или употребление вводных слов перед примером (например, "такой как") предназначено для лучшего описания изобретения и не ограничивает объем изобретения, если иное не указано в прилагаемой формуле изобретения. Никакие фразы, приведенные при описании изобретения, не должны рассматриваться как указывающие на элемент, не заявленный в формуле изобретения, то есть существенный для воплощения изобретения.

В настоящем описании рассмотрены предпочтительные примеры осуществления настоящего изобретения, которые включают наилучший из известных авторам изобретения способ осуществления изобретения. Специалист в данной области техники после прочтения приведенного выше описания может создать варианты описанных предпочтительных примеров осуществления. Авторы изобретения ожидают, что специалисты в данной области техники смогут подходящим образом применять такие варианты, и авторы изобретения предполагают, что изобретение может быть воплощено образом, отличным от конкретного рассмотренного в настоящей работе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета изобретения, раскрытого в приведенных ниже пунктах формулы изобретения, в соответствии с применяемыми правовыми нормами. Кроме того, если не указано иное или если из контекста ясно не следует иное, то следует понимать, что любая комбинация рассмотренных выше элементов во всех их возможных вариантах включена в объем изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный или очищенный Т-клеточный рецептор (TCR), где TCR обладает антигенной специфичностью в отношении мутантной аминокислотной последовательности RAS человека, презентруемой молекулой антигена лейкоцитов человека (HLA) класса II, при этом мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой аминокислотную последовательность мутантного человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (KRAS), мутантного человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Харви (HRAS) или мутантного человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы нейробластомы (NRAS), где

(a) TCR содержит аминокислотную последовательность области, определяющей комплементарность, (CDR) CDR1 альфа-цепи SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность CDR2 альфа-цепи SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность CDR1 бета-цепи SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность CDR2 бета-цепи SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 6;

мутантная аминокислотная последовательность RAS человека включает человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа с заменой глицина на валин в положении 12, где положение 12 определяется относительно аминокислотной последовательности человеческого белка KRAS дикого типа, человеческого белка HRAS дикого типа или человеческого белка NRAS дикого типа, соответственно; и

молекула HLA класса II представляет собой молекулу HLA-DR7; или

(b) TCR содержит аминокислотную последовательность CDR1 альфа-цепи SEQ ID NO: 7, аминокислотную последовательность CDR2 альфа-цепи SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 9, аминокислотную последовательность CDR1 бета-цепи SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность CDR2 бета-цепи SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 12;

мутантная аминокислотная последовательность RAS человека включает человеческую аминокис-

лотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа с заменой глицина на цистеин в положении 12, где положение 12 определяется относительно аминокислотной последовательности человеческого белка KRAS дикого типа, человеческого белка HRAS дикого типа или человеческого белка NRAS дикого типа, соответственно; и

молекула HLA класса II представляет собой молекулу HLA-DR11.

2. TCR по п.1, причем TCR содержит аминокислотную последовательность области, определяющей комплементарность, (CDR) CDR1 альфа-цепи SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность CDR2 альфа-цепи SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность CDR1 бета-цепи SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность CDR2 бета-цепи SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 6;

мутантная аминокислотная последовательность RAS человека включает человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа с заменой глицина на валин в положении 12, где положение 12 определяется относительно аминокислотной последовательности человеческого белка KRAS дикого типа, человеческого белка HRAS дикого типа или человеческого белка NRAS дикого типа, соответственно; и

молекула HLA класса II представляет собой молекулу HLA-DR7.

3. TCR по п.1, причем TCR содержит аминокислотную последовательность CDR1 альфа-цепи SEQ ID NO: 7, аминокислотную последовательность CDR2 альфа-цепи SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 9, аминокислотную последовательность CDR1 бета-цепи SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность CDR2 бета-цепи SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 12;

мутантная аминокислотная последовательность RAS человека включает человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа с заменой глицина на цистеин в положении 12, где положение 12 определяется относительно аминокислотной последовательности человеческого белка KRAS дикого типа, человеческого белка HRAS дикого типа или человеческого белка NRAS дикого типа, соответственно; и

молекула HLA класса II представляет собой молекулу HLA-DR11.

4. TCR по п.2, где молекула HLA класса II представляет собой молекулу HLA-DRB1*07:01.

5. TCR по п.3, где молекула HLA класса II представляет собой молекулу HLA-DRB1*11:01.

6. TCR по пп.1, 2 или 4, включающий следующие аминокислотные последовательности:

(i) вариабельная область α -цепи SEQ ID NO: 13, (ii) вариабельная область β -цепи SEQ ID NO: 14 или (iii) обе последовательности SEQ ID NO: 13-14.

7. TCR по пп.1, 3 или 5, включающий следующие аминокислотные последовательности:

(i) вариабельная область α -цепи SEQ ID NO: 15, (ii) вариабельная область β -цепи SEQ ID NO: 16 или (iii) обе последовательности SEQ ID NO: 15-16.

8. TCR по любому из пп.1-7, дополнительно включающий:

(a) константную область α -цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, где:

(i) X в положении 48 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Thr или Cys;

(ii) X в положении 112 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(iii) X в положении 114 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;

и

(iv) X в положении 115 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(b) константную область β -цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, где X в положении 57 в SEQ ID NO: 31 представляет собой Ser или Cys; или

(c) как (a), так и (b).

9. Выделенный или очищенный TCR по любому из пп.1-8, включающий:

(a) α -цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, где:

(i) X в положении 179 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Thr или Cys;

(ii) X в положении 243 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(iii) X в положении 245 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;

и

(iv) X в положении 246 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(b) β -цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, где X в положении

189 в SEQ ID NO: 35 представляет собой Ser или Cys;

(с) α -цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, где:

(i) X в положении 180 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Thr или Cys;

(ii) X в положении 244 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(iii) X в положении 246 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;

и

(iv) X в положении 247 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(d) β -цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, где X в положении 194 в SEQ ID NO: 37 представляет собой Ser или Cys;

(е) как (а), так и (b); или

(f) как (с), так и (d).

10. Выделенный или очищенный полипептид, включающий функциональную часть T-клеточного рецептора (TCR), обладающего антигенной специфичностью в отношении мутантной аминокислотной последовательности RAS человека, презентируемой молекулой антигена лейкоцитов человека (HLA) класса II,

где мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой мутантную аминокислотную последовательность человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (KRAS), мутантную аминокислотную последовательность человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Харви (HRAS) или мутантную аминокислотную последовательность человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы нейробластомы (NRAS), причем

(а) функциональная часть TCR содержит аминокислотную последовательность области, определяющей комплементарность, (CDR) CDR1 альфа-цепи SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность CDR2 альфа-цепи SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность CDR1 бета-цепи SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность CDR2 бета-цепи SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 6;

мутантная аминокислотная последовательность RAS человека включает человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа с заменой глицина на валин в положении 12, где положение 12 определяется относительно аминокислотной последовательности человеческого белка KRAS дикого типа, человеческого белка HRAS дикого типа или человеческого белка NRAS дикого типа, соответственно; и

молекула HLA класса II представляет собой молекулу HLA-DR7; или

(b) функциональная часть TCR содержит аминокислотную последовательность CDR1 альфа-цепи SEQ ID NO: 7, аминокислотную последовательность CDR2 альфа-цепи SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 9, аминокислотную последовательность CDR1 бета-цепи SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность CDR2 бета-цепи SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 12;

мутантная аминокислотная последовательность RAS человека включает человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа с заменой глицина на цистеин в положении 12, где положение 12 определяется относительно аминокислотной последовательности человеческого белка KRAS дикого типа, человеческого белка HRAS дикого типа или человеческого белка NRAS дикого типа, соответственно; и

молекула HLA класса II представляет собой молекулу HLA-DR11.

11. Полипептид по п.10, где функциональная часть TCR содержит аминокислотную последовательность области, определяющей комплементарность, (CDR) CDR1 альфа-цепи SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность CDR2 альфа-цепи SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность CDR1 бета-цепи SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность CDR2 бета-цепи SEQ ID NO: 5 и аминокислотную последовательность CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 6;

мутантная аминокислотная последовательность RAS человека включает человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа с заменой глицина на валин в положении 12, где положение 12 определяется относительно аминокислотной последовательности человеческого белка KRAS дикого типа, человеческого белка HRAS дикого типа или человеческого белка NRAS дикого типа, соответственно; и

молекула HLA класса II представляет собой молекулу HLA-DR7.

12. Полипептид по п.10, где функциональная часть TCR содержит аминокислотную последователь-

ность CDR1 альфа-цепи SEQ ID NO: 7, аминокислотную последовательность CDR2 альфа-цепи SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность CDR3 альфа-цепи SEQ ID NO: 9, аминокислотную последовательность CDR1 бета-цепи SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность CDR2 бета-цепи SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность CDR3 бета-цепи SEQ ID NO: 12;

мутантная аминокислотная последовательность RAS человека включает человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа с заменой глицина на цистеин в положении 12, где положение 12 определяется относительно человеческого белка KRAS дикого типа, человеческого белка HRAS дикого типа или человеческого белка NRAS дикого типа, соответственно; и

молекула HLA класса II представляет собой молекулу HLA-DR11.

13. Выделенный или очищенный полипептид по п.10 или 11, где функциональная часть включает следующую аминокислотную последовательность (аминокислотные последовательности):

(i) варибельная область α -цепи SEQ ID NO: 13, (ii) варибельная область β -цепи SEQ ID NO: 14 или (iii) обе последовательности SEQ ID NO: 13-14.

14. Полипептид по п.10 или 12, где функциональная часть включает следующую аминокислотную последовательность (аминокислотные последовательности):

(i) варибельная область α -цепи SEQ ID NO: 15, (ii) варибельная область β -цепи SEQ ID NO: 16 или (iii) обе последовательности SEQ ID NO: 15-16.

15. Выделенный или очищенный полипептид по любому из пп.10-14, дополнительно включающий:

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, где:

(i) X в положении 48 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Thr или Cys;

(ii) X в положении 112 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(iii) X в положении 114 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;

и

(iv) X в положении 115 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, где X в положении 57 в SEQ ID NO: 31 представляет собой Ser или Cys; или

(c) как (a), так и (b).

16. Выделенный или очищенный полипептид по любому из пп.11-15, включающий:

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, где:

(i) X в положении 179 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Thr или Cys;

(ii) X в положении 243 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(iii) X в положении 245 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;

и

(iv) X в положении 246 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, где X в положении 189 в SEQ ID NO: 35 представляет собой Ser или Cys;

(c) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, где:

(i) X в положении 180 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Thr или Cys;

(ii) X в положении 244 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(iii) X в положении 246 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;

и

(iv) X в положении 247 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(d) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, где X в положении 194 в SEQ ID NO: 37 представляет собой Ser или Cys;

(e) как (a), так и (b); или

(f) как (c), так и (d).

17. Выделенный или очищенный белок, имеющий антигенную специфичность к мутантной аминокислотной последовательности RAS человека, презентуемой молекулой антигена лейкоцитов человека (HLA) класса II,

где мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой мутантную аминокислотную последовательность человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (KRAS), мутантную аминокислотную последовательность человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Харви (HRAS) или мутантную аминокислотную последовательность чело-

- (i) X в положении 48 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Thr или Cys;
- (ii) X в положении 112 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;
- (iii) X в положении 114 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;
- и
- (iv) X в положении 115 в SEQ ID NO: 30 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;
- (b) вторая полипептидная цепь включает в себя аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, где X в положении 57 в SEQ ID NO: 31 представляет собой Ser или Cys; или
- (c) как (a), так и (b).
23. Выделенный или очищенный белок по любому из пп.17-22, где:
- (a) первая полипептидная цепь включает в себя аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, где:
- (i) X в положении 179 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Thr или Cys;
- (ii) X в положении 243 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;
- (iii) X в положении 245 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;
- и
- (iv) X в положении 246 в SEQ ID NO: 34 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;
- (b) вторая полипептидная цепь включает в себя аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, где X в положении 189 в SEQ ID NO: 35 представляет собой Ser или Cys;
- (c) первая полипептидная цепь включает в себя аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, где:
- (i) X в положении 180 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Thr или Cys;
- (ii) X в положении 244 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;
- (iii) X в положении 246 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;
- и
- (iv) X в положении 247 в SEQ ID NO: 36 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;
- (d) вторая полипептидная цепь включает в себя аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, где X в положении 194 в SEQ ID NO: 37 представляет собой Ser или Cys;
- (e) как (a), так и (b); или
- (f) как (c), так и (d).
24. Выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую TCR по любому из пп.1-9, полипептид по любому из пп.10-16 или белок по любому из пп.17-23.
25. Рекомбинантный вектор экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту по п.24.
26. Выделенная или очищенная клетка-хозяин, включающая рекомбинантный вектор экспрессии по п.25.
27. Выделенная или очищенная популяция клеток, включающая клетку-хозяина по п.26.
28. Фармацевтическая композиция, включающая (a) TCR по любому из пп.1-9, полипептид по любому из пп.10-16, белок по любому из пп.17-23, нуклеиновую кислоту по п.24 или рекомбинантный вектор экспрессии по п.25, и (b) фармацевтически приемлемый носитель.
29. Фармацевтическая композиция, содержащая (a) клетку-хозяина по п.26 или популяцию клеток по п.27 и (b) фармацевтически приемлемый носитель.
30. Способ обнаружения наличия рака у млекопитающего, включающий:
- (a) приведение образца в контакт с TCR по любому из пп.1-9, что приводит к образованию комплекса; и
- (b) обнаружение комплекса, где обнаружение комплекса указывает на наличие рака у млекопитающего,
- причем указанный рак экспрессирует мутантную аминокислотную последовательность RAS человека, которая включает в себя человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа с заменой глицина на валин или цистеин в положении 12, где положение 12 определяется относительно аминокислотной последовательности человеческого белка KRAS дикого типа, человеческого белка HRAS дикого типа или человеческого белка NRAS дикого типа, соответственно.
31. Способ по п.30, где мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой мутантную аминокислотную последовательность человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (KRAS).

32. Способ по п.30, где мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой мутантную аминокислотную последовательность человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы нейробластомы (NRAS).

33. Способ по п.30, где мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой мутантную аминокислотную последовательность человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Харви (HRAS).

34. Способ по любому из пп.30-33, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак эндометрия, рак яичников и рак простаты.

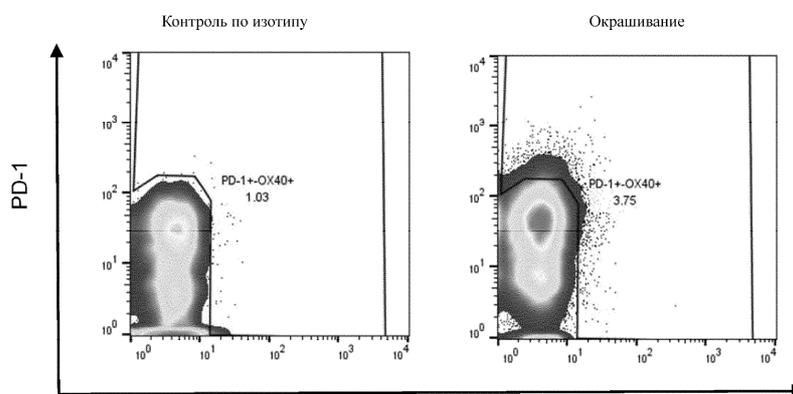
35. Применение TCR по любому из пп.1-9, полипептида по любому из пп.10-16, белка по любому из пп.17-23, нуклеиновой кислоты по п.24, рекомбинантного вектора экспрессии по п.25, клетки-хозяина по п.26, популяции клеток по п.27 или фармацевтической композиции по п.28 или 29 в производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения рака у млекопитающего, причем указанный рак экспрессирует мутантную аминокислотную последовательность RAS человека, которая включает в себя человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа с заменой глицина на валин или цистеин в положении 12, где положение 12 определяется относительно аминокислотной последовательности человеческого белка KRAS дикого типа, человеческого белка HRAS дикого типа или человеческого белка NRAS дикого типа, соответственно.

36. Применение по п.35, где мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой мутантную аминокислотную последовательность человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (KRAS).

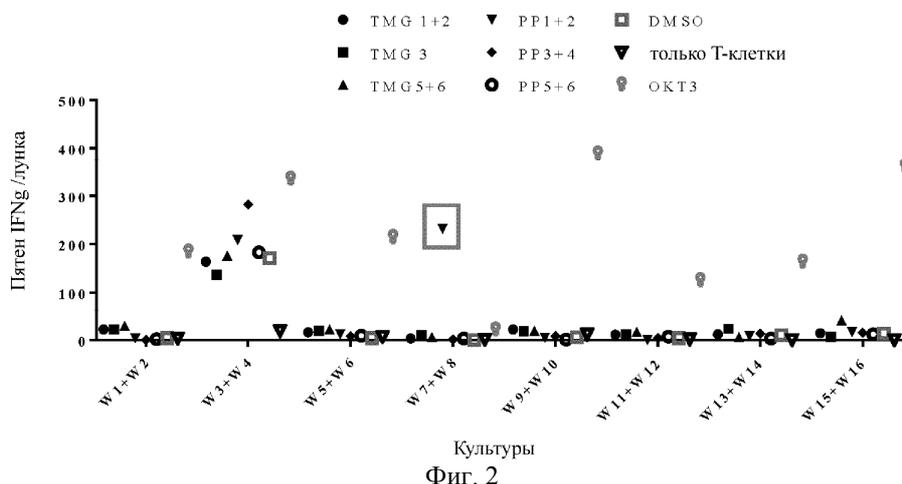
37. Применение по п.35, где мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой мутантную аминокислотную последовательность человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы нейробластомы (NRAS).

38. Применение по п.35, где мутантная аминокислотная последовательность RAS человека представляет собой мутантную аминокислотную последовательность человеческого гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Харви (HRAS).

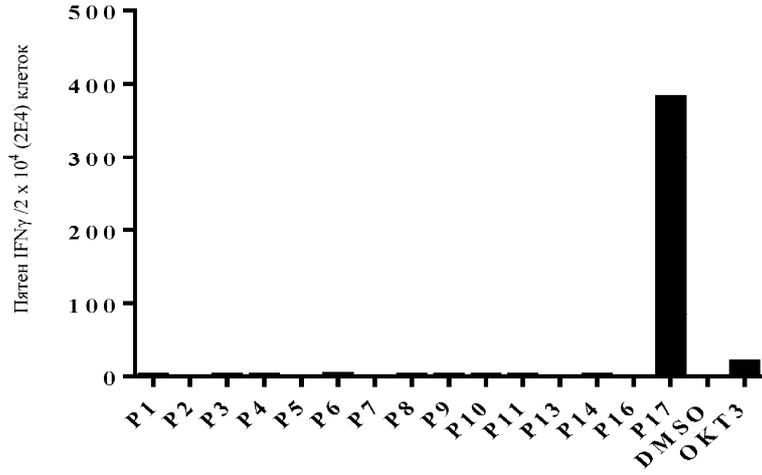
39. Применение по любому из пп.35-38, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак эндометрия, рак яичников и рак простаты.



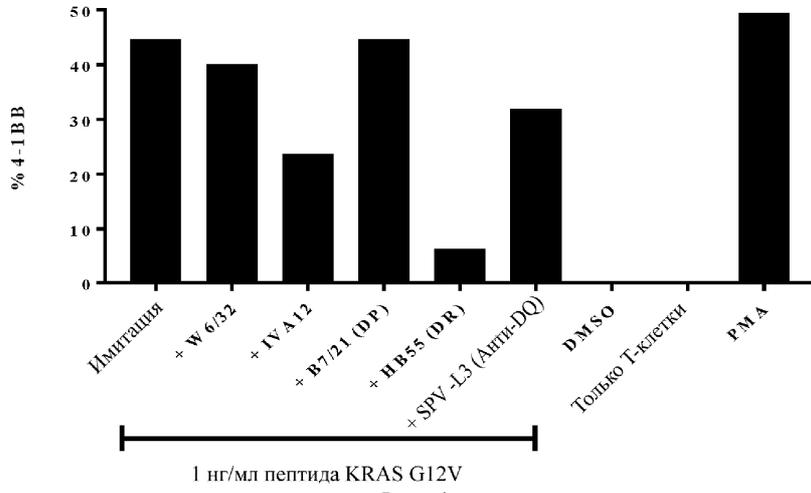
OX40
Фиг. 1



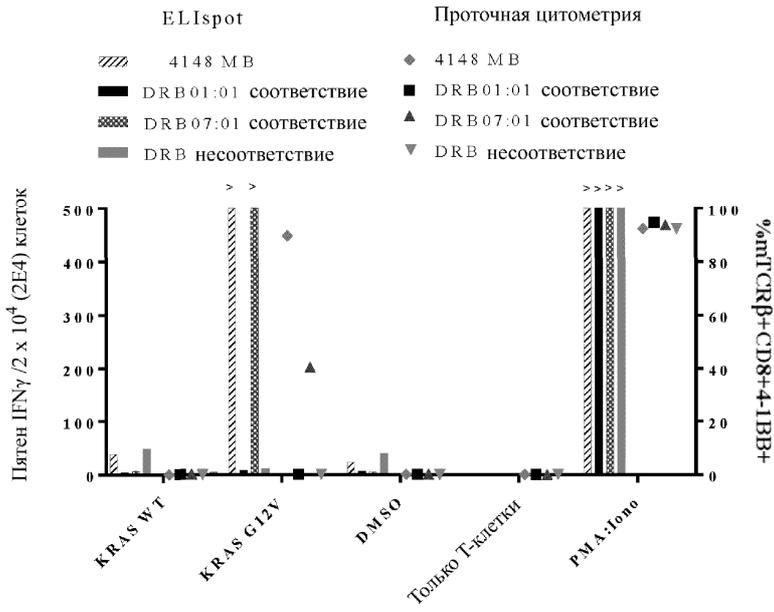
Культуры
Фиг. 2



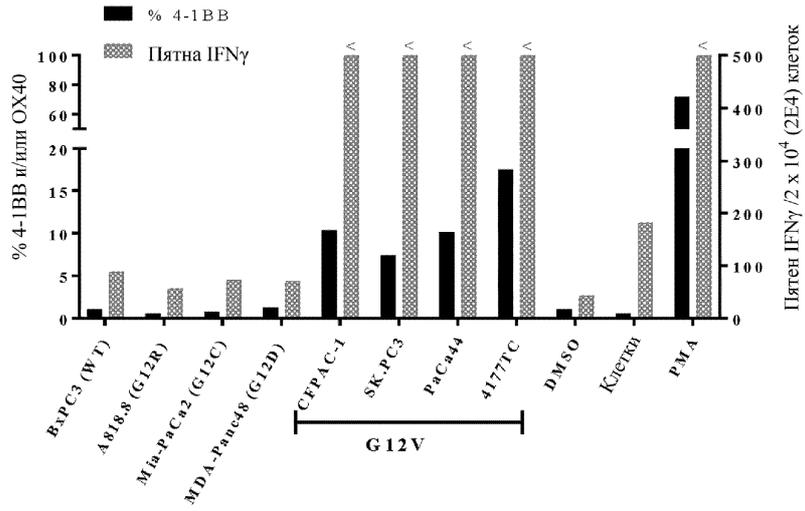
Фиг. 3



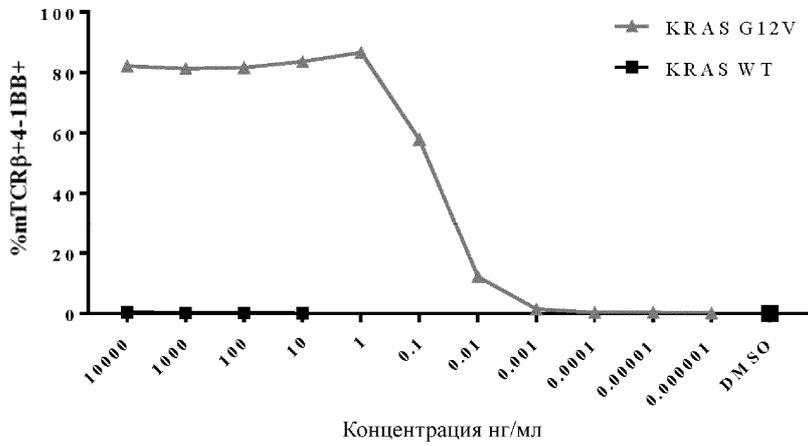
Фиг. 4



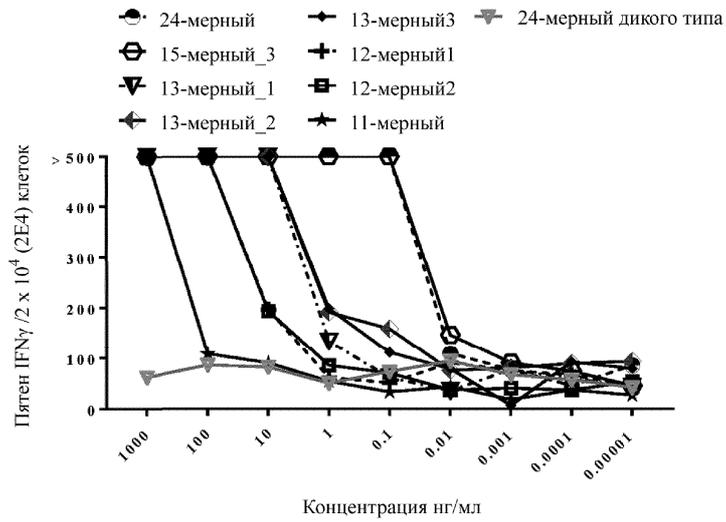
Фиг. 5



Фиг. 6

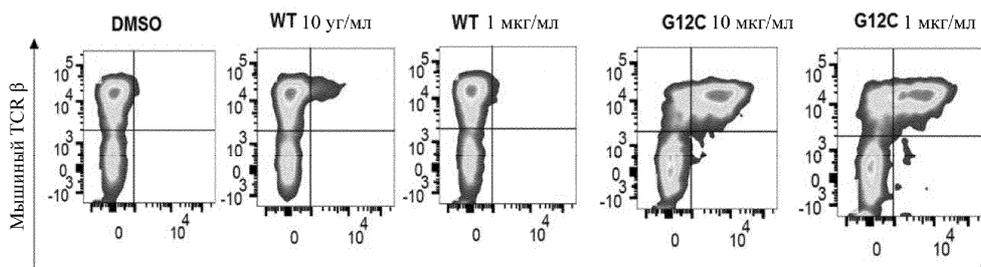


Фиг. 7

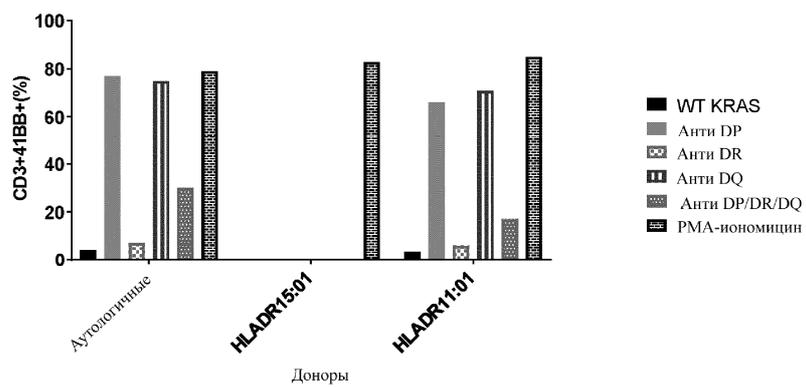


Фиг. 8

045621



41BB
Фиг. 9



Доноры
Фиг. 10