

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090757** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.21

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

(22) Дата подачи заявки
2018.09.17

(54) Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, РАСПОЗНАЮЩИЕ МУТАНТНЫЙ p53

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

(32) **2017.09.29**

(33) **US**

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

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

(71) Заявитель:

**ДЗЕ ЮНАЙТЕД СТЕЙТС ОФ
АМЕРИКА, ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ
ДЗЕ СЕКРЕТАРИ, ДЕПАРТМЕНТ
ОФ ХЕЛС ЭНД ХЬЮМАН
СЁРВИСЕЗ (US)**

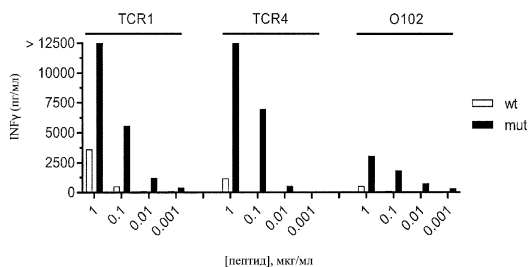
(72) Изобретатель:

**Денигер Дрю С., Розенберг Стивен А.
(US), Пасетто Анна (SE), Йозеф
Рами, Ло Унифред М., Лу Йон-Чэнь,
Паркхёрст Мария Р., Роббинс Пол Ф.,
Малекзадех Париза (US)**

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

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



A1

202090757

202090757

A1

Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, РАСПОЗНАЮЩИЕ МУТАНТНЫЙ P53

Перекрестная ссылка на родственную заявку

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

Утверждение относительно исследования или разработки, финансируемых из федерального бюджета

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

Включение посредством ссылки или материал, представленный в электронной форме

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

Предшествующий уровень техники

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

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно одному воплощению изобретения предложен выделенный или очищенный Т-клеточный рецептор (TCR – от англ. T cell receptor), обладающий антигенной специфичностью в отношении мутантного p53 человека.

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

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

Краткое описание нескольких видов графических материалов

Фиг. 1 представляет собой график, показывающий концентрацию IFN- γ (от англ. interferon gamma – интерферон-гамма) (пг/мл), измеренную после совместного культивирования аутологичных PBL, трансдуцированных одним из указанных TCR от пациента 4127 после совместного культивирования с аутологичными дендритными клетками (DC – от англ. dendritic cell), в которые под действием импульсов вводили либо пептид WT p53-G245 (wt (от англ. wild type – дикий тип)) (незаштрихованные столбцы), либо мутантный пептид p53-G245S (mut) (заштрихованные столбцы) при указанных уменьшающихся концентрациях пептида (мкг/мл).

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1 BB позитивных клеток (% CD4⁺ mTCR β ⁺), выявленное после совместного культивирования аутологичных PBL (от англ. peripheral blood mononuclear - мононуклеарная клетка периферической крови), трансдуцируемых одним из указанных TCR от пациента 4127, с аутологичными DC, в которые под действием импульсов вводили или пептид WT p53-G245 (wt) (незаштрихованные столбцы) или мутантный пептид p53-G245S (mut) (заштрихованные столбцы) при указанных уменьшающихся концентрациях пептида (мкг/мл).

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

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий концентрацию IFN- γ (пг/мл), измеренную после совместного культивирования TIL (от англ. tumor-infiltrating lymphocyte - опухоль-инфильтрирующий лимфоцит) от пациента 4127 или Т-клеток, трансдуцированных одним из указанных TCR, с клетками COS7, трансдуцированными одной из указанных аллелей HLA (от англ. human leukocyte

antigen - человеческий лейкоцитарный антиген), и в которые под действием импульсов вводили ДМСО (диметилсульфоксид) или один из указанных пептидов.

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

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий число пятен на 2х10⁴ эффекторных клеток, измеренное после совместного культивирования TIL от пациента 4127 с аллогенными (DRB3*01:01:01 или DRB3*02:02:01) APC (от англ. antigen-presenting cell - антигенпрезентирующая клетка), которые (1) подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; левые заштрихованные незакрашенные столбцы), WT p53 (p53-WT; левые заштрихованные серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; серые столбцы) последовательности, или (2) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; правые заштрихованные незакрашенные столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ (Высокоэффективная жидкостная хроматография)) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-G245 (LP-p53-wt-G245; правые заштрихованные серые столбцы) или мутантной последовательности p53-G245S (LP-p53-mut-G245S; черные столбцы).

Фиг. 7 представляет собой график, показывающий число пятен на 2х10⁴ эффекторных клеток, измеренное после совместного культивирования клеток, экспрессирующих 4127-TCR1, с аллогенными (DRB3*01:01:01 или DRB3*02:02:01) APC, которые (1) подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; левые заштрихованные незакрашенные столбцы), p53 WT (p53-WT; левые заштрихованные серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; серые столбцы) последовательности, или (2) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; правые заштрихованные незакрашенные столбцы), или очищенные (выше 95%, посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-G245 (LP-p53-wt-G245; правые заштрихованные серые столбцы) или мутантной последовательности p53-G245S (LP-p53-mut-G245S; черные столбцы).

Фиг. 8А представляет собой график, показывающий секрецию IFN- γ (пятна/2 х 10⁴ клеток), измеренную после совместного культивирования TIL из инфузионного

пакета, используемого для лечения пациента 4196, с клетками Cos7, трансфицированными плазмидами для TMG1 и указанной аллелью HLA.

Фиг. 8B представляет собой график, показывающий секрецию IFN- γ (пятна/2 x 10⁴ клеток), измеряемую после совместного культивирования TIL из инфузионного пакета, используемого для лечения пациента 4196, с аутологичными DC, в которые под действием импульсов вводили минимальный эпитоп-кандидат (HMTEVVRHC (SEQ ID NO: 530) или (SQHMTEVVRH (SEQ ID NO: 531)). Т-клетки, культивируемые отдельно, служили контролем.

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

Фиг. 10A-10B представляют собой графики, показывающие секрецию IFN- γ (пг/мл) (A) и процентное содержание 4-1BB позитивных клеток (% mTCR β +) (B), измеряемые после совместного культивирования клеток T2, в которые под действием импульсов вводили минимальный мутантный эпитоп в указанных концентрациях, с клетками, трансдуцированными одним из следующих TCR: AV12/BV6-1 (закрашенные треугольники), AV6/BV11 (круги) или AV38/BV10-3 (квадраты). Совместная культивация клеток T2, в которые под действием импульсов вводили минимальный мутантный эпитоп, с нетрансдуцированными (UT) клетками (незакрашенные треугольники) служила контролем.

Фиг. 11 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2x10⁴ эффекторных клеток, выявляемое после совместного культивирования TCR-трансдуцированных клеток с указанными линиями клеток-мишеней. Эффекторные клетки трансдуцировали AV12/BV6-1 (черные столбцы), AV6/BV11 (полосатые столбцы) или AV38/BV10-3 (серые столбцы). HLA-A*02:01 - трансдуцированные клетки-мишени обозначены LS123-A2, CCRF-CEM-A2 и AU-565-A2. Клетки-мишени, в который под действием импульсов вводили пептид, обозначены (+). Клетки-мишени, которым не вводили под действием импульсов пептид, обозначены (-). Нетрансдуцированные эффекторные клетки

(незаштрихованные столбцы), совместно культивируемые с линиями клеток-мишеней, использовали в качестве контроля.

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

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

Фиг. 14 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD8+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместной культивации фрагментов TIL пациента 4238 F1-F24 (n равен 24) с аутологичными APC, которые подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной (IRR; незакрашенные столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; черные столбцы) последовательности.

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

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

электропорации p53-mut-TMG, содержащим мутантную последовательность p53-R248W.

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

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

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

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

Фиг. 21 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ -позитивных пятен на 2×10^4 эффекторных клеток, измеренное после совместного культивирования аутологичных PBL от пациента 4149 (с переносом 4149-TCRa2b1 или 4149-TCRa2b2) с аутологичными APC, (1) которые подвергались электропорации TMG, состоящим их нерелевантной (IRR; правые заштрихованные черные столбцы), WT p53 (p53-wt-TMG; левые заштрихованные черные столбцы)

или мутантной p53 (p53-mut-TMG; серые столбцы) последовательности, или (2) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; открытые столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-Y220 (LP-p53-Y220-WT; черные столбцы с горизонтальной штриховкой) или мутантной последовательности p53-Y220C (LP-p53-Y220C-MUT; черные столбцы). Форбол 12-миристенат 13-ацетат (PMA - от англ. Phorbol-12-myristate-13-acetate) и Иономицин (Iono) представлял собой положительный контроль (серые столбцы).

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

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

Фиг. 24 представляет собой график, показывающий секрецию IFN- γ (пг/мл) после совместного культивирования Т-клеток с переносом 4149-TCRa2b2 с клетками Cos7, совместно трансфицируемыми отдельными аллелями HLA +/- TMG. В клетки, не трансфицированные TMG, под действием импульсов вводили 15-мерный пептид p53Y220C. Клетки-мишени с ведением под действием импульсов обозначены заштрихованными столбцами.

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

из мутантной последовательности p53-R248Q (LP-p53-R248Q-MUT; черные столбцы).

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

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

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

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

Фиг. 30 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD8+4-1BB+ клеток, выявляемое после совместного культивирования фрагментов TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО; незакрашенные столбцы)

или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 (LP-p53-R248-WT; серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R248Q (LP-p53-R248Q-MUT; черные столбцы).

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

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

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

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

На Фиг. 35 показано выравнивание аминокислотных последовательностей девяти вариантов сплайсинга p53. SP|P04637|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 1); SP|P04637-2|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 535); SP|P04637-3|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 536); SP|P04637-4|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 537); SP|P04637-5|P53_HUMAN (SEQ ID

NO: 538); SP|P04637-6|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 539); SP|P04637-7|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 540); SP|P04637-8|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 541); и SP|P04637-9|P53_HUMAN (SEQ ID NO: 542).

Фиг. 36 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1BB позитивных клеток (% mTCR β +), выявляемое после совместного культивирования Т-клеток, трансдуцированных 4127-O37-TCR, с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили уменьшающиеся концентрации пептидов из 25 аминокислот, соответствующих WT (незакрашенные круги) или мутантной (закрашенные квадраты) p53-G245S последовательности.

Фиг. 37A-37C представляют собой графики, показывающие процентное содержание 4-1BB позитивных клеток (% mTCR β +) (слева ось Y; заштрихованные столбцы) и IFN- γ (пг/мл) (справа ось Y; черные столбцы), измеряемое после совместного культивирования Т-клеток, трансдуцированных 4127-O37-TCR (A), 4127-TP53-G245S-TCR1 (B) или 4127-O102-TCR (C), с клетками COS7, совместно трансфицированными одной из указанных аллелей HLA и в которые под действием импульсов вводили пептид из 25 аминокислот p53-G245S.

Фиг. 38 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1BB позитивных клеток (% CD8+) (справа ось Y; черные столбцы) и IFN- γ (пятна/2х10⁴ клеток) (слева ось Y; заштрихованные столбцы), измеренное после совместного культивирования TIL от пациента 4141 (культура фрагмента 12) с аутологичными APC, трансфицированными TMG, кодирующим нерелевантные мутации (TMG-IRR), последовательность WT p53 (TP53-wt-TMG) или мутантную последовательность p53, включая R175H (TP53-mut-TMG). Только среды и PMA и иономицин представляли собой отрицательный и положительный контроли, соответственно.

Фиг. 39 представляет собой график, показывающий количество IFN- γ позитивных пятен на 2х10⁴ эффекторных клеток, измеряемое после совместного культивирования TIL от пациента 4141 (культура фрагмента 12) с клетками Cos7, совместно трансфицированными указанными аллелями HLA и либо без дополнительного гена (только HLA; незакрашенные столбцы), либо WT TP53 TMG (серые заштрихованные столбцы), либо мутантным (черные столбцы) TP53 TMG содержащим последовательность p53-R175H.

Фиг. 40 представляет собой график, показывающий концентрацию IFN- γ (пг/мл), измеренную после совместного культивирования Т-клеток, экспрессирующих имитацию (без TCR) или 4141-TCR1a2, с опухолевыми клетками T2 (экспрессирующими HLA-A*02:01). В клетки T2 под действием импульсов

вводили носитель пептида (ДМСО; серые столбцы) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды, состоящие из пептида WT p53-R175 (заштрихованные серые столбцы) или мутантного пептида p53-R175H (черные столбцы). Только среды (незакрашенные столбцы) и РМА и Иномицин (решетчатые столбцы) представляли собой отрицательный и положительный контроли, соответственно. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM (от англ. Standard error of the mean - стандартная ошибка среднего) (n равен 3).

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

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

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

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

Фиг. 45 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1BB позитивных клеток (% CD4+), выявленное после совместного культивирования культуры фрагмента TIL № 6 от пациента 4259 с клетками Cos7, совместно трансфицированными указанными аллелями HLA от пациента 4259, и в которые под действием импульсов вводили ДМСО (незакрашенные столбцы) или пептид p53-Y220C (закрашенные столбцы).

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

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

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

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

незакрашенные столбцы), p53 WT-типа (p53-WT; серые столбцы) или мутантной p53 (p53-MUT; черные столбцы) последовательности.

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

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

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

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

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

(заштрихованные серые столбцы) или мутантной последовательности p53-R248W (черные столбцы). Только среды (незакрашенные столбцы) и РМА и Иномицин (решетчатые столбцы) представляли собой отрицательный и положительный контроли, соответственно.

Фиг. 55 представляет собой график, показывающий процентное содержание 4-1BB+ клеток (% CD8+), выявляемое после совместного культивирования Т-клеток, экспрессирующих имитацию (без TCR) или p53-R248W-специфичные TCR (4266-TCR2, 4266-TCR3 или 4266-TCR4), с линией опухолевых клеток (ТС), созданной из ксенотрансплантированного фрагмента опухоли, иссеченного у пациента 4266, затем серийно пропускаемого через мышей с ослабленным иммунитетом (ТС#4266). Клетки ТС#4266 или инкубировали без всего (черные столбцы), или с W6/32 pan-HLA Класс-I-специфичным блокирующим антителом (правые серые заштрихованные столбцы), или с IVA12 pan-HLA Класс-II-специфичным блокирующим антителом (серые столбцы) или мутантным пептидом p53-R248W (левые серые заштрихованные столбцы). Только среды (без ТС; незакрашенные столбцы) и РМА и Иномицин (серые решетчатые столбцы) представляли собой отрицательный и положительный контроли, соответственно.

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

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

Фиг. 58 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD4+ 4-1BB+ клеток, выявленное после совместного культивирования TIL от пациента 4273 с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили пептиды из 15 аминокислот из неопитопа p53-R248W (аминокислотная замена, выделенная жирным шрифтом) с перекрытием 14 аминокислот. ДМСО

представлял собой носитель пептида, только среды (только Т-клетки) и РМА и иономицин представляли собой контроли. Пептиды из 25 аминокислот (wt p53-R248 и мутантный p53-R248W) представляли собой дополнительные контроли для пептидов из 15 аминокислот. Пептиды представляют собой: YMCNSSCMGGMNWRP (SEQ ID NO: 592); MCNSSCMGGMNWRPI (SEQ ID NO: 593); CNSSCMGGMNWRPIL (SEQ ID NO: 594); NSSCMGGMNWRPILT (SEQ ID NO: 595); SSCMGGMNWRPILTI (SEQ ID NO: 596); SCMGGMNWRPILTII (SEQ ID NO: 597); CMGGMNWRPILTIIT (SEQ ID NO: 598); MGGMNWRPILTIITL (SEQ ID NO: 599); GGMNWRPILTIITL (SEQ ID NO: 600); GMNWRPILTIITLED (SEQ ID NO: 601) и MNWRPILTIITLED (SEQ ID NO: 602).

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

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

Подробное описание изобретения

Опухолевый белок Р53 (также называемый «TP53» или «p53») действует в качестве опухолевого супрессора посредством, например, регуляции деления клеток. Белок p53 локализован в ядре клетки, где он прямо связывается с ДНК. Когда ДНК повреждается, белок p53 включается в определение того, будет ли ДНК восстановлена, или же поврежденная клетка будет подвергаться апоптозу. Если ДНК может быть восстановлена, p53 активирует другие гены для устранения повреждения. Если ДНК не может быть восстановлена, белок p53 предотвращает деление клетки и сигнализирует о прохождении ею апоптоза. Останавливая деление клеток с мутантной или поврежденной ДНК, p53 помогает предотвратить развитие опухолей. Полноразмерный (нормальный) p53 дикого типа (WT) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

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

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

например, мутации относятся к замене аминокислотного остатка в аминокислотной последовательности конкретного варианта сплайсинга p53 в соответствии с указанным положением 393-аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, исходя из предположения, что фактические положения в варианте сплайсинга могут отличаться.

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

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

TCR по изобретению предоставляют множество преимуществ, включая случаи, когда экспрессируются клетками, используемыми для адоптивного переноса клеток. Мутантный p53 экспрессируется раковыми клетками и не экспрессируется нормальными, нераковыми клетками. Без привязки к конкретной теории или

механизму, полагают, что TCR по изобретению преимущественно нацелены на уничтожение раковых клеток при минимизации или исключении уничтожения нормальных, нераковых клеток, снижая, вследствие этого, например, минимизируя или исключая, токсичность. Кроме того, TCR по изобретению могут, преимущественно, успешно лечить или предупреждать мутантный p53-позитивные виды рака, которые не отвечают на другие типы лечения, такие как, например, химиотерапия, хирургическое вмешательство или лучевая терапия. Кроме того, TCR по изобретению могут обеспечивать высокоавидное распознавание мутантного p53, которое может обеспечивать способность распознавать неманипулированные опухолевые клетки (например, опухолевые клетки, которые не обрабатывали интерфероном (IFN)- γ , трансфицировали вектором, кодирующим одно или оба из мутантного p53 и применимой молекулы HLA, вводили под действием импульсов пептид p53 с мутацией p53, или их комбинация). Приблизительно половина всех опухолей несет мутацию в p53, примерно половина которых будет представлять собой миссенс-мутацию и примерно 30% миссенс-мутаций встречается в следующих остатках-«горячих точках»: R175H, Y220C, G245D, G245S, R248L, R248Q, R248W, R249S, R273C, R273L, R273H и R282W. Кроме того, те же мутации «горячих точек» в p53 (например, R175H, Y220C, G245D, G245S, R248L, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273C, R273L или R282W) часто встречаются (в совокупности примерно 30% миссенс-мутаций p53) в опухолях неродственных людей. Соответственно, TCR по изобретению могут увеличивать число пациентов, которые могут быть допущены к лечению иммунотерапией.

Фраза «антигенная специфичность», в том виде, в котором она используется в данном документе, означает, что TCR может специфично связываться с и иммунологически распознавать мутантный p53 с высокой авидностью. Например, TCR можно считать обладающим «антигенной специфичностью» в отношении мутантного p53, если от примерно 1×10^4 до примерно 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих TCR, секретируют по меньшей мере примерно 200 пг/мл или более (например, 200 пг/мл или более, 300 пг/мл или более, 400 пг/мл или более, 500 пг/мл или более, 600 пг/мл или более, 700 пг/мл или более, 1000 пг/мл или более, 5000 пг/мл или более, 7000 пг/мл или более, 10000 пг/мл или более, 20000 пг/мл или более, или диапазон, определенный любыми двумя из приведенных выше значений) IFN- γ при совместном культивировании с (а) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида p53 (например, от примерно 0,05 нг/мл до примерно 5 нг/мл, 0,05 нг/мл, 0,1 нг/мл, 0,5

нг/мл, 1 нг/мл, 5 нг/мл или диапазон, определенный любыми двумя из приведенных выше значений), или (b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный p53, таким образом, чтобы клетка-мишень экспрессировала мутантный p53. Клетки, экспрессирующие TCR по изобретению, могут также секретировать IFN- γ при совместном культивировании с антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили более высокие концентрации мутантного пептида p53.

В качестве альтернативы или дополнительно, TCR может считаться обладающим «антигенной специфичностью» в отношении мутантного p53, если Т-клетки, экспрессирующие TCR, секретируют по меньшей мере в два раза больше IFN- γ при совместном культивировании с (a) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида p53, или (b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный p53, таким образом, чтобы клетка-мишень экспрессировала мутантный p53, в сравнении с количеством IFN- γ , экспрессируемым отрицательным контролем. Отрицательный контроль может представлять собой, например, (i) Т-клетки, экспрессирующие TCR, совместно культивируемые с (a) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили такую же концентрацию нерелевантного пептида (например, какой-то другой пептид с последовательностью, отличной от мутантного пептида p53), или (b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую нерелевантный пептид, или (ii) нетрансдуцированные Т-клетки (например, происходящие от PBMC (от англ. peripheral blood mononuclear cell - мононуклеарная клетка периферической крови), которые не экспрессируют TCR), совместно культивируемые с (a) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили такую же концентрацию мутантного пептида p53, или (b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный p53, таким образом, чтобы в клетке-мишени экспрессировался мутантный p53. Секреция IFN- γ может измеряться способами,

известными в данной области, такими как, например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA - от англ. enzyme-linked immunosorbent assay).

В качестве альтернативы или дополнительно, TCR может считаться обладающим «антигенной специфичностью» в отношении мутантного p53, если по меньшей мере в два раза большее число Т-клеток, экспрессирующих TCR, секретируют IFN- γ при совместном культивировании с (а) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида p53, или (b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный p53, таким образом, чтобы в клетке-мишени экспрессировался мутантный p53, в сравнении с числом Т-клеток отрицательного контроля, которые секретируют IFN- γ . Концентрация пептида и отрицательного контроля может представлять собой такую, как описано в данном документе, в отношении других аспектов изобретения. Число клеток, секретирующих IFN- γ , может быть измерено способами, известными в данной области, такими как, например, аналитический метод иммуноферментных пятен (ELISOT – от англ. Enzyme-Linked ImmunoSpot).

В качестве альтернативы или дополнительно, TCR может считаться обладающим «антигенной специфичностью» в отношении мутантного p53, если по меньшей мере в два раза больше пятен выявляют посредством ELISPOT для Т-клеток, экспрессирующих TCR, при совместном культивировании с (а) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида p53, или (b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный p53, таким образом, чтобы в клетке-мишени экспрессировался мутантный p53, в сравнении с числом пятен, выявляемым посредством ELISPOT для Т-клеток отрицательного контроля, совместно культивируемых с теми же клетками-мишенями. Концентрация пептида и отрицательного контроля может представлять собой такую, как описано в данном документе, в отношении других аспектов изобретения.

В качестве альтернативы или дополнительно, TCR может считаться обладающим «антигенной специфичностью» в отношении мутантного p53, если больше чем примерно 50 пятен выявляют посредством ELISPOT для Т-клеток, экспрессирующих TCR при совместном культивировании с (а) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые под

действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида p53, или (b) антиген-негативными, применяемая молекула HLA-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный p53, таким образом, чтобы в клетке-мишени экспрессировался мутантный p53. Концентрация пептида может представлять собой такую, как описано в данном документе, в отношении других аспектов изобретения.

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

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

В одном воплощении изобретения TCR содержит две полипептидные цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, содержащую гипервариабельную область (CDR - от англ. complementarity determining region)1, CDR2 и CDR3 TCR. В одном воплощении изобретения TCR содержит первую полипептидную цепь, содержащую CDR1 цепи α (CDR1 α), CDR2 цепи α (CDR2 α) и CDR3 цепи α (CDR α), и вторую полипептидную цепь, содержащую CDR1 цепи β (CDR1 β), CDR2 цепи β (CDR2 β) и CDR3 цепи β (CDR3 β). В одном воплощении изобретения TCR содержит следующие аминокислотные последовательности: (1) все из SEQ ID NO: 27-32; (2) все из SEQ ID NO: 37-42; (3) все из SEQ ID NO: 47-52; (4) все из SEQ ID NO: 57-62; (5) все из SEQ ID NO: 67-72; (6) все из SEQ ID NO: 77-82; (7) все из SEQ ID NO: 87-92; (8) все из SEQ ID NO: 97-102; (9) все из SEQ ID NO: 107-112; (10) все из SEQ ID NO: 117-122; (11) все из SEQ ID NO: 127-132; (12) все из SEQ ID NO: 137-142; (13) все из SEQ ID NO: 147-152; (14) все из SEQ ID NO: 157-162; (15) все из SEQ ID NO: 167-172; (16) все из SEQ ID NO: 177-182; (17) все из SEQ ID NO: 187-192; (18) все из SEQ ID NO: 197-202; (19) все из SEQ ID NO: 207-212; (20) все из SEQ ID NO: 217-222; (21) все из SEQ ID NO: 227-232; (22) все из SEQ ID NO: 237-242; (23) все из SEQ ID NO: 247-252; (24) все из SEQ ID NO: 257-262; (25) все из SEQ ID NO: 267-272; (26) все из SEQ ID NO: 277-282; (27) все из SEQ ID NO: 287-

292; (28) все из SEQ ID NO: 297-302; (29) все из SEQ ID NO: 307-312; (30) все из SEQ ID NO: 317-322; (31) все из SEQ ID NO: 327-332; (32) все из SEQ ID NO: 337-342; (33) все из SEQ ID NO: 347-352; (34) все из SEQ ID NO: 357-362; (35) все из SEQ ID NO: 367-372; (36) все из SEQ ID NO: 377-382; (37) все из SEQ ID NO: 387-392; (38) все из SEQ ID NO: 397-402; (39) все из SEQ ID NO: 407-412; (40) все из SEQ ID NO: 417-422; (41) все из SEQ ID NO: 427-432; (42) все из SEQ ID NO: 437-442; (43) все из SEQ ID NO: 447-452; (44) все из SEQ ID NO: 457-462; (45) все из SEQ ID NO: 467-472; (46) все из SEQ ID NO: 477-482; или (47) все из SEQ ID NO: 487-492. Каждая из приведенных выше 47 совокупностей аминокислотных последовательностей в данном абзаце устанавливает шесть CDR областей каждого из 47 разных TCR, обладающих антигенной специфичностью в отношении мутантного человеческого р53. Эти шесть аминокислотных последовательностей в каждой совокупности соответствуют CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β и CDR3 β TCR, соответственно.

В одном воплощении изобретения TCR содержит аминокислотную последовательность вариабельной области цепи α и аминокислотную последовательность вариабельной области цепи β , которые вместе содержат одну из совокупностей CDR, установленных выше. В данном отношении TCR может содержать аминокислотные последовательности: (1) обеих из SEQ ID NO: 33-34; (2) обеих из SEQ ID NO: 43-44; (3) обеих из SEQ ID NO: 53-54; (4) обеих из SEQ ID NO: 63-64; (5) обеих из SEQ ID NO: 73-74; (6) обеих из SEQ ID NO: 83-84; (7) обеих из SEQ ID NO: 93-94; (8) обеих из SEQ ID NO: 103-104; (9) обеих из SEQ ID NO: 113-114; (10) обеих из SEQ ID NO: 123-124; (11) обеих из SEQ ID NO: 133-134; (12) обеих из SEQ ID NO: 143-144; (13) обеих из SEQ ID NO: 153-154; (14) обеих из SEQ ID NO: 163-164; (15) обеих из SEQ ID NO: 173-174; (16) обеих из SEQ ID NO: 183-184; (17) обеих из SEQ ID NO: 193-194; (18) обеих из SEQ ID NO: 203-204; (19) обеих из SEQ ID NO: 213-214; (20) обеих из SEQ ID NO: 223-224; (21) обеих из SEQ ID NO: 233-234; (22) обеих из SEQ ID NO: 243-244; (23) обеих из SEQ ID NO: 253-254; (24) обеих из SEQ ID NO: 263-264; (25) обеих из SEQ ID NO: 273-274; (26) обеих из SEQ ID NO: 283-284; (27) обеих из SEQ ID NO: 293-294; (28) обеих из SEQ ID NO: 303-304; (29) обеих из SEQ ID NO: 313-314; (30) обеих из SEQ ID NO: 323-324; (31) обеих из SEQ ID NO: 333-334; (32) обеих из SEQ ID NO: 343-344; (33) обеих из SEQ ID NO: 353-354; (34) обеих из SEQ ID NO: 363-364; (35) обеих из SEQ ID NO: 373-374; (36) обеих из SEQ ID NO: 383-384; (37) обеих из SEQ ID NO: 393-394; (38) обеих из SEQ ID NO: 403-404; (39) обеих из SEQ ID NO: 413-414; (40) обеих из SEQ ID NO: 423-424; (41) обеих из SEQ ID NO: 433-434; (42) обеих из SEQ ID NO: 443-444; (43) обеих из SEQ

ID NO: 453-454; (44) обеих из SEQ ID NO: 463-464; (45) обеих из SEQ ID NO: 473-474; (46) обеих из SEQ ID NO: 483-484; или (47) обеих из SEQ ID NO: 493-494. Каждая из приведенных выше 47 совокупностей аминокислотных последовательностей в данном абзаце устанавливает две переменные области каждого из 47 разных TCR, обладающих антигенной специфичностью в отношении мутантного человеческого р53. Данные две аминокислотные последовательности в каждой совокупности соответствуют переменной области цепи α и переменной области цепи β TCR, соответственно.

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

В одном воплощении изобретения TCR по изобретению может содержать цепь α TCR и цепь β TCR. Цепь α TCR может содержать переменную область

цепи α и константную область цепи α . Цепь α данного типа может составлять пару любой цепи β TCR. Цепь β может содержать переменную область цепи β и константную область цепи β . В одном воплощении изобретения TCR содержит аминокислотные последовательности: (1) обеих SEQ ID NO: 35-36; (2) обеих SEQ ID NO: 45-46; (3) обеих SEQ ID NO: 55-56; (4) обеих SEQ ID NO: 65-66; (5) обеих SEQ ID NO: 75-76; (6) обеих SEQ ID NO: 85-86; (7) обеих SEQ ID NO: 95-96; (8) обеих SEQ ID NO: 105-106; (9) обеих SEQ ID NO: 115-116; (10) обеих SEQ ID NO: 125-126; (11) обеих SEQ ID NO: 135-136; (12) обеих SEQ ID NO: 145-146; (13) обеих SEQ ID NO: 155-156; (14) обеих SEQ ID NO: 165-166; (15) обеих SEQ ID NO: 175-176; (16) обеих SEQ ID NO: 185-186; (17) обеих SEQ ID NO: 195-196; (18) обеих SEQ ID NO: 205-206; (19) обеих SEQ ID NO: 215-216; (20) обеих SEQ ID NO: 225-226; (21) обеих SEQ ID NO: 235-236; (22) обеих SEQ ID NO: 245-246; (23) обеих SEQ ID NO: 255-256; (24) обеих SEQ ID NO: 265-266; (25) обеих SEQ ID NO: 275-276; (26) обеих SEQ ID NO: 285-286; (27) обеих SEQ ID NO: 295-296; (28) обеих SEQ ID NO: 305-306; (29) обеих SEQ ID NO: 315-316; (30) обеих SEQ ID NO: 325-326; (31) обеих SEQ ID NO: 335-336; (32) обеих SEQ ID NO: 345-346; (33) обеих SEQ ID NO: 355-356; (34) обеих SEQ ID NO: 365-366; (35) обеих SEQ ID NO: 375-376; (36) обеих SEQ ID NO: 385-386; (37) обеих SEQ ID NO: 395-396; (38) обеих SEQ ID NO: 405-406; (39) обеих SEQ ID NO: 415-416; (40) обеих SEQ ID NO: 425-426; (41) обеих SEQ ID NO: 435-436; (42) обеих SEQ ID NO: 445-446; (43) обеих SEQ ID NO: 455-456; (44) обеих SEQ ID NO: 465-466; (45) обеих SEQ ID NO: 475-476; (46) обеих SEQ ID NO: 485-486; или (47) обеих SEQ ID NO: 495-496. Каждая из приведенных выше 47 совокупностей аминокислотных последовательностей в данном абзаце устанавливает цепь α и цепь β каждого из 47 разных TCR, обладающих антигенной специфичностью, в отношении мутантного человеческого p53. Данные две аминокислотные последовательности в каждой совокупности соответствуют цепи α и цепи β TCR, соответственно.

В объем изобретения включены функциональные варианты TCR по изобретению, описанные в данном документе. Термин «функциональный вариант», в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к TCR, полипептиду или белку, обладающему существенной или значимой идентичностью или сходством последовательностей с исходным TCR, полипептидом или белком, чей функциональный вариант сохраняет биологическую активность TCR, полипептида или белка, чьим является вариант. Функциональные варианты охватывают, например, функциональные варианты TCR, полипептида или белка, описанных в данном документе (исходный TCR, полипептид или белок), которые сохраняют способность специфично связываться в мутантным p53, в отношении

которого исходный TCR обладает антигенной специфичностью или с которым исходный полипептид или белок специфично связывается, в похужей степени, в такой же степени или в большей степени, чем исходный TCR, полипептид или белок. В отношении исходного TCR, полипептида или белка функциональный вариант может, например, быть по меньшей мере на примерно 30%, по меньшей мере на примерно 50%, по меньшей мере на примерно 75%, по меньшей мере на примерно 80%, по меньшей мере на примерно 90%, по меньшей мере на примерно 95%, по меньшей мере на примерно 96%, по меньшей мере на примерно 97%, по меньшей мере на примерно 98%, по меньшей мере на примерно 99% или более идентичным по аминокислотной последовательности исходному TCR, полипептиду или белку, соответственно.

Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность исходного TCR, полипептида или белка с по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой. Консервативные аминокислотные замены хорошо известны в данной области и включают аминокислотные замены, в которых одна аминокислота, имеющая определенные физические и/или химические свойства, заменяется на другую аминокислоту, которая имеет такие же химические или физические свойства. Например, консервативная аминокислотная замена может представлять собой кислотную аминокислоту, замещенную другой кислотной аминокислотой (например, Asp или Glu), аминокислоту с неполярной боковой цепью, замещенную другой аминокислотой с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val и т.д.), основную аминокислоту, замещенную другой основной аминокислотой (Lys, Arg и т.д.), аминокислоту с полярной боковой цепью, замещенную другой аминокислотой с полярной боковой цепью (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr и т.д.), и т.д.

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

TCR, полипептид или белок может по существу состоять из определенной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в

данном документе, таким образом, что другие компоненты TCR, полипептида или белка, например, другие аминокислоты, существенно не меняют биологической активности TCR, полипептида или белка.

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

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

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

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

последовательности: (1) всех из SEQ ID NO: 27-32; (2) всех из SEQ ID NO: 37-42; (3) всех из SEQ ID NO: 47-52; (4) всех из SEQ ID NO: 57-62; (5) всех из SEQ ID NO: 67-72; (6) всех из SEQ ID NO: 77-82; (7) всех из SEQ ID NO: 87-92; (8) всех из SEQ ID NO: 97-102; (9) всех из SEQ ID NO: 107-112; (10) всех из SEQ ID NO: 117-122; (11) всех из SEQ ID NO: 127-132; (12) всех из SEQ ID NO: 137-142; (13) всех из SEQ ID NO: 147-152; (14) всех из SEQ ID NO: 157-162; (15) всех из SEQ ID NO: 167-172; (16) всех из SEQ ID NO: 177-182; (17) всех из SEQ ID NO: 187-192; (18) всех из SEQ ID NO: 197-202; (19) всех из SEQ ID NO: 207-212; (20) всех из SEQ ID NO: 217-222; (21) всех из SEQ ID NO: 227-232; (22) всех из SEQ ID NO: 237-242; (23) всех из SEQ ID NO: 247-252; (24) всех из SEQ ID NO: 257-262; (25) всех из SEQ ID NO: 267-272; (26) всех из SEQ ID NO: 277-282; (27) всех из SEQ ID NO: 287-292; (28) всех из SEQ ID NO: 297-302; (29) всех из SEQ ID NO: 307-312; (30) всех из SEQ ID NO: 317-322; (31) всех из SEQ ID NO: 327-332; (32) всех из SEQ ID NO: 337-342; (33) всех из SEQ ID NO: 347-352; (34) всех из SEQ ID NO: 357-362; (35) всех из SEQ ID NO: 367-372; (36) всех из SEQ ID NO: 377-382; (37) всех из SEQ ID NO: 387-392; (38) всех из SEQ ID NO: 397-402; (39) всех из SEQ ID NO: 407-412; (40) всех из SEQ ID NO: 417-422; (41) всех из SEQ ID NO: 427-432; (42) всех из SEQ ID NO: 437-442; (43) всех из SEQ ID NO: 447-452; (44) всех из SEQ ID NO: 457-462; (45) всех из SEQ ID NO: 467-472; (46) всех из SEQ ID NO: 477-482; или (47) всех из SEQ ID NO: 487-492.

В одном воплощении изобретения полипептид по изобретению может содержать, например, вариабельную область TCR по изобретению, содержащую комбинацию CDR областей, установленную выше. В этом отношении полипептид может содержать следующие аминокислотные последовательности: (1) обе из SEQ ID NO: 33-34; (2) обе из SEQ ID NO: 43-44; (3) обе из SEQ ID NO: 53-54; (4) обе из SEQ ID NO: 63-64; (5) обе из SEQ ID NO: 73-74; (6) обе из SEQ ID NO: 83-84; (7) обе из SEQ ID NO: 93-94; (8) обе из SEQ ID NO: 103-104; (9) обе из SEQ ID NO: 113-114; (10) обе из SEQ ID NO: 123-124; (11) обе из SEQ ID NO: 133-134; (12) обе из SEQ ID NO: 143-144; (13) обе из SEQ ID NO: 153-154; (14) обе из SEQ ID NO: 163-164; (15) обе из SEQ ID NO: 173-174; (16) обе из SEQ ID NO: 183-184; (17) обе из SEQ ID NO: 193-194; (18) обе из SEQ ID NO: 203-204; (19) обе из SEQ ID NO: 213-214; (20) обе из SEQ ID NO: 223-224; (21) обе из SEQ ID NO: 233-234; (22) обе из SEQ ID NO: 243-244; (23) обе из SEQ ID NO: 253-254; (24) обе из SEQ ID NO: 263-264; (25) обе из SEQ ID NO: 273-274; (26) обе из SEQ ID NO: 283-284; (27) обе из SEQ ID NO: 293-294; (28) обе из SEQ ID NO: 303-304; (29) обе из SEQ ID NO: 313-314; (30) обе из SEQ ID NO: 323-324; (31) обе из SEQ ID NO: 333-334; (32) обе из SEQ ID NO: 343-344; (33) обе из SEQ ID NO: 353-354; (34) обе из SEQ ID NO: 363-364; (35) обе из

SEQ ID NO: 373-374; (36) обе из SEQ ID NO: 383-384; (37) обе из EQ ID NO: 393-394; (38) обе из SEQ ID NO: 403-404; (39) обе из SEQ ID NO: 413-414; (40) обе из SEQ ID NO: 423-424; (41) обе из SEQ ID NO: 433-434; (42) обе из EQ ID NO: 443-444; (43) обе из SEQ ID NO: 453-454; (44) обе из SEQ ID NO: 463-464; (45) обе из SEQ ID NO: 473-474; (46) обе из SEQ ID NO: 483-484; или (47) обе из SEQ ID NO: 493-494.

В одном воплощении изобретения полипептид по изобретению может дополнительно содержать константную область TCR по изобретению, установленную выше. В этом отношении полипептид может содержать аминокислотную последовательность (i) одной из SEQ ID NO 23-25 или (ii) SEQ ID NO: 25 и одной из SEQ ID NO: 23-24.

В одном воплощении изобретения полипептид по изобретению может содержать цепь α и цепь β TCR по изобретению. В этом отношении полипептид может содержать аминокислотные последовательности: (1) обеих SEQ ID NO: 35-36; (2) обеих SEQ ID NO: 45-46; (3) обеих SEQ ID NO: 55-56; (4) обеих SEQ ID NO: 65-66; (5) обеих SEQ ID NO: 75-76; (6) обеих SEQ ID NO: 85-86; (7) обеих SEQ ID NO: 95-96; (8) обеих SEQ ID NO: 105-106; (9) обеих SEQ ID NO: 115-116; (10) обеих SEQ ID NO: 125-126; (11) обеих SEQ ID NO: 135-136; (12) обеих SEQ ID NO: 145-146; (13) обеих SEQ ID NO: 155-156; (14) обеих SEQ ID NO: 165-166; (15) обеих SEQ ID NO: 175-176; (16) обеих SEQ ID NO: 185-186; (17) обеих SEQ ID NO: 195-196; (18) обеих SEQ ID NO: 205-206; (19) обеих SEQ ID NO: 215-216; (20) обеих SEQ ID NO: 225-226; (21) обеих SEQ ID NO: 235-236; (22) обеих SEQ ID NO: 245-246; (23) обеих SEQ ID NO: 255-256; (24) обеих SEQ ID NO: 265-266; (25) обеих SEQ ID NO: 275-276; (26) обеих SEQ ID NO: 285-286; (27) обеих SEQ ID NO: 295-296; (28) обеих SEQ ID NO: 305-306; (29) обеих SEQ ID NO: 315-316; (30) обеих SEQ ID NO: 325-326; (31) обеих SEQ ID NO: 335-336; (32) обеих SEQ ID NO: 345-346; (33) обеих SEQ ID NO: 355-356; (34) обеих SEQ ID NO: 365-366; (35) обеих SEQ ID NO: 375-376; (36) обеих SEQ ID NO: 385-386; (37) обеих SEQ ID NO: 395-396; (38) обеих SEQ ID NO: 405-406; (39) обеих SEQ ID NO: 415-416; (40) обеих SEQ ID NO: 425-426; (41) обеих SEQ ID NO: 435-436; (42) обеих SEQ ID NO: 445-446; (43) обеих SEQ ID NO: 455-456; (44) обеих SEQ ID NO: 465-466; (45) обеих SEQ ID NO: 475-476; (46) обеих SEQ ID NO: 485-486; или (47) обеих SEQ ID NO: 495-496.

Согласно изобретению дополнительно предложен белок, содержащий по меньшей мере один из полипептидов, описанных в данном документе. Под термином «белок» подразумевается молекула, содержащая одну или более полипептидных цепей. В одном воплощении белок по изобретению может содержать: (1) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные

В одном воплощении изобретения белок содержит: (1) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; (2) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторую полипептидную цепь,

[illegible]

[illegible]

последовательность SEQ ID NO: 435, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 436; (42) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 445, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 446; (43) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 455, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 456; (44) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 465, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 466; (45) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 475, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 476; (46) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 485, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 486; или (47) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 495, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 496.

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

Слитый белок может содержать одну или более копий полипептида по изобретению и/или одну или более копий другого полипептида. Например, слитый белок может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или более копий полипептида по изобретению

и/или другого полипептида. Подходящие способы получения слитых белков известны в данной области и включают, например, способы генной инженерии.

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

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

TCR, полипептиды и белки по изобретению могут быть любой длины, то есть могут содержать любое число аминокислот, при условии, что TCR, полипептиды или белки сохраняют свою биологическую активность, например, способность специфично связываться с мутантным р53; выявлять рак у млекопитающего; или лечить или предупреждать рак у млекопитающего и т.д. Например, полипептид может находиться в интервале от примерно 50 до примерно 5000 аминокислот в длину, как например, 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более аминокислот в длину. В связи с этим, полипептиды по изобретению также включают олигопептиды.

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

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

TCR, полипептид и/или белок по изобретению может быть получен способами, известными в данной области, такими как, например, синтез *de novo*. Кроме того, полипептиды и белки могут быть рекомбинантно получены с использованием нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, с использованием стандартных способов генной инженерии. См., например, Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012). В качестве альтернативы, TCR, полипептиды и/или белки, описанные в данном документе, могут быть коммерчески

синтезированы компаниями, такими как Synper (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) и Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). В связи с этим, TCR, полипептиды и белки по изобретению могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

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

Предпочтительно, нуклеиновые кислоты по изобретению являются рекомбинантными. В том виде, в котором он используется в данном документе, термин «рекомбинантный» относится к (i) молекулам, которые сконструированы вне живых клеток посредством соединения природных или синтетических сегментов нуклеиновой кислоты с молекулами нуклеиновой кислоты, которые могут реплицироваться в живой клетке, или (ii) молекулам, которые получены в результате репликации молекул, описанных выше в (i). В целях данного документа, репликация может представлять репликацию *in vitro* или репликацию *in vivo*.

Нуклеиновые кислоты могут быть сконструированы на основе химического синтеза и/или реакций ферментативного лигирования с использованием способов, известных в данной области. См., например, Green and Sambrook et al., выше. Например, нуклеиновая кислота может быть химически синтезирована с использованием встречающихся в природе нуклеотидов или различным образом модифицированных нуклеотидов, сконструированных для повышения биологической стабильности молекул или для повышения физической стабильности дуплекса, образующегося при гибридизации (например, производные фосфотиоатов

и акридин-замещенные нуклеотиды). Примеры модифицированных нуклеотидов, которые могут быть использованы для получения нуклеиновых кислот, включают 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил) урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N⁶-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метиинозин, 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, метилов эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил) урацил и 2,6-диаминопурин, но не ограничиваются ими. В качестве альтернативы одну или более нуклеиновых кислот по изобретению можно приобрести у компаний, таких как Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) и Synthegen (Houston, TX).

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

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

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

Согласно изобретению также предложена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 70% или более, например, примерно 80%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99% идентична любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. В связи с этим, нуклеиновая кислота может по существу состоять из любых нуклеотидных последовательностей, описанных в данном документе.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть включены в рекомбинантный экспрессионный вектор. В этом отношении, согласно изобретению предложен рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот по изобретению. В одном воплощении изобретения

рекомбинантный экспрессионный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую цепь α , цепь β и линкер пептида.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Согласно другому воплощению изобретения дополнительно предложена клетка-хозяин, содержащая любой из рекомбинантных экспрессионных векторов, описанных в данном документе. В том виде, в котором он используется в данном документе, термин «клетка-хозяин» относится к любому типу клетки, которая может содержать рекомбинантный экспрессионный вектор по изобретению. Клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, например, растения, животного, грибов или водорослей, или может представлять собой прокариотическую клетку, например, бактерий или простейших. Клетка-хозяин может представлять собой культивируемую клетку или первичную клетку, то есть выделенную непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может представлять собой адгезивную клетку или суспензионную клетку, то есть клетку, которая растет в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в данной области и включают, например, клетки *E. coli* DH5 α , клетки яичника китайского хомяка, клетки VERO мартышки, клетки COS, клетки HEK293 и тому подобное. В целях амплификации или репликации рекомбинантного экспрессионного вектора, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой прокариотическую клетку, например, клетку DH5 α . В целях получения рекомбинантного TCR, полипептида или белка, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой клетку млекопитающего. Наиболее предпочтительно, клетка-хозяин представляет собой клетку человека. В

то время, как клетка-хозяин может быть клеткой любого типа клетки, может происходить из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой лимфоцит периферической крови (PBL – от англ. peripheral blood lymphocyte) или мононуклеарную клетку периферической крови (PBMC). Более предпочтительно, клетка-хозяин представляет собой Т-клетку.

В целях данного документа Т-клетка может представлять собой любую Т-клетку, такую как культивируемая Т-клетка, например, первичная Т-клетка или Т-клетка из культивируемой линии Т-клеток, например, Jurkat, SupT1 и т.д., или Т-клетка, полученная от млекопитающего. В случае получения от млекопитающего Т-клетка может быть получена из многих источников, включая, не, не ограничиваясь кровью, костным мозгом, лимфатическим узлом, тимусом или другими тканями или жидкостями. Т-клетки могут быть также обогащены или очищены. Предпочтительно, Т-клетка представляет собой Т-клетку человека. Т-клетка может быть любого типа Т-клетки и может находиться на любой стадии развития, включая $CD4^+/CD8^+$ дважды позитивные Т-клетки, $CD4^+$ Т-хелперы, например, клетки Th_1 и Th_2 , $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), Т-клетки памяти (например, центральные Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки памяти), интактные Т-клетки и т.п., но, не ограничиваясь ими.

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

экспрессионный вектор. В одном воплощении изобретения популяция клеток представляет собой клональную популяцию, содержащую клетки-хозяева, содержащие рекомбинантный экспрессионный вектор, как описано в данном документе.

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

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

TCR, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева (включая их популяции), все из которых далее в данном документе в совокупности называются «TCR материалами по изобретению», могут быть приготовлены в композиции, такой как фармацевтическая композиция. В связи с этим, согласно изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая любой из TCR, полипептидов, белков, нуклеиновых кислот, экспрессионных векторов, и клеток-хозяев (включая их популяции), описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции по изобретению, содержащие любой из TCR материалов по изобретению, могут содержать более одного TCR материала по изобретению, например, полипептид и нуклеиновую кислоту, или два или более разных TCR. В качестве альтернативы, фармацевтическая композиция может

содержать TCR материал по изобретению в комбинации с другим(и) фармацевтически активным(и) агентом(ами) или лекарственным(и) средством(ами), таким(и) как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубин, доксорубин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д.

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

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

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

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

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

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

Одному из обычных специалистов в данной области должно быть сразу понятно, что TCR материалы по изобретению могут быть модифицированы

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

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

Согласно одному воплощению изобретения предложена любая из фармацевтических композиций, TCR, полипептидов или белков, описанных в данном документе, любая нуклеиновая кислота или рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность,

кодирующую любой из TCR, полипептидов, белков, описанных в данном документе, или любая клетка-хозяин или популяция клеток, содержащих рекомбинантный вектор, который кодирует любой из TCR, полипептидов или белков, описанных в данном документе, для применения в лечении или предупреждении рака у млекопитающего.

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

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

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

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

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

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

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

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

следующих мутаций человеческого p53: R175H, Y220C, G245D, G245S, R248L, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273C, R273L и R282W. Предпочтительно, рак представляет собой эпителиальный рак или холангиокарциному, меланому, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак яичника, рак эндометрия, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиобластому, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря.

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

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

Примеры

Аминокислотные последовательности, изложенные в Таблицах 1-3, использовали в экспериментах, описанных в следующих Примерах. В Таблицах 1-2, «LP» означает «длинный пептид». В Таблице 3 «TMG» означает «тандемный миниген»

Таблица 1

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
2	LP-p53-R175H-MUT	YKQSQHMTEVVR <u>H</u> CPHHHERCSDSDG
3	LP-p53-R273H-MUT	SGNLLGRNSFEV <u>H</u> VCACPGRDRRTE
4	LP-p53-R248L-MUT	YMCNSSCMGGMN <u>L</u> RPILTIITLEDSS
5	LP-p53-R282W-MUT	FEVRYVCACPGRD <u>W</u> RTEEEENLRKKGE
6	LP-p53-R273C-MUT	SGNLLGRNSFEV <u>C</u> VCACPGRDRRTE
7	LP-p53-G245S-MUT	HYNYMCNSSCMG <u>S</u> MNRRPILTIITL
8	LP-p53-R248Q-MUT	YMCNSSCMGGMN <u>Q</u> RPILTIITLEDSS
9	LP-p53-G245D-MUT	HYNYMCNSSCMG <u>D</u> MNRRPILTIITL
10	LP-p53-R273L-MUT	SGNLLGRNSFEV <u>L</u> VCACPGRDRRTF
11	LP-p53-R248W-MUT	YMCNSSCMGGMN <u>W</u> RPILTIITLEDSS
12	LP-p53-Y220C-MUT	DRNTFRHSVVVP <u>C</u> EPPEVGSQCTTI
13	LP-p53-R249S-MUT	MCNSSCMGGMN <u>R</u> SILTIITLEDSS

Версии WT пептидов Таблицы 1 изложены в Таблице 2.

Таблица 2

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
15	LP-p53-R175-WT	YKQSQHMTEVVR <u>R</u> CPHHHERCSDSDG
16	LP-p53-R273-WT	SGNLLGRNSFEV <u>R</u> VCACPGRDRRTE
17	LP-p53-R248-WT	YMCNSSCMGGMN <u>R</u> RPILTIITLEDSS
18	LP-p53-R282-WT	FEVRYVCACPGRD <u>R</u> RTEEEENLRKKGE
19	LP-p53-G245-WT	HYNYMCNSSCMG <u>G</u> MNRRPILTIITI
20	LP-p53-Y220-WT	DRNTFRHSVVVP <u>P</u> EPPEVGSQCTTI
21	LP-p53-R249-WT	MCNSSCMGGMN <u>R</u> RPILTIITLEDSS

Таблица 3

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
14	TMG-p53-MUT	YKQSQHMT EVVRHCP HHERCSDSDGSGNLLGRNSFEV HVCACP GRDRRTEYMCNSSCMGGMN LRPIL ITITLED SFEV RVCA CPGRD W RTEENLRKKGESGNLLGRNSFEV VCACPGRDRRT CIINYMCN SSCMG S MNRRPILITITLYMCNSSCMGGMN Q RPILITITLED SHYNY MCNSSCMGDMNRRPILITITLSGNLLGRNSFEV VCACPGRDRR I EYMCNSSCMGGMN WRPIL ITITLEDSDRNTFRHSV VVPC EPPEVG SDCTTIMCNSSCMGGMN RPIL ITITLEDSS
22	TMG-p53-WT	YKQSQHMT EVVRCP HHERCSDSDGSGNLLGRNSFEV RVCAACP GRDRRTEYMCNSSCMGGMN RRPIL ITITLED SFEV RVCA CPGRDR RTEENLRKKGESGNLLGRNSFEV RVCAACPGRDRRT EHYNYMCN SSCMG G MNRRPILITITLYMCNSSCMGGMN R RPILITITLED SHYNY MCNSSCMG G MNRRPILITITLSGNLLGRNSFEV RVCAACPGRDR RT EYMCNSSCMGGMN RRPIL ITITLEDSDRNTFRHSV VVPEP PEVG SDCTTIMCNSSCMGGMN RRPIL ITITLEDSS

Пример 1

Данный пример демонстрирует выделение и специфичную реактивность 4-х TCR против мутантного p53 от пациента 4127.

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

Аутологичные PBL трансдуцировали одним из TCR, показанных на Фиг. 1, и тестировали, спустя 2 недели. Аутологичные клетки DC высевали в количестве 3×10^4 клеток/лунка и в течение ночи под действием импульсов в них вводили или пептид WT p53-G245 (wt) или мутантный пептид p53-G245S (mut) при уменьшении концентраций пептидов. 3×10^4 трансдуцированных Т-клеток добавляли в лунку и совместно культивировали в течение ночи при 37°C. Супернатанты собирали для ELISA IFN- γ . Результаты ELISA по IFN- γ показаны на Фиг. 1. Экспрессию 4-1BB измеряли посредством гейтирования FACS (от англ. fluorescent-activated cell sorting - сортировка клеток с активированной флуоресценцией): лимфоциты\PI (от англ. propidium iodide - йодид пропидия) (негатив.)CD3⁺CD3⁺mTCR⁺CD8(негатив.)CD4⁺. Результаты FACS показаны на Фиг. 2.

Аутологичные PBL трансдуцировали одним из TCR, показанных на Фиг. 3, и совместно культивировали, как описано для эксперимента Фиг. 2, за исключением того, что в DC под действием импульсов вводили ДМСО (носитель пептида) или один из 15-мерных пептидов p53-G245S с перекрытием 14 аминокислот,

показанных в Таблице А. Экспрессию 4-1BB осуществляли, как описано в случае Фиг. 2. Результаты показаны на Фиг. 3.

Таблица А

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

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

Таблица В

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

DRB3*02 экспрессируется 1367 из 3719 (37%) DRB_типированных пациентов в базе данных HLA NCI и 5 из 9 (56%) пациентов с раком эндометрия и яичника в

NCI-SB (Хирургическое отделение национального института онкологии). Сообщаемая частота аллели DRB3*02 является очень высокой в соответствии с веб-сайтом allelefrequencies.net. Например, на данном веб-сайте сообщается о том, что частота аллели DRB3*02 составляет 0,3447 популяции средневосточного или северного побережья Африки NMDP (от англ. National Marrow Donor Program - Национальная программа донорства костного мозга) США.

TIL от пациента 4127 совместно культивировали с аллогенными (DRB3*01:01:01 или DRB3*02:02:01) антигенпрезентирующими клетками (APC – от англ. antigen presenting cell), которые (1) подвергали электропорации тандемными минигенами (TMG), состоящими из нерелевантной, WT p53 или мутантной p53 последовательности, или которым (2) под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO) или очищенные (выше 95% посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-G245 или мутантной последовательности p53-G245S. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на Фиг. 6.

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

В аутологичные APC под действием импульсов вводили уменьшающиеся концентрации пептидов из 25 аминокислот, соответствующих WT p53-G245 или мутантной p53-G245S последовательности. Т-клетки, трансдуцированные 4127-О37-TCR от пациента 4127, совместно культивировали в течение ночи при 37°C с APC, которым под действием импульсов вводили пептид. Экспрессию 4-1BB анализировали посредством проточной цитометрии после следующего гейтирования: лимфоциты → одиночные клетки → живые клетки → CD3+mTCR+. Результаты показаны на Фиг. 36.

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

посредством проточной цитометрии после гейтирования: лимфоциты → одиночные клетки → живые клетки → CD3+mTCR+. Результаты показаны на Фиг. 37A-37C.

Последовательность TCR 4127-TP53-G245S-TCR1, которую выделяли у Пациента 4127, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 30), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 31), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 32), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 27), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 28) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 29). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23). Варибельная область бета цепи (SEQ ID NO: 34) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 33) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 36) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 35) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4127-TP53-G245S-TCR1

Распознавание мутации p53: G245S

Способ: способ Tran

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке (ниже), адаптивный Pairseq (фрагмент 4127-F10), 5'RACE из клона TIL O71

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

Ориентация TCR: бета-альфа

Экспрессионный вектор: гамма-ретровирус

MATRIICWAALCLIGAE^{TEAGVAQSPRYKH}EK^{QSVAFWCNPI}SG^{HATLYWYQQ}
 ILGQGP^{KLILQFQNNQ}V^{VDDSQLPKDR}ESAERLKG^{VDSLKTQPAK}LED^{SAVYLCASS}
 LVNTEA^{FEQGQGR}LT^{VVEDLRNV}TP^{PKVSLF}EP^{SKAELANKQ}KAT^{LVCLARG}FE^{PDHVEL}
 SFWVNG^{KEVTISG}FC^{TDPQAY}KES^{NYSYCLSS}RL^{RVSATFW}IN^{PRNIFRC}QV^{QFHGLSEE}
 DKWPE^{GSPKPV}TQ^{NISAEAW}GR^{ADCCITS}ASY^{QQGVLSATH}LYE^{ILLGKATLY}AV^{LVSTLVF}
 MAMV^{KRKNSRAK}RS^{GSGATN}FS^{LLKQAGD}VEEN^{PGPM}ILL^{IPVLGM}IFAL^{RDAR}
 AQSV^{SQHNHII}VH^{SEAASLE}LC^{GNYSYGG}TV^{NLFWYVQ}YP^{GQHLQLL}KY^{ESGDPL}
 YKGI^{KGFLEAE}FI^{KSKFSF}NLR^{KPSVQWS}DT^{AEYFCAV}KGDY^{KLSFG}AG^{ITVTVRAM}
 QNPE^{AVYQLK}DR^{PSQDST}LC^{LFTDFDNQ}IN^{VPKTME}SG^{TFHDKC}VLD^{MKAM}DS^{SKSNGA}
 IAF^{SNQTS}FC^{QDI}KE^{TNATYP}SS^{DPVPCD}AT^{LTEKSF}ET^{DMNLNF}QNL^{LVIVLRH}LL^{KVA}
 GF^{NLLMTLR}LW^{SS} (SEQ ID NO: 543)

Статистические данные по TCR 4127-TP53-G245S-TCR1 для Пациента 4127 изложены ниже в Таблице 4.

Таблица 4

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

Последовательность TCR 4127-TP53-G245S-TCR4, которую выделяли из Пациента 4127, установлена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 40), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 41), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 42), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 37), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 38) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 39). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23). Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 44) включает последовательность, начинающуюся с N-конца

и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 43) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся сразу перед началом константной области альфа цепи. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 46) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 45) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4127-TP53-G245S-TCR4

Распознавание мутации p53: G245S

Способ: способ Tran

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

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

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

Ориентация TCR: бета-альфа

Экспрессионный вектор: гамма-ретровирус

MAPGLLHWMALCULGTGHGDAMVIQNPYQVTFQGKPVTLSCSQTLSNHNMYWY
QQKSSQAPKLLFHYDDKDFNNEADTPDNFQSRNPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYLCAL
TSRELRGNEQFFGPGTRLTVLEDLRNFTPPKVSLEFESKAEIANKQKATLVCLARGFFPD
HVELSFWWNGKRYTISGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWINPRNHRCQVQFHG
LSEEDRWPEGSPKPYTQNISAEAWGRADCGTSSASYQQGVLSATHYELGKATLYAFLVST

LVVMAMVKKNSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMILASLLRAVIASICVV
SSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDGVYETRDITYYLEFWYKQPPSGELVFLIRNSF
DEONEISGRYSWNFQKSTSSFNFTTASQVVDSAVYFCALSEGGSNYKI_TFOKGTLLT
VNPNIQNPEPARYQLKDPRSQDSTLCLETFDSDQINFPKTMESGTFTHDKCVLDMKAMDS
KSNGLAWSNQTSFTCODIFKETNATYPSSDFTCDATLTEKSFETDMNINPQNLLYTVLRH
LLKVAGFNLMTHRLWSS (SEQ ID NO: 544)

Статистические данные по TCR 4127-TP53-G245S-TCR4 для Пациента 4127 изложены ниже в Таблице 5.

Таблица 5

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

Последовательность TCR 4127_O102_TCR, которую выделяли у Пациента 4127, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 50), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 51), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 52), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 47), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 48) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 49). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23). Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 54) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 53) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 56) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 55) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4127_O102_TCR

Распознавание мутации p53: G245S

Способ: Способ Tran

Совместная культивация для идентификации TCR: не проводили. TCR прямо идентифицировали из РНК клона Т-клетки (О102), используя 5'RACE. Клон разрабатывали посредством сортировки ОХ40+ Т-клеток и получения клонов Т-клеток посредством предельного разведения. Осуществляли скрининг клонов Т-клеток с использованием способа Tran.

Способ идентификации TCR: 5'RACE из клона TIL O102

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

Ориентация TCR: бета-альфа

Экспрессионный вектор: гамма-ретровирус

MAMSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTTGQSM¹LQCAQDMNII²LYMS
WYRQDPGMGLRLIHYSVGAGIT³DQGEV⁴PNQYNVSRST⁵TEDFPLRLISAAPSQTSVYF
CASSYRESHYGYTEGSGTRITVVEDLRNVTPPKVSLFFPSKAEIANKQKATLVCLARGFF
PDIIVEISWVWNGKEFISGVCTDTPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWINFRNIHRCQVQF
HGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGFTSASYQQGVLSATHLYEHLGKATLYAVL
PSILVFMAMVKKRNSRAKRSCSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMWGVFLIYVSMK
MGGTTGQNIDQPIEMTATEGAIVQINCTYQTS⁶GENGLFWYQQHAGEAPTFLSYNVL
DGLEEKGRFSSFLSRSKGYSYLLKELQMKDSASYLC⁷AVKWTGGFKTIEGAGTRLFV
KANIQNPEPAVYQLKDI⁸PSQDSTLCLETFDSDQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSK
SNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATT⁹TEKSFETTMNI¹⁰NFQNI¹¹VIVLRILL
LKVAGFNLLMTIRLWSS (SEQ ID NO: 545)

Последовательность TCR 4127-O37-TCR, которую выделяли у Пациента 4127, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 460), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 461), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 462), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 457), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 458) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 459).

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

начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 465) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4127-O37-TCR

Распознавание мутации p53: G245S

Способ: Tran способ

Совместная культивация для идентификации TCR: не проводили. TCR прямо идентифицировали из геномной ДНК клона Т-клетки (О37) с использованием адаптивных TCRAD и TCRB исследований (платформа секвенирования нового поколения (NGS – от англ. next-generation sequencing)). Клон О37 разрабатывали посредством сортировки ОХ40+ Т-клеток и получения клонов Т-клетки посредством предельного разведения. Осуществляли скрининг клонов Т-клетки, используя способ Tran.

Способ идентификации TCR: адаптивное секвенирование TCR (NGS) клона TIL O37

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

Ориентация TCR: бета-альфа

Экспрессионный вектор: гамма-ретровирус

MAII.LLLLPGGISLII.PGSLAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATIM
FWYRQFPKQSLIMIMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSLTVTSAHPEDSS
FYICSAAGQANTEAFEGQGTRIITVVEDLRNFTPPKYSLEPISKAEIANKQKATLVCLARG
FFPDHVELSWYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFWINPRNIHRCQV
QFIRHSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATHYEILLGKATLYA
VLVSTLVVMAMVKRKNSRAKRSQSGCATNFSLKQAGDVEENPGPMHSLRVLEVLW
LQLSWVWSQKQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIM
FIYSNGDKEDGRFTAQILNKASQYVSLIIRDSQPSDSATYILCAVNDAGNMLTFGGGTR
LMVKPNIQNPEPAVYQKDPKRSQDSTLCLETFDQSQINVPKIMESGTFITDKCVLDMKA
MDSKSNAGAWSNQTSFTCQDHFKETNATYPSSIVPCDAILTEKSFETDMNLNFQNLIVV
LRHLLKVGAFNLLMTLRWSS (SEQ ID NO: 546)

Пример 2

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

Эксперименты проводили, как описано для Фиг. 8-11 для Пациента 4196. p53-Реактивные Т-клетки для данного пациента идентифицировали способом Tran, как

описано в патентной заявке США № 2017/0224800. Способ Fluidigm использовали для выделения отдельных TCR. Статистические данные для Пациента 4196 показаны в Таблице D.

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

Таблица C

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

TMG1 в сравнении с TIL 4196-Rx1: Клетки Cos7 трансфицировали плазмидами для TMG1 и HLA аллели. Клетки совместно культивировали с инфузионным пакетом TIL 4196 Rx1 в течение 20 часов (ч). Результаты показаны на Фиг. 8A.

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

A*02:01-рестриктированный TP53 тетрамер можно использовать для выделения TP53-реактивных клеток из инфузионного пакета TIL: Выделение TP53-реактивных клеток с использованием 4-1BB+ сортировки после совместного культивирования с пептидом TP53 было технически ограничено. Для выделения TP53-реактивных клеток получали тетрамер A*02:01-TP53. Нерелевантный тетрамер (A*02:01-grp100) получали в качестве контроля. Анализ FACS проводили с гейтированием на живых клетках, CD3+, CD8+ клетках. В случае тетрамера A*02:01-TP53 выявляли 14,9% p53 тетрамер+ клеток. В случае тетрамера A*02:01- grp100 выявляли 0,7% p53 тетрамер+ клеток.

Выделение и характеристика TP53-реактивных клеток: стратегия выделения и характеристики TP53-реактивных клеток выглядела следующим образом: (1) отсортировать тетрамер-позитивные клетки с использованием FACS, как описано выше. (2) Провести ПЦР на одной клетке. (3) Провести глубокое секвенирование Vβ.

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

Таблица D

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

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

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

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

Следующие линии исходных опухолевых клеток трансдуцировали HLA-A*02:01: Линия клеток толстой кишки - LS123 (ATCC CCL-255) с R175H, но

неизвестен статус HLA-A2. Линия клеток лейкоза: CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119, лейкоз) с R175H, но неизвестен статус HLA-A2. Линия клеток молочной железы: AU-565 (ATCC CRL-2351, аденокарцинома молочной железы) с R175H, но неизвестен статус HLA-A2. Линия клеток меланомы: MEL624; эндогенная экспрессия HLA-A2 и wt R175.

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

Последовательность TCR 4196_AV12-1_with_BV6-1, которую выделяли у Пациента 4196, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 70), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 71), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 72), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 67), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 68) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 69). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 24). Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 74) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 73) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 76) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 75) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4196_AV12-1_with_BV6-1

Распознавание мутации p53: R175H

Способ: Tran способ

MAIGLLCCVAFSLI.WASPVNAGVTQTTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNIHNSMYWY
 RQDIPGMGLRLIYYSASEGTIDKGEVPNGYVNSRLNKREFSLRLESAAPSQTSVYFCA
SSEWQVGDEQYFGPGTRLTIVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLPCLARGF
 PPDIIVELSWWVNGKEVHSGVCTDIPQAYKESVYSYCLSSRLRVSATFWINPRNIIPRCQVQ
 PHGLSEEDKWPEGSPKPTTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATHLYELLGKATLYAV
 LVSTLVFMAMVKRKNSRAKRSGSGATNFSILLKQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWL
 QISWVWSQRKEVEQIDPGFENVPEGATVAFNCTYSNSASQSEFFWYRQDCRKEPKLL
 MSVYSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVQPGGYQKVITGTGT
 KIQVIPDIQNPEPAVYQIKIDPRSQINYLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKVLDMKA
 MDSKSNCAIAWSNQTSTTCQIDIFKETNATYPSSNVPCTDITTEKSFETDMNINFEQNLITV
 LRHLIKVAGFNLLMTLRLLWSS (SEQ ID NO: 547)

Последовательность TCR 4196_AV38-1_with_BV10-3, которую выделяли у Пациента 4196, установлена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнута область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 80), вторая подчеркнута область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 81), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 82), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 77), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 78) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 79). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 24). Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 84) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 83) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 86) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 85) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4196_AV38-1_with_BV10-3

Распознавание мутации p53: R175H

Способ: Способ Tran

MATRLFFYVAICLLWTGHMDAGITQSPRIHKVTETGTPVTLRCHQTENHRYMYWYR
QDPGHGLRLIHYSYGVKDTDKGLVSDGYSVSRSKTJEDFLITLESATSSQTSVYFCAJS
ELVTGDSPLIEFGNGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFFPSKAFIANKQKAILVCLARGFFPDH
FELSWFFNGKEVHISGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRIKFSATFWIINPRNIFRCQVQFHGL
SEEDKWFPGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGFLSATILYFILLGKATLYAVLVSTL
VFMAMFKRKNRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMTRVSLWAVVVSTCLE
SGMAQTVTQSOPEMSVQEAETVTLSCITYDISENNYYLFWYKQPPSRQMLVIRQEA
YKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFCAEMGYSGAGSYQLTFGK
GTKLSVIPDIQNTEPAVYQLKIDPRSDSHCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMK
AMISKSNGLAWSNQTSFTCDIFKETNATYPSSDUPCDATUTEKSFETDMNINFNQLLVI
VLRILLKLVAGFNILMTLRLLWSS (SEQ ID NO: 548)

Последовательность TCR 4196_AV6_with_BV11-2, которую выделяли у Пациента 4196, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 90), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 91), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 92), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 87), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 88) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 89). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 24). Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 94) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу после начала константной области цепи бета. Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 93) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 96) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 95) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4196_AV6_with_BV11-2

Распознавание мутации p53: R175H

Способ: Способ Tran

MATRLLCWAALCLIGAEUTEAGVAQSPRYKHEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQ
ILGQGPILLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERIKGV DSTLKIQPAKLEDSAVYLCASS
LDPGDIGELFFCGEGSRITVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAFHANKQKATLYCLARGTFPDH
VELSWVWNGKEVHISGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHRCQFQFHGL
SEEDKWPPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATHYEHLGKATLYAVLVSTL
VVMAMPKRKNSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMESFLGGVLLILWLQVD
WVKSQKIEQNSEALNIQEGKTATLTCTNYTNYSPAYLQWYRQDPCGRQPVFLLIRENE
KFKRKERLKVTFDTTLKQSLPHITASQPADSATYLCALDIYPHDMRFAGCTRITVKP
DIQNPEPAVYQLKDRSQDSTLCLFTDPSQINVTKTMESGTFITDKCYLDMKAMDSSN
GALAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTERKSFETDMNLNFQNLITVLRILLK
VAGFNLLMTLRLLPSS (SEQ ID NO: 549)

Пример 3

Данный пример демонстрирует выделение одиннадцати TCR против мутантного p53 у пациента 4238.

Эксперименты проводили, как описано для Фиг. 12-15 для Пациента 4238.

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

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

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

Последовательность TCR 4238-F10-TCR1, которую выделяли у Пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 207), вторая подчеркнутая область

представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 208), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 209), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 210), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 211) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 212). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 213) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся прямо перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 214) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 215) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 216) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся C-концом.

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

Названием TCR: 4238-F10-TCR1

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

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

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MATASLI RAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEIDVTLD CVYETRDITYYLFW
 YKQPPSGELVFILRRNSFDEONEISCRYSWNFQKSTSSFNFTTASQVVD SAVYFCALS
EVDSGNTPLVEGKGTRISVIANIQNPEPAFYQLKDPRSQDSTLCITDFDSQINVPKIME
 SGFTTIDKCVLDMKAMD SKSNGALAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSIDVTCDAITLFEKSF
 ETDMNLNFQNLVIFLRILLKVAGFNILMTLRLWSSRAKRKSGGATNFSLLKQAGDV
ERNPGPMIIFRLLCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSV
 YWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSEINLSSLEIGDSALY
 FCASSVGSSSSTDTQYEGPGTRLTVLIEDLRNFTPPKVSLFEP SKAEIANKQKATLVCLAR
 GFFPDHVELSWVNGKEVHSVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFWIINPRNHRCQ
 VQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGHTSASYQQGVLSATILYEHLLGKATLY
 AVLYSTLVVMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 550)

Статистические данные по TCR 4238-F10-TCR1 для Пациента 4238 изложены ниже в Таблице 6.

Таблица 6

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

Последовательность TCR 4238-F10-TCR2, которую выделяли у Пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 217), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 218), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 219), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 220), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 221) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 222). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 223) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 224) включает последовательность, начинающуюся

сразу после линкера и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 225) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 226) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4238-F10-TCR2

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MATASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTEDCVYETIRDTTYYLEFW
YKQPPSGELVFEIIRRNSEDEQNEISGRYSWNFQKSTSSSENETITASQVVDNAVYFCALS
EVDSGNTPIVFGKGTIRISVIANIQNTEPAVYQKDPKSDSTLCLETFDQSQINVPKTMF
SGTFITDKCVLDMKAMDSSKNGALAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLIEKSF
ETDMNINFNQNLIVIVLRILLKVAGFNLMLTLRLWSSRAKRSCSGATNFSLLKQAGDV
KENPGPMIHRULCCVAFCLIGAGPYDSGVTQIPKHLITATGQRVTURCSPRSGDLSV
YWYQQSLDQGLQELIHYYNQGERAKGNILERFSAQQFPDLHSEINISSLEIGDSALY
FCASSVGSSSSTDTQYFGPGIRITVLEILRNVTTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCTAR
GTFPDIFELSWVFNKKEVTSGLCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWIINPRNHFRQ
VQFTIGLSSEDKWPEGSPKPYTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATHYEILLGKATLY
AVLYSTLVVMAMVKKKNS (SEQ ID NO: 551)

Статистические данные по TCR 4238-F10-TCR2 для Пациента 4238 изложены ниже в Таблице 7.

Таблица 7

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%
CDR3альфа	4	4,2%

CDR3бета	4	4,2%
Пары 4238-F10-TCR2	3	3,1%
Общее число спаренных TCR	12	12,5%

Последовательность TCR 4238-F10-TCR3, которую выделяли у Пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 227), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 228), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 229), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 230), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 231) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 232). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 233) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 234) включает последовательность, начинающуюся прямо после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 235) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 236) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4238-F10-TCR3

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAKSLRVLLVILWLQISWVWSQQKEVEQDPGLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFOYFM
WYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAM
TSPYNNNDMRFGAGTRLTVKPNIQNPPEPAVYQLKDPKSDSTLCIFDDFDSQINVPKIM
ESGTFITDKCYLDMKAMDSSKNGAJAWSNQTSFTCQDIFKETNATYTPSSDVPCDATLFEKS
PETDMNLNFQNLIVFLRILLKLVAGFNLLMTLRWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGD
VEENPGPMHLLLLLLGPGISLLPGSLAGSGLGAVVVSQHPSWVICKSGTSVKHECRSL

DEQATTMFWRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSLTIVT
SAHPEDSSFYICSGGLEEAARQFPGGTRITVLEIDLRNFTTPKVSLEEPSKALIANKQKAT
LVCLARGFTFPDIFELSWWFNGKEFHSXGCTDPQAYKESNYSYCLSSRLKFSATFWINPRN
HFRCCQFQFHGLSEEDKWTEGSPKPVITQNSAFAWGRADCGHSASYQXGVLSATHLYEHL
GKATLYAVLYSTLFVMAVFKRKNS (SEQ ID NO: 552)

Статистические данные по TCR 4238-F10-TCR3 для Пациента 4238 изложены ниже в Таблице 8.

Таблица 8

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

Последовательность TCR 4238-F10-TCR4, которую выделяли у Пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 237), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 238), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 239), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 240), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 241) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 242). Область, выделенная жирным шрифтом (SEQ ID NO: 26), представляет собой линкер. Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа

(SEQ ID NO: 243) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 244) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 245) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 246) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4238-F10-TCR4

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAKSLRVLLVILWLQISWVWSQQKEVEQDPGLSVIEGAIIVSLNCTYSNSAFQYFM
WYRQYSRKGPILLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRODSQPSDSATYLCAM
TSPYNNNDMRFAGTRITVKPNIQNPEPAFYQLKDPHSQDSTLCLETFDSDQINVPKTM
ESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNCAIAWSNQTSTTCQDIFKETNATYPSSDVPCTATLTKS
FETDMNLNFQNLIVIVLRILLKVAGFNJLMTLRILWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGD
VEENPGPMHLLILLGPAQSGLGAVVSQIIPSRVICKSGT SVKIECRSI DEQATTMFW
YRQFPKQSLMLMATSNESKATYEQGVKDKFLINHASITLSTLTVTSAIPEDSSFYI
CSGGLEEAARQFIQPGTRITVLEDLRNVTPPKESLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFP
DHVELSWVNGKEVHSQVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRIIFRCQVQPH
GLSEEDKWPEGSPKPYTONISAEAWGRAIXCITSASYQQGVLSATLYEILLGKATLYAVLV
STLVFMAMFKRKNS (SEQ ID NO: 553)

Статистические данные для TCR 4238-F10-TCR4 для Пациента 4238 изложены ниже в Таблице 9.

Таблица 9

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

Последовательность TCR 4238-F11-TCR1, которую выделяли у Пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 247), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 248), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 249), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 250), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 251) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 252). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область альфа цепи (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 253) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 254) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 255) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная часть бета (SEQ ID NO: 256) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4238-F11-TCR1

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MALVARVTVELTFGTIDAKITTPPSMDCAEGRAANLPCNHSTISGNEYVYWYROIH
 SQGPQYIIIQLKNNETNEMASLITFEDRKSSTLILPIATLRDTAVYYCIVPNDYKLSFG
 AGTTVTIVRANIQNPEPAVYQLKDPKSDSTLCITDITDSQINVPKIMESGTFITDKCVLD
 MKAMDSKSNCAIAWSENQTSFTCQDIFKETNATYPSSIVPCDATITEKSFETDMNINFNQNL
 LVIVLRHLLKVAQENLMTLRWSSRAKRSGSGATNESLILKQAGDVEENPGPMHIRL
 LCRVAFCFLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGKVFLECVQDMDIENMFWYRQDPGL
 GLRLLYFSYDVKMKKEKGDIPGYSVSREKKERFSLILESASTNQUSMYLCASSFQTCISI
 QETQYEGPGITRLVLVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSW
 WYNGKEVUSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLVFSATFWINPRNHFRCQVQFIHGLSEEDK
 WPEGSPKPYTONISAEAWGRADCGITSASTQGGFLSATILYEILLGKATLYAVLYSTLFFMA
 MPKRENS (SEQ ID NO: 554)

Статистические данные по TCR 4238-F11-TCR1 для Пациента 4238 изложены ниже в Таблице 10.

Таблица 10

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

Последовательность TCR 4238-F11-TCR2, которую выделяли у Пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 257), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 258), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 259), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 260), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 261) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 262). Область, выделенная жирным

шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 262). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 263) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 264) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области бета цепи. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 265) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 266) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4238-F11-TCR2

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAYSPGLVSLILLLLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEAFLTINCTYTAIGYPSLFWYVQ
YPCUGLQILLKATKADDKGSNKGFEATYRKETTSEHLEKGSVQVSDSAVYFCALNP
NAGGTSYQKLTFGQGTILTVLPNQNPPEPAVYQLKDPKSDSTLCLETDPSQINVPKI
MESGTFITDKCFLLMKAMDSSNGALWNSNQTSFTQQDIFKETNATYPSSDFPCIDATLLE

*KSFEEDMININFNQNLIVIVLRHLLKVFAGFNILMTLRWSSRAKRSCSGATNFSLLKQAG
 DVEENPGPMIIPRILEFWAIIICLLGTGPVEAQVTQSPTHLIKTRGQQAFLRCSPISGHI
 SVYWYQQAALGIGLQULLWYDEGEERNRGNUPPRESGRQEPNYSSELNVNALELEDSE
 ALYLICASSSPGATSGGANTGHELEFEGESRLTVLEDERNFPPKVSLEPESKAELANKQK
 ATLKCLIRGFFPDHVELSWWFNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP
 RNHFRCCQFQFHGLSEEDKWPEGSPKPYIQNISAEAWGRADCGTESASYQQGVLSATILYEL
 LLGKATLYAVLKSTLVVMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 535)*

Статистические данные по TCR 4238-F11-TCR2 для Пациента 4238 изложены ниже в Таблице 11.

Таблица 11

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

Последовательность TCR 4238-F11-TCR3, которую выделяли у Пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 267), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 268), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 269), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 270), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 271) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 272). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 273) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 274) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 275) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и кончающуюся сразу

перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 276) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4238-F11-TCR3

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MATFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYLYWYK
QEPGAGIQLLTYIESNMDMKQDQRI.TVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEIP
RDSGGGADGLTFCGKGTLLIQPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLTDFDSQINVPKTM
ESCTFTDKCVLDKAMDSKSNGLAWSNQTSFTCDHFKETNATYPSSDVPDADLTLEKS
FETDMNLNFQNLIVIVLRILLKVGAGNLMTLRLWSSRAKRSCSGATNFSLLKQAGD
VFENPGPMHLLILLGPGISLLLPGLAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSL
DEQATTMFWRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVKDKFLJNILASLTI STUTVT
SAHPEDSSFYICSAIDLQRSYEQYFGPGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQK
ATLYCLARGFFPDHYELSWVWNGKEYHISGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWINP
RNHRCQYQFTHGSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATLYEI
LLGKATLYAVLVSTLVFMAMFKHKNS (SEQ ID NO: 556)

Статистические данные по TCR 4238-F11-TCR3 для Пациента 4238 изложены ниже в Таблице 12.

Таблица 12

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

Последовательность TCR 4238-F11-TCR4, которую выделяли у Пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 277), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 278), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 279), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 280), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 281) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 282). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 283) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 284) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 285) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 286) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4238-F11-TCR4

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способы идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MATFAGFSFI FLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYLYWYK
 QEPGAGLQLLTYIESNMDMKQDQRIFVLLNKKDKHLSLRIAD1QTGDSAIYFCAEIP
RDSGGGADGLTFGKGTHLIQPNIQNPEPAFYQLKDPRSQDSTLCLETFDFDSQINVPKTM
 ESGTFTDKEVLDMKAMDSSKNGATAWSNQISFTCQDIFKETNATYPSSDVPCTATLTEKS
 FETDMNLNFGNLLVIVLRILLKKFAGFNILMTLRLWSSRAKRSGSGATNPSLLKQAGD
 VEENPGPMHLLLLLLGPAGSGLGAVVVSQHPSRVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMF
 YRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVFEKDKFLJNHASLTLSLTITVTSAHIPEDSSFI
CSARDLQRSYEQYEGPGTRUTVTEDLRNVTPPKVSLFFPSKAEIANKQKATLVCLARGFF
 PDHVELSVIVYNGKEVTSQVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWINPRNHRCCQVQF
 HGLSEEDKWPPEGSPKIPVTQNISAGAWGRADCGHSASYQGGVLSATHYEILLOKATLYAVL
 FSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 557)

Статистические данные по TCR 4238-F11-TCR4 для Пациента 4238 изложены ниже в Таблице 13.

Таблица 13

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

Последовательность TCR 4238-F17-TCR1, которую выделяли у Пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 287), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 288), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 289), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 290), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 291) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 292). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 293) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 294) включает последовательность,

начинающуюся сразу после линкера и кончающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 295) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 296) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4238-F17-TCR1

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAGIRALFMYLWLQLDWVSRGHESVGLHLP~~TL~~SVQEGD~~NS~~HNCAYSN~~SASD~~YFIWY
KQFSGKGPQFUDIRSN~~MD~~KRQGGQRVTVLIN~~KT~~VKHL~~SL~~QIAATQPGDSAVYFC~~AE~~P
V~~CG~~LNSGYALNFGK~~CT~~SLLVTPM~~Q~~NPEPAVYQ~~L~~KDPRSQD~~ST~~LCL~~F~~TD~~FD~~SQIN~~EP~~KT
MESG~~TT~~TDKCVLD~~MD~~KAMDSKSN~~GA~~LWSN~~QT~~ST~~TC~~QD~~IF~~KETNATYPSSD~~VPC~~DATL~~TE~~
KSFETDMN~~LN~~PQNL~~V~~IV~~LR~~ILLK~~V~~AGENLLMTLR~~W~~SSRAK~~RS~~SGGATNFSLLKQAG
DVEENPGPMHPGLLCWVLLCLLGAGPVDAGVTQSP~~TH~~LKTRGQQVT~~LR~~CSP~~IS~~GH
KSVSWYQQVLCGGPQFIFQYYEK~~FER~~GRGN~~FP~~DRFSARQ~~FP~~NYSS~~EL~~NVNALLGDS
ALYL~~C~~ASSGGRTSGAYE~~Q~~FG~~I~~GTRL~~TV~~L~~ED~~LRN~~FT~~PPK~~V~~SLFEP~~SK~~ARIANKQKAT~~LV~~
CLARGFFPDH~~VE~~LSWWYNGKE~~V~~ISGV~~CT~~DPQAYKESNYSY~~CI~~SSRLRV~~SAT~~FWHNPRNH
PRCQV~~Q~~FTIGLSEEDKWPEGSPKPV~~TQ~~NISAEAWGRAD~~CG~~ITSASYQ~~Q~~GVLSATILYEILLG
KATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 558)

Статистические данные по TCR 4238-F17-TCR1 для Пациента 4238 изложены ниже в Таблице 14.

Таблица 14

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%

CDR3альфа	3	3,1%
CDR3бета	2	2,1%
Пары 4238-F17-TCR1	2	2,1%
Общее число спаренных TCR	6	6,3%

Последовательность TCR 4238-F17-TCR2, которую выделяли у Пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 297), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 298), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 299), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 300), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 301) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 302). Выделенная жирным шрифтом область представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 303) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 304) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 305) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 306) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4238-F17-TCR2

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGESSILNCSYTVSGLRGLFW
YRQDPGKGPEFLFTLYSAGBEEKERLKAUTKKESFLIUTAPKPEDSATYLCVAFALI
RGSTLGRLYEGRCTQLTVWPNIQNPEPAVYQLKDPKSDSTLCLETFDSDQINVPKME
SGTFPTDKCVLDMKAMDSKSNGLAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDAILTEKSF
ETDMNLNFQNLIVIVLRILLKLVAGFNILMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDV
EENPGPMHPGLLCWALLCLLGAGLVDAAGVTQSPTHLIKTRGOQVTLRCSPKSGIIDI
VSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQGNFPDRFSGHIQFPNYSSEILNVNALLLGDSAL
YLCASSRRGQAYNEQFEGPCTRIIVLEDIRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLAR
GFPFDIIVELSWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWINPRMIFRCQ
VQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATLYEILLGKATLY
AVLVSTLVFMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 559)

Статистические данные по TCR 4238-F17-TCR2 для Пациента 4238 изложены ниже в Таблице 15.

Таблица15

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

Последовательность TCR 4238-F17-TCR3, которую выделяли у Пациента 4238, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 307), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 308), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 309), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 310), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 311) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 312). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа

(SEQ ID NO: 313) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 314) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 315) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 316) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4238-F17-TCR3

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAKNP(LAAPLLILWFHLDGVSSILNVEQSPQSLIVQEGDSTNFTCSFPSSNEFYALHWY
RWETAKSPEALFVMTLNGDEKKKGRISATLNTKEGYSYL.YIKGSQPEDSATYLCASV
GGGADGLTFGKGTHLHPNIONPEPAVYQLKDPKSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESG
TFHDKCYLDMKAMDSSNGAIAWSNQTSTFCQDIKETNATYTPSSDYPCDAITLTKSFET
DMNLNFQNLIVIVLRULLKVACFNLLMILRLWSSRAKRSCSGATNFSLLKQAGDYEE
NPGPMHTRLLFWVAFCLIGADITGAGVSQSPSNKVTEKCKDVELRCDPISGITALLY
WYRQSLGGGLEFLIYFQGNAPDKSGLPSDRFSAERTGGSVSTLTIQRTQQEDSAVYL
CASTWDRGSYNEQFEFGPGTRLTVLEDIRNVTPPKVSLLEPSKAEIANKQKATLVCLARG
FPFDHWEISWPPNGKEVTSIGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRFSAITFWINPRNTHRCQV
QFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCCHTSASYQQGVLSATHYELLGKATLYA
VLVSTLVVMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 560)

Статистические данные по TCR 4238-F17-TCR3 для Пациента 4238 изложены ниже в Таблице 16.

Таблица 16

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

Пример 4

В данном примере продемонстрировано выделение двух TCR против мутантного p53 у пациента 4253.

Эксперимент проводили, как описано для Фиг. 16 для Пациента 4253.

Фрагменты TIL (F1-F24; n равен 24) от пациента 4253 совместно культивировали с аутологичными APC (1), в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO), (2) в которые под действием импульсов вводили очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из мутантной последовательности p53-R248W, (3) которые подвергались электропорации нерелевантным TMG, или (4) которые подвергались электропорации p53-mut-TMG, содержащим мутантную последовательность p53-R248W. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали посредством ELISPOT. Результаты показаны на Фиг. 16. F15 отбирали для сортировки TCR, поскольку он был реактивным в отношении и p53-mut-TMG и длинного пептида p53-R248W.

Последовательность TCR 4253-TIL-TCR1, которую выделяли у пациента 4253, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 187), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 188), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 189), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 190), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 191) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 192). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 193) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа.

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

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

Название TCR: 4253-TIL-TCR1

Распознавание мутации p53: R248W

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

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAKCPQALLAIFWLLLSWVSSSEDKVVQSPLSLVVIIEGDTVTLNCSYFVTNFRSLLW
YKQEKKAPTFLFMIITSSGIEKKSGRLSSILDKKFISSILNITATQTGDSAIYLCAGQAY
GGSGQGNLIFOKGFKLSVKPMIQNPEPAVYQLKDPKSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESG
TFITDKCVLDMKAMDSSKNGALAWSNQISFTCQDIKETNATYPSSDVPDADLTETKSTTT
DMNINPQNLLVIVLRHLLRVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSCSGATNFSLLKQAGDVEE
NPGPMHTWLVCWAIISLLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGOEVILRCVPISNHLIFY
WYRQILGQKVEFLVSEYNNSEISEKSEIFDDQESVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYTC
ASRDPAEYEQYFGPGTRLTVTEDLRNVTTPPKFSLEFESKAEIANKQKATLVCLARGFTPD
HVELSWFWNGKEVHNGPCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWINPRNHRCQEQFHG
LSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGTSASYQQGVLSATHYELLGKATLYAVLVST
LVVMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 561)

Статистические данные по TCR 4253-TIL-TCR1 для Пациента 4253 изложены ниже в Таблице 17.

Таблица 17

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

Последовательность TCR 4253-TIL-TCR2, которую выделяли у Пациента 4253, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 197), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 198), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 199), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 200), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 201) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 202). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 203) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 204) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 205) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 206) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4253-TIL-TCR2

Распознавание мутации p53: R248W

Способ: Сокращенный универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53 (оценивали только мутантный TMG и R248W длинный пептид)

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MASLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLESVPEGALASLNCTYS~~DRGSQS~~FFW
YRQYSGKSP~~ELIMFIYSNGQ~~KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAYNP
PVKTSY~~DKVIFGPGTSLSVIPNIQNPEPAVYQIKDPRSQDSTLCLETTDFDSQINVPKTMES~~
GTFITDKCVLDAMKAMISKSNGALAWSNQISFTCCQDIKKT NATYPSSDVPCD~~ATLTEKSFE~~
TDMNINFNQNLVIVLRHLLKVAGFNLLMTLRWSSRAKRSCSGATNFSLLKQAGDVE
ENPGPMHTSLLCWVVLGFLCTDITGAGVSQSPRYKVTKRGQDVALRCDPISGHVSL
YWYRQALGQGIPEHLYENYEAQQDKSGLPNDRFSAERPEGSISTLTIQRT~~EQORDSAM~~
YRCASSHREPHITGELFFGEGSRLLTVLEDLRNVTPTKVSLEPESKAEIANKQKATLYCLAR
GTFPDHPELSWWVNGKEVTSQVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQ

VQFHCHSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGTSSASYQQGVLSATHYEHLGKATLY
AVLVSTLVFMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 562)

Статистические данные по TCR 4253-TIL-TCR2 для Пациента 4253 изложены ниже в Таблице 18.

Таблица 18

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

Пример 5

В данном примере продемонстрирована идентификация Т-клеток против мутантного p53 у пациента 4273 в результате совместного культивирования аутологичных APC, в которых была вызвана экспрессия мутантного p53, с аутологичными Т-клетками (« универсальный скрининг мутаций горячих точек p53»). В данном примере также продемонстрировано выделение двух TCR против мутантного p53 у пациента 4273.

Эксперименты проводили, как описано для Фиг. 17-20 и 56-60 для Пациента 4273.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4273 совместно культивировали с аутологичными APC, которые подвергались электропорации TMG, состоящим из нерелевантной, WT p53 или мутантной p53 последовательности. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на Фиг. 17. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам → живым клеткам (PI-негативным) → CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на Фиг. 18.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4273 совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (DMCO) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 или мутантной последовательности p53-R248W. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на Фиг. 19. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам → живым клеткам (PI-негативным) → CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на Фиг. 20.

Для пациента 4273 F15 представлял собой наиболее реактивный фрагмент, и ответы F15 на LP и TMG были сопоставимы и в основном с CD4 Т-клетками. Таким образом, 4273-F15 совместно культивировали с APC, в которые под действием импульсов вводили LP R248W, и на следующий день CD4+41BB+ Т-клетки отсортировывали в виде одиночных клеток в лунки 96-луночного ПЦР-планшета в количестве одна клетка на лунку. В каждой лунке ПЦР-планшета имеется раствор для ОТ-ПЦР, где амплифицируются CDR3 области цепей альфа и бета TCR в одном и том же растворе. Затем лунки планшета разбивают на два 96-луночных ПЦР-планшета, и проводят второй раунд ПЦР для амплификации либо CDR3 альфа, либо CDR3 бета в виде отдельных реакций. ПЦР-продукты из каждой лунки (всего 192 ПЦР-продукта, расположенных в каждой лунке - альфа или бета) секвенируют посредством секвенирования по Сэнгеру. Нуклеотидную последовательность вводят в IMGT/V-QUEST (imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanTcR), IgBlast (ncbi.nlm.nih.gov/igblast/igblast.cgi?CMD=Web&SEARCH_TYPE=TCR&LINK_LOC=igtab) и транслируют посредством ExPASy (web.expasy.org/translate/). Определяют переменное семейство и сливают с CDR3 и соединением (J или DJ) из

транслированной последовательности. Вариабельную последовательность сливают с мышинной константной последовательностью, и реконструированные TCRальфа и TCRбета связываются посредством линкера фурин-гибкий-P2A (RAKR-SGSG-ATNFSLLKQAGDVEENPGP) (SEQ ID NO: 26). Затем, последовательность синтезируют в ДНК *de novo* и клонируют в экспрессионный вектор (гамма-ретровирус или SLEEPING BEAUTY (SB) транспозон (Университет Миннесоты, Minneapolis, MN)). Затем Т-клетки заставляют экспрессировать TCR, используя стандартные протоколы вирусной трансдукции или невирусной транспозиции, и Т-клетки, экспрессирующие муринизированные TCR (как выявлено посредством константной цепи TCRбета мыши), тестируют на предмет предполагаемого пептида.

Аутологичные APC трансфицировали TMG, кодирующим нерелевантные мутации, последовательности WT p53 или мутантные последовательности p53, включая p53-R248W. Только среды и PMA и Иномицин представляли собой отрицательный и положительный контроли, соответственно. TIL от пациента 4273 (культуры фрагментов 8 и 15) совместно культивировали в течение ночи при 37°C с TMG-трансфицированными APC. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования для лимфоцитов → живых клеток (PI-негативных) → CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на Фиг. 56.

В аутологичные APC под действием импульсов вводили пептиды из 25 аминокислот, соответствующие WT или мутантному p53-R248W неозопитопу, в течение 2 часов при 37°C. TIL от пациента 4273 (культура фрагмента 15) со специфичностью к p53-R248W совместно культивировали в течение ночи при 37°C с APC, в которые под действием импульсов вводили пептид APC. ДМСО являлся носителем пептида. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования для лимфоцитов → живых клеток (PI-негативных) → CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на Фиг. 57.

В аутологичные APC под действием импульсов вводили пептиды из 15 аминокислот из неозопитопа p53-R248W с перекрыванием 14 аминокислот. TIL от пациента 4273 (культура фрагмента 15) со специфичностью к p53-R248W совместно культивировали в течение ночи при 37°C с APC, в которые под действием импульсов вводили пептид. ДМСО представлял собой носитель пептида, только среды (только Т-клетки) и PMA и иномицин представляли собой контроли. Пептиды из 25 аминокислот (wt p53-R248 и мутантный p53-R248W) представляли собой дополнительные контроли для пептидов из 15 аминокислот. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении

лимфоцитов → живых клеток (PI-негативных) → CD3⁺ (Т-клеток) → CD4⁺CD8⁻. Результаты показаны на Фиг. 58.

Клетки Cos7 (2,5x10⁴/лунка) высевали в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов. На следующий день, клетки совместно трансфицировали индивидуальными аллелями HLA от пациента 4273 и либо TP53 TMG дикого типа, либо мутантным TP53 TMG, с или без неоантигена p53-R248W, соответственно. На следующий день TIL со специфичностью к p53-R248W от Пациента 4273 (культура фрагмента 15) совместно культивировали с трансфицированными клетками Cos7 в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN-γ оценивали посредством ELISA. Результаты показаны на Фиг. 59.

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

Последовательность TCR 4273-TP53-R248W-TCR1a1, которую выделяли у Пациента 4273, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 437), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 438), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 439), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 440), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 441) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 442). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 443) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 444) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 445)

включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 446) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

Название TCR: 4273-TP53-R248W-TCR1a1

Распознавание мутации p53: R248W

Способ: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

MASLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQN⁵⁶SGPLSVPEGAIASLNCTYS⁵⁷DRGSSQ⁵⁸STFW
YRQYSGKSP⁵⁹ELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSI.LIRDSQPSDSATYLC⁶⁰AVTL
CGGYNKLIEGAGTRILAVHPNIQNPEPAVYQLK⁶¹DP⁶²RSQDSTLC⁶³LTDFDSQINVPKTMES
GTFITDKCVLDMKAMD⁶⁴SKSNGAIAWSNQTSFTCQ⁶⁵DPK⁶⁶ETNATYPSSDVP⁶⁷CDATITEK⁶⁸SFE
TDMNLNFQ⁶⁹NLLVIVLRILLK⁷⁰VAGFNLLMTLR⁷¹LWSSRAK⁷²RS⁷³SGSGATNFSLLK⁷⁴QAGDVE
ENPGPMIINQVLC⁷⁵CVL⁷⁶CFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC⁷⁷EQNLNIDA
MYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIVEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAF
YLCASSSRDYEQYFC⁷⁸PGTRLT⁷⁹VTEDLRNVT⁸⁰PPK⁸¹VSLEP⁸²SKAFIANKQKATL⁸³PC⁸⁴LARGFF
PDHIFELSW⁸⁵FWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWINPRNHFRCQ⁸⁶Q⁸⁷Q⁸⁸F
HGLSEEDKWPEGSPK⁸⁹PVTQ⁹⁰NISAF⁹¹AWGRADCGHSASYQ⁹²QGVLSATHYELLGKATLYAVL
FSTLFFMAMV⁹³KRKNS (SEQ ID NO: 563)

Последовательность TCR 4273-TP53-R248W-TCR1a2, которую выделяли из пациента 4273, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 447), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 448), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 449), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 450), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 451) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 452). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 453) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 454) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 455) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 456) включает

последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Название TCR: 4273-TP53-R248W-TCR1a2

Распознавание мутации p53: R248W

Способ: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

MASLRVLLVILWLQISWVWSQQKEVEQNSGPI.SVPEGALASLNCTYSDRGSSQSF
YRQYSGKSPELIMFIYSNQDKEDGRIFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLC
SGGYNKLIFGACTRLAVHPNIQNPEPAVYQLKIDPRSQDSTLCCLFTDIDSDQINVT
KTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNAGIAWNSQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDA
ILTEKSFETDMNLNFQNLIVIVLRILLKVAAGFNILMTLRWFSSRAKRSGSGATNFS
LLKQAGDVEENPGPMINQVLCVVLCELGANTVDGGITQSPKYLPRKEGQNVTLSC
FONLNHDA MYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFOKGDIVESVSREKKESFPLTV
TSAQKNPTAFYLCASSSRDYEQYFEGPGTRITVTFDLRNVTFFKVSLEFESKAEL
ANKQKATLVCLARGFFPDHVFELSWVYNGKEVHSQVCTDPQAYKFSNYSYCLSSRL
RVSATFWINPRNIHRCQVQF HGLSEEDKWPEGSPPKPVITQNISAEAWGRADCG
ITSASYQQGVLSATHLYELLGKATLYAVL PSTLFFMAMVKKKNS (SEQ ID NO: 564)

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

Таблица 19

Название TCR	4273-TP53-R248W-TCR1a1	4273-TP53-R248W-TCR1a2
CDR3a	CAVTLCCGGYNKLIF (SEQ ID NO: 439)	CAVTLSSGGYNKLIF (SEQ ID NO: 449)
CDR3b	CASSSRDYEQYF (SEQ ID NO: 442)	CASSSRDYEQYF (SEQ ID NO: 452)
Общее число лунок	96	
Общее число пар CDR3a/CDR3b	77	

% спаренных	80,21%	
# раз CDR3a	50	33
# раз CDR3b	83	83
спаренные CDR3a/CDR3b	43	30
% спаренных CDR3a/CDR3b пар	55,84%	38,96%

Пример 6

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

Эксперименты проводили, как описано для Фиг. 21-24, для Пациента 4149. TCR обнаруживали, используя способ Tran. TCR затем использовали для проверки способа «универсального скрининга мутаций горячих точек p53».

TCR (4149-TCRa2b1 или 4149-TCRa2b2) переносили в аутологичные PBL от пациента 4149 и совместно культивировали с аутологичными APC, которые (1) подвергали электропорации TMG, состоящим из нерелевантной, WT p53 или мутантной p53 последовательности, или (2) в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-Y220 или мутантной последовательности p53-Y220C. Комбинация PMA и иономицина представляла собой положительный контроль. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на Фиг. 21. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов $\rightarrow$ живых клеток (PI-негативных) $\rightarrow$ CD3+ (Т-клеток) $\rightarrow$ CD4+ mTCR+ (Т-клеток с переносом TCR). Результаты показаны на Фиг. 22.

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

Таблица Е

Название TCR	% CD4+41BB посредством глубокого секвенирования TCRAD	% CD4+41BB посредством глубокого секвенирования TCRB
--------------	---	--

4149-TCR-a2b1	20%	66%
4149-TCR-a2b2	20%	18%

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

Таблица F

№ Пептида	Результат ELISPOT, позитивный (+) или негативный (-) в отношении продукции IFN- γ	Пептид	SEQ ID NO:
0	-	Носитель	неприменимо
1	-	DRNTERHSVVVPCER	508
2	+	RNTERHSVVVPCERPP	509
3	+	NTERHSVVVPCERPE	510
4	+	TERHSVVVPCERPEV	511
5	(слабый)	ERHSVVVPCERPEVVG	512
6	-	RHSVVVPCERPEVGS	513
7	-	HSVVVPCERPEVGSQ	514
8	-	SVVVPCERPEVGSQC	515
9	-	VVVPCERPEVGSQCT	516
10	-	VVPCERPEVGSQCTT	517
11	-	VECFRRVGSQCTT1	518

Клетки Cos7 ($2,5 \times 10$ на лунку) высевали в лунки плоскodonных 96-луночных планшетов. Спустя 20 часов, клетки совместно трансфицировали индивидуальными аллелями HLA с или без TMG. Спустя 20 часов, параллельно аутологичные клетки DC трансфицировали TMG. Осуществляли совместную трансфекцию всеми аллелями HLA класса II в одном наборе лунок с или без TMG. В клетки, нетрансфицированные TMG, под действием импульсов вводили 15-мерный пептид p53-Y220C в течение 2-3 часов при 37°C в количестве 10 мкг/мл. После промывки T-

клетки с переносом 4149-TCRa2b2 (10^5) в сутки+14 второго REP добавляли в лунки и совместно культивировали в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ измеряли посредством ELISA. Результаты показаны на Фиг. 24. Предсказание (Таблица G) посредством NetMHCIIpan: cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/.

Таблица G

HLA	Пептид	Аффинность, нМ	Ранг
DRB3*02:02	NTFRHSVVVP <u>CE</u> PE (SEQ ID NO: 510)	433,8	17

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

Последовательность TCR 4149TCRa2b2, которую выделяли у Пациента 4149, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 57), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 58), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 59), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 60), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 61) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 62). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 63) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 64) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 65) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 66) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

Опухоль-реактивные Т-клетки идентифицировали, используя способ скрининга, изложенный ниже. p53-реактивные клетки для данного пациента

идентифицировали способом Транскрининга, как описано в заявке США № 2017/0224800.

Название TCR: 4149TCRa2b2

Распознавание мутации p53: Y220C

Способ скрининга: Использовали для проверки универсального скрининга мутаций «горячих точек» p53

Совместное культивирование для идентификации TCR: Совместное культивирование фрагмента TIL 4149-F11 с длинным пептидом p53-Y220C, отсортированные CD4+41BB+ Т-клетки

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

Распространенность TCR среди всех TCR: как ниже

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MASAFISMMLAMLEFTLSGLRAQSVAPEDQVNVAFGNPLTVKCTYSVSGNPLYLWYV
QYPNRGLQFILKYITGDNIYKGSYGFEAFENKSQTSFHLKKPSALVSDSALYFC AVR
VWDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPEPAVYQIKDPRSQDSTLCLETFDFDSQINVPKIMESG
TFITDKCVLDMKAMDSKSNGLAWSNQTSFTCDIFKEFNATYPSSDVPCDAITLTKSFET
DMNLNFQNLIVIVLRILLKLVAGFNILMTLRVWSSRAKRSGSGATNPSLLKQAGDVEE
NPGPMHNOVLCCYVLCFLGANTYDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCBQNLNHDAM
YWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFOKGDIAEGYSVSRKKESFPLTVTSAQKNPTAFY
LCASSISAGGIDGYTFGSGTRUTVVEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLYCLARGF
FPDHFELSWFVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSHLVVSATFWHNP RNHFRCQVQ
FHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCHTSASYQQGVLSATHYELLGKATLYAV
LVSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 565)

Статистические данные по TCR 4149TCRa2b2 Пациента 4149 изложены ниже в Таблице 20.

Таблица 20

CDR3	Ранг уникальных, продуктивных CDR3	Число CDR3	Частота CDR3
Альфа: CAVRVWDYKLSF (SEQ ID NO: 59)	2 из 4308	648707 из 3309400	19,6%

Бета: CASSISAGGDGYTF (SEQ ID NO: 62)	2 из 3176	104325 из 578948	18,0%
---	-----------	---------------------	-------

Пример 7

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

Эксперименты проводили, как описано для Фиг. 25-26 для Пациента 4213.

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

CD4+ Т-клетки происходили из лимфоцитов периферической крови пациента 4213. CD4+ Т-клеточную культуру совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из мутантной последовательности р53-R248Q. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN-γ оценивали посредством ELISPOT. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования для лимфоцитов → живых клеток (PI-негативных) CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на Фиг. 26. CD4+41BB+ Т-клетки сортировали в лунках 96-луночных планшетов. TCR идентифицировали, используя ОТ-ПЦР на одной клетке.

Последовательность 4213-F2-TCR1, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 317), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 318), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 319), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 320), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 321) и шестая подчеркнутая область представляет собой

CDR3бета (SEQ ID NO: 322). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 323) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 324) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 325) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 326) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4213-F2-TCR1

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDQVVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMF
 DYFLWYKKYPAFGPTFLISSIKDKNEDGRFTVELNKSARKHLSLHIVPSQPGDSAVYF
 CAANTGNQFYEGTGTSITVITMIONPEPAVYQLKDPQSQDSTLCITDDFDSQINVPKTIME
 SGITFDKCVLDMKAMDSSKNGALAWSNQISFTCQDIFKETNATYPSSIVPCDATLTEKSF
 ETDMNLNFQNLIVIVIRILLKVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSCSGATNFSLLKQAGDV
EENPGPMITIRLLCWAALCLLGAFLTEAGVAQSPRYKIEKQSVAFWCNPISGHATL
 YWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAV
 YLCASSIILAGIEFYNEQFFGPGTRITVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLA
 RGFFPDHVEISWWVNGKEYHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAITWHNPRNIIFRC
 QVQFTIGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRAIDCGITSASYQQGVLSATLYEHLGKAT
 LVAVLYSTLVVMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 566)

Статистические данные по TCR 4213-F2-TCR1 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 21.

Таблица 21

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

Последовательность 4213-F2-TCR2, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 327), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 328), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 329), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 330), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 331) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 332). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 333) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 334) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 335) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 336) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4213-F2-TCR2

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAGAFILLYVSMKMGGTAGQSLEQSEVLAVEGAIVQINCTYQTSGFYQLSWYQQH
 DGGAPTFLSYNALDGL^{EE}TGRFSSFLSRSDSYGYILLQELQMKDSASYFCAPAYGQN
 FVFCPCTRLSVLPNQNP^{EP}AVYQLKDIPRSQDSILCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKC
 FLDAKAMDSKSNGAIAWSNQTSFT^{QC}DIFKETNATYPSSDVPCDAILTEKSPETDMNINP
 QNLLVIVLRHLLKVAGFNLLMTLRLLWSSRAKRRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMIL
 FRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTTPKHLITATQQRVTLRCSPRSG^{DI}SVYWYQQSLD
 QGLQFLIQYYNGEERAKGNIL^{ER}FSAQQFPDIIISEINISSLELGDSALYFCASSPLGD
 SGNITLYEGEGSWLTVVEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS
 WFWNGKEVHISGFCTDPQAYKESNYSYCLSSRLVVSATFWINPRNIFRCQVQFHGSEED
 KWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGTSASTQQGVLSATHYEILLGKATLYAVLVSTLVVM
 AMVKRKNS (SEQ ID NO: 567)

Статистические данные по TCR 4213-F2-TCR2 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 22.

Таблица 22

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

Последовательность 4213-F2-TCR3, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 337), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 338), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 339), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 340), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 341) и шестая подчеркнутая область представляет собой

CDR3бета (SEQ ID NO: 342). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 343) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 344) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 345) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 346) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4213-F2-TCR3

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MATILGVSLVILWILQIARVNSQQGEEDPQALSIQEGENATMNC SYKJ SINNLQWYR
QNSGRGLVIIILIRSNEREKHSCKIRVTLDTSKKSSSLITASRAADTASYFCATDAW
YNDMRFGAGTRLTVKPMIQNPEPAVYQLKIDPRSQDSTLCIFTD FUSQINVPKTMESGTF
ITDKCYLDMKAMD SKSNGALAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCCATLTEKSFETD
MNINFPQNLLFVIRULLKVAGFNLMTLRLWSSRAKRSCSGATNFSLLKQAGDVEEN
PGPMHIGLLCCVAFSLLWASPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMFLQCAQDMNHNSMY
WYRQDPQMGRLRIYYASSTGTTDRGFEVPNGYNVSRNLNKREFSURLSAAPSQTSVYF
CASSESQGNTEAFEGQGTRLTVVEDIRNVTTPPKVSLFEPSKAEELANKQKATLVCLARGFF
PDHVELSWWYNGKEVHSQVCTOPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRIIFRCQVQF
IIGLSEEDKWPEGSFKPVTQNISAEAFGRADCCGITSASYQQGVLSATHYELHUGKATLYAVI
KNTLVFAMMKRKNS (SEQ ID NO: 568)

Статистические данные по TCR 4213-F2-TCR3 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 23

Таблица 23

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

Последовательность 4213-F24-TCRa1, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 347), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 348), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 349), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 350), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 351) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 352). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 353) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 354) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 355) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 356) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4213-F24-TCRa1

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAKHLTTFVLWLYFYRGNGKNQVEQSPQSILLEGKNCITLQCNYTVSPFSNLRWY
KQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRYTATLDAQIKQSSLHITASQLSDSASYICVVSS
YKIEGIGTRLHVFPNIQNPPEPAVYQIKDPRSQDSTLCIFIDFDSQINVPKTMESGTHITD
KCYLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSITCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLITEKSFETDMNL
NFQNLIVIVIRILLKVGGENLLMTLRWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
MITRLLFWVAFCLLGAYITGAGVVSQSPSNKVTEKKGKDVEIRCDPISGHITALYWYR
QRLGQGLEFLIYFOGNSAPDKSGLPSDRFSAERTGESVSTLTIQRTQOEDSAVYLCAS
SPIQGENSPLHFGNCTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPD
HVELSWWWNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLVYSATFWINPRNIHRCQVQFHG
ISEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLKATUYAVLVST
LFFMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 569)

Статистические данные по TCR 4213-F24-TCRa1 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 24.

Таблица 24

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

Последовательность 4213-F24-TCRa2, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 357), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 358), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 359), четвертая подчеркнутая область представляет

собой CDR1бета (SEQ ID NO: 360), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 361) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 362). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 363) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 364) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 365) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 366) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4213-F24-TCRa2

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAKHLTTFLVILWLYFYRGNGKNQVEQSPQSLHLEGGKNC TLQCNYTYSPESNLRWY
 KQDYFGRGPVSLTIMTFSENJKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSS
YKLIICTGTTRLQVFPMIQNPPEPAVYQLKDPKSDSTLCLETFDSDQINVPKTMESGTHFD
 KCVLDMKAMD SKSNGALAWSNQTSFTCQDIFKEFNATYPSSDVPCDATTTEKSFETDMNI
 NFQNLIVFLRHLLKVAGFNLLMTLRWSSRAKRSGSGATNFSLLKQACDVEENPGP
 MHTRLLEFWVAFCLLGAYHTGAGVVSQSPSNKVTEKGDVFLRCDPISGHTALYWYR
 QRLCQGLHFLIYFQGN5AIPDKSGLPSDRFSAERTGESVSTLFIQRTQOEDSAVYLCAS
SPIQGENSPLHIFGNCTRLTVTEDIRNITPPKVSLEPSSKAELANKQKATLVCLARGFFPD
 HVELSWWFVNGKEVINGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAITWHNPRNHIFCQVQFIFG
 LSEEDKWPEGSPKPYTONISAAWGRADCGITSASYQQGVLSATHYELJGKATLYAVLVST
 LVVMAMVKKKNS (SEQ ID NO: 570)

Статистические данные по TCR 4213-F24-TCRa2 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 25.

Таблица 25

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

Последовательность 4213-PBL-TCR1, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 367), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 368), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 369), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 370), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 371) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 372). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 373) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 374) включает последовательность, начинающуюся сразу после

линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 375) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 376) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4213-PBL-TCR1

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦП на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

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

MAILLVPAFQVIFLLGCTRAQSVTQLDSQVPVFEAPVELRCNYSSSVSYLFWYVQ
YPNQGLQLILKYLSGSTLYESINGFEAEFNKSQTSFHLRKPSVHUSDTAEYFCAYSKG
TGAQKLYFGQCTRLTINPNIQNPEPAUYQLKDPQRSQDSTLCLETFDSDQINVPKIMESGT
FITDKCVLDMMKAMDSKSNGLAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCTDATTLEKSFETD
MNLNFQNLIVLRLILKFAGENILMTLRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEEN
PGPMINQVLCVVLCELGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCQNLNIBDAMY
WYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLIVTSAQKNPTASYLC
ASEAIFGQCTRLTVVEDLRNFTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFTPDHYELSW
WVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWINPRNIFRCQVQFHGLSEEDK
WPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATHYEHLGKATLYAVLVSTLVVMA
MVKRANS (SEQ ID NO: 571)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR1 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 26.

Таблица 26

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	192	100%

CDR3альфа	9	4,7%
CDR3бета	6	3,1%
Пары 4213-PBL-TCR1	6	3,1%
Общее число спаренных TCR	63	32,8%

Последовательность 4213-PBL-TCR2, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 377), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 378), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 379), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 380), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 381) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 382). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 383) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 384) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 385) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 386) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4213-PBL-TCR2

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MALVTSITVLLSLGIMGDAKITTPQNSMESNEEFVHLPCHNSTISGTDYHHWYRQLPS
 QGPLEYVHGLT\$NVNNRMA\$LAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYYCJLASGAGSYQ
LIFGKGTKLSVIPNIQNPEPAVYQIKOPRSQDSTLCLETFDSDQINVPKTMESGTFITDKC
VLDMAKAMDSK\$NGAIAWSNQTSFTTCQDIKFTNATYPS\$SDVPCDATHTEKSPETDMNINP
QNLIVIVLRILLIKYAGFNILMTLRLLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMH
 CRLLCCVVVCLLQAGPLDTAVSQIPKYLVTQMGNDKSIKCEQNLGHDTMYWYKQD
 SKKFLKIMUSYNKELINETVPNRFSPKSPDKAHLNLHINSLFLGDSAVYFCASRTIG
YNTEAFEGQGTRELVVVEDLRNVTPPKVSLPEPSKAFIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS
WFWYNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV\$ATFWHNP\$RNHFR\$QVQFFIGLSEED
KWPPGSPKPVTTQNISAF\$AWGRADCGITSASYQQGFLSATLYEILLGKATLYAVLVSTLVFM
 AMVKRKNS (SEQ ID NO: 572)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR2 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 27.

Таблица 27

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

Последовательность 4213-PBL-TCR3, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 387), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 388), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 389), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 390), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 391) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 392). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 393)

включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 394) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 395) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 396) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4213-PBL-TCR3

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAKIRQELLAILWLQLSCVSAKNEVEQSPQNLTAQEGFTTNCSSYSGISALHWLQ
QHFGGGIVSLFMLS~~SSG~~KKKHGRLLATINIQEKHSSLHITASHPRDSAVYICAAISYNTQ
KLIEGTGTRIQVFPNIQNPEPAVYQLKIDPRSDSTLCLFTDFDSQINYPKTMESGTFIDK
CYLDMKAMD~~SKS~~NGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVP~~CD~~ATLIEKSFETDMNLN
FQNLAVIVLRILLIKVAGFNLLMTLRLLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDYFENPGPM
HTRLICWAALCLLGADHTGAGVSQTPSNKVTEKGYVELRCDPISGHTALYWYRQS
LGQGPEFLIYFQGTGAADDSGLPNDREFAVRPEGSVSTIKIQRTERGDSAVYLCASSL
SGILLQITQYEGPGTRLLVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFPFDIV
ELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWINPRNIFRCQVQFHGIS
EEDKWTEGSPKPPPTQNSAEAWGRADCHTSASYQQGVLSATHYEILLGKATLYAVLYSTL
VVMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 573)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR3 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 28.

Таблица 28

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

Последовательность 4213-PBL-TCR4a1, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 397), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 398), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 399), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 400), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 401) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 402). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 403) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 404) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 405) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 406) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4213-PBL-TCR4a1

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

Совместное культивирование для идентификации TCR: CD4+ Т-клетки памяти после сенсibilизации *in vitro* длинным пептидом R248Q совместно

культивировали с длинным пептидом R248Q, и отсортировывали CD4+41BB+ T-клетки.

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAYSPGLVSLILLLLLGRTRGNSVTQMEGPVFLSEUAFLTINCTYATATGYPSEIFWYVQ
YPCBGLQLLLKATKADDKGSNKGFEATYRKETTSPHLEKGSVQVSDSAVYFCALSH
TGSSNTGKLEGGQGTRLQVKPMIQNPETAVYQLKDPKPSQDSTLCLETFDFDSQINVPKTM
SGTFTIDKCVLDMKAMDSKSNAGAWSNQTSFTCQDIKETNATYPSSDVPCDATLTEKSF
ETDMNLNFQNLIVLRIILLKFAENLMTLRDSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDV
EENPGPMHTRLICWAALCLLGAELEAGVAQSPRYKIEKRSVAFWCNPISGHATL
YWYQQILGQPKLLIQFQNGVVDSDQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIOPAKLEDSAV
YLCASSTGGGRHQPHQEGDGTRLSILEDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLAR
GFFPDIVELSWWVNGKEVHISGVCTTPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAITFWINPRNIHRCQ

VQFHGLSEEDKWPEGSPKPVITQNISAEAWGRADCGLISASYQQGVLSATHLYEHLGKATLY
AVLESTLVFMAMPKRKNS (SEQ ID NO: 574)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR4a1 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 29.

Таблица 29

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

Последовательность 4213-PBL-TCR4a2, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 407), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 408), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 409), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 410), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 411) и шестая подчеркнутая область представляет собой

CDR3бета (SEQ ID NO: 412). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Вариабельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 413) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 414) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 415) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 416) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4213-PBL-TCR4a2

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAYSPGLVSIILLLLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEFAFLJINCTYTAIGYPSIFWYVQ
 YPGEGIQIILKATKADDKGSNKGFEATYRKETTTFHLEKGSVQVSDSAVYFCALSQ
TCSSKTKGLIFGQGTRIQVKPNIQNPEPAVYQLKDPKSDSTLCITDFDSQINVPKIME
SGFTFDKCTIDMKAMDSSNGAIAWBNQTSFTCQDIFKETNATYPSDVPCDATTTEKSF
ETDMNINFNQNLVIVLRHLLKVAGFNLMTHRWSSRAKRSCSGATNFSILLKQAGDV
EENPGPMHTRIICWAALCLLGAEITEAGVAQSPRYKIEKRQSVAFWCNPFISQIATL
 YWYQQILGQGPKLLIQEQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAV
 YLCASSTGGGRHQPQHFGDGTRLSEDLRNVTTPKVSILEPSKAFIANKQKATLVCLAR
 GFFPDIVELSWWVNGKEVHISGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWINPRNHFRCQ
 VQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATHLYEHLGKATLY
 AVLPSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 575)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR4a2 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 30.

Таблица 30

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

Последовательность 4213-PBL-TCR4a3, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 417), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 418), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 419), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 420), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 421) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 422). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 423) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 424) включает последовательность, начинающуюся сразу после

линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 425) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 426) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4213-PBL-TCR4a3

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAYSPGLVSLILLLLGRTRGNSVTQMEGPVTLSEEAFLTINCTYTAIGYPSLFWYVQ
YPGFGLQLLLKATKADDEKGSNKGFEATYRKETUSFHLEKGSVQVSDSAVYFCALSO
TGSSNTGKLIFGQGTRLQVKPNIONPEPAVYQLKDPKRSQDSTLCLETFDIDSQINVPKIME
SGTFITDKCVLDMAIDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATTLEKSF
ETDMNLNFQNLIVIVLRHLLKVFAGFNLLMTLRRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDV
EENPGPMHTRLLCWAALCLUGABLTEAGVAQSPRYKIEKRQSVAFWCNPIEGHATL
YWYQQILGQGPKEILIQFQNGVVDSDQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIOPAKLEDNAV
YICASSITGGGRHQPOHFGDGTRLSILEDIRNVTTPKVSLETPSKAIAANKQKATTFCLAR
GFFPDHIVEISWWWNGKEVVISGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRIKVSATFWINPRNIIKCCQ
VQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISALAWGRADCGITSASYQQGFISATHYEILLGKATLY
APLPSTLVVMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 576)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR4a3 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 31.

Таблица 31

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	192	100%
CDR3альфа	4	2,1%

CDR3бета	36	18,8%
Пары 4213-PBL-TCR4a3	3	1,6%
Общее число спаренных TCR	63	32,8%

Последовательность 4213-PBL-TCR4a4, которую выделяли у Пациента 4213, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 427), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 428), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 429), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 430), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 431) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 432). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 433) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 434) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 435) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 436) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4213-PBL-TCR4a4

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAYSPGLVSLHLLLLGRTRGINSVTQMEGPVTLSEEAFLTNCTYTATIGYPSLEFWYVQ
YPGEGIQULLKAIKADDKGSNKGFEATYRKETTSFHLEKGSVQVSDSAVYFCAUSTT
GSSNTQKLIFFGGTTLQVKPNIQNPEPAVYQIKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMES

CTFHDKCYLDMKAMDSKSNGLAWSNQTSTTCQDIFKETNATYPSSDVPCLMILTEKSFE
TDMNLNFQNLFFVLRHLLKFAGNLLMTLRHWSRAKRSCSGATNFSILLKQAGDVE
ENPGPMHTRLLCWAALCLLGAHLTEAGVAQSPRYKIEKRQSVAFWCNPISGLATLY
WYQQILGQGPKLLIQFONNGVVDSDQLPKDRPSAPRIKGVDSLKIQPAKLHDSAVY
LCASSTGGGRHQPIIFGIDCTRLSILEDLRNVTPPKVSLFEPKAEELANKQKATLFCCLARG
FPFDIVELSWWFVNGKEVHISGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWIINPRNIHRCQV
QFTICLSEEDKWPEGSPKPVITQNISAPAWGRADCGHFSASYQQGVLSATHYEILLGKATLYA
VLVSTLVVMAMVKKRNS (SEQ ID NO: 577)

Статистические данные по TCR 4213-PBL-TCR4a4 Пациента 4213 изложены ниже в Таблице 32.

Таблица 32

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

Пример 8

Данный пример демонстрирует идентификацию Т-клеток против мутантного р53 у Пациента 4268 посредством совместного культивирования аутологичных APC, в которых индуцировали экспрессию мутантного р53, с аутологичными Т-клетками («универсальный скрининг мутаций горячих точек р53»). В данном примере также продемонстрировано выделение пяти TCR против мутантного р53 TCR у пациента 4268.

Эксперименты проводили, как описано для Фиг. 27-30 для Пациента 4268.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 совместно культивировали с аутологичными APC, которые подвергали электропорации TMG, состоящим из нерелевантной, WT р53 или мутантной р53 последовательности.

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

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 или мутантной последовательности p53-R248Q. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны на Фиг. 28.

Фрагменты TIL (F1-F24, n равен 24) от пациента 4268 совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности wt p53-R248 или мутантной последовательности p53-R248Q. Совместные культивации проводили в течение ночи при 37°C. Экспрессию 4-1 BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов → живых клеток (PI-негативных) → CD3+ (Т-клеток). Результаты показаны на Фиг. 29. Фрагменты TIL F18 и F19 представляли собой источники TCR после осуществления сортировки CD4+41BB+ Т-клеток.

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

Последовательность 4268-TCR1, которую выделяли из Пациента 4268, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 137), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 138), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 139), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 140), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 141) и шестая подчеркнутая область представляет собой

CDR3бета (SEQ ID NO: 142). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 143) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 144) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 145) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 146) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4268-TCR1

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦП на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MASLRVILVLWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFW
 YRQYSQKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAVS
 WYSTLTFGKGTMLLVSPNIQNPEPAVYQLKIDPR5QDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGT
FTDKCVLDMKAMD5KSNCAIAWSNQISFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATTTEKSFETD
MNLNFQNLFFIVLRHLLKVAGFNLLMTLRWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEEN
PGPMITRLFFYYVALCLLWAGHRDAGITQSPRYKITETGRQVTLTMCHQTWSHSYMF
 WYRQDLGHGLRLIYYSAADITDKGEVPDQYVVSRSKTENFPLTLESATRSQTSVYF
CASSGSRTDTQYFGPGTRLTVLEDLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFP
DIPELSWVWNGKEVISGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAITFWHNPRIHFRQVQFH
GLSEFDKWPEGSPKPVITQNISAFWGRADCITISASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV
 STLVMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 578)

Статистические данные по TCR 4268-TCR1 Пациента 4268 изложены ниже в Таблице 33.

Таблица 33

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

Последовательность 4268-TCR2, которую выделяли у Пациента 4268, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 147), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 148), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 149), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 150), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 151) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 152). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 153) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 154) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 155) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 156) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4268-TCR2

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MALKFSVSILWVQLAWVSTQLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSSSVTSLLQWYRQEPG
EGPVLVTVVYTGGEVKKIKRLIFQFGDARKDSSLHITAAQPGIYTGLYLCAGEFAON
QIFYEGTGTSLTVIPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLETFDSDQINVPKTMESGTFITDK
CVLDMKAMDSSKSNAGAWPSNQTSFTQDIIFKETNATYPSSDVPCTATTEKSFETDMNLN
FQNLIVIVLRHLLKVAGENLLMTLRWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPM
HCRLCCAVLCLLGAVPIDTEVTQTPKHLYVMGMTNKKSLKCEQHMGIIRAMYWYK
QKAKKPPELMPVYSYEKLSINESVPSRFSPECNSSLNLNLHLHALQPEDSALYLCASS
QVGLTYEQYFGPGTRLTVTEDLRNVTTPPKVSLFFPSKAEHANKQKATIVCLARGFFPDH
VELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYULSSRLVSAITWIIINPRNIFRCQVQFUGL
SEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGHSASYQQGVTSATHYHLLGKATLYAVLVSTL
VYMAHVKRKNS (SEQ ID NO: 579)

Статистические данные по TCR 4268-TCR2 Пациента 4268 изложены ниже в Таблице 34.

Таблица 34

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

Последовательность 4268-TCR3, которую выделяли у пациента 4268, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 157), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 158), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 159), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 160), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 161) и шестая подчеркнутая область представляет собой

CDR3бета (SEQ ID NO: 162). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 163) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 164) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 165) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 166) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4268-TCR3

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MASAPISMILAMIFTL^{SGLR}AQSVAQPEDQVNVAEGNPILTVKCTYSVSGN**NPYLF**WYV
QYPNRGLQFLLKYITGDNIYKGSYGFEAEFNKSQTSFHLKKPSALVSDSALYFC^{AVR}
D**NSGG**SNYKI**TEGKGT**ILTVNPNIQNPEPAVYQIKDPRSQDSTICLFDPFDSQINVPKT
MESGTTTDDKCVLDMKAMDSKSN^{GAL}WFSNQTSTTCQDIFKETNATYPSSDVP^{CDAT}LT
KSFETDMNLNFQNIIVVIRILLIKVAGFNLMTLRLWSSRAKRSCSGATNFSILKQAG
DVETENPGPMHTRILCWAALCLIGAEITEAGVAQSPRYKIEKQSVAFWCNPISGH
ATLYWYQQHGGPKILLIQEQNGVVDSDQLPKDRFSAERIKGV DSTILKIQPAKLEU
SAVYL**CASSLGQQGT**IQYFGPGTRILVIEDIRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCL
ARGFFPDHVELSWVVGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFWINPRNIHR
CQVQPTIGLSEEDKWPEGSPKPYTQNISAEAWGRADC^{GITS}ASYQQGVLSATILYEILLGKA
TLYAVLUSTLVMMAMFKRKNS (SEQ ID NO: 580)

Статистические данные по TCR 4268-TCR3 Пациента 4268 изложены ниже в Таблице 35.

Таблица 35

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

Последовательность 4268-TCR4, которую выделяли у Пациента 4268, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 167), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 168), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 169), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 170), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 171) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 172). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 173) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 174) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 175) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 176) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4268-TCR4

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAIIILVPAPQVIFTLGGTRAQSVTQLDSQVPVFEEAPVFEIRCNYSSSSVSYLFWYVQ
 YPNQGLQILLLKYISGSTLYFSINGFEAFENKSSQTSFIILRKPSVHISDTAEYPCAVRGSS
 GLYKYIFGTGTRLKVLAMIQNPPEPIVYQLKDPQRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKIMESGTF
 ITDKCVLDWKAMDSKSNQAIWSNQTSFTCQDIFKEFNATYPSSDVPICDATTLEKSFETD
 MNINPQNLIVIVIRILLKYAGFNLLMTLRLWSSRAKRSCSGATNFSLLKQAGDVFEEN
 PGPMMHRIILCRVAFCFIAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVLEFCVQDMDHENMF
 WYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKKEKGDIPGYSYSREKKERFSIILESASTNQTSMYL
 CASKGIDQNTLAEFCQGTRLTIVVEDIRNVTPPKYSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFF
 PDHFEISWWWNGKEFHSIGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWIINPRNHFRCCVQV
 HGLSEEDKWPFGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATHLYEILLGKATLYAVL
 VSTLVFMAMVRRKNS (SEQ ID NO: 581)

Статистические данные по TCR 4268-TCR4 Пациента 4268 изложены ниже в Таблице 36.

Таблица 36

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

Последовательность 4268-TCR5, которую выделяли у Пациента 4268, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 177), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 178), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 179), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 180), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 181) и шестая подчеркнутая область представляет собой

CDR3бета (SEQ ID NO: 182). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 183) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 184) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 185) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 186) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4268-TCR5

Распознавание мутации p53: R248Q

Способ: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAGVFLLYVSMKMGOTTGQNIHQPTMTATEGAIVQINCTYQITSGENGLFWYQQH
AGEAPTFLSYNVLDGLEBKGRFSSELSRSKGYSYLLLELOMKDSASYLC AVRDLQT
GANNLEFGTGTRLTVIPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLETTDFDSQINYPKTMESGTFI
TDKCYLDMKAMDSSKNGATAWSNQTSFTUQDIFKETNATYPSSDVPCDALTLEKSFETDM
NUNFQNLIVIVLRILLKVAGFNILMTLRWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENP
GPMHIRLLCRVAFCEFLAVGLVIDVKVTQSSRYLVKRTGUKVFLECVQDMDIENMFW
YRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKKEKGDIPGYSVSREKKERFSLIJESASTNQTSMYLCA
SSLTGTTEAFEGQGTTRLTVVEDLRNFTTPKVSLEFESKAEIANKQKATLYCLARGFFPD
IVELSWWVNGKEVVISGYCTDPQAYKESNYSYCTSSRLRVSATFWHNPNNHRCQVQFTIG
LSEEDKWPPEGSPKPYTONISAEAWGRADUGITSASYQQGVLSATHLYEILLGKATLYAVLVST
LPPMAMFKRKNS (SEQ ID NO: 582)

Статистические данные по TCR 4268-TCR5 Пациента 4268 изложены ниже в Таблице 37.

Таблица 37

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

Пример 9

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

Эксперименты проводили, как описано для Фиг. 31-34 и 53-55 для Пациента 4266.

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

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

цитометрии после гейтирования по лимфоцитам → живым клеткам (PI-негативным) → CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на Фиг. 34.

Клетки Cos7 ($2,5 \times 10^4$ на лунку) высевали в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов. На следующий день клетки совместно трансфицировали индивидуальными аллелями HLA от пациента 4266. На следующий день в клетки под действием импульсов не вводили пептид, вводили ДМСО, пептид дикого типа p53-R248 SSCMGGMNRR (SEQ ID NO: 590) или мутантный пептид p53-R248W SSCMGGMNWR (SEQ ID NO: 591) в течение 2 часов при 37°C в количестве 1 мкг/мл. Культуры TIL от пациента 4266 (10^5) добавляли в лунки и совместно культивировали в течение ночи при 37°C. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов → живых клеток (PI-негативных) → CD3+ (Т-клеток) → CD4-CD8+. Результаты показаны на Фиг. 53.

Т-клетки, экспрессирующие имитацию (без TCR), 4266-TCR1, 4266-TCR2, 4266-TCR3 или 4266-TCR4 с предполагаемой специфичностью к p53-R248W, идентифицируемой у 4266-TIL, совместно культивировали с аутологичными APC, в которые под действием импульсов вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды из 25 аминокислот, состоящие из последовательности WT p53-R248 или мутантной последовательности p53-R248W. Только среды и PMA и Иномицин представляли собой отрицательный и положительный контроли, соответственно. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Экспрессию 4-1 BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам → живым клеткам (PI-негативным) → CD3+ (Т-клеткам) → CD4-CD8+. Результаты показаны на Фиг. 54.

Линию опухолевых клеток (TC – от англ. tumor cell) создавали из ксенотрансплантированного фрагмента опухоли, иссеченного у Пациента 4266, затем серийно пропускаемого через мышей с ослабленным иммунитетом (ТС#4266). ТС#4266 совместно культивировали с Т-клетками (10^5), экспрессирующими имитацию (без TCR) или p53-R248W-специфичные TCR (4266-TCR2, 4266-TCR3 или 4266-TCR4) в течение ночи при 37°C. Клетки ТС#4266 или инкубировали без всего, или с W6/32 pan-HLA Класс-I-специфичным блокирующим антителом, или с IVA12 pan-HLA Класс-II-специфичным блокирующим антителом или с мутантным пептидом p53-R248W SSCMGGMNWR (SEQ ID NO: 591) в течение 2 часов при 37°C. Антитела содержались в совместной культуре в конечной концентрации 5 мкг/мл. Пептид инкубировали в количестве 1 мкг/мл, и избыток пептида смывали после инкубации. Только среды (без TC) и PMA и Иномицин представляли собой отрицательный и положительный контроли, соответственно. Экспрессию 4-1BB оценивали

посредством проточной цитометрии после гейтирования в отношении лимфоцитов → живых клеток (PI-негативных) → CD3⁺ (Т-клеток) → CD4-CD8⁺. Результаты показаны на Фиг. 55.

Последовательность 4266-TCR1, которую выделяли у Пациента 4266, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 97), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 98), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 99), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 100), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 101) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 102). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 103) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 104) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 105) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 106) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4266-TCR1

Распознавание мутации p53: R248W

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MALLLVPAFQVIFTLLGGFRAQSVTQLDSQVPVFEAPVELRCNYSSSVSVYLFWYVQ
 YPNQGLQLLLKYLSGSTLVESINGFEAEFNKSQTSFHLRKPSVHISDTAEYFCAYSDL
VRDDKIEGCKGTRIHLPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTF
 ITDKCVLDMKAMDSSKNGALAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATHLEKSFED
 MNLFQNLIVIVLRILLKVGAFNLIJMTLRILVSSRAKRSGSGATNYSLLKQACDVEEN
 PGPMLIIGLCCVAFSLWASPVNAGVTQTPKEQVLKTCQSMTLQCAQDMNHNSMY
 WYRQDPGMGLRIYYSA**SEGIT**TDKGEVPNGYNVSRLNKREPSLRLESAAPSQTSVYF
CASIGGFEAEFGQGTRIITVVVEDIRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLYCLARGFFPDH
 VELSWIVNGKEVHISGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLVSAFWINPRNHFRCQVQFHGL
 SEEDKWPEGSPKPVVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATHYELLGKATLYAVLFSTL
 VVMAMVKKKN5 (SEQ ID NO: 583)

Статистические данные по TCR 4266-TCR1 Пациента 4266 изложены ниже в Таблице 38.

Таблица 38

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

Последовательность 4266-TCR2, которую выделяли у Пациента 4266, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 107), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 108), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 109), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 110), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 111) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 112). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 113) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета

(SEQ ID NO: 114) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 115) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 116) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4266-TCR2

Распознавание мутации p53: R248W

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAQVFLLYVSMKMGCTTGQNI~~DQ~~TEMTATEGAIVQINCTYQTSGENGLFWYQQH
AGIAPTFLSYNVI~~DGLEEKGR~~SSFLSRSGYSYLLKELQMKDSASYLC~~AVYTGGF~~
KTI~~FG~~ACTRI~~FVKAMIQNPEPAVYQ~~LK~~DP~~RSQ~~DS~~TL~~CL~~FD~~DS~~QINVPK~~TM~~SG~~TH~~TD
KC~~Y~~LD~~MD~~KAM~~DS~~K~~NG~~AIA~~WS~~NQ~~TS~~TCQ~~DI~~F~~K~~ET~~N~~ATYPSSD~~Y~~PC~~DA~~TL~~E~~K~~S~~F~~E~~TT~~DM~~NL
NFQ~~N~~LL~~P~~TVL~~R~~ILL~~K~~VAG~~F~~NLL~~M~~TL~~R~~U~~W~~SS~~R~~AK~~R~~SGSGATN~~F~~SLI~~K~~QAGDVEEN~~P~~GI
MI~~T~~RL~~C~~WAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIEKROSVAFWCN~~P~~ISGHATFLYWYQQ
ILGQ~~Q~~PKLLIQ~~F~~Q~~N~~NGVVD~~D~~SQ~~L~~PK~~D~~RFSAERI~~K~~GVDSTLKIQ~~P~~AKLEDSAVYL~~C~~AS
NLGGG~~S~~TD~~T~~QY~~F~~GP~~G~~TRL~~T~~VLE~~D~~LR~~N~~VTPPK~~V~~SL~~F~~EP~~S~~KAEIANKQKAT~~L~~VCLARG~~F~~FP
DI~~V~~EL~~S~~W~~W~~FN~~G~~K~~E~~V~~I~~SG~~F~~CT~~D~~PQAYK~~F~~S~~N~~YS~~C~~LSS~~R~~IR~~V~~SATFWIN~~P~~R~~N~~TH~~P~~RC~~V~~Q~~F~~FI
GL~~S~~ED~~K~~W~~E~~GSPK~~P~~VTQ~~N~~ISAEAWGRADCG~~I~~TSASYQ~~Q~~GVLSATH~~L~~YHLLGKAT~~L~~YAVLV
STL~~V~~FMAM~~V~~K~~R~~K~~N~~S (SEQ ID NO: 584)

Статистические данные по TCR 4266-TCR2 Пациента 4266 изложены ниже в Таблице 39.

Таблица 39

Параметр	#	Частота
Общее число лунок	96	100%

CDR3альфа	21	21,9%
CDR3бета	18	18,8%
Пары 4266-TCR2	13	13,5%
Общее число спаренных TCR	53	55,2%

Последовательность 4266-TCR3, которую выделяли из Пациента 4266, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 117), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 118), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 119), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 120), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 121) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 122). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 123) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 124) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 125) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 126) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4266-TCR3

Распознавание мутации p53: R248W

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

Распространенность TCR среди всех спаренных TCR: 34,0% (наблюдали 18 раз из 53 пар) Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAGVFLLYVSMKMGGTTGQNI^{DQPT}EMTAT^{EG}AI^{VQ}IN^{CT}YQ^{TS}GENGLFWYQQH
AGEAP^{TF}LSYN^{VLD}GL^{LUK}GR^{SS}FLSR^{SG}YSYLL^{KE}LQ^{MD}SA^{SY}LCA^{FY}YGG^S
QGNLHFGK^GTK^LSVK^{PN}IQ^{NP}EPA^{VT}QLK^{DP}RSQ^{DS}TL^{CL}FT^{TD}FD^{SQ}IN^{VP}KTMESG^{TF}TT

DKCVLD^{MD}KAM^{DS}KSNG^{AI}AW^{SN}Q^{TS}FE^QDI^{FK}ET^{NAT}YP^{SD}VP^{CD}AT^{TE}KSF^{FT}DMN
LNFQ^NLL^VVL^RILL^LK^FAG^{FN}LL^{MT}RL^WSS^{RA}K^{RS}SG^{SG}AT^NES^{LL}KQ^{AG}DVE^{EN}PG
PMH^{TR}LL^CW^VVL^GEL^GTD^{HT}GAG^{VS}QSP^{RY}KVAK^{RG}QDV^{AE}RC^{DP}IS^GH^VS^LFWY
QQALGQ^{CP}EFL^{TY}FQ^{NE}AQ^{LD}KS^{GI}PS^{DR}FA^{ER}PEG^{SV}ST^LKI^{QR}TQ^QEDSA^{VY}LC
AS^{FG}SGSTDT^{QY}EG^{PC}IR^LTV^LED^{LR}N^{VT}PP^{KV}SL^{FE}PS^{KA}EL^{AN}KQ^{KA}TL^{VC}LARG^{FF}
PD^{IV}EL^{SW}W^NG^KE^YHS^GV^{CT}DP^QAY^{KE}SN^{YS}YC^{LS}RL^{RV}SA^{TF}W^{HI}N^{PR}NI^{FR}CQ^{VQ}F
HGL^{SE}ED^{KW}PEG^{SP}K^PVT^QNIS^{AE}AW^{GR}AD^{CG}HS^{AS}YQ^{QG}VLS^{AT}HL^{YE}LL^{OK}AT^{LY}AV^L
VST^{LP}FM^{AM}V^KRR^{KN}S (SEQ ID NO: 385)

Статистические данные по TCR 4266-TCR3 Пациента 4266 изложены ниже в Таблице 40.

Таблица 40

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

Последовательность 4266-TCR4, которую выделяли из Пациента 4266, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 127), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 128), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 129), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 130), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 131) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 132). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 133)

включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Вариабельная область цепи бета (SEQ ID NO: 134) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 135) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 136) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4266-TCR4

Распознавание мутации p53: R248W

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAGVFLLYVSMKMGCTTGQNIHQPTMTATEGAIVQENCTYQTSGFNGLFWYQQH
AGEAIFTELSYNYLDGLEIKGRFSSFLSRSGYSYLLKELQMKDSASYLCAYYPGGS
QGNLIEGKGTCLSVKPNIQNPEPAFYQLKIDPRSQDSTLCIFTDHDSQINVPKTMESGTFIT
DKCYLDMKAMDSEKSNAGIAWBNQTSFTCQDIEKETNATYPSSDVPCDAILTEKSEETDMN
LNFQNLIVIVLRILLKVAGFNILMTIRLWSSRAKRSGSGATNFSLLKQACDVEENPG
PMHTRLI CWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIEKQSVAFWCNPISGHATLYWYQ
QHGGGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCA
SSLGTGSTDTOYFGPGTRILVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATVCLARGFP
DHVELSWWFNGKEVHISGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRIIFRCQVQFH
GLSEEDKWPEGSPKPVITQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV
STLVVMAVMVKRKNS (SEQ ID NO: 586)

Статистические данные по TCR 4266-TCR4 Пациента 4266 изложены ниже в Таблице 41.

Таблица 41

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

Пример 10

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

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

Таблица 42

#	Тип опухоли	Пациент	P53 mut	Скрининг Т-клеток	HLA
1	Опухоль желудка	3446	G245S	н./д.	н./д.
2	Желудочно-пищеводная опухоль	3788	Y220C	N	н./д.
3	Опухоль прямой кишки	3942	R273C	н./д.	н./д.
4	Опухоль толстой кишки	4023	R282W	Y	Класс-II
5	Опухоль толстой кишки	4095	R282W	н./д.	н./д.
6	Опухоль яичника	4127	G245S	Y	DRB3*02:02
7	Опухоль молочной железы	4130	R273H	Y	Класс II
8	Опухоль толстой кишки	4141	R175H	Y	A*02:01
9	Опухоль яичника	4149	Y220C	Y	DRB3*02:02

10	Опухоль толстой кишки	4160	R273H	N	н./д.
11	Меланома	4165	G245D	N	н./д.
12	Опухоль толстой кишки	4166	R248W	н./д.	н./д.
13	Опухоль прямой кишки	4171	R248Q	N	н./д.
14	Меланома	4187	R273H	N	н./д.
15	Опухоль толстой кишки	4196	R175H	Y	A*02:01
16	Опухоль толстой кишки	4213	R248Q	Y	оба
17	Опухоль толстой кишки	4217	R175H	N	н./д.
18	Холангиокарцинома	4220	R248Q	N	н./д.
19	Опухоль прямой кишки	4235	R273C	N	н./д.
20	Опухоль толстой кишки	4238	R248Q	Y	Класс-I
21	Опухоль толстой кишки	4244	R282W	N	н./д.
22	Опухоль толстой кишки	4245	R248Q	N	н./д.
23	Опухоль толстой кишки	4252	R175H	N	н./д.
24	Меланома	4253	R248W	Y	неизвестно
25	Опухоль толстой кишки	4254	R273H	N	н./д.
26	Опухоль толстой кишки	4257	R248W	N	н./д.
27	Опухоль эндометрия	4258	R273H	N	н./д.
28	Опухоль толстой кишки	4259	Y220C	Y	A*0,2:01, DRB1*04
29	Опухоль толстой кишки	4266	R248W	Y	A*68:01

	кишки				
30	Опухоль толстой кишки	4268	R248Q	Y	оба
31	Опухоль поджелудочной железы	4270	R282W	Y	неизвестно
32	Опухоль прямой кишки	4273	R248W	Y	DPB1*02:01
33	Опухоль прямой кишки	4274	R175H	н./д.	
34	Опухоль толстой кишки	4283	R175H	N	н./д.
35	Опухоль толстой кишки	4285	R175H	Y	DRB1*13:01
36	Опухоль толстой кишки	4287	R248W	N	н./д.
37	Опухоль толстой кишки	4312	R175H	N	н./д.

н./д. обозначает нет данных; N обозначает негативные; Y обозначает подтвержденные реактивные; TBS обозначает подлежит скринингу.

Пример 11

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

Краткая информация о лечении пациентов TIL, реактивными в отношении мутации p53, предоставлена в Таблице 43.

Таблица 43

#	Тип опухоли	Пациент	p53mut	Скрининг инфузионного пакета	Общее # клеток ($\times 10^9$)	% p53-реактивных TIL	# p53-реактивных TIL ($\times 10^9$)	Ответ	Продолжительность (месяцы)
1	Опухоль яичника	4127	G245S	Y	143	2,8	4,0	P.R	4
2	Опухоль	4141	R175H	Y	69	0,8	0,6	N.R	-

	толстой кишки							.	
3	Опухоль толстой кишки	4196	R175H	Y	92	3,3	3,0	N.R	-
4	Опухоль яичника	4149	Y220C	Y	37	11,1	4,1	N.R	-
5	Опухоль толстой кишки	4213	R248Q	TBS	33			P.R	4
6	Опухоль толстой кишки	4238	R248Q	TBS	57			N.R	
7	Опухоль толстой кишки	4266	R248W	Y	104	50,8	52,8		
8	Опухоль толстой кишки	4268	R248Q	**TBS					
9	Опухоль прямой кишки	4273	R248W	**Y	117	6,8	8,0	N.R	-
10	Толстой кишки	4285	R175H	Y	69,6	2,4	1,7	N.R	-

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

Пример 12

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

Аутологичные APC трансфицировали TMG, кодирующим нерелевантные мутации, последовательность WT p53 или мутантную последовательность p53, включающую R175H. Только среды и PMA и иономицин представляли собой отрицательный и положительный контроли, соответственно. На следующий день TIL от пациента 4141 (культура фрагмента 12) совместно культивировали в течение

ночи при 37°C с TMG-трансфицированными APC. Секрецию IFN- γ оценивали посредством ELISPOT. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам $\rightarrow$ живым клеткам (PI-негативным) $\rightarrow$ CD3+ (Т-клеткам) $\rightarrow$ CD4-CD8+. Результаты показаны на Фиг. 38.

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

Т-клетки, экспрессирующие имитацию (без TCR) или 4141-TCR1a2, совместно культивировали с опухолевыми клетками T2 (экспрессирующими HLA-A*02:01). В Т2-клетки под действием импульсов в течение 2 часов при 37°C вводили носитель пептида (ДМСО) или очищенные (выше 95% посредством ВЭЖХ) пептиды, состоящие из пептида WT p53-R175 HMTEVVRRC (SEQ ID NO: 532) или мутантного пептида p53-R175H HMTEVVRHC (SEQ ID NO: 530). Только среды и РМА и Иномицин представляли собой отрицательный и положительный контроли, соответственно. Совместное культивирование проводили в течение ночи при 37°C. Секрецию IFN- γ оценивали посредством ELISA. Результаты показаны на Фиг. 40.

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

Последовательность 4141-TCR1a2, которую выделяли у Пациента 4141, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 467), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 468), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 469), четвертая подчеркнутая область представляет

собой CDR1бета (SEQ ID NO: 470), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 471) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 472). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 473) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 474) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 475) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 476) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся С-концом.

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

Название TCR: 4141-TCR1a 2

Распознавание мутации p53: R175H

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MASIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPS^{TLSVQEGDS}AVIKCTYSD^{SASNYFPWYKQ}
ELGKGPQI^{IIDIRSNVGEKKDORIAVTLNKTAKHFS}LHITETQ^{PEDSAVYFCAASKSAI}
MVVIQTSSSLELALCLISSQVMQNPEPAVYQIKDPRSQDSTLCIFTDFDSDQINVPKTMK
SGITTTDKCVLDMKAMDSKSNGLAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLAEKSF
ETDAMNINFNQNLVIVLRHLLKVAGFNLLMTLRWSSRAKRSGSGA'UNFSLKQAGDV
EENPGPMHPQLIGYVVICLLGAGPLEAQVTQNPRLITVTGKKLTVTCSQNMNHEY
MSWYRQDPGLGLRQTYYSMNVEYTDKGDVPEGYKVSRKEKRNFPLIFSPSPNQTSL
YFCASSIQQGAIDIQYEGPGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPSKABIANKQKATLVCLARG
FFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKFSNYSYCLSSRLRFSATFWHNPRNIIFRCQV
QFHGLSEEDKWPEGSPKPYTQNISAEAWGRADCGTSASYQQGVLSATILYEHJGKATLYA
VLVSTLVVMAMVKRKNS (SEQ ID NO: 587)

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

Таблица 44

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

Пример13

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

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

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

В аутологичные антиген-презентирующие клетки под действием импульсов вводили ДМСО, пептид WT p53-Y220 RNTFRHSVVVPYE (SEQ ID NO: 533) или мутантный пептид p53-Y220C RNTFRHSVVVPCE (SEQ ID NO: 534) в течение 2 часов при 37°C. Избыток пептида смывали. TIL от пациента 4259 (культура фрагмента 6) со специфичностью к p53-Y220C совместно культивировали в течение

ночи при 37°C с APC, в которые под действием импульсов вводили пептид. Экспрессию 4-1BB оценивали посредством проточной цитометрии после гейтирования по лимфоцитам → живым клеткам (PI-негативным) → CD3+ (Т-клеткам). Результаты показаны на Фиг. 44.

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

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

Таблица 45

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

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

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

Последовательность TCR 4259-F6-TCR, которую выделяли у Пациента 4259, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 477), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 478), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 479), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 480), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 481) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 482). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 483) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 484) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 485) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 486) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4259-F6-TCR

Распознавание мутации p53: Y220C

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MASLRVLLVILWILQLSWVWSQQKLEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCITYSDRGSSQSF~~FW~~
 YRQYSQKSP~~ELIMF~~Y~~SNQ~~DKEDGRFTAQLNKASQYVSILJRDSQPSDSATYLC~~AWN~~
 SGGSNYKLT~~EGKGTLLTVNPMIQNP~~EP~~AVYQ~~LKD~~PRSQD~~STLC~~LTDFDSQ~~IN~~YPT~~MT~~ES~~
 GT~~FTTD~~KCVLD~~MKAMD~~SK~~SNQ~~AI~~AWSNQ~~TS~~FTCQD~~IP~~KET~~NAT~~YPS~~SD~~VPC~~DI~~LT~~TK~~SFE~~
 TDMNI~~NPQNLLFIVLRHLLK~~VAG~~ENTLMT~~RL~~WSS~~RA~~KRS~~GSGA~~TNFS~~LLKQAGDVE
ENPGPMHLGILCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQSMTLLCAQDMNHEY
 MYWYRQDPG~~MGIRLIHYSV~~GEGITAKGEVPDGYNVSRUKKQNFLLGLESAAPSQTS
 VYFCASSYSQA~~WGPQ~~HFGDGT~~RLSIL~~EDLRN~~VTPPKV~~SLFEP~~SKAEI~~ANKQKATLVCL
 ARG~~TFPDH~~VELSW~~VNGKEV~~HSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRYSATFW~~HNPRNHFR~~
 CQVQ~~FTIGLSE~~EDK~~WPEG~~SPK~~PFTQ~~MSAEAWGRADCGITSASYQ~~QGVLS~~ATH~~YEH~~L~~GKA~~
 TLYAVLVSTLVVMAMVKKRKN~~S~~ (SEQ ID NO: 588)

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

Таблица 46

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

Пример 14

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

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

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

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

В аутологичные APC под действием импульсов вводили пептиды из 15 аминокислот из последовательности p53-R175H (аминокислотная замена, подчеркнутая в Таблице 45) с перекрыванием 14 аминокислот. TIL от пациента 4285 (культуры фрагментов 10, 6 и 9) со специфичностью к p53-R175H совместно культивировали в течение ночи при 37°C с APC, в которые под действием импульсов вводили пептид. ДМСО представлял собой носитель пептида. Секрецию IFN-γ оценивали, используя анализ ELISPOT. Результаты показаны в Таблице 47.

Таблица 47

		Результат ELISPOT, позитивный (+) или негативный (-) в отношении продукции IFN- γ		
Пептид	SEQ ID NO:	4285-F10	4285-F6	4285-F9
Отсутствие (носитель)	Неприменимо	-	-	-
YKQSQNHMT EVVR HC PH	519	-	-	-
KQSQNHMT EVVR HC PH	520	-	-	!
QSQNHMT EVVR HC PH	521	-	!	+
SQNHMT EVVR HC PH	522	+	!	!
QNHMT EVVR HC PH	523	+	!	-
NHMT EVVR HC PH	524	+	!	!
MT EVVR HC PH	525	+	!	+
TEVVR HC PH	526	!	+	!
EVVR HC PH	527	+	!	+
VVR HC PH	528	!	-	-
VR HC PH	529	+	!	-

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

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

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

Последовательность 4285-TCR1, которую выделяли у Пациента 4285, изложена ниже. Начиная с N-конца, первая подчеркнутая область представляет собой CDR1альфа (SEQ ID NO: 487), вторая подчеркнутая область представляет собой CDR2альфа (SEQ ID NO: 488), третья подчеркнутая область представляет собой CDR3альфа (SEQ ID NO: 489), четвертая подчеркнутая область представляет собой CDR1бета (SEQ ID NO: 490), пятая подчеркнутая область представляет собой CDR2бета (SEQ ID NO: 491) и шестая подчеркнутая область представляет собой CDR3бета (SEQ ID NO: 492). Область, выделенная жирным шрифтом, представляет собой линкер (SEQ ID NO: 26). Начиная с N-конца, первая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи альфа (SEQ ID NO: 23) и вторая выделенная курсивом область представляет собой константную область цепи бета (SEQ ID NO: 25). Варибельная область цепи альфа (SEQ ID NO: 493) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи альфа. Варибельная область цепи бета (SEQ ID NO: 494) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся сразу перед началом константной области цепи бета. Полноразмерная цепь альфа (SEQ ID NO: 495) включает последовательность, начинающуюся с N-конца и заканчивающуюся сразу перед началом линкера. Полноразмерная цепь бета (SEQ ID NO: 496) включает последовательность, начинающуюся сразу после линкера и заканчивающуюся C-концом.

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

Название TCR: 4285-TCR1

Распознавание мутации p53: R175H

Способ скрининга: универсальный скрининг мутаций «горячих точек» p53

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

Способ идентификации TCR: ОТ-ПЦР на одной клетке

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

Ориентация TCR: альфа-бета

Экспрессионный вектор: SB транспозон

MAKNPLAAPLLILWFHLDGVSSILNVFOSPOSUHVQEGDSTNFTCSFPSSNEFYALHWY
 RWETAKSPFALFVWJLNGDEJKKGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPTDSATYLCAII
TGGGNKLTFGTGTQLKVELNIQNPEDVYQLKDPKRSQDSTLCLETFDPSQINPKFMES
 GTFITDKCVLDAMKAMDSSKSNGLAWSNQTSFTQDDIFKETNATTPSSDVPDQATLTEKSEF
 TDMNLNPNQNLLEFVLRHLLKFAGFNLLMTLRWSSRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVE
ENPGPMHILGLLCCGAFSLIWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQSMTLLCAQDMNHEY
 MYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEETAKGEVPDGYNVSRLLKKQNFILGLESAAPSQTS
 VYFCASRIQGWNSPLHFONGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLA
 RGFFPDHIVELSWVNGKEVHSQFCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHINPRNIHRC
 QVQFHIGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCUITSASYQQGVLSATHYELLGKAT
 LYAVLVSTLYVMAMVKKKNS (SEQ ID NO: 589)

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

Таблица 48

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

Пример 15

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

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

Таблица 49

Линия клеток	HLA-A*0201, сообщен.	HLA-A2 согласно FACS MFI (изотип MFI)	P53 R175H, сообщен.	Оценка # копий P53 R175H на 1e5 GAPDH
KLE	+	+ 46733 (2038)	+	167
SKUT1	+	- 1009 (1009)	+	308
TYKNU	+	+ 6556 (1537)	+	175
TYKNU CpR	+	+ 8611 (1511)	+	179
VMRCLCD	+	+ 8340 (949)	+	43

SKBR3	+	Слабый 3414 (2546)	+	99
CEM/C1	-	- 387 (330)	+	138
HCC1395	-	- 1743 (1537)	+	105
KMS26	+	+ 57284 (679)	+	87
AU565	+	Слабый 3839 (1870)	+	80
LS123	-	- 1916 (2009)	+	190
CCRF CEM	+	- 253 (177)	+	149
SAOS2 R175H	+	+ 51049 (1417)	+	н.п.
SAOS исходн. среды	+	+ 40003 (1272)	-	22 (предел обнаружения)
Неприменимо (н.п.)	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.
PMA/Io	н.п.	н.п.	н.п.	н.п.

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

Таблица 50

Линия клеток	TP53 TCR AV38/BV10 CD8+	TP53 TCR AV12/BV6 CD8+	TP53 TCR AV6/BV11 CD8+	Имитация TCR
KLE	<u>741</u>	110	<u>71</u>	51
SKUT1	28	24	26	38
TYKNU	196	41	27	33
TYKNU CpR	<u>298</u>	65	34	24
VMRCLCD	23	22	23	23
SKBR3	26	23	24	26
CEM/C1	26	23	22	28

HCC1395	25	23	26	24
KMS26	<u>472</u>	<u>168</u>	<u>95</u>	23
AU565	21	30	25	28
LS123	25	23	25	26
CCRF CEM	23	23	30	30
SAOS2 R175H	<u>>2000</u>	<u>1064</u>	<u>190</u>	24
SAOS исходн.	29	26	26	25
среды	25	26	26	25
PMA/lo	<u>1166</u>	<u>485</u>	<u>98</u>	<u>161</u>

Таблица 51

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

Пример16

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

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

Таблица 52

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

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

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

Предпочтительные воплощения данного изобретения описаны в данном документе, включая наилучший способ, известный авторам изобретения, для осуществления изобретения. Изменения данных предпочтительных воплощений

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный или очищенный Т-клеточный рецептор (TCR), обладающий антигенной специфичностью к мутантному человеческому р53.

5

2. TCR по п. 1, где TCR обладает антигенной специфичностью к человеческому р53 с мутацией в положении 175, 220, 245 или 248 SEQ ID NO: 1.

3. TCR по п. 1, где TCR обладает антигенной специфичностью к человеческому р53 с одной из следующих мутаций человеческого р53: R175H, Y220C, G245S, R248Q или R248W.

10

4. TCR по любому из пп. 1-3, где TCR содержит следующие аминокислотные последовательности:

15

(1) все из SEQ ID NO: 27 -32;

(2) все из SEQ ID NO: 37 -42;

(3) все из SEQ ID NO: 47 -52;

(4) все из SEQ ID NO: 57-62;

(5) все из SEQ ID NO: 67 -72;

20

(6) все из SEQ ID NO: 77 -82;

(7) все из SEQ ID NO: 87-92;

(8) все из SEQ ID NO: 97-102;

(9) все из SEQ ID NO: 107-112;

(10) все из SEQ ID NO: 117-122;

25

(11) все из SEQ ID NO: 127-132;

(12) все из SEQ ID NO: 137-142;

(13) все из SEQ ID NO: 147-152;

(14) все из SEQ ID NO: 157-162;

(15) все из SEQ ID NO: 167-172;

30

(16) все из SEQ ID NO: 177-182;

(17) все из SEQ ID NO: 187-192;

(18) все из SEQ ID NO: 197-202;

(19) все из SEQ ID NO: 207-212;

(20) все из SEQ ID NO: 217-222;

35

(21) все из SEQ ID NO: 227-232;

(22) все из SEQ ID NO: 237-242;

(23) все из SEQ ID NO: 247-252;

(24) все из SEQ ID NO: 257-262;

- (25) все из SEQ ID NO: 267-272;
 (26) все из SEQ ID NO: 277-282;
 (27) все из SEQ ID NO: 287-292;
 (28) все из SEQ ID NO: 297-302;
 5 (29) все из SEQ ID NO: 307-312;
 (30) все из SEQ ID NO: 317-322;
 (31) все из SEQ ID NO: 327-332;
 (32) все из SEQ ID NO: 337-342;
 (33) все из SEQ ID NO: 347-352;
 10 (34) все из SEQ ID NO: 357-362;
 (35) все из SEQ ID NO: 367-372;
 (36) все из SEQ ID NO: 377-382;
 (37) все из SEQ ID NO: 387-392;
 (38) все из SEQ ID NO: 397-402;
 15 (39) все из SEQ ID NO: 407-412;
 (40) все из SEQ ID NO: 417-422;
 (41) все из SEQ ID NO: 427-432;
 (42) все из SEQ ID NO: 437-442;
 (43) все из SEQ ID NO: 447-452;
 20 (44) все из SEQ ID NO: 457-462;
 (45) все из SEQ ID NO: 467-472;
 (46) все из SEQ ID NO: 477-482; или
 (47) все из SEQ ID NO: 487-492.
- 25 5. TCR по любому из пп. 1-4, где TCR содержит следующие аминокислотные последовательности:
- (1) обе из SEQ ID NO: 33-34;
 (2) обе из SEQ ID NO: 43-44;
 (3) обе из SEQ ID NO: 53-54;
 30 (4) обе из SEQ ID NO: 63-64;
 (5) обе из SEQ ID NO: 73-74;
 (6) обе из SEQ ID NO: 83-84;
 (7) обе из SEQ ID NO: 93-94;
 (8) обе из SEQ ID NO: 103-104;
 35 (9) обе из SEQ ID NO: 113-114;
 (10) обе из SEQ ID NO: 123 -124;
 (11) обе из SEQ ID NO: 133 -134;
 (12) обе из SEQ ID NO: 143 -144;

- (13) обе из SEQ ID NO: 153 -154;
 (14) обе из SEQ ID NO: 163 -164;
 (15) обе из SEQ ID NO: 173 -174;
 (16) обе из SEQ ID NO: 183 -184;
 5 (17) обе из SEQ ID NO: 193 -194;
 (18) обе из SEQ ID NO: 203-204;
 (19) обе из SEQ ID NO: 213-214;
 (20) обе из SEQ ID NO: 223-224;
 (21) обе из SEQ ID NO: 233 -234;
 10 (22) обе из SEQ ID NO: 243 -244;
 (23) обе из SEQ ID NO: 253 -254;
 (24) обе из SEQ ID NO: 263 -264;
 (25) обе из SEQ ID NO: 273 -274;
 (26) обе из SEQ ID NO: 283 -284;
 15 (27) обе из SEQ ID NO: 293 -294;
 (28) обе из SEQ ID NO: 303 -304;
 (29) обе из SEQ ID NO: 313 -314;
 (30) обе из SEQ ID NO: 323 -324;
 (31) обе из SEQ ID NO: 333-334;
 20 (32) обе из SEQ ID NO: 343-344;
 (33) обе из SEQ ID NO: 353-354;
 (34) обе из SEQ ID NO: 363 -364;
 (35) обе из SEQ ID NO: 373 -374;
 (36) обе из SEQ ID NO: 383-384;
 25 (37) обе из SEQ ID NO: 393-394;
 (38) обе из SEQ ID NO: 403-404;
 (39) обе из SEQ ID NO: 413-414;
 (40) обе из SEQ ID NO: 423-424;
 (41) обе из SEQ ID NO: 433-434;
 30 (42) обе из SEQ ID NO: 443-444;
 (43) обе из SEQ ID NO: 453-454;
 (44) обе из SEQ ID NO: 463-464;
 (45) обе из SEQ ID NO: 473-474;
 (46) обе из SEQ ID NO: 483-484; или
 35 (47) обе из SEQ ID NO: 493-494.

6. TCR по любому из пп. 1-5, где TCR содержит следующие аминокислотные последовательности:

- (1) обе из SEQ ID NO: 35-36;
(2) обе из SEQ ID NO: 45-46;
(3) обе из SEQ ID NO: 55-56;
(4) обе из SEQ ID NO: 65-66;
5 (5) обе из SEQ ID NO: 75-76;
(6) обе из SEQ ID NO: 85-86;
(7) обе из SEQ ID NO: 95-96;
(8) обе из SEQ ID NO: 105-106;
(9) обе из SEQ ID NO: 115-116;
10 (10) обе из SEQ ID NO: 125-126;
(11) обе из SEQ ID NO: 135-136;
(12) обе из SEQ ID NO: 145-146;
(13) обе из SEQ ID NO: 155-156;
(14) обе из SEQ ID NO: 165-166;
15 (15) обе из SEQ ID NO: 175-176;
(16) обе из SEQ ID NO: 185-186;
(17) обе из SEQ ID NO: 195-196;
(18) обе из SEQ ID NO: 205-206;
(19) обе из SEQ ID NO: 215-216;
20 (20) обе из SEQ ID NO: 225-226;
(21) обе из SEQ ID NO: 235-236;
(22) обе из SEQ ID NO: 245-246;
(23) обе из SEQ ID NO: 255-256;
(24) обе из SEQ ID NO: 265-266;
25 (25) обе из SEQ ID NO: 275-276;
(26) обе из SEQ ID NO: 285-286;
(27) обе из SEQ ID NO: 295-296;
(28) обе из SEQ ID NO: 305-306;
(29) обе из SEQ ID NO: 315-316;
30 (30) обе из SEQ ID NO: 325-326;
(31) обе из SEQ ID NO: 335-336;
(32) обе из SEQ ID NO: 345-346;
(33) обе из SEQ ID NO: 355-356;
(34) обе из SEQ ID NO: 365-366;
35 (35) обе из SEQ ID NO: 375-376;
(36) обе из SEQ ID NO: 385-386;
(37) обе из SEQ ID NO: 395-396;
(38) обе из SEQ ID NO: 405-406;

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

10

7. Выделенный или очищенный полипептид, содержащий функциональную часть TCR по любому из пп. 1-6, где полипептид содержит следующие аминокислотные последовательности:

- (1) все из SEQ ID NO: 27-32;
- (2) все из SEQ ID NO: 37-42;
- (3) все из SEQ ID NO: 47-52;
- (4) все из SEQ ID NO: 57-62;
- (5) все из SEQ ID NO: 67-72;
- (6) все из SEQ ID NO: 77-82;
- (7) все из SEQ ID NO: 87-92;
- (8) все из SEQ ID NO: 97-102;
- (9) все из SEQ ID NO: 107-112;
- (10) все из SEQ ID NO: 117-122;
- (11) все из SEQ ID NO: 127-132;
- (12) все из SEQ ID NO: 137-142;
- (13) все из SEQ ID NO: 147-152;
- (14) все из SEQ ID NO: 157-162;
- (15) все из SEQ ID NO: 167-172;
- (16) все из SEQ ID NO: 177-182;
- (17) все из SEQ ID NO: 187-192;
- (18) все из SEQ ID NO: 197-202;
- (19) все из SEQ ID NO: 207-212;
- (20) все из SEQ ID NO: 217-222;
- (21) все из SEQ ID NO: 227-232;
- (22) все из SEQ ID NO: 237-242;
- (23) все из SEQ ID NO: 247-252;
- (24) все из SEQ ID NO: 257-262;
- (25) все из SEQ ID NO: 267-272;

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

8. Полипептид по п. 7, где полипептид содержит следующие аминокислотные
 25 последовательности:

- (1) обе из SEQ ID NO: 33-34;
 (2) обе из SEQ ID NO: 43-44;
 (3) обе из SEQ ID NO: 53-54;
 (4) обе из SEQ ID NO: 63-64;
 30 (5) обе из SEQ ID NO: 73-74;
 (6) обе из SEQ ID NO: 83-84;
 (7) обе из SEQ ID NO: 93-94;
 (8) обе из SEQ ID NO: 103-104;
 (9) обе из SEQ ID NO: 113-114;
 35 (10) обе из SEQ ID NO: 123-124;
 (11) обе из SEQ ID NO: 133-134;
 (12) обе из SEQ ID NO: 143-144;
 (13) обе из SEQ ID NO: 153-154;

- (14) обе из SEQ ID NO: 163-164;
 (15) обе из SEQ ID NO: 173-174;
 (16) обе из SEQ ID NO: 183-184;
 (17) обе из SEQ ID NO: 193-194;
 5 (18) обе из SEQ ID NO: 203-204;
 (19) обе из SEQ ID NO: 213-214;
 (20) обе из SEQ ID NO: 223-224;
 (21) обе из SEQ ID NO: 233-234;
 (22) обе из SEQ ID NO: 243-244;
 10 (23) обе из SEQ ID NO: 253-254;
 (24) обе из SEQ ID NO: 263-264;
 (25) обе из SEQ ID NO: 273-274;
 (26) обе из SEQ ID NO: 283-284;
 (27) обе из SEQ ID NO: 293-294;
 15 (28) обе из SEQ ID NO: 303-304;
 (29) обе из SEQ ID NO: 313-314;
 (30) обе из SEQ ID NO: 323-324;
 (31) обе из SEQ ID NO: 333-334;
 (32) обе из SEQ ID NO: 343-344;
 20 (33) обе из SEQ ID NO: 353-354;
 (34) обе из SEQ ID NO: 363-364;
 (35) обе из SEQ ID NO: 373-374;
 (36) обе из SEQ ID NO: 383-384;
 (37) обе из SEQ ID NO: 393-394;
 25 (38) обе из SEQ ID NO: 403-404;
 (39) обе из SEQ ID NO: 413-414;
 (40) обе из SEQ ID NO: 423-424;
 (41) обе из SEQ ID NO: 433-434;
 (42) обе из SEQ ID NO: 443-444;
 30 (43) обе из SEQ ID NO: 453-454;
 (44) обе из SEQ ID NO: 463-464;
 (45) обе из SEQ ID NO: 473-474;
 (46) обе из SEQ ID NO: 483-484; или
 (47) обе из SEQ ID NO: 493-494.
- 35

9. Полипептид по п. 7 или п. 8, где полипептид содержит следующие аминокислотные последовательности:

- (1) обе из SEQ ID NO: 35-36;

- (2) обе из SEQ ID NO: 45-46;
(3) обе из SEQ ID NO: 55-56;
(4) обе из SEQ ID NO: 65-66;
(5) обе из SEQ ID NO: 75-76;
5 (6) обе из SEQ ID NO: 85-86;
(7) обе из SEQ ID NO: 95-96;
(8) обе из SEQ ID NO: 105-106;
(9) обе из SEQ ID NO: 115-116;
(10) обе из SEQ ID NO: 125-126;
10 (11) обе из SEQ ID NO: 135-136;
(12) обе из SEQ ID NO: 145-146;
(13) обе из SEQ ID NO: 155-156;
(14) обе из SEQ ID NO: 165-166;
(15) обе из SEQ ID NO: 175-176;
15 (16) обе из SEQ ID NO: 185-186;
(17) обе из SEQ ID NO: 195-196;
(18) обе из SEQ ID NO: 205-206;
(19) обе из SEQ ID NO: 215-216;
(20) обе из SEQ ID NO: 225-226;
20 (21) обе из SEQ ID NO: 235-236;
(22) обе из SEQ ID NO: 245-246;
(23) обе из SEQ ID NO: 255-256;
(24) обе из SEQ ID NO: 265-266;
(25) обе из SEQ ID NO: 275-276;
25 (26) обе из SEQ ID NO: 285-286;
(27) обе из SEQ ID NO: 295-296;
(28) обе из SEQ ID NO: 305-306;
(29) обе из SEQ ID NO: 315-316;
(30) обе из SEQ ID NO: 325-326;
30 (31) обе из SEQ ID NO: 335-336;
(32) обе из SEQ ID NO: 345-346;
(33) обе из SEQ ID NO: 355-356;
(34) обе из SEQ ID NO: 365-366;
(35) обе из SEQ ID NO: 375-376;
35 (36) обе из SEQ ID NO: 385-386;
(37) обе из SEQ ID NO: 395-396;
(38) обе из SEQ ID NO: 405-406;
(39) обе из SEQ ID NO: 415-416;

- (40) обе из SEQ ID NO: 425-426;
- (41) обе из SEQ ID NO: 435-436;
- (42) обе из SEQ ID NO: 445-446;
- (43) обе из SEQ ID NO: 455-456;
- (44) обе из SEQ ID NO: 465-466;
- (45) обе из SEQ ID NO: 475-476;
- (46) обе из SEQ ID NO: 485-486; или
- (47) обе из SEQ ID NO: 495-496.

10. Выделенный или очищенный белок, содержащий:

- (1) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 27-29, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 30-32;
- (2) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 37-39, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 40-42;
- (3) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 47-49, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 50-52;
- (4) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 57-59, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 60-62;
- (5) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 67-69, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 70-72;
- (6) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 77-79, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 80-82;
- (7) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 87-89, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 90-92;
- (8) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 97-99, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 100-102;
- (9) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 107-109, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 110-112;

13. Выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую TCR по любому из пп. 1-6, полипептид по любому из пп. 7-9 или белок по любому из пп. 10-12.

5 14. Рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 13.

15. Выделенная или очищенная клетка-хозяин, содержащая рекомбинантный экспрессионный вектор по п. 14.

10

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

15 17. Фармацевтическая композиция, содержащая (а) TCR по любому из пп. 1-6, полипептид по любому из пп. 7-9, белок по любому из пп. 10-12, нуклеиновую кислоту по п. 13, рекомбинантный экспрессионный вектор по п. 14, клетку-хозяина по п. 15 или популяцию клеток по п. 16 и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

20 18. Способ выявления наличия рака у млекопитающего, включающий:
 (а) приведение в контакт образца, содержащего раковые клетки, с TCR по любому из пп. 1-6, полипептидом по любому из пп. 7-9, белком по любому из пп. 10-12, нуклеиновой кислотой по п. 13, рекомбинантным экспрессионным вектором по п. 14, клеткой-хозяином по п. 15, популяцией клеток по п. 16 или фармацевтической композицией по п. 17, с образованием, вследствие этого, комплекса; и
 25 (b) выявление данного комплекса,
 где выявление комплекса указывает на наличие рака у млекопитающего.

30 19. TCR по любому из пп. 1-6, полипептид по любому из пп. 7-9, белок по любому из пп. 10-12, нуклеиновая кислота по п. 13, рекомбинантный экспрессионный вектор по п. 14, клетка-хозяин по п. 15, популяция клеток по п. 16 или фармацевтическая композиция по п. 17 для применения в лечении или предупреждении рака у млекопитающего.

20. Популяция клеток для применения по п. 19, где популяция клеток является аутологичной в отношении млекопитающего.

35

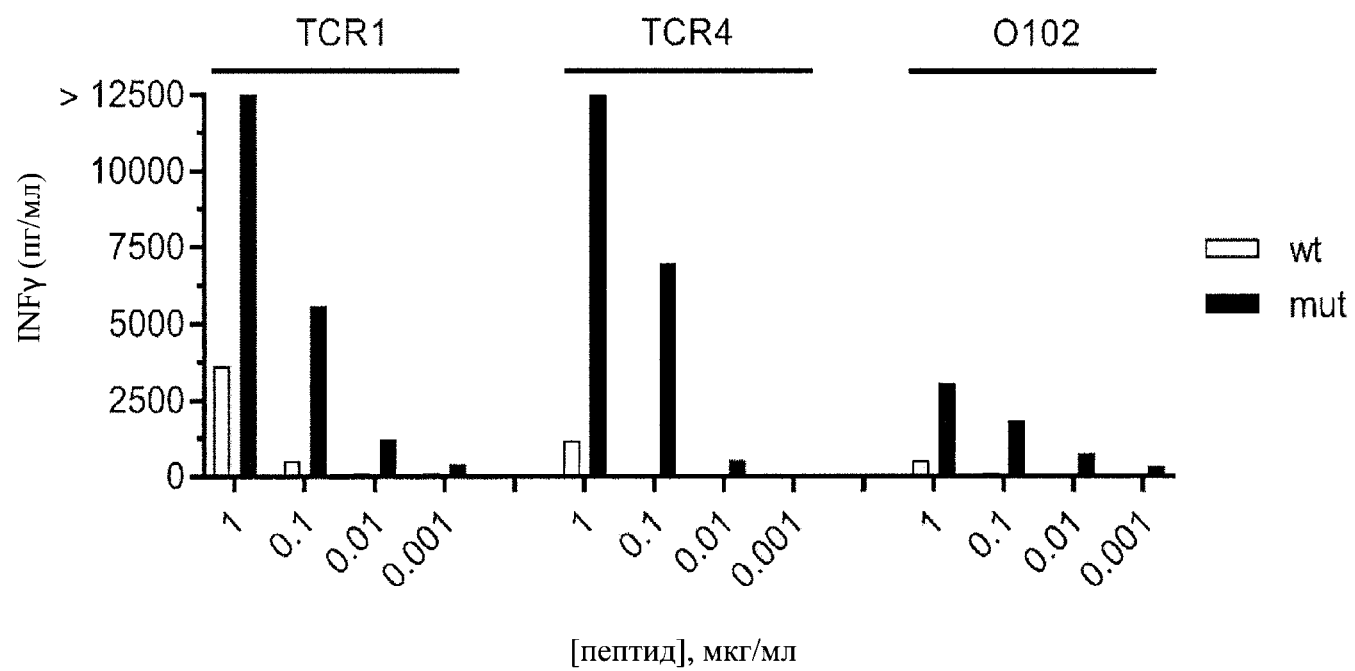
21. Популяция клеток для применения по п. 19, где популяция клеток является аллогенной в отношении млекопитающего.

22. Способ по п. 18 или TCR, полипептид, белок, нуклеиновая кислота, рекомбинантный экспрессионный вектор, клетка-хозяин, популяция клеток или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 19-21, где рак представляет собой эпителиальный рак.

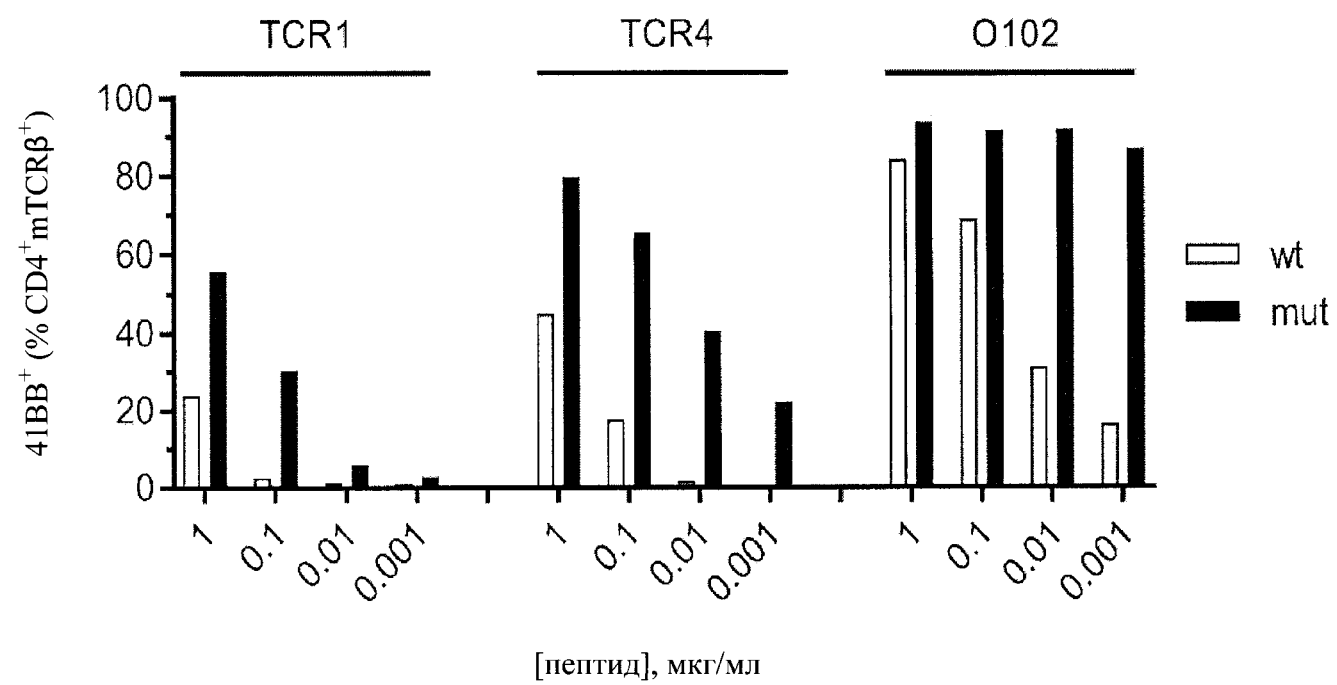
5

23. Способ по п. 18 или TCR, полипептид, белок, нуклеиновая кислота, рекомбинантный экспрессионный вектор, клетка-хозяин, популяция клеток или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 19-21, где рак представляет собой холангиокарциному, меланому, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак яичника, рак эндометрия, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиобластому, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря.

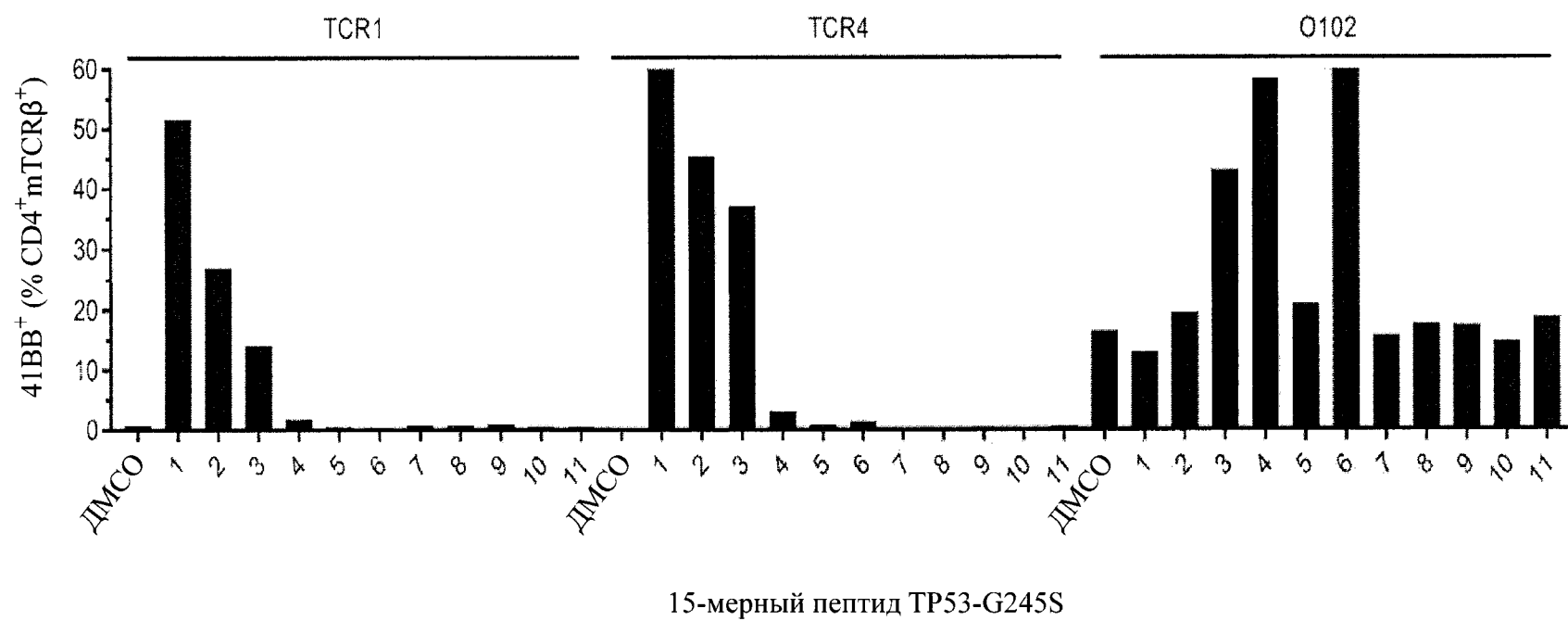
10



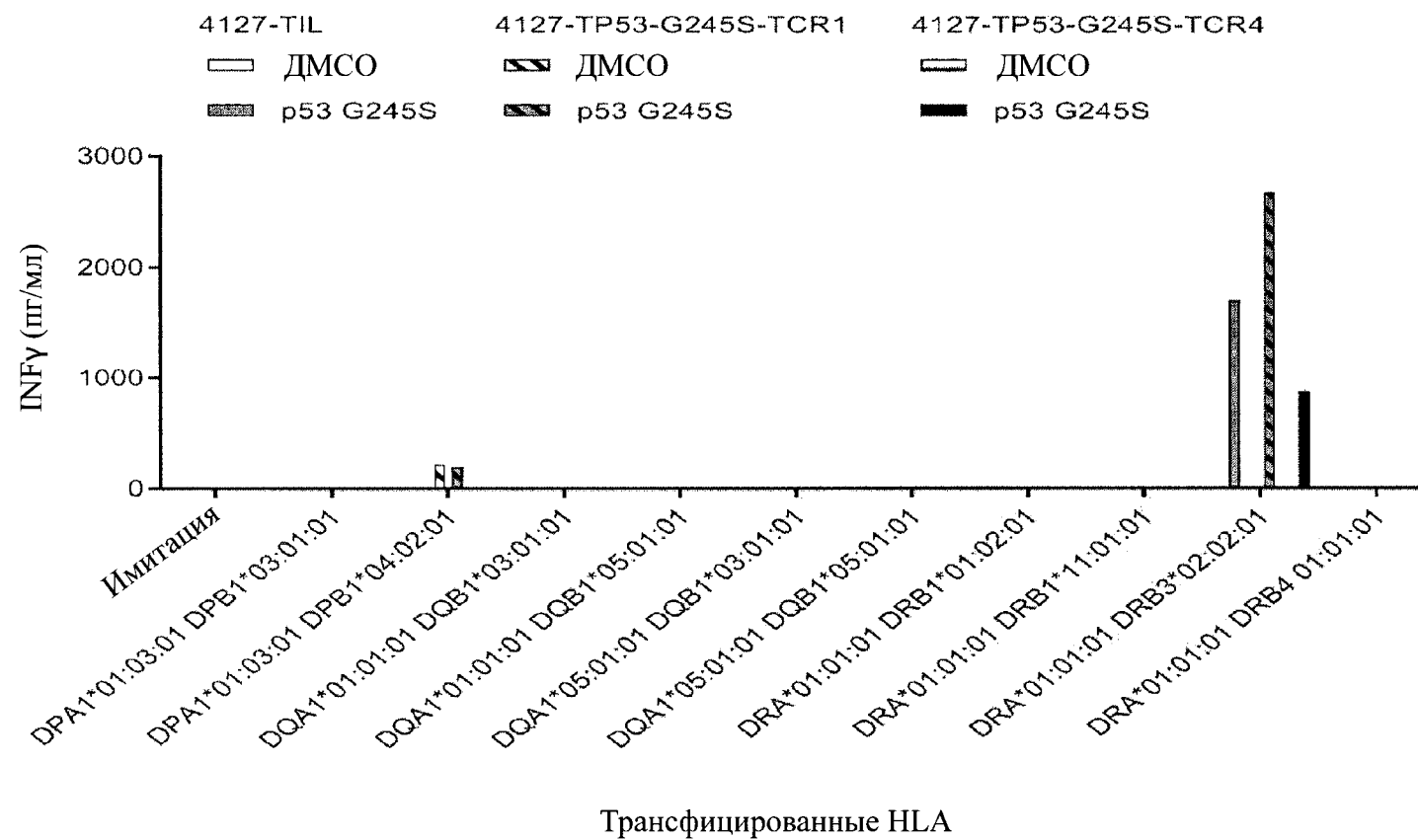
ФИГ. 1



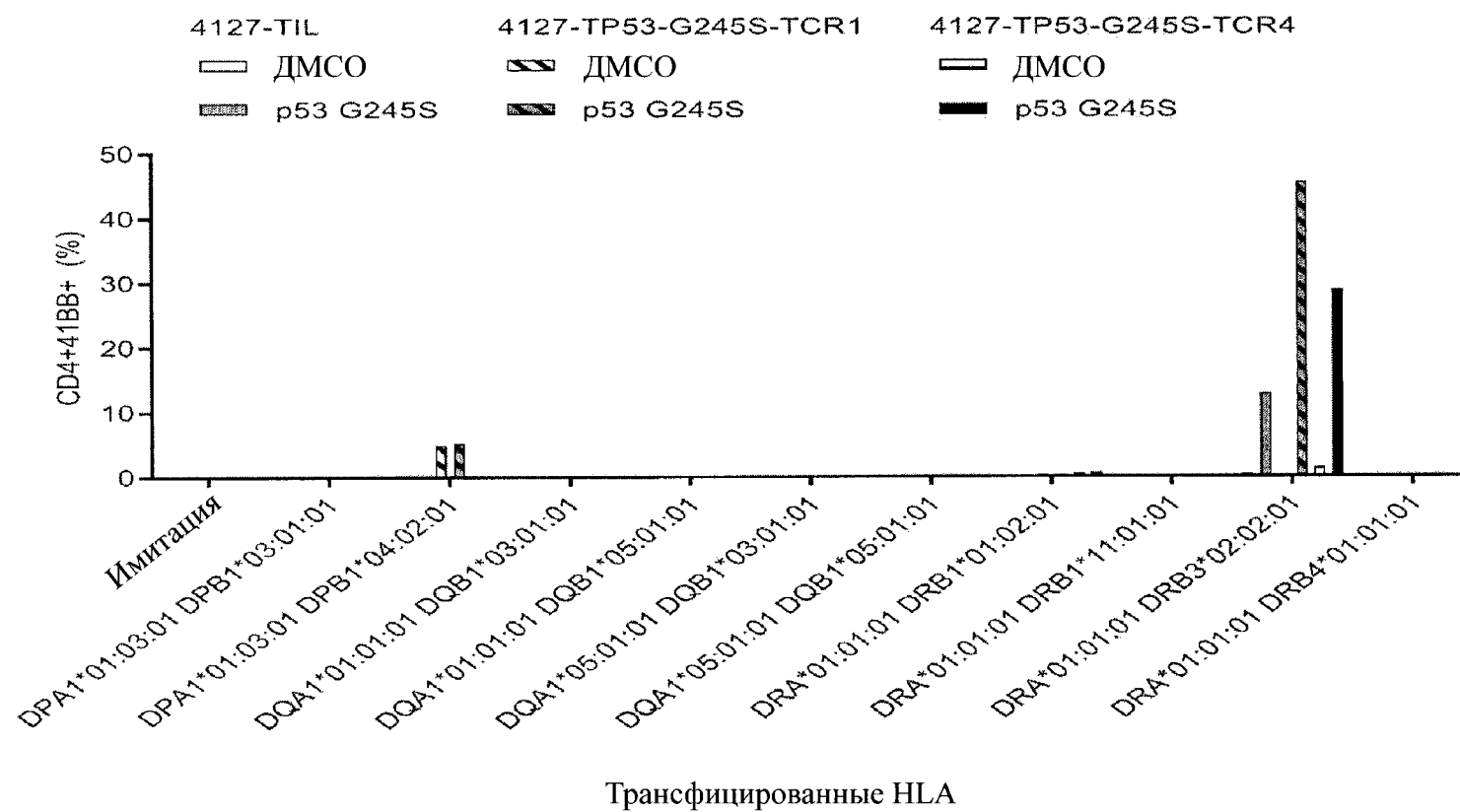
ФИГ. 2



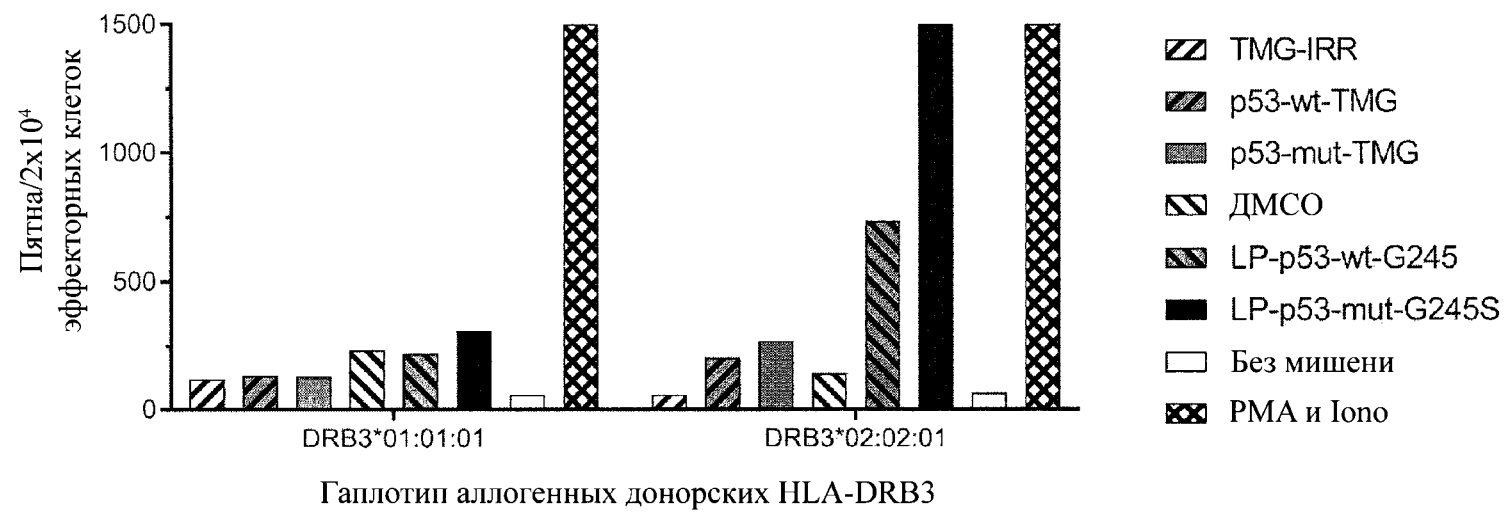
ФИГ. 3



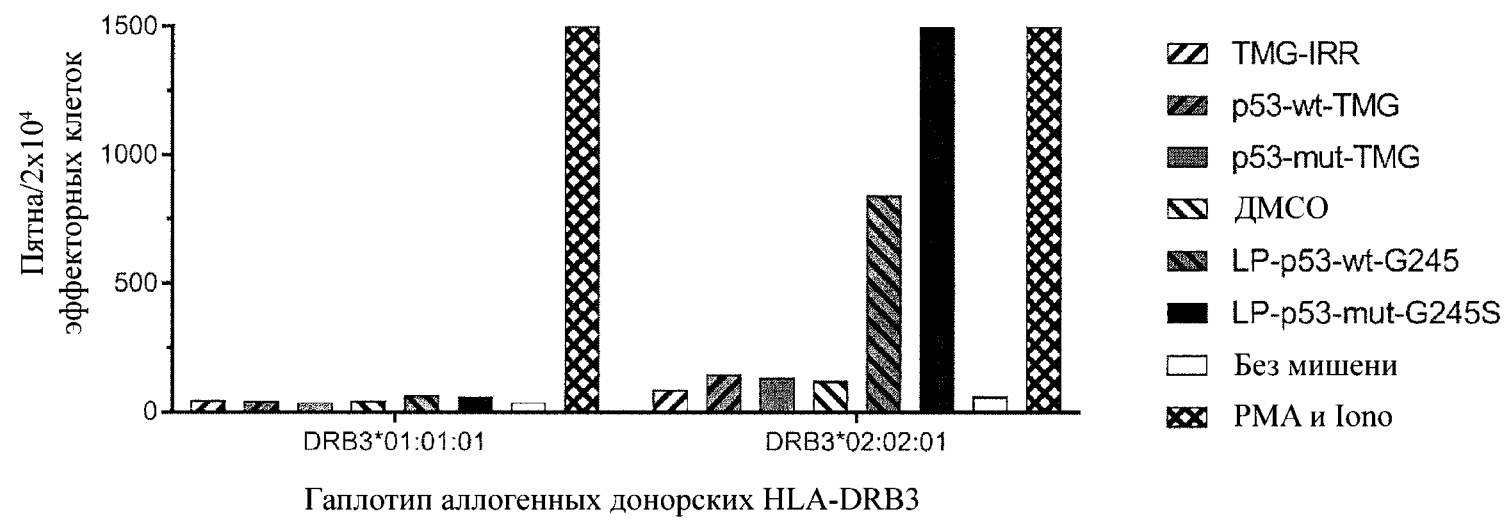
ФИГ. 4



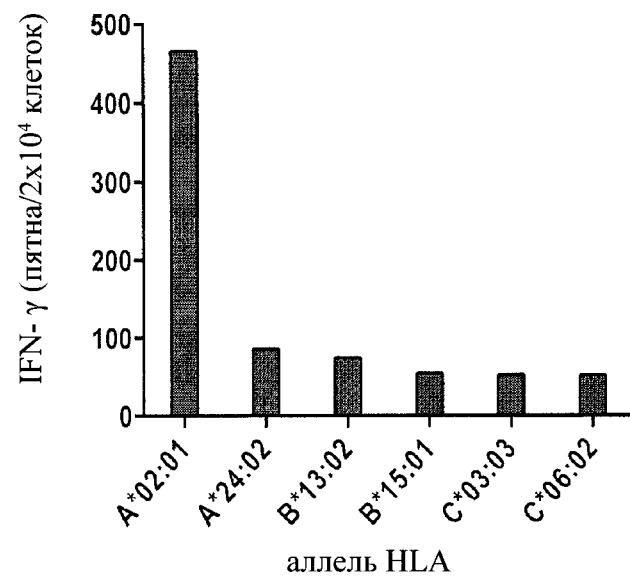
ФИГ. 5



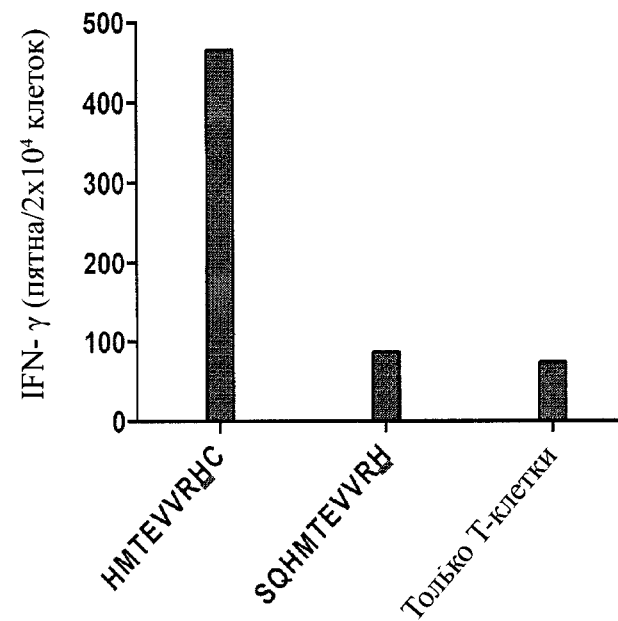
ФИГ. 6



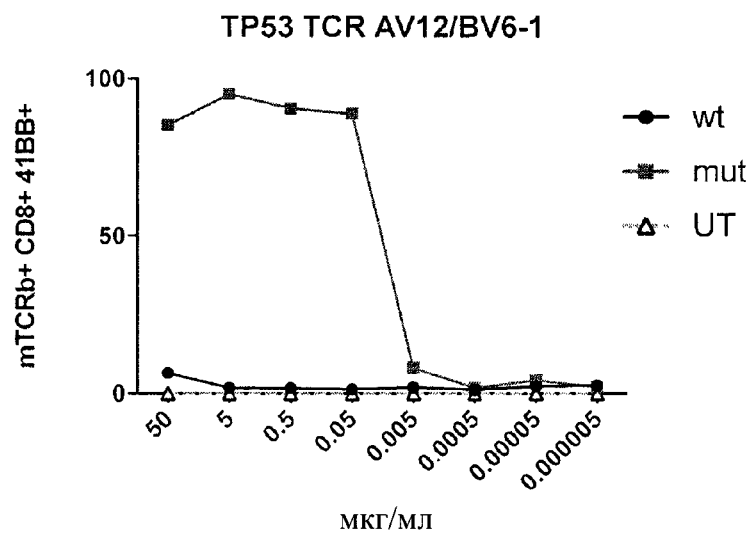
ФИГ. 7



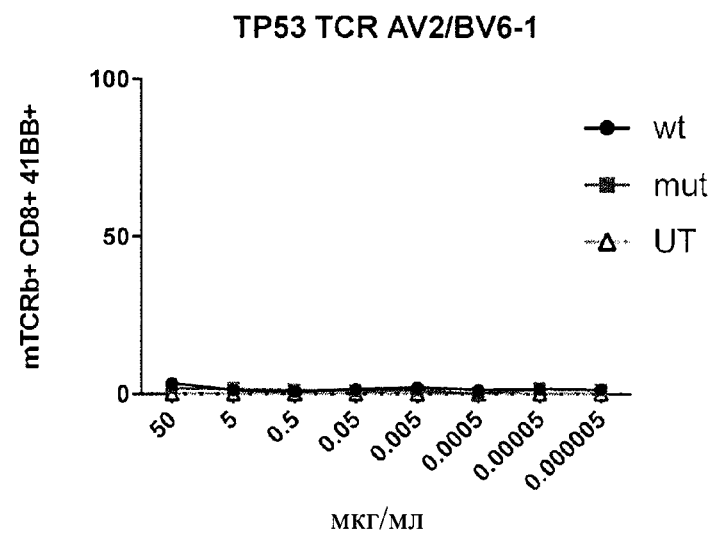
ФИГ. 8А



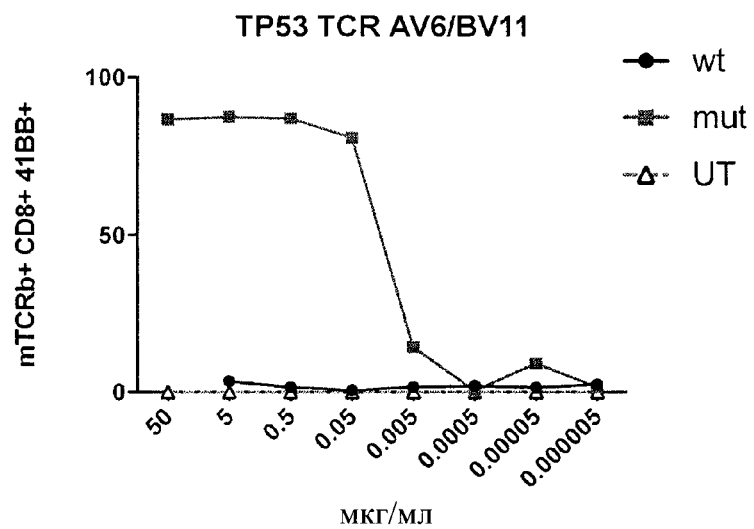
ФИГ. 8В



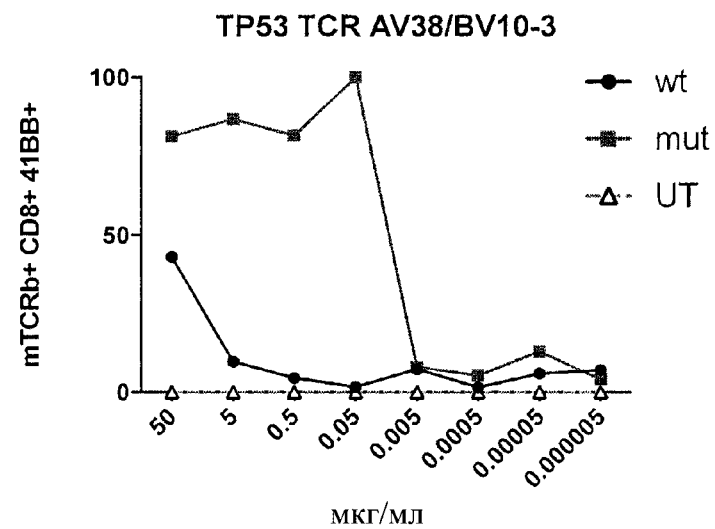
ФИГ. 9А



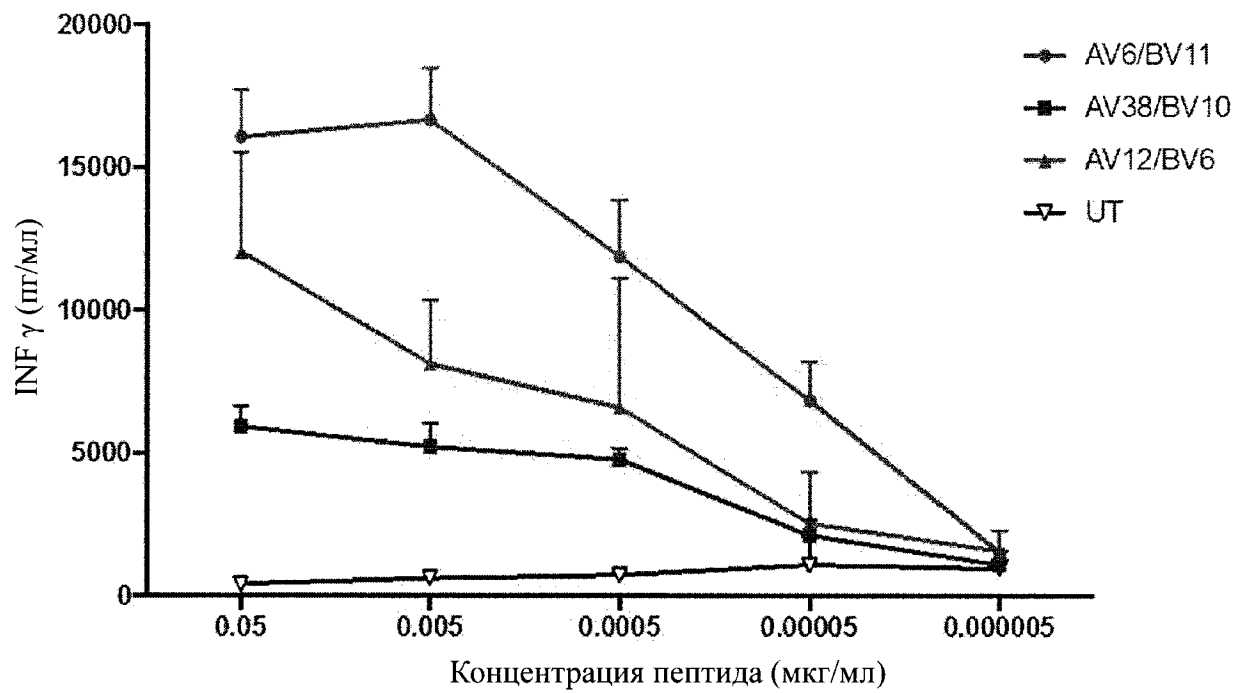
ФИГ. 9В



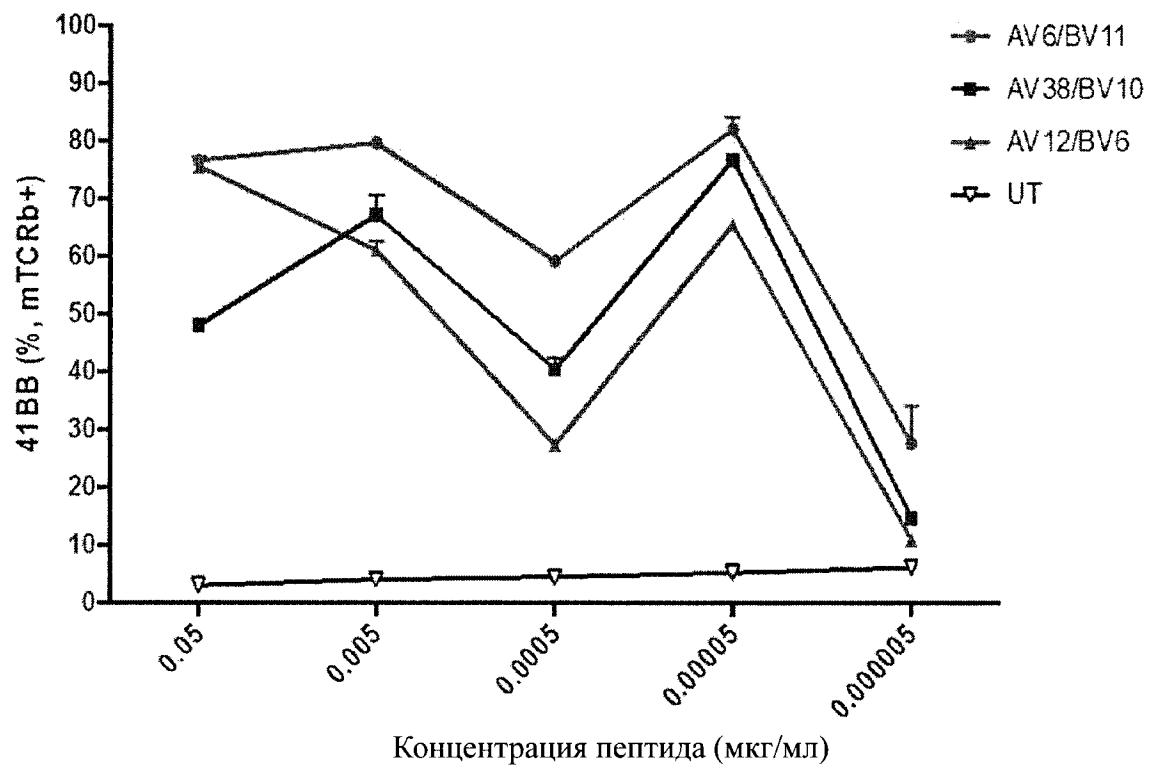
ФИГ. 9С



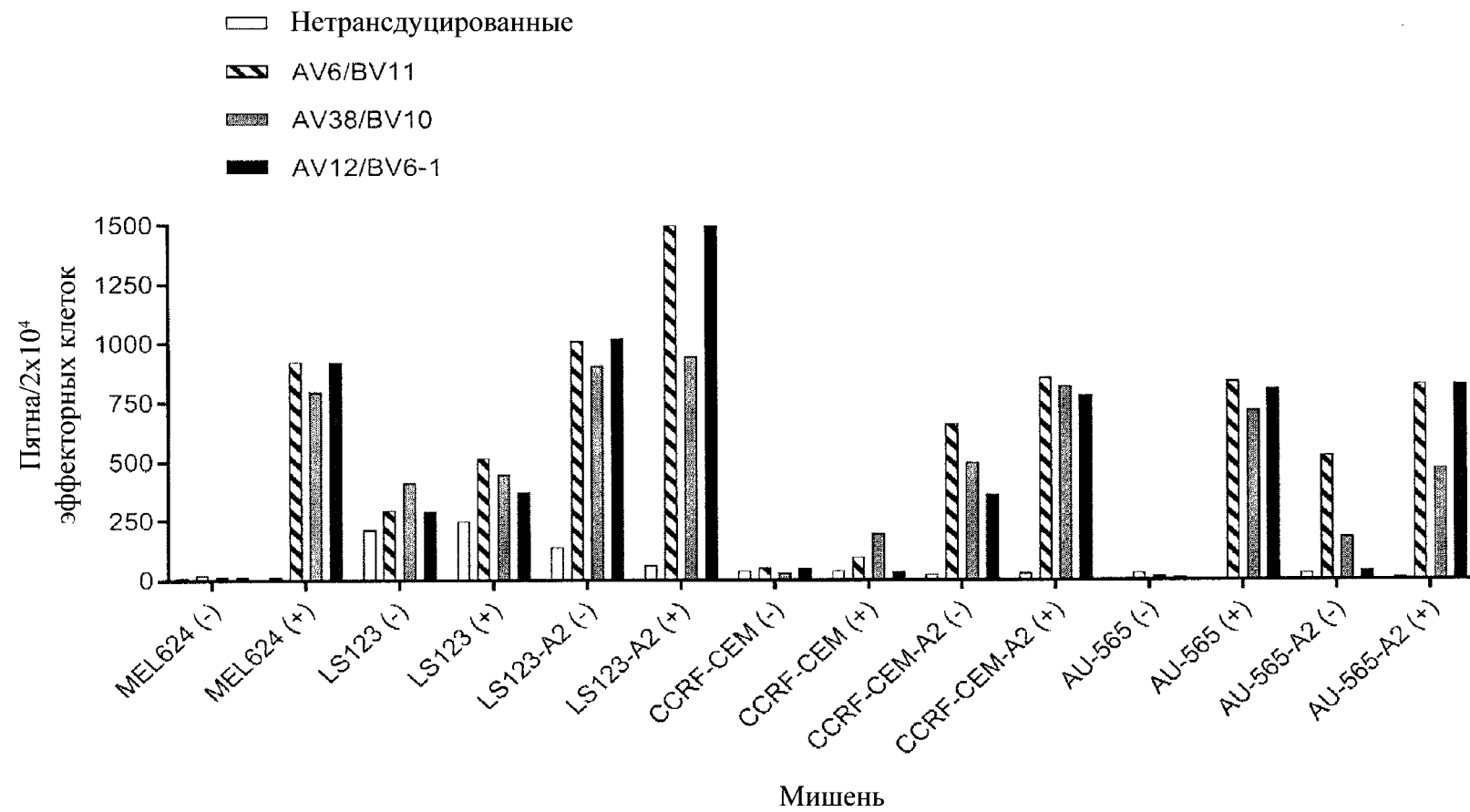
ФИГ. 9D



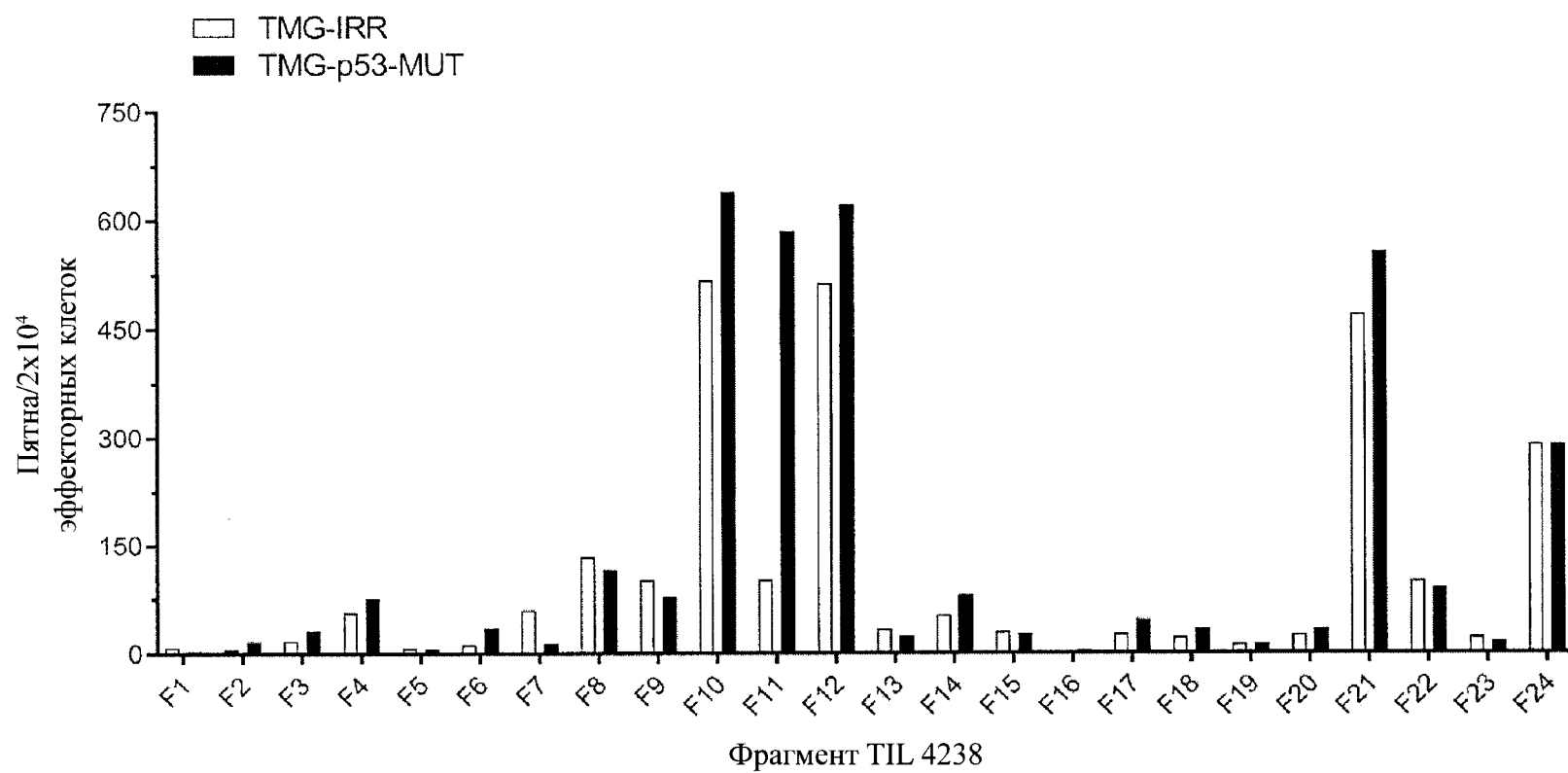
ФИГ. 10А



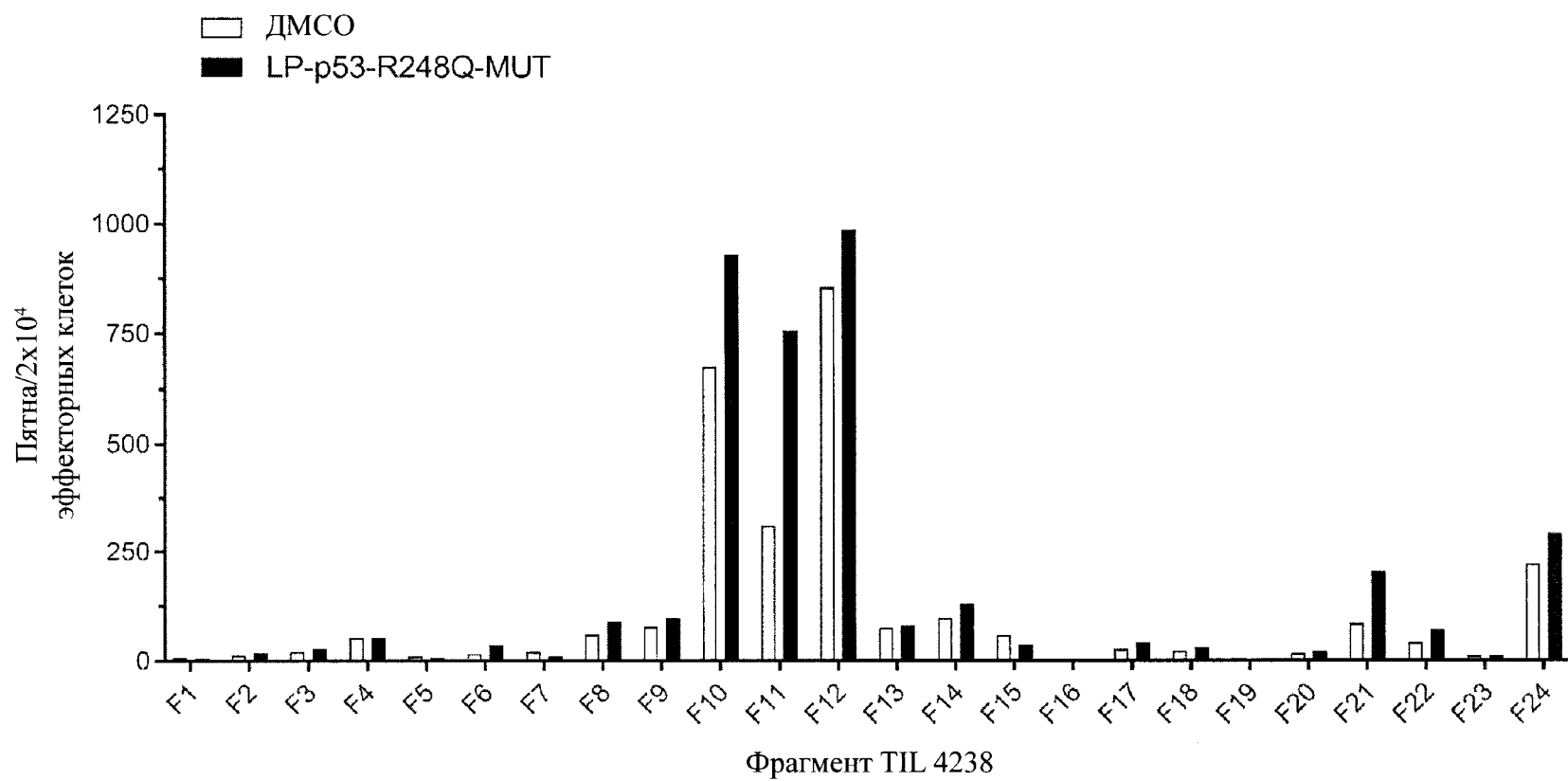
ФИГ. 10В



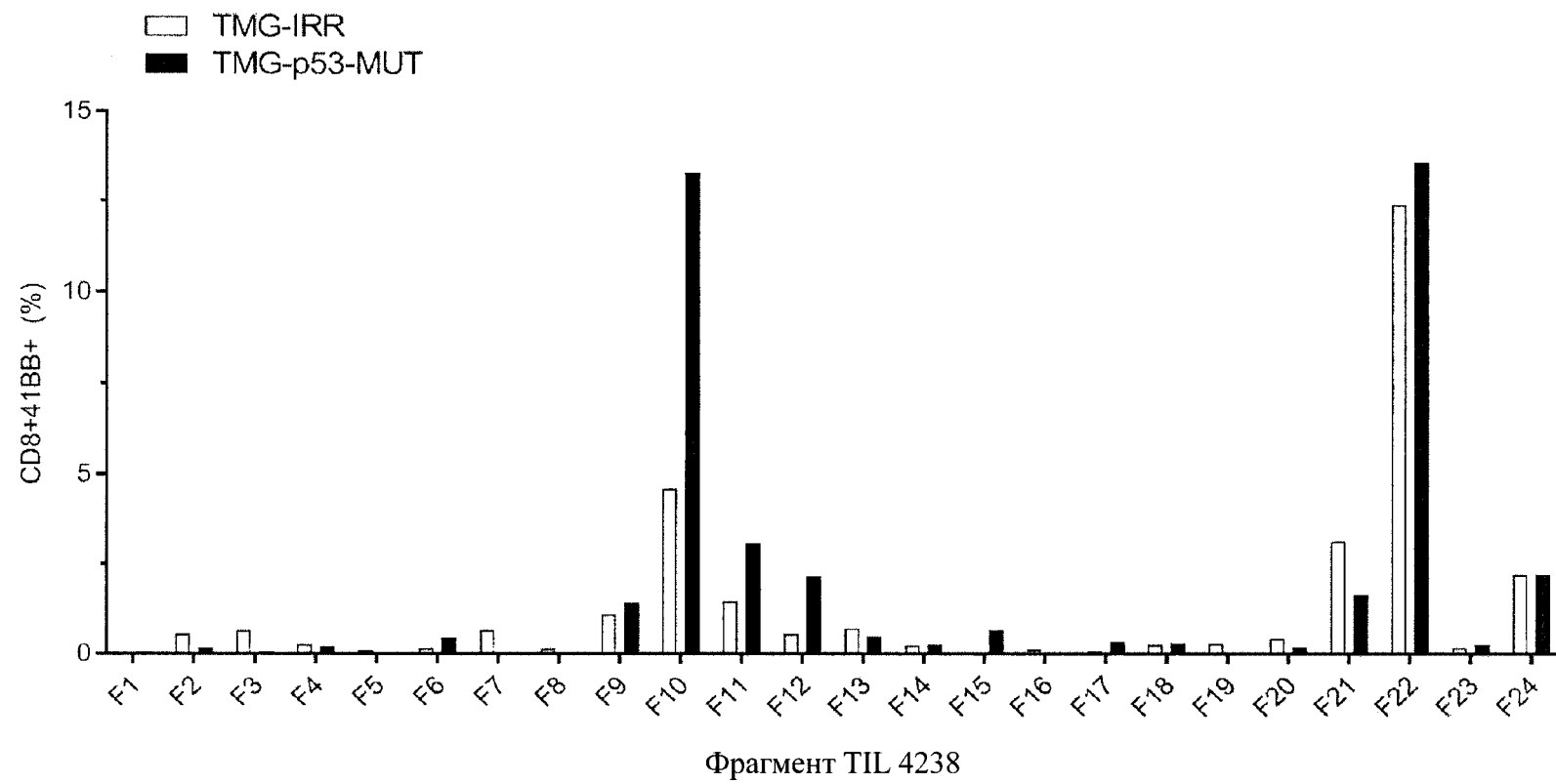
ФИГ. 11



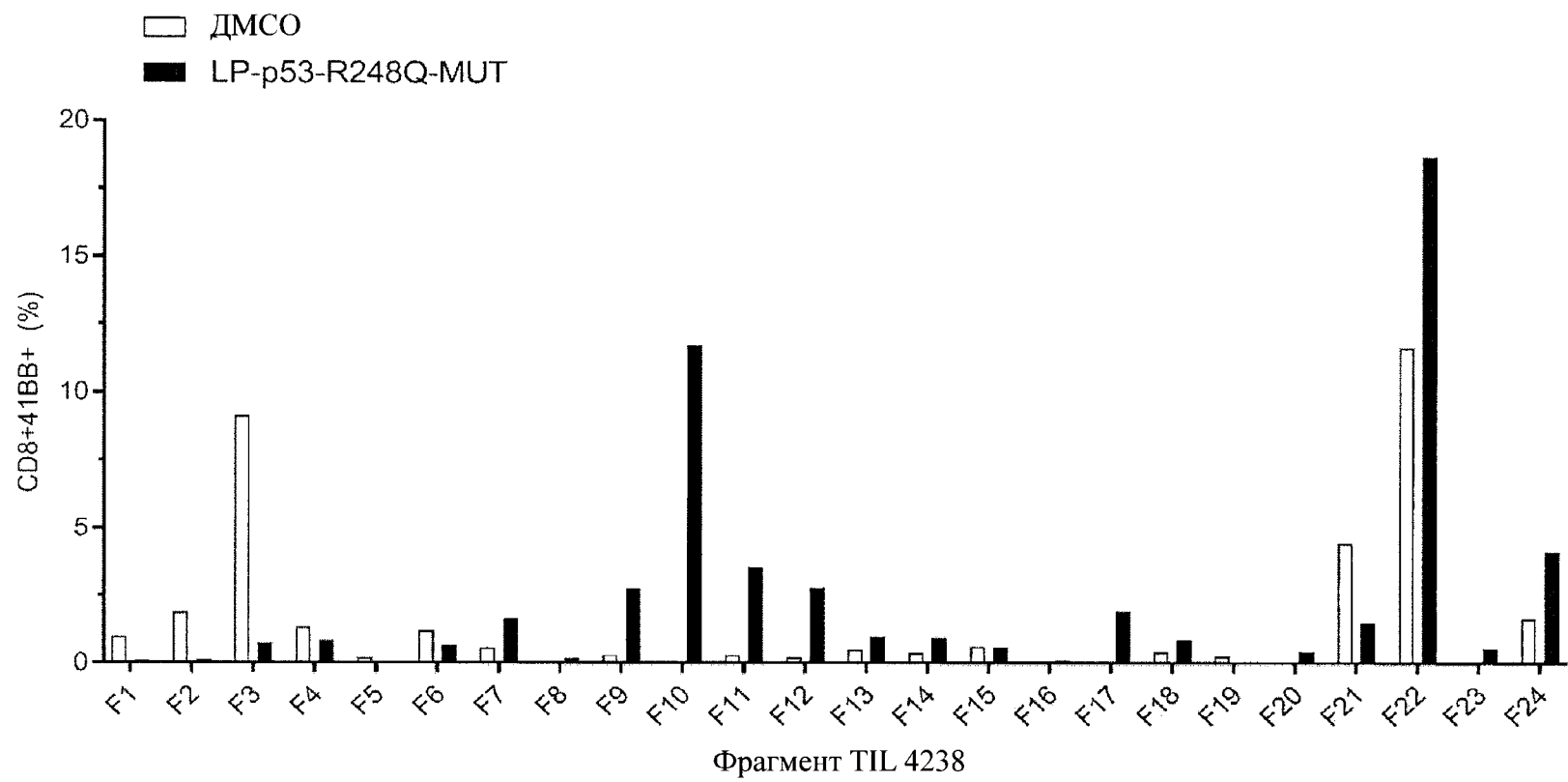
ФИГ. 12



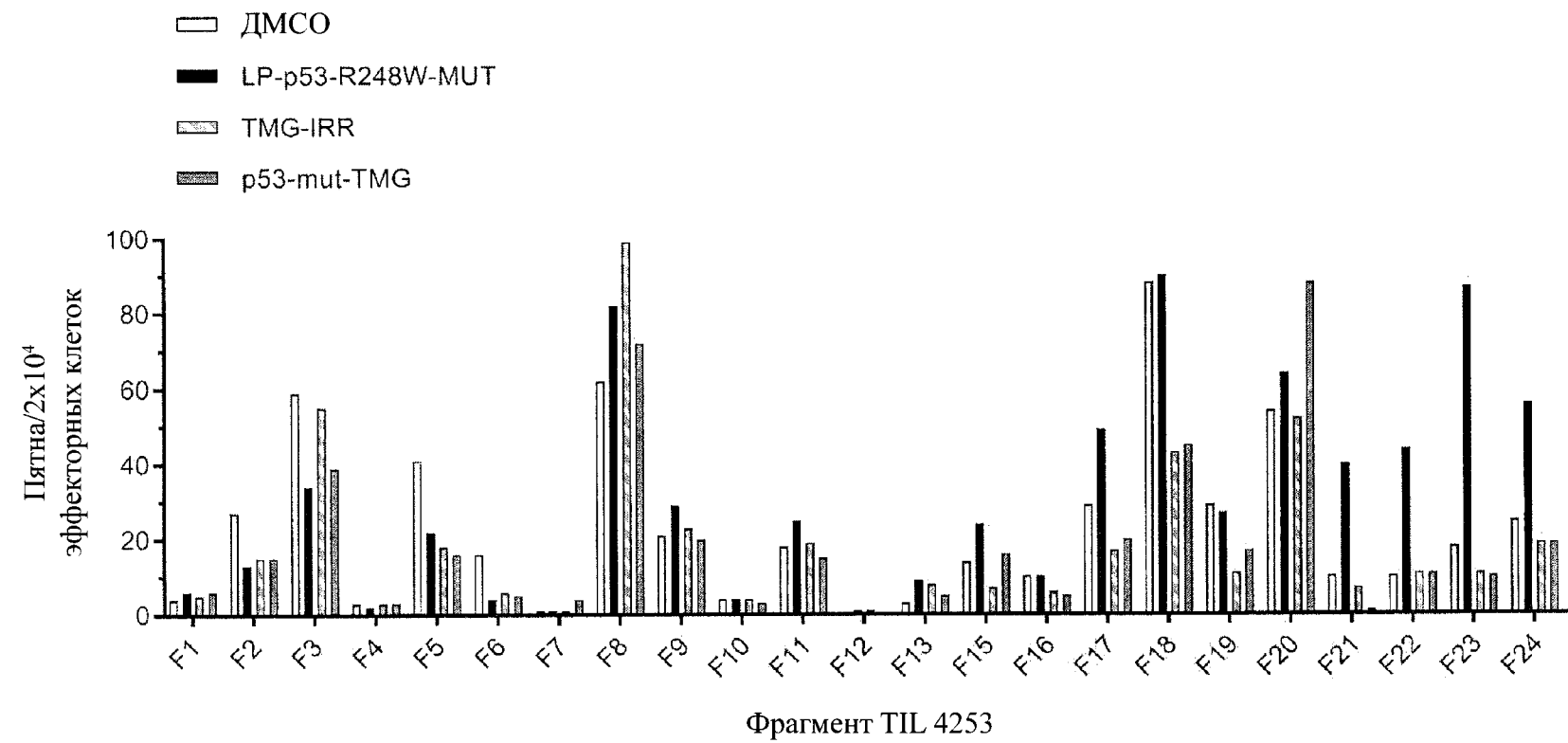
ФИГ. 13



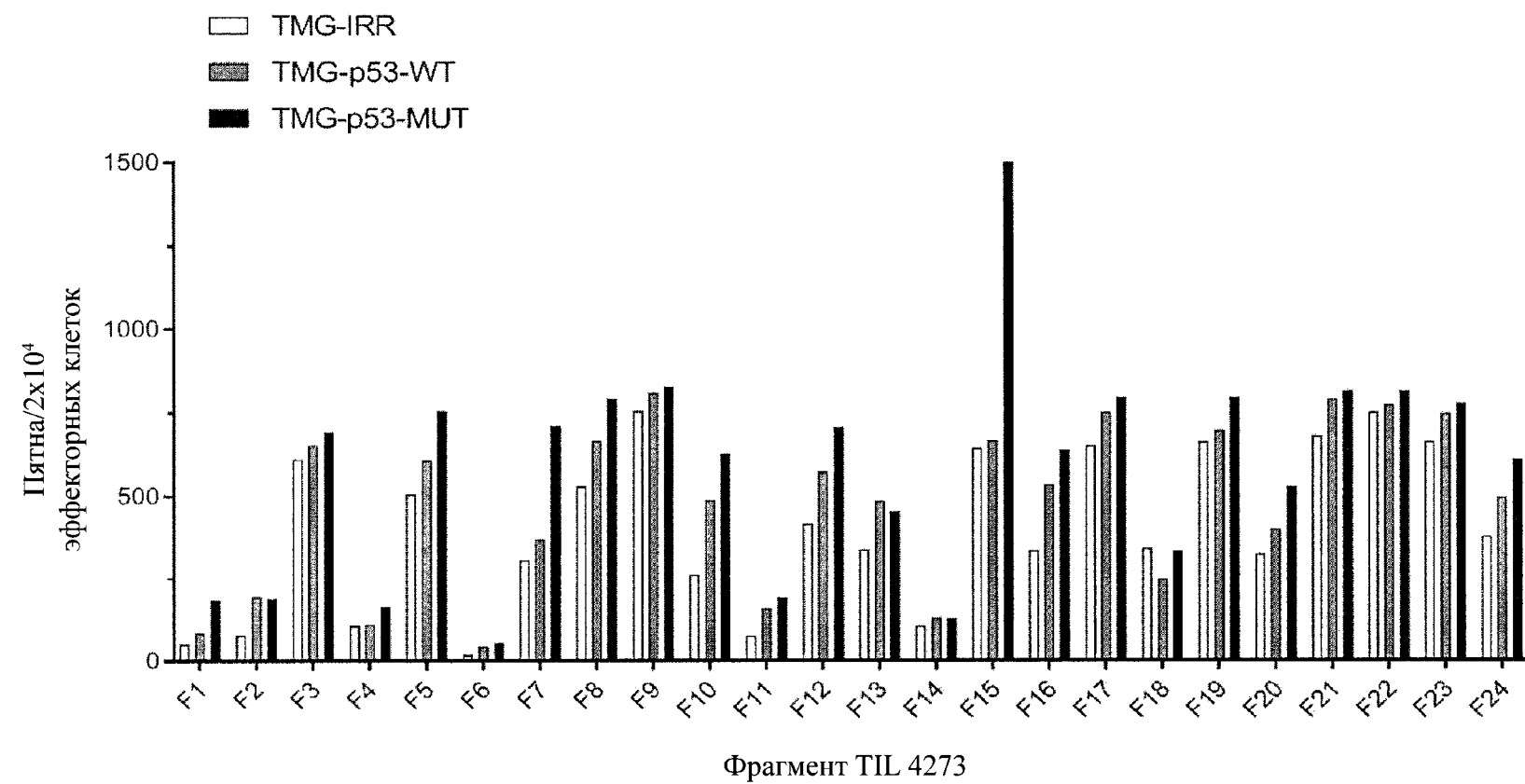
ФИГ. 14



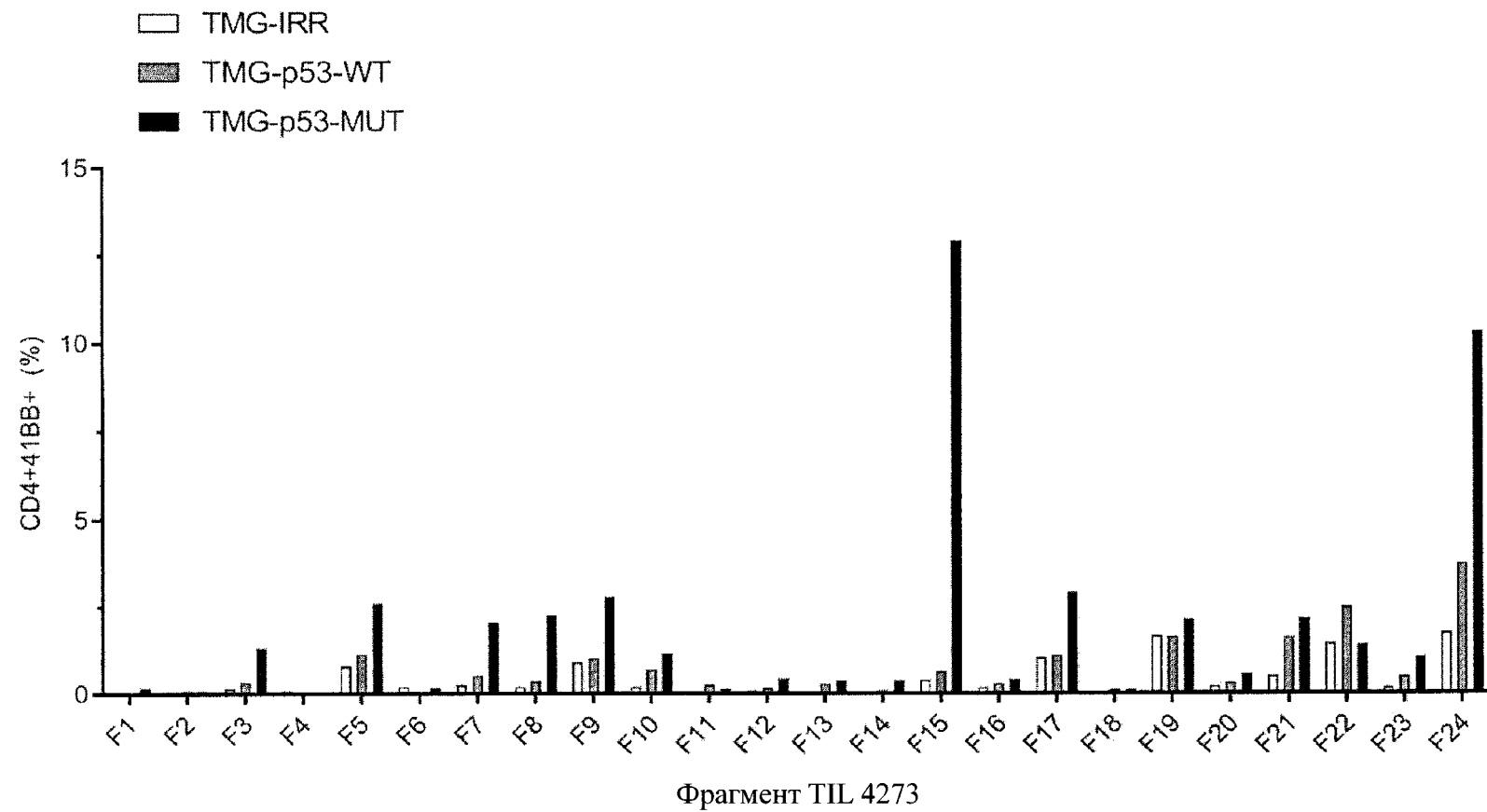
ФИГ. 15



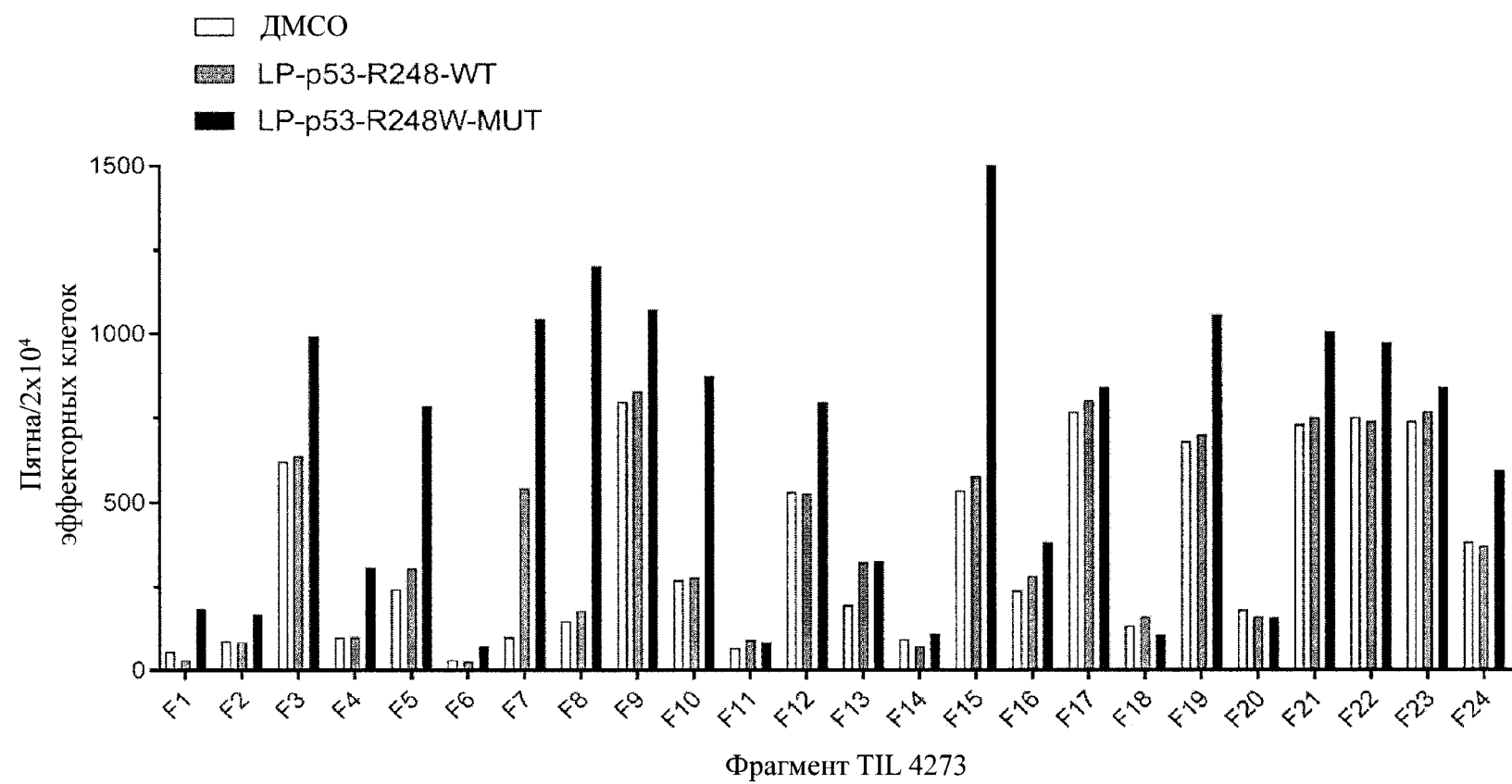
ФИГ. 16



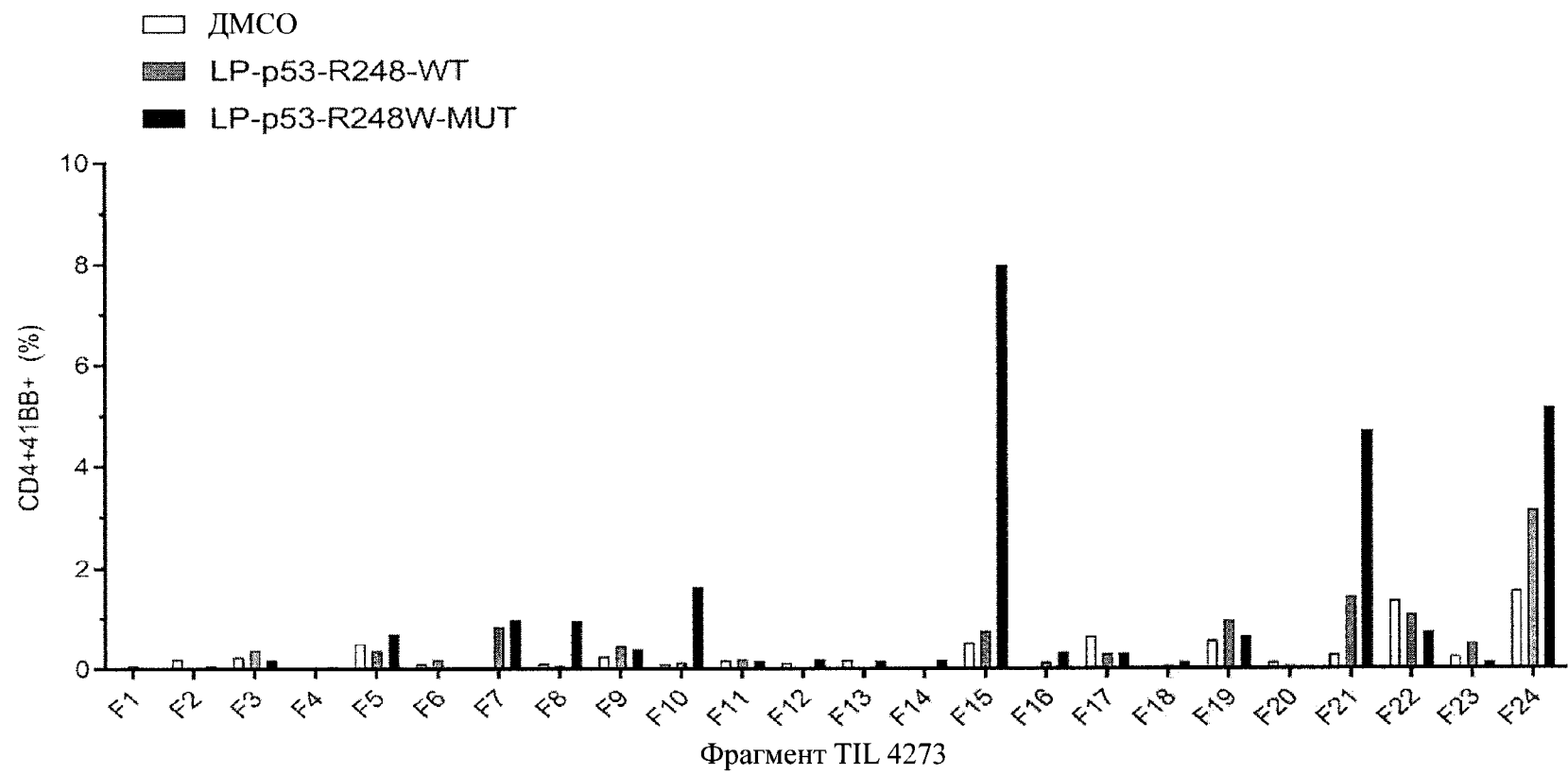
ФИГ. 17



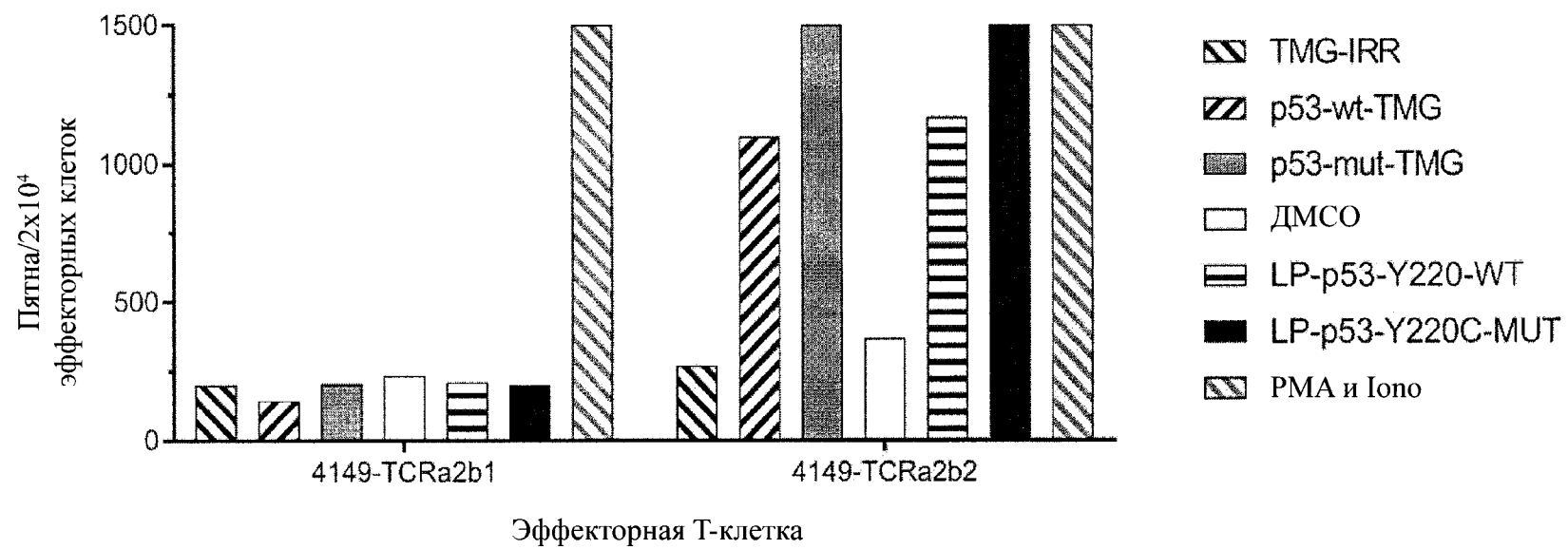
ФИГ. 18



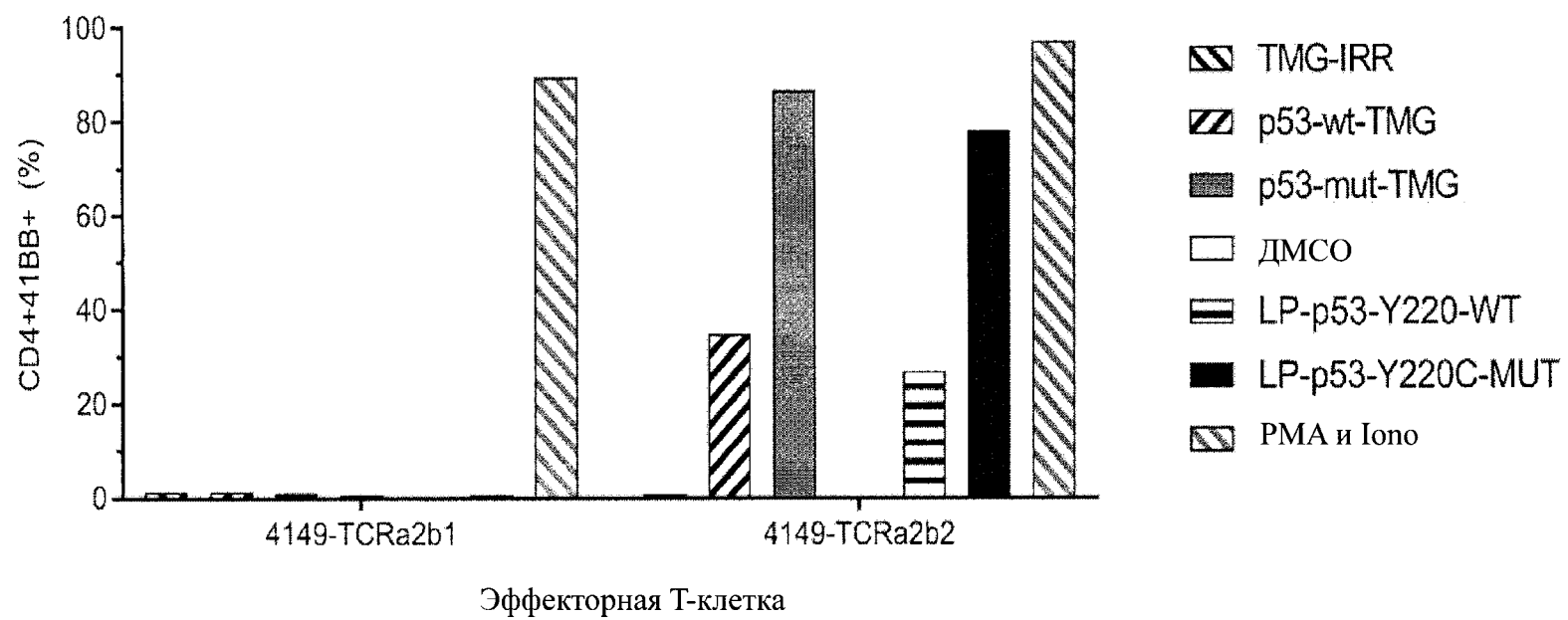
ФИГ. 19



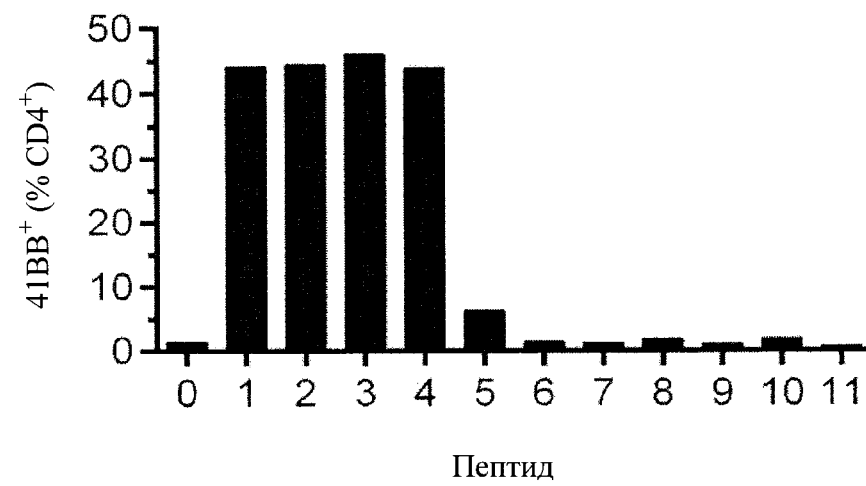
ФИГ. 20



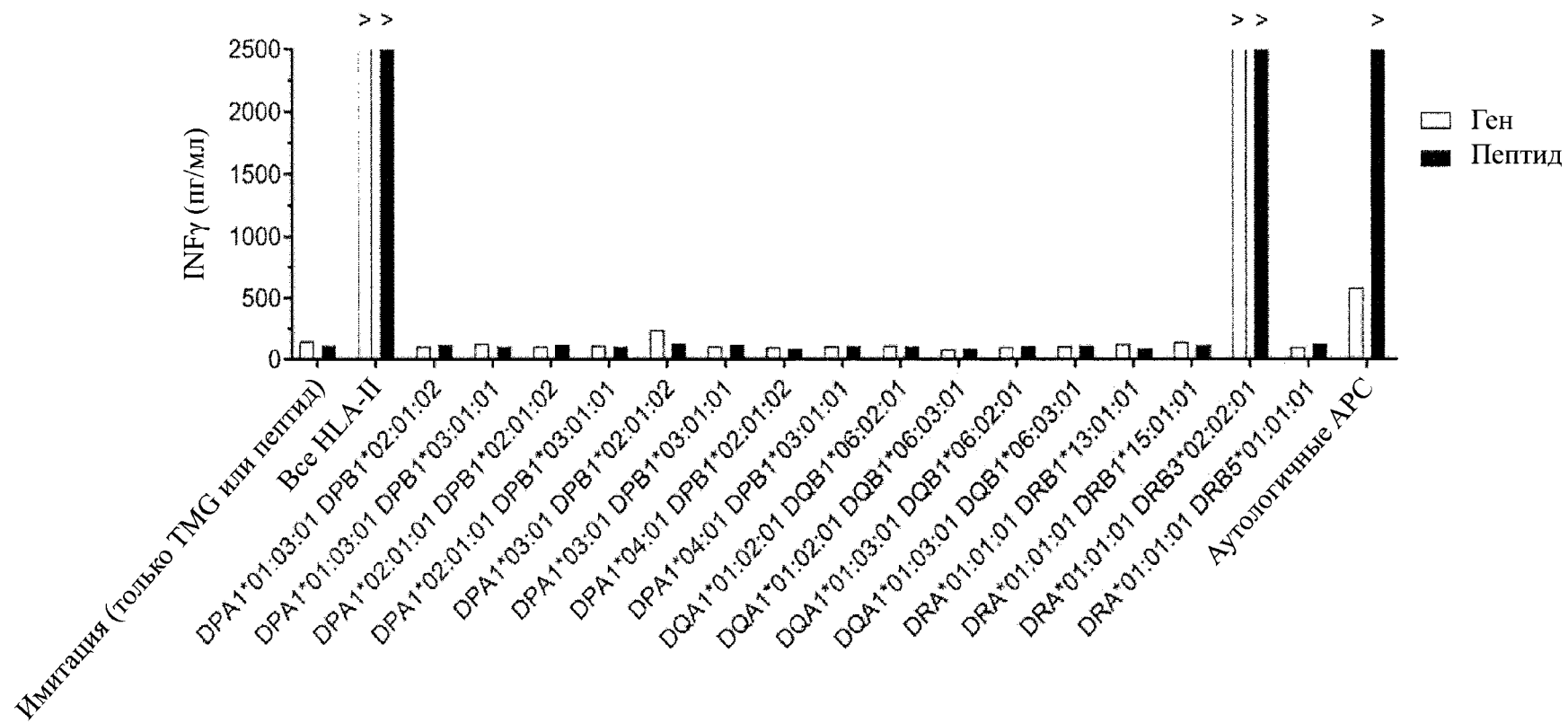
ФИГ. 21



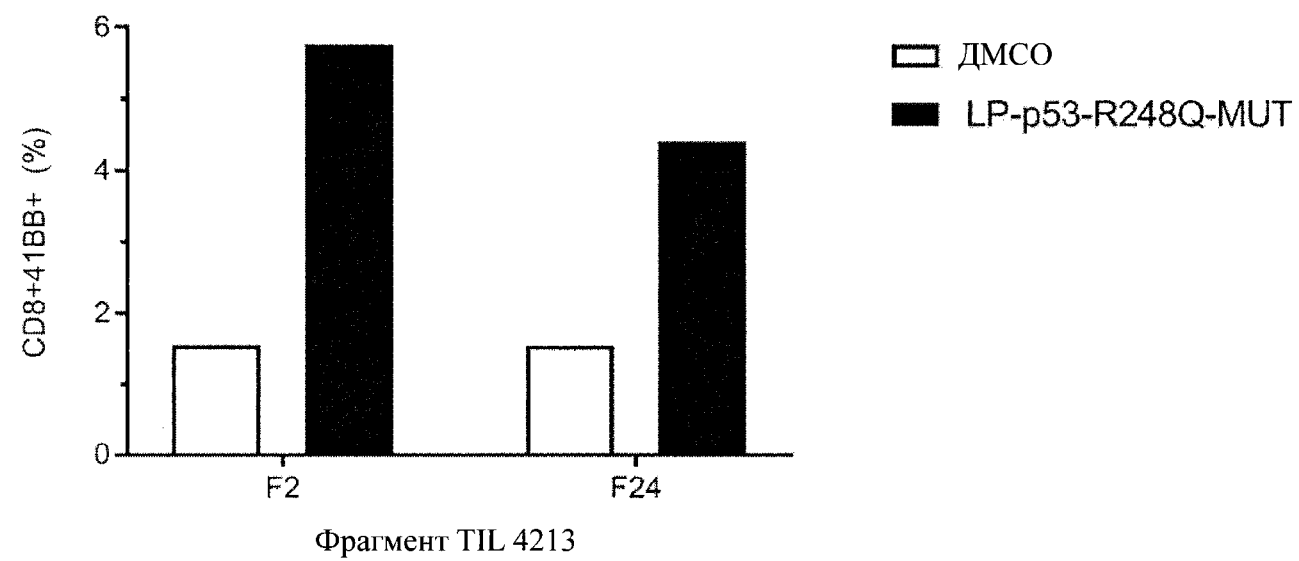
ФИГ. 22



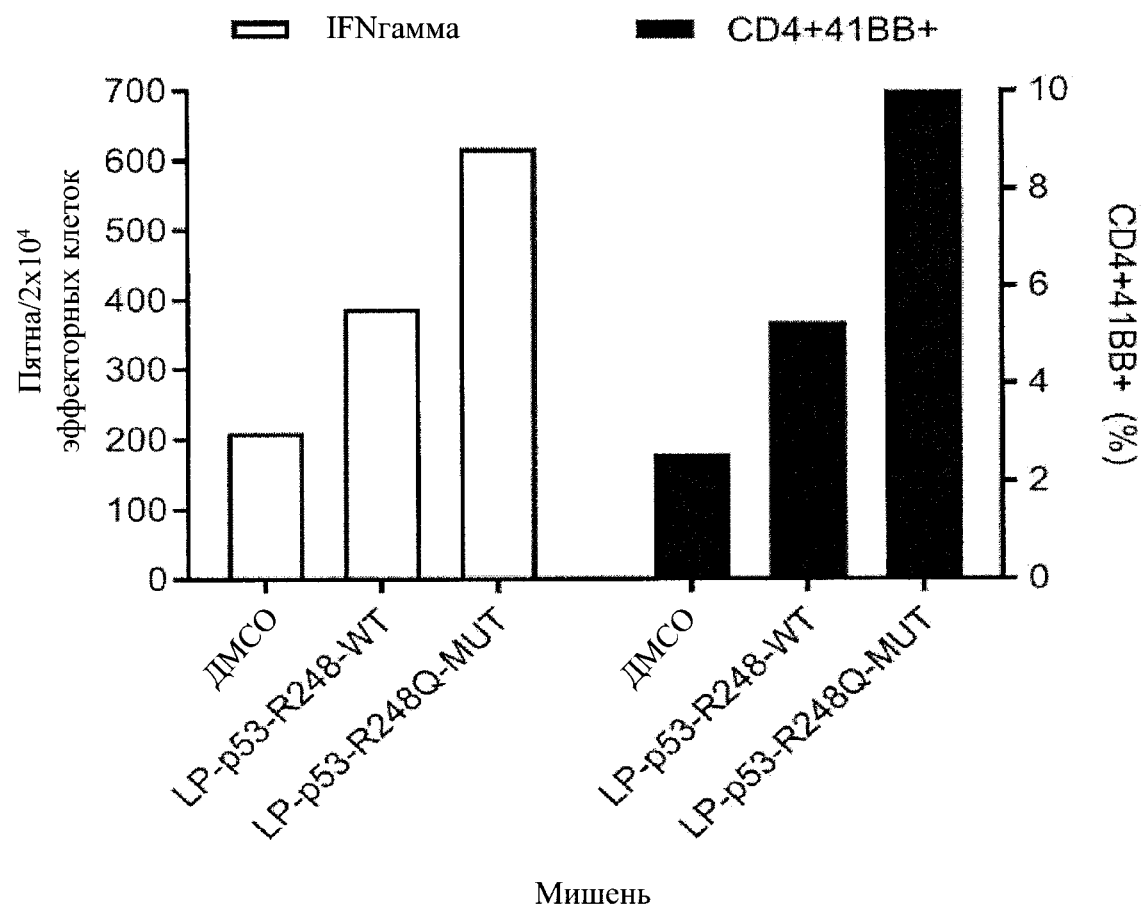
ФИГ. 23



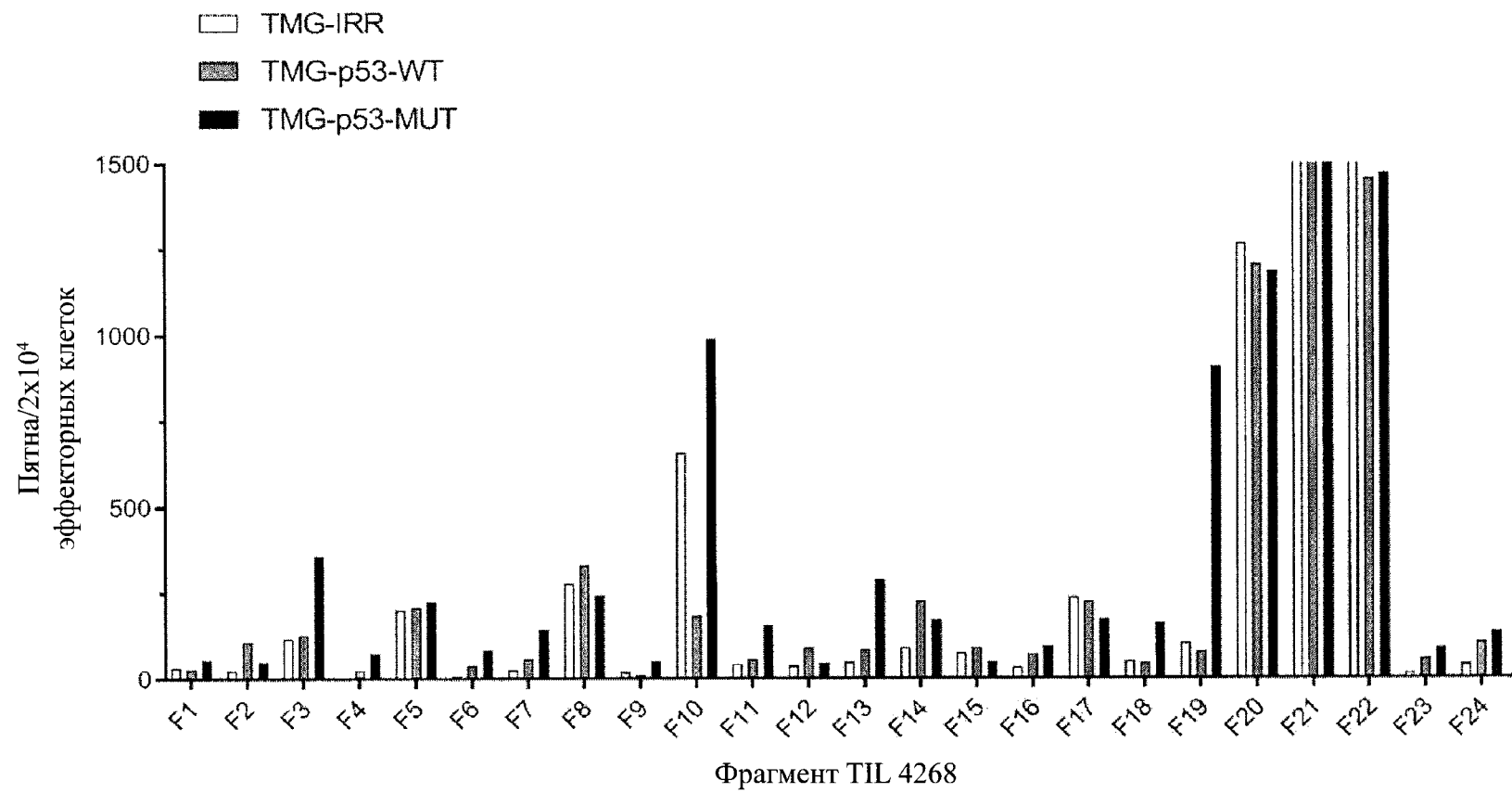
ФИГ. 24



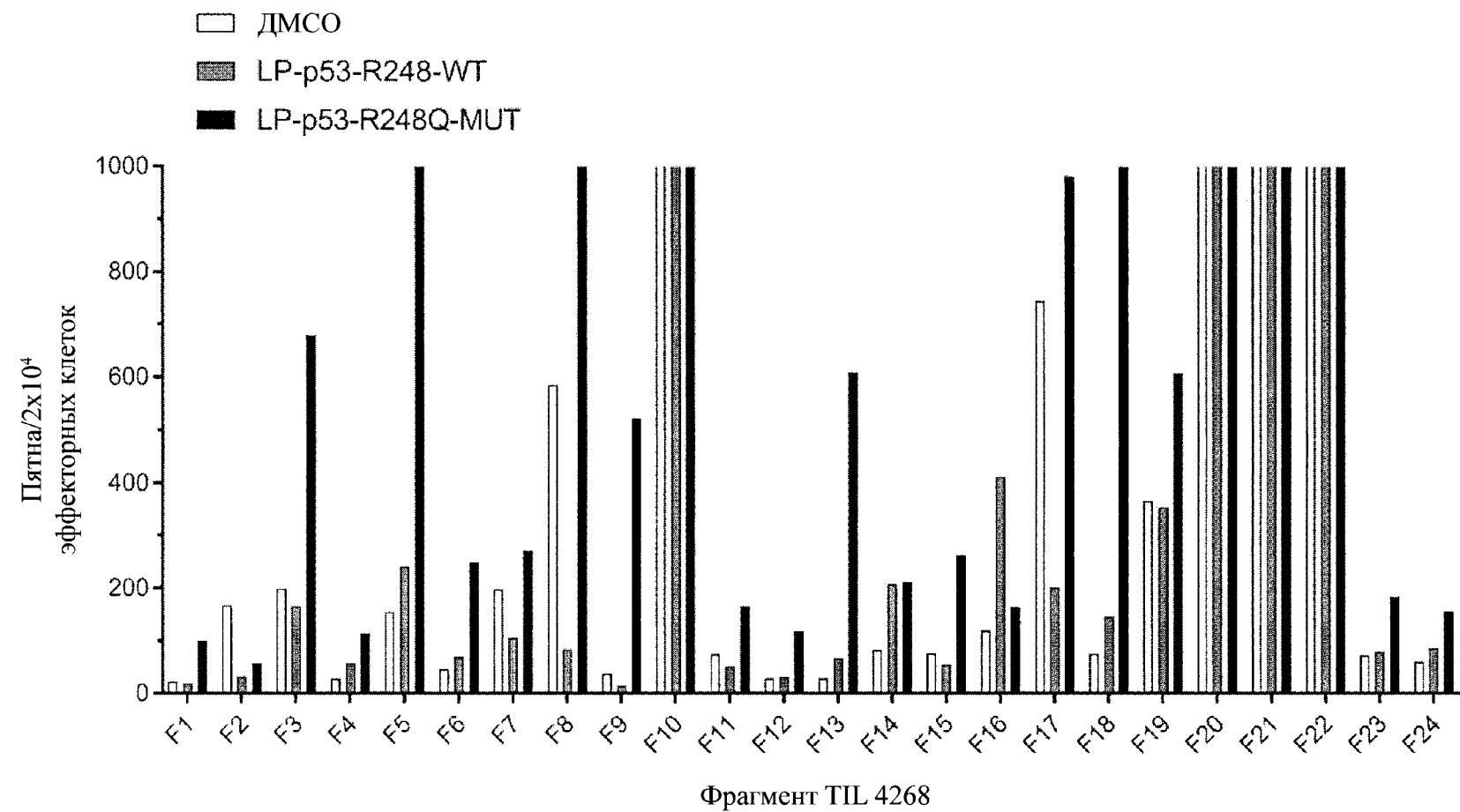
ФИГ. 25



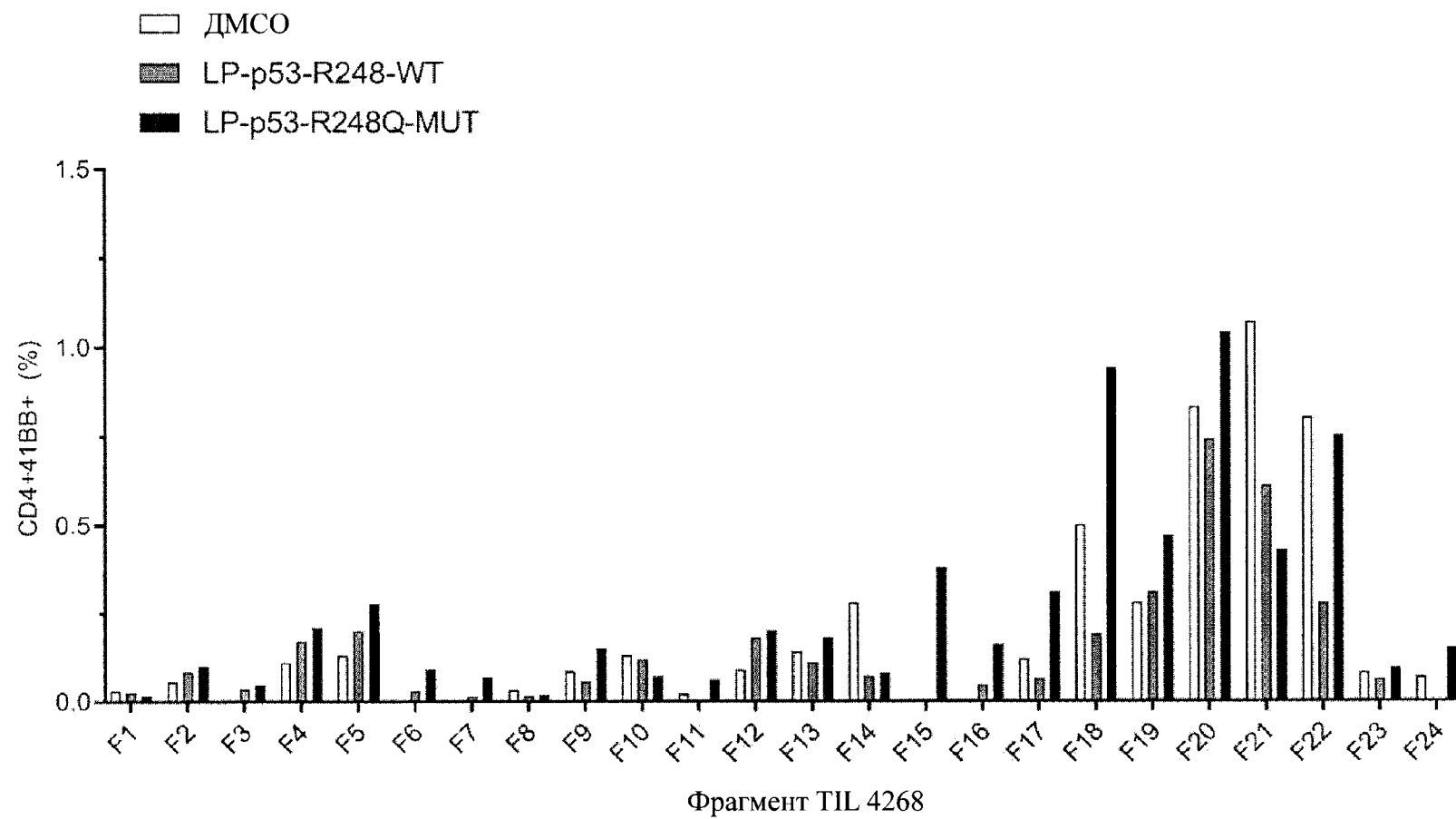
ФИГ. 26



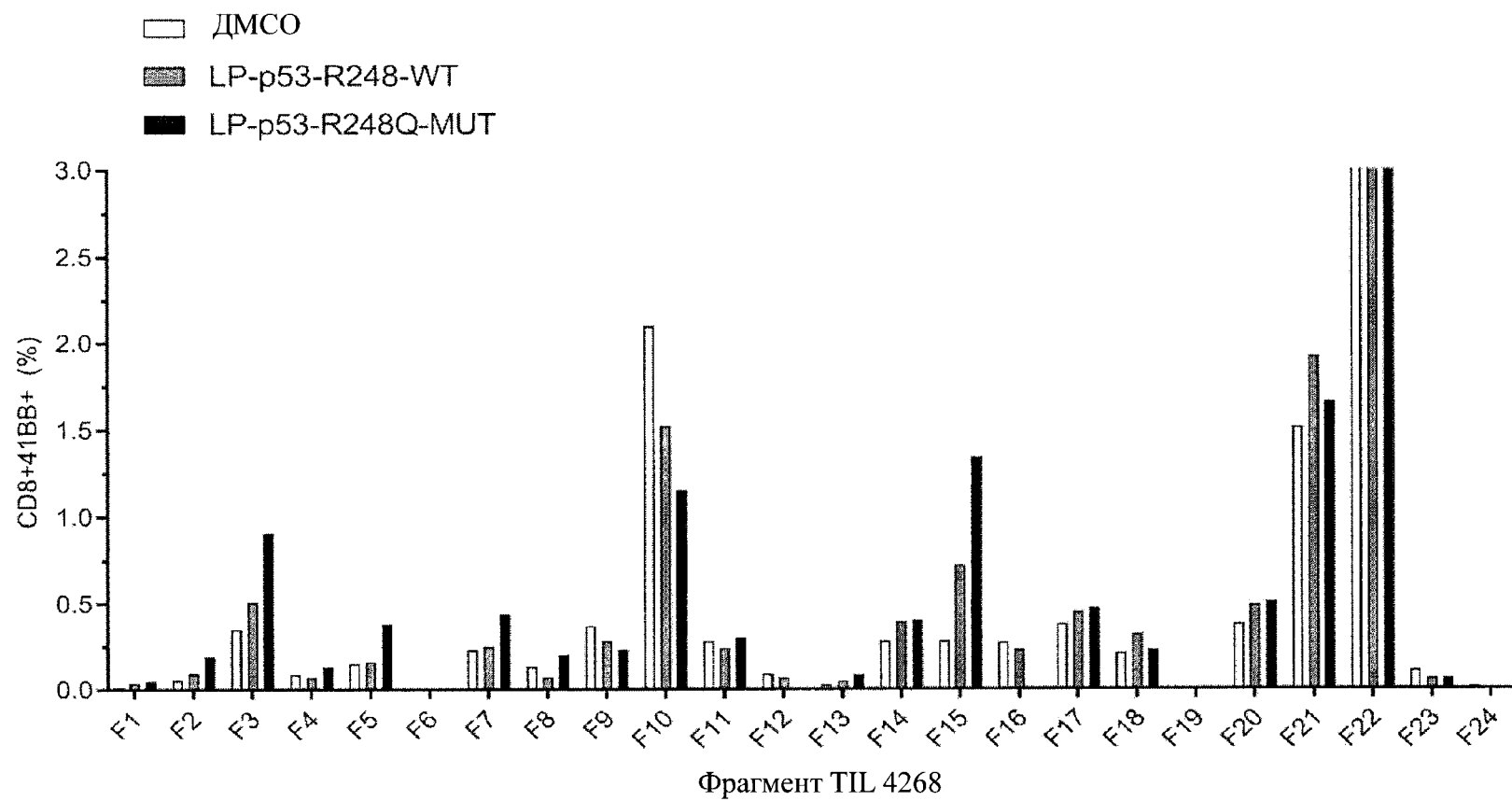
ФИГ. 27



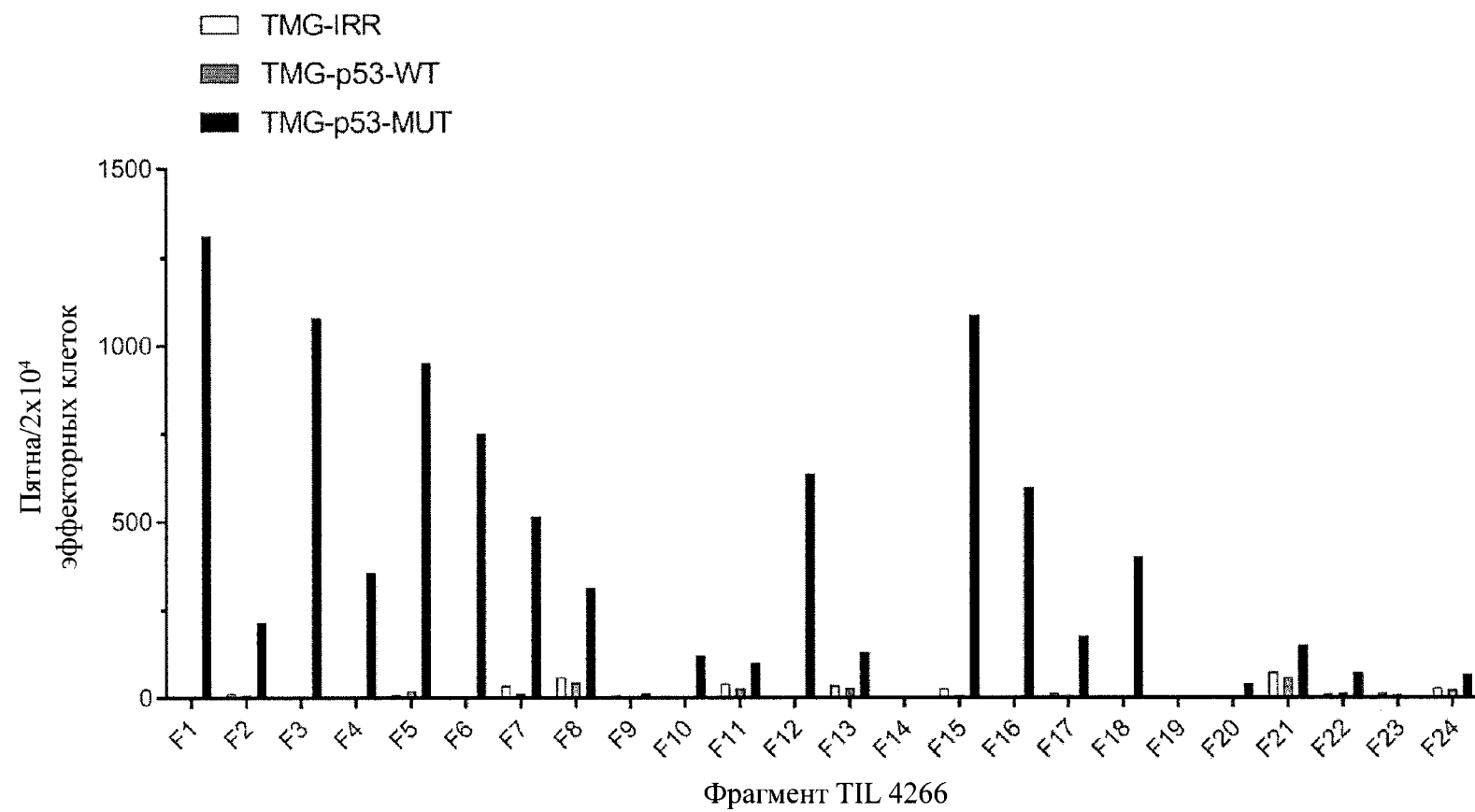
ФИГ. 28



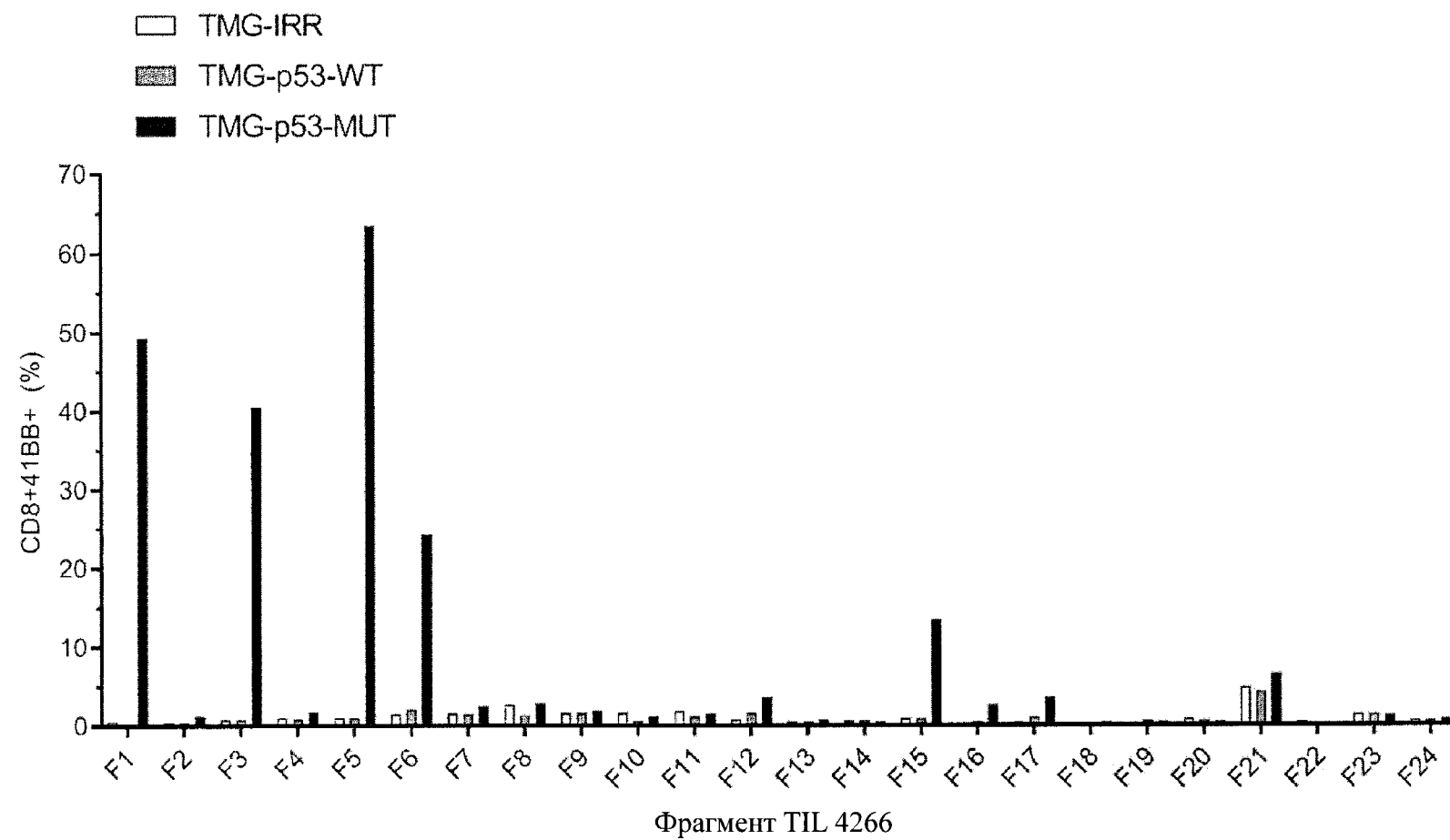
ФИГ. 29



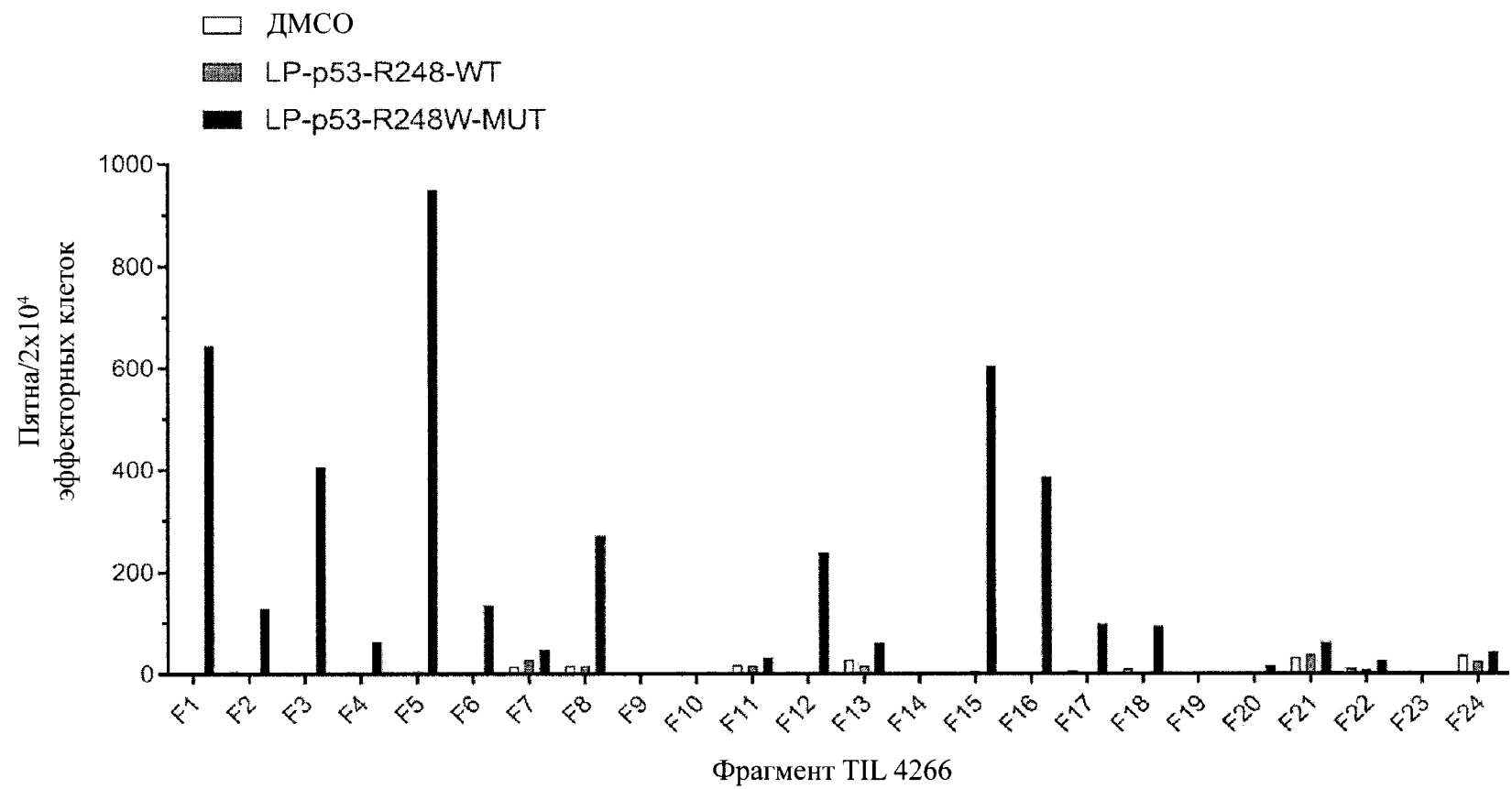
ФИГ. 30



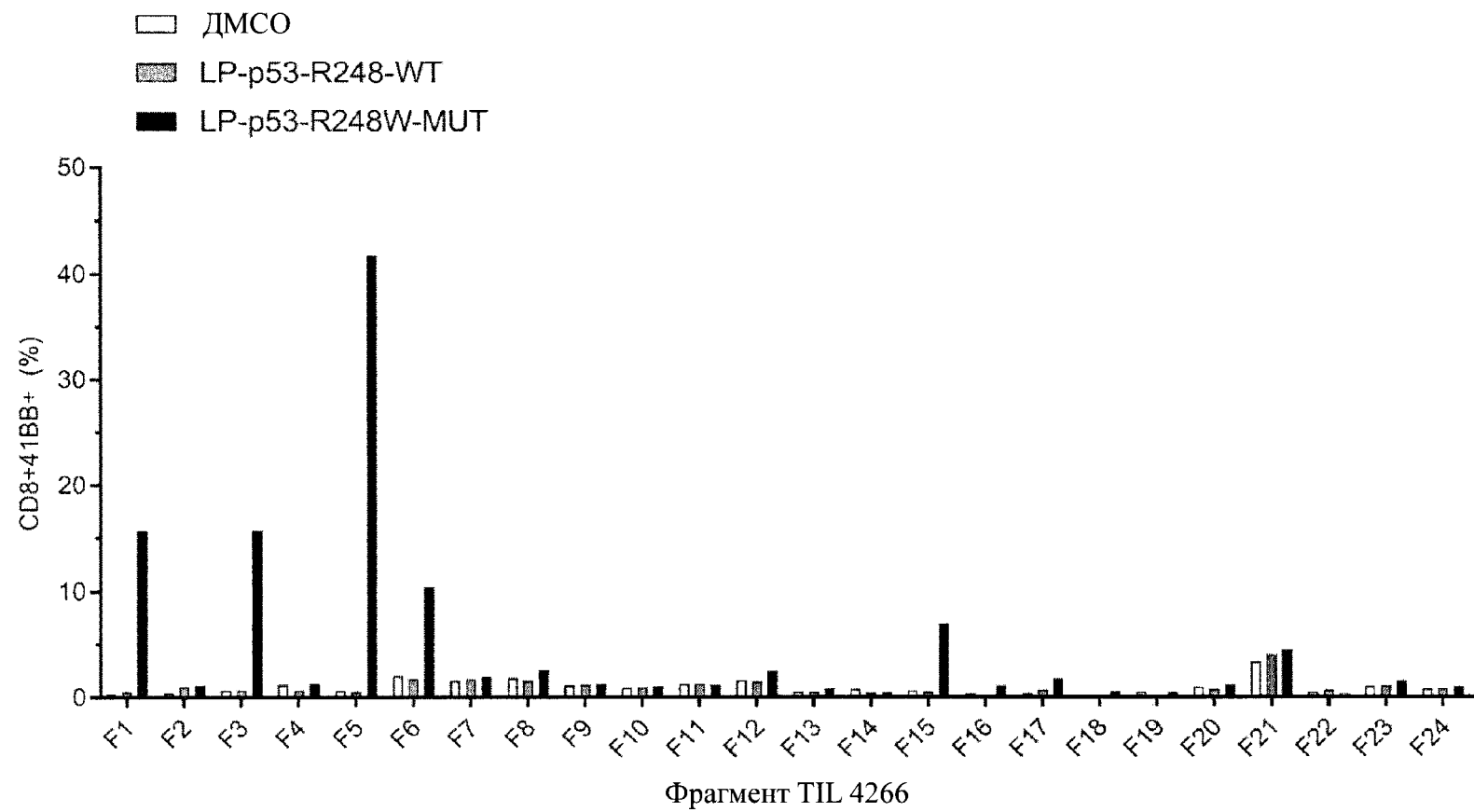
ФИГ. 31



ФИГ. 32



ФИГ. 33



ФИГ. 34

CLUSTAL 0(1.2.4) множественное выравнивание последовательностей

```

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

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

SP|P04637|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHE 180
SP|P04637-2|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHE 180
SP|P04637-3|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHE 180
SP|P04637-4|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHE 141
SP|P04637-5|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHE 141
SP|P04637-6|P53_HUMAN  SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHE 141
SP|P04637-7|P53_HUMAN  -----MFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHE 48
SP|P04637-8|P53_HUMAN  -----MFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHE 48
SP|P04637-9|P53_HUMAN  -----MFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHE 48
*****

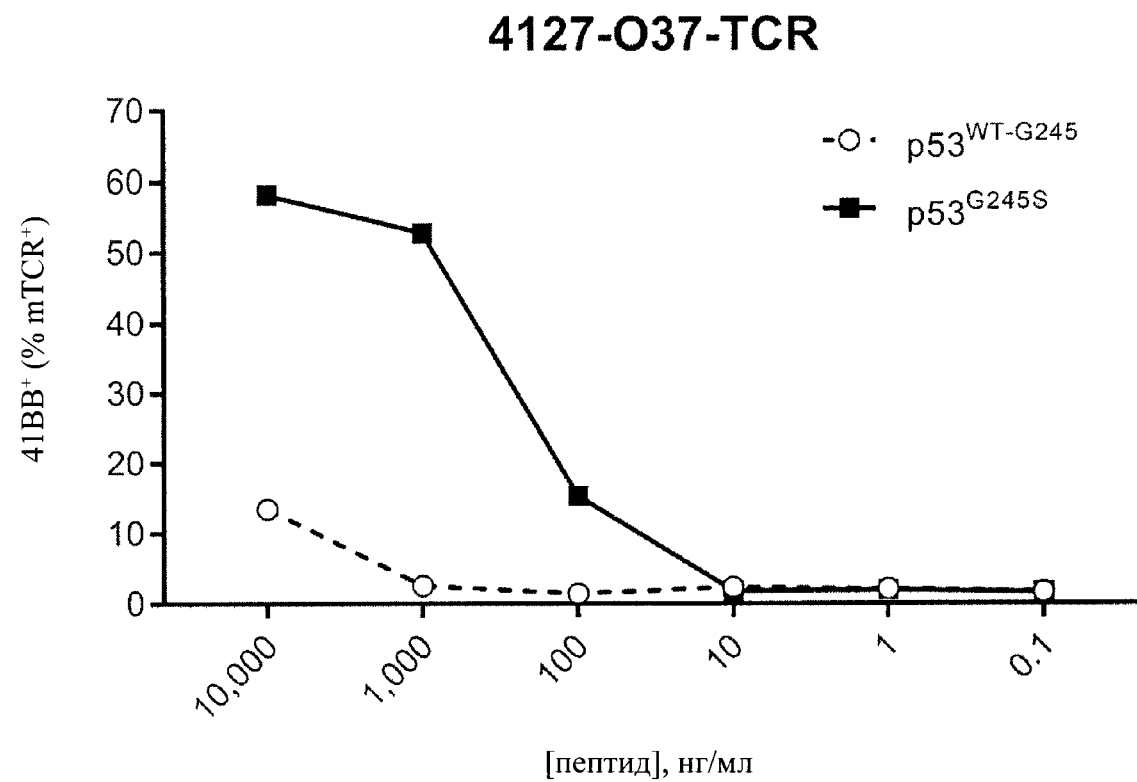
SP|P04637|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDNRNTRFRHSVVVPYEPPEVGSQDCTTIHYNMNCNS 240
SP|P04637-2|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDNRNTRFRHSVVVPYEPPEVGSQDCTTIHYNMNCNS 240
SP|P04637-3|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDNRNTRFRHSVVVPYEPPEVGSQDCTTIHYNMNCNS 240
SP|P04637-4|P53_HUMAN  RCSDSGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDNRNTRFRHSVVVPYEPPEVGSQDCTTIHYNMNCNS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

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

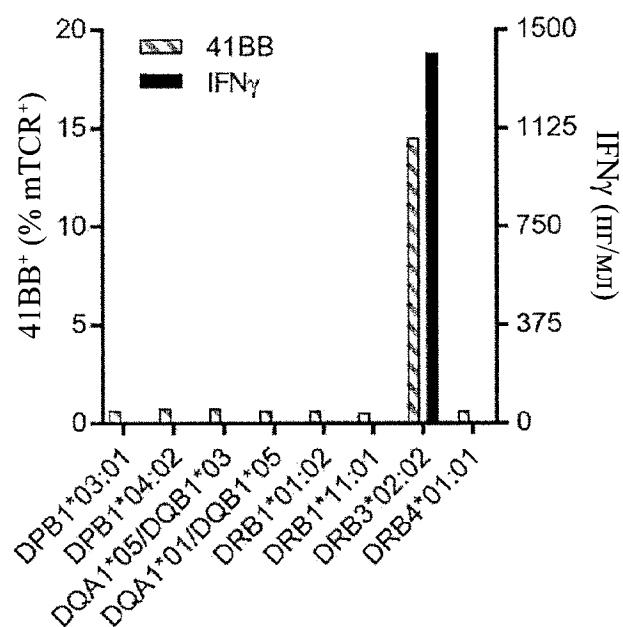
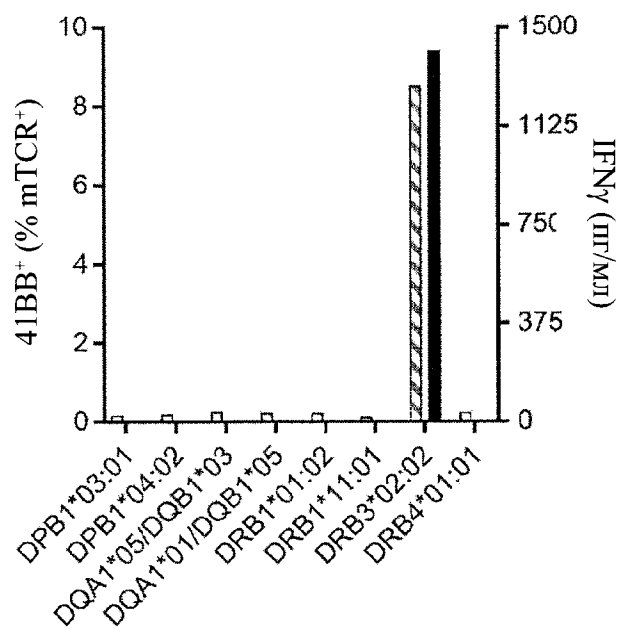
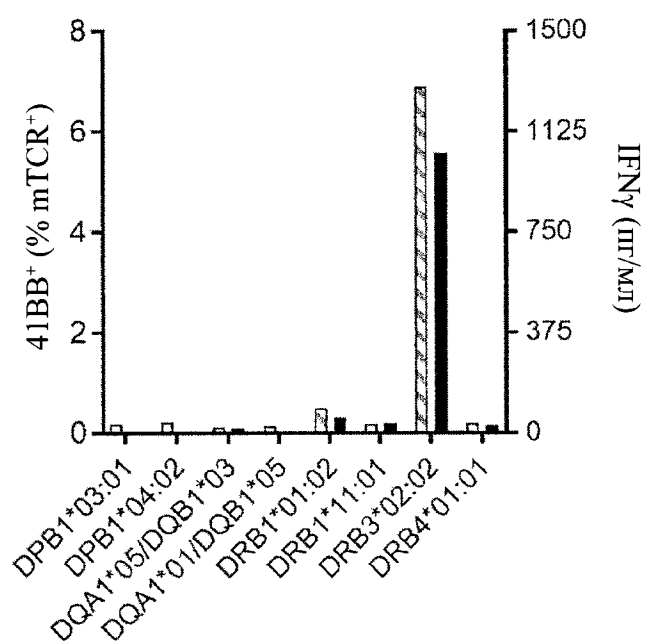
SP|P04637|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDQAQGEKPG 360
SP|P04637-2|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQDQTSFQKENC----- 341
SP|P04637-3|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQMLDLRWCYFLINSS----- 346
SP|P04637-4|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDQAQGEKPG 321
SP|P04637-5|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQDQTSFQKENC----- 302
SP|P04637-6|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQMLDLRWCYFLINSS----- 307
SP|P04637-7|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDQAQGEKPG 228
SP|P04637-8|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQDQTSFQKENC----- 209
SP|P04637-9|P53_HUMAN  PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQMLDLRWCYFLINSS----- 214
*****

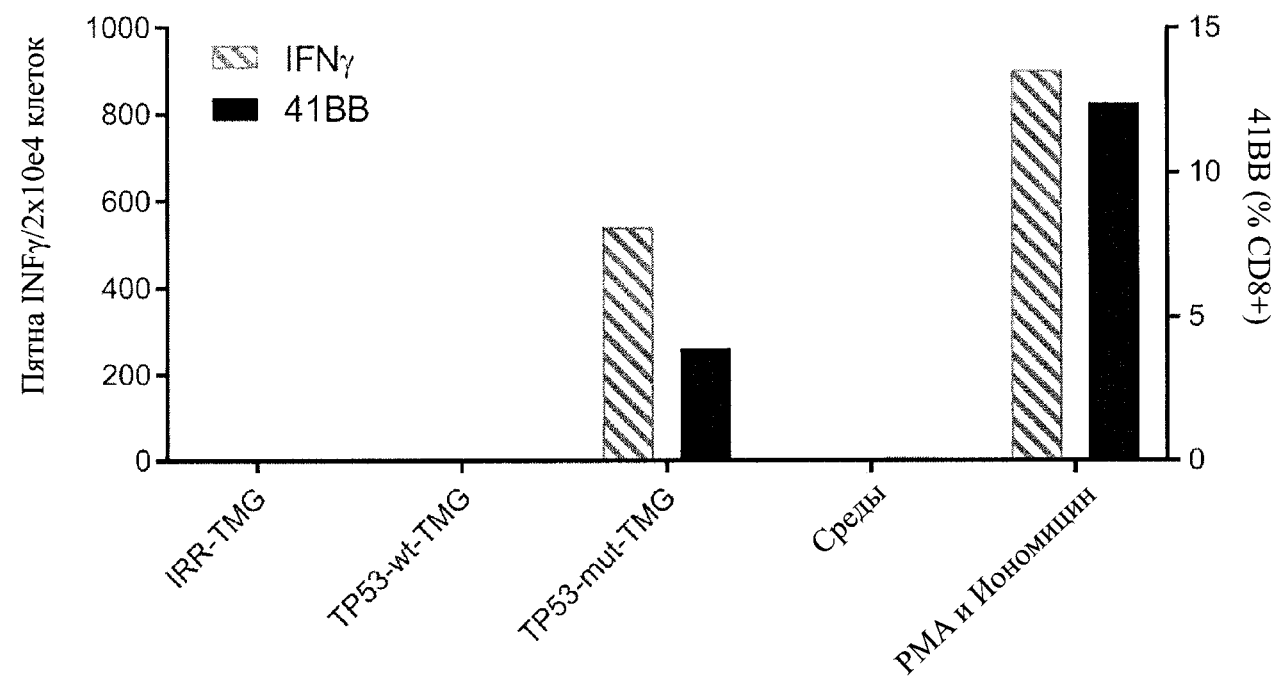
SP|P04637|P53_HUMAN  GSRAHSHLKSCKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDS 393
SP|P04637-2|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-3|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-4|P53_HUMAN  GSRAHSHLKSCKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDS 354
SP|P04637-5|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-6|P53_HUMAN  -----
SP|P04637-7|P53_HUMAN  GSRAHSHLKSCKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDS 261
SP|P04637-8|P53_HUMAN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

```

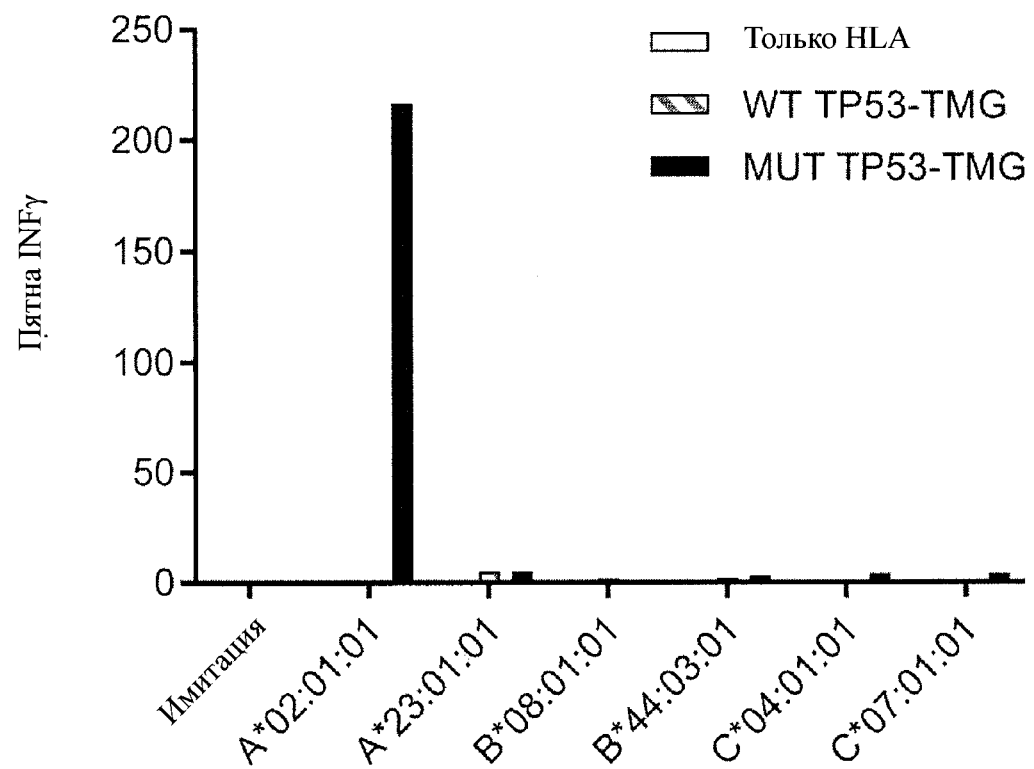


ФИГ. 36

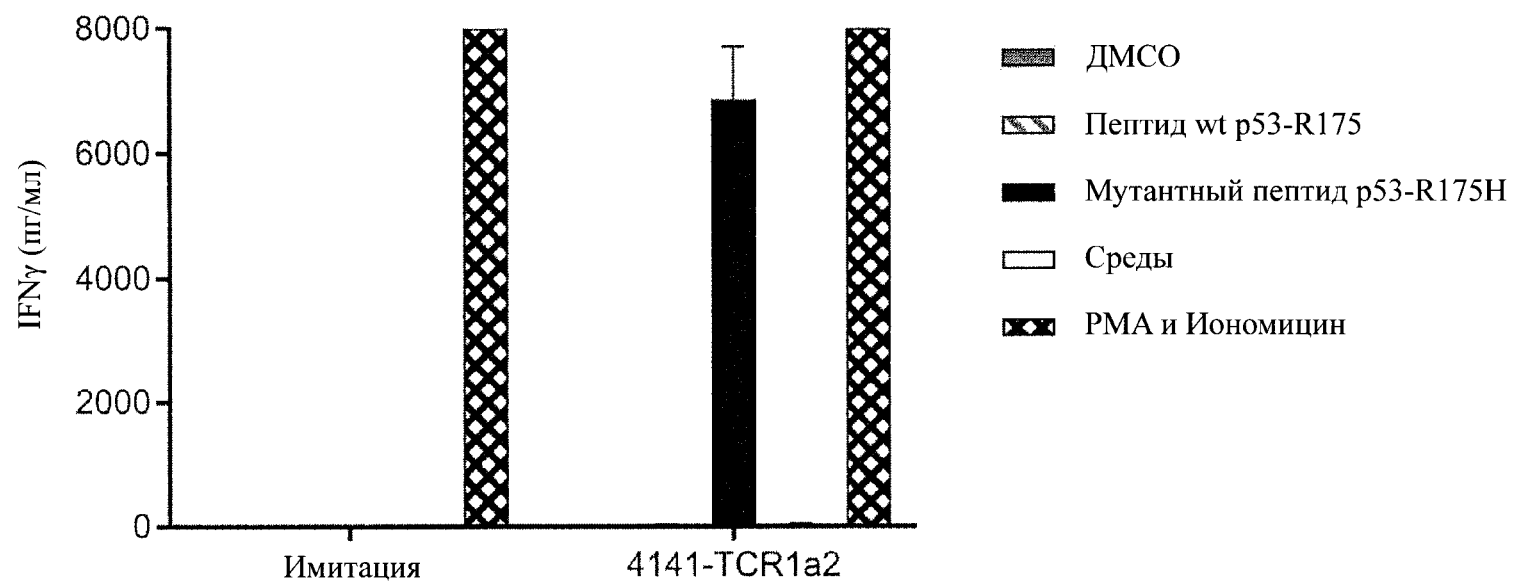
4127-O37-TCR**ФИГ. 37А****4127-TP53-G245S-TCR1****ФИГ. 37В****4127-O102-TCR****ФИГ. 37С**



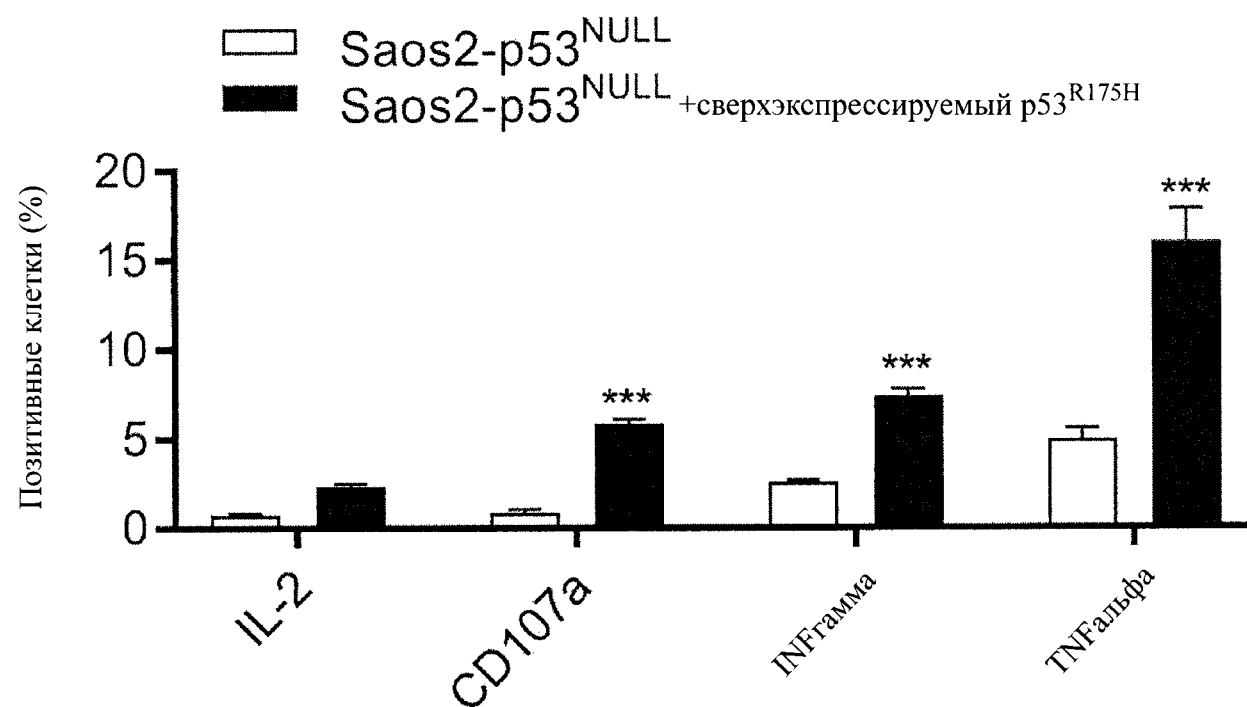
ФИГ. 38



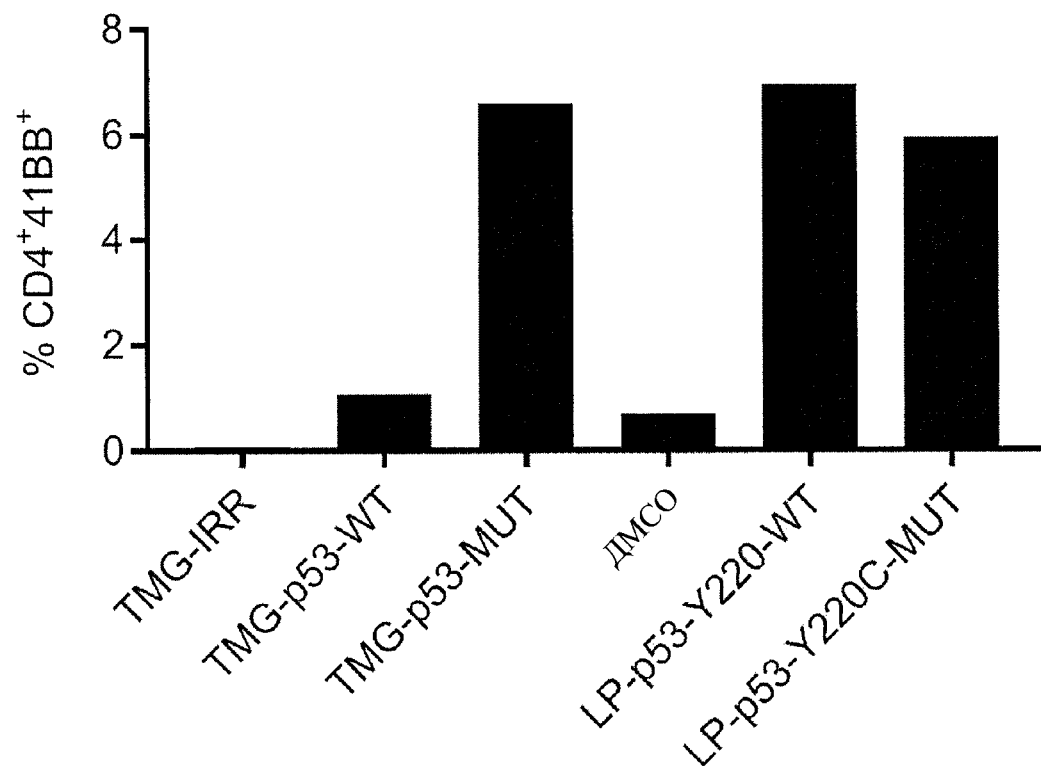
ФИГ. 39



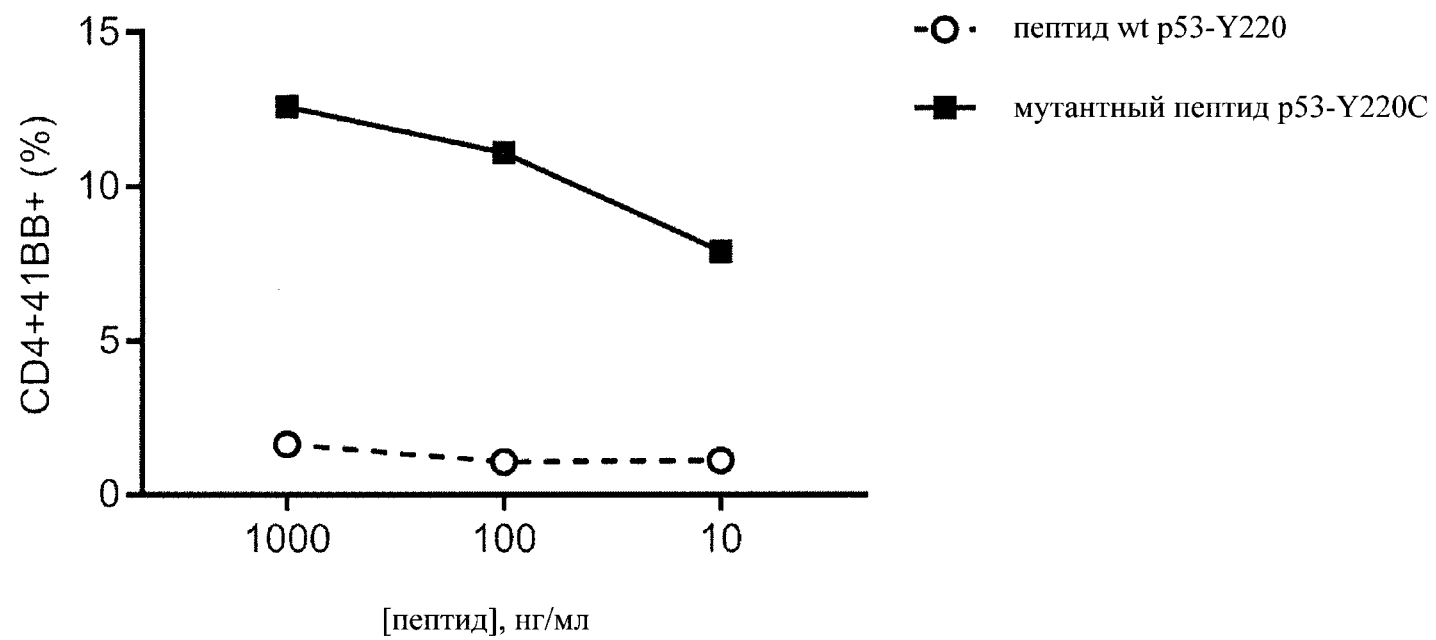
ФИГ. 40



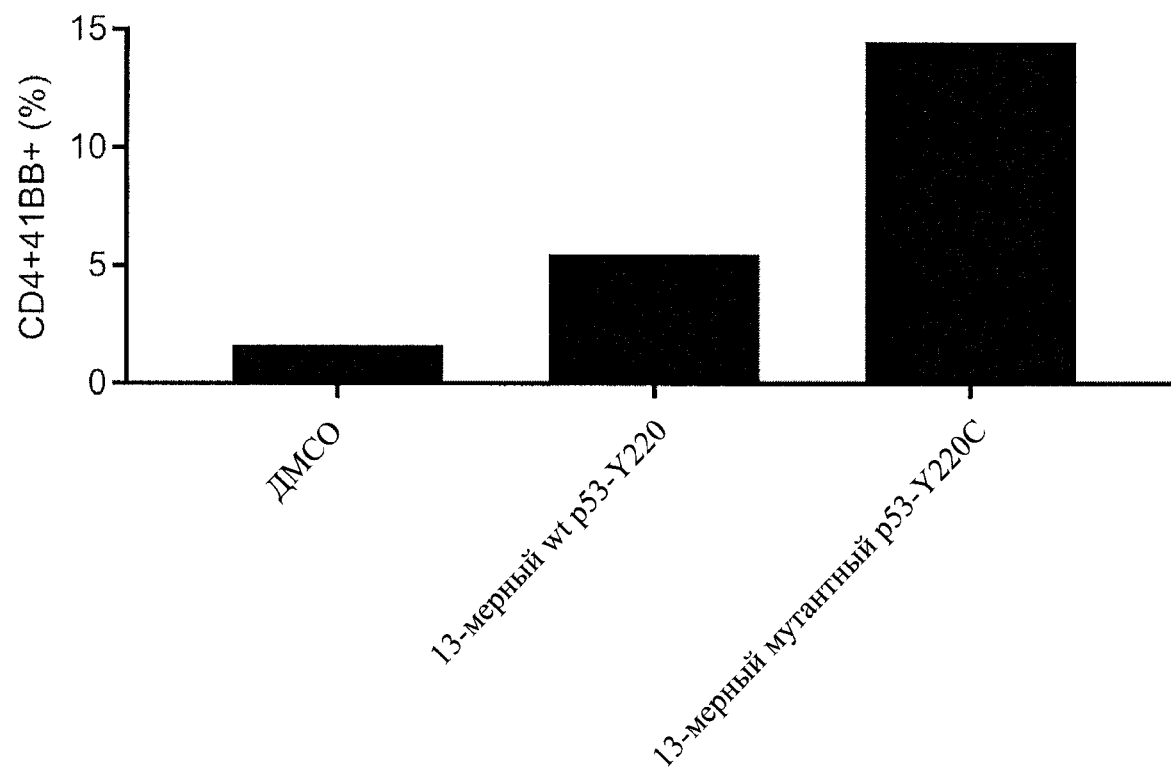
ФИГ. 41



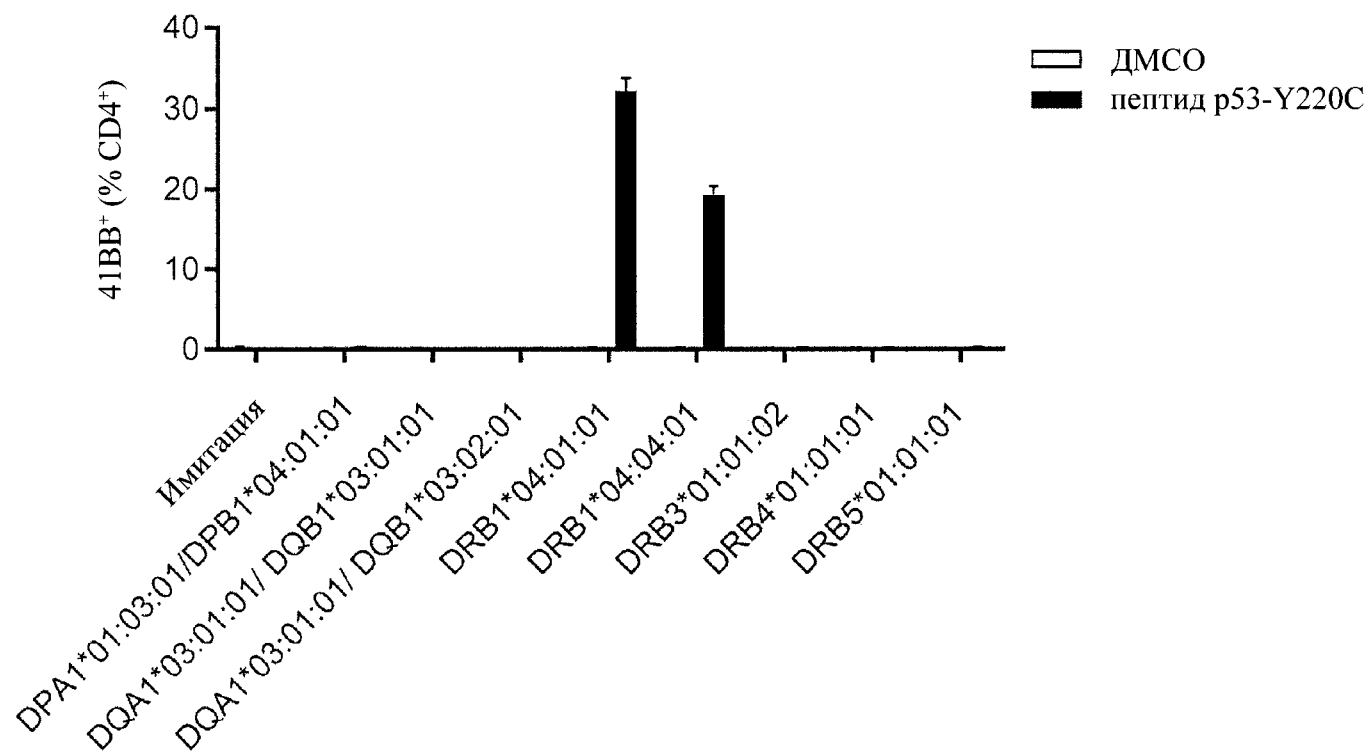
ФИГ. 42



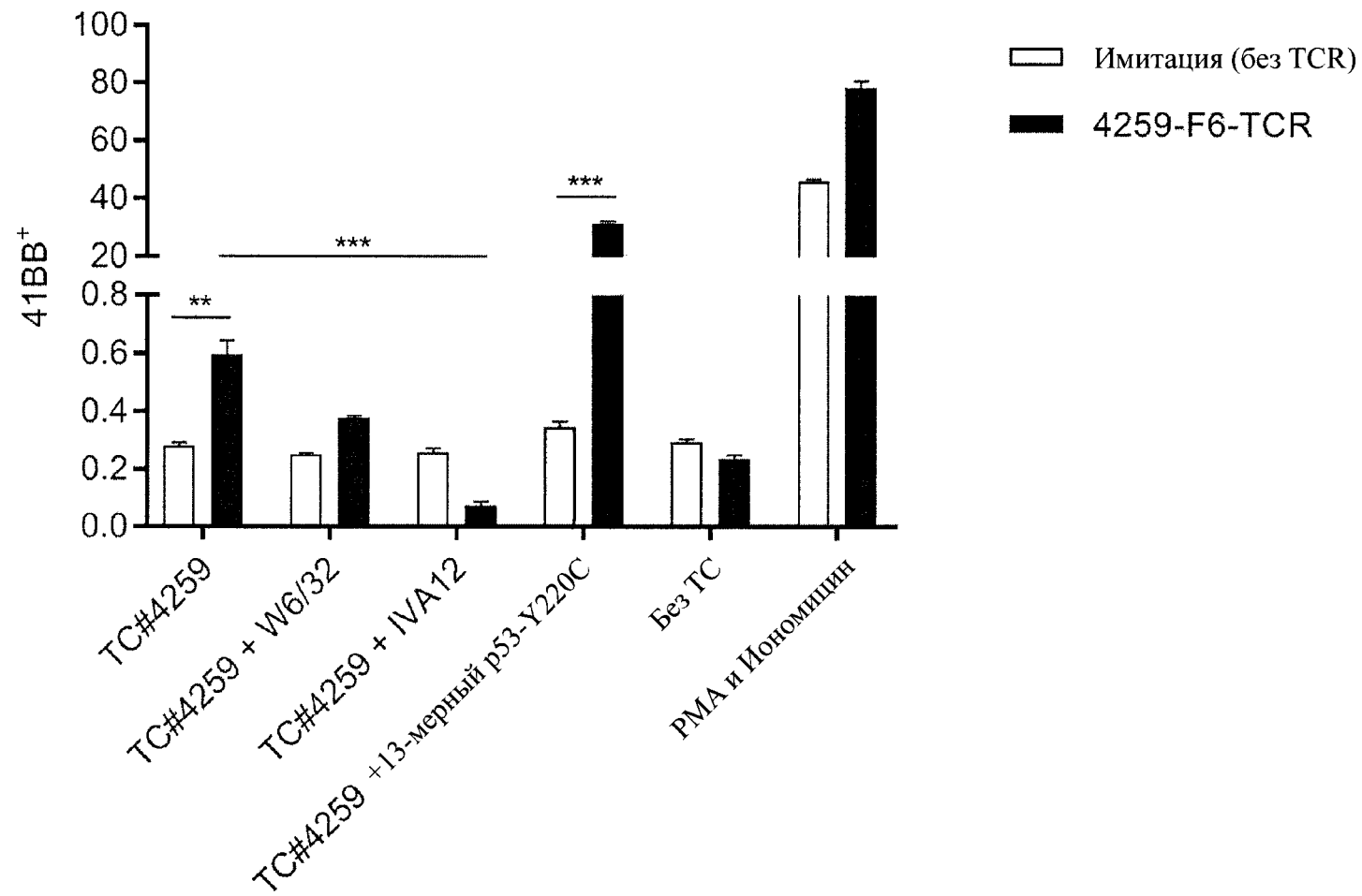
ФИГ. 43



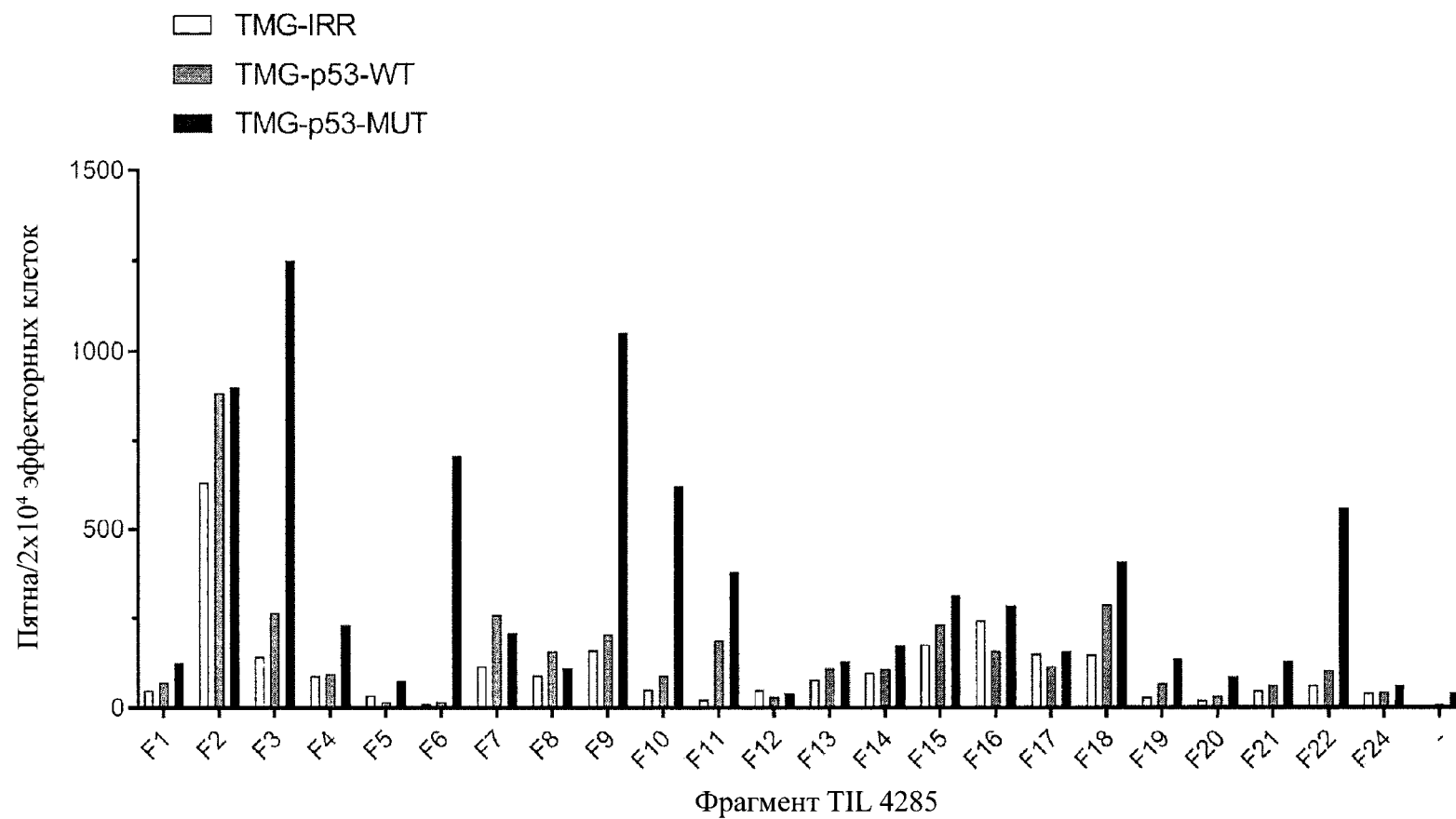
ФИГ. 44



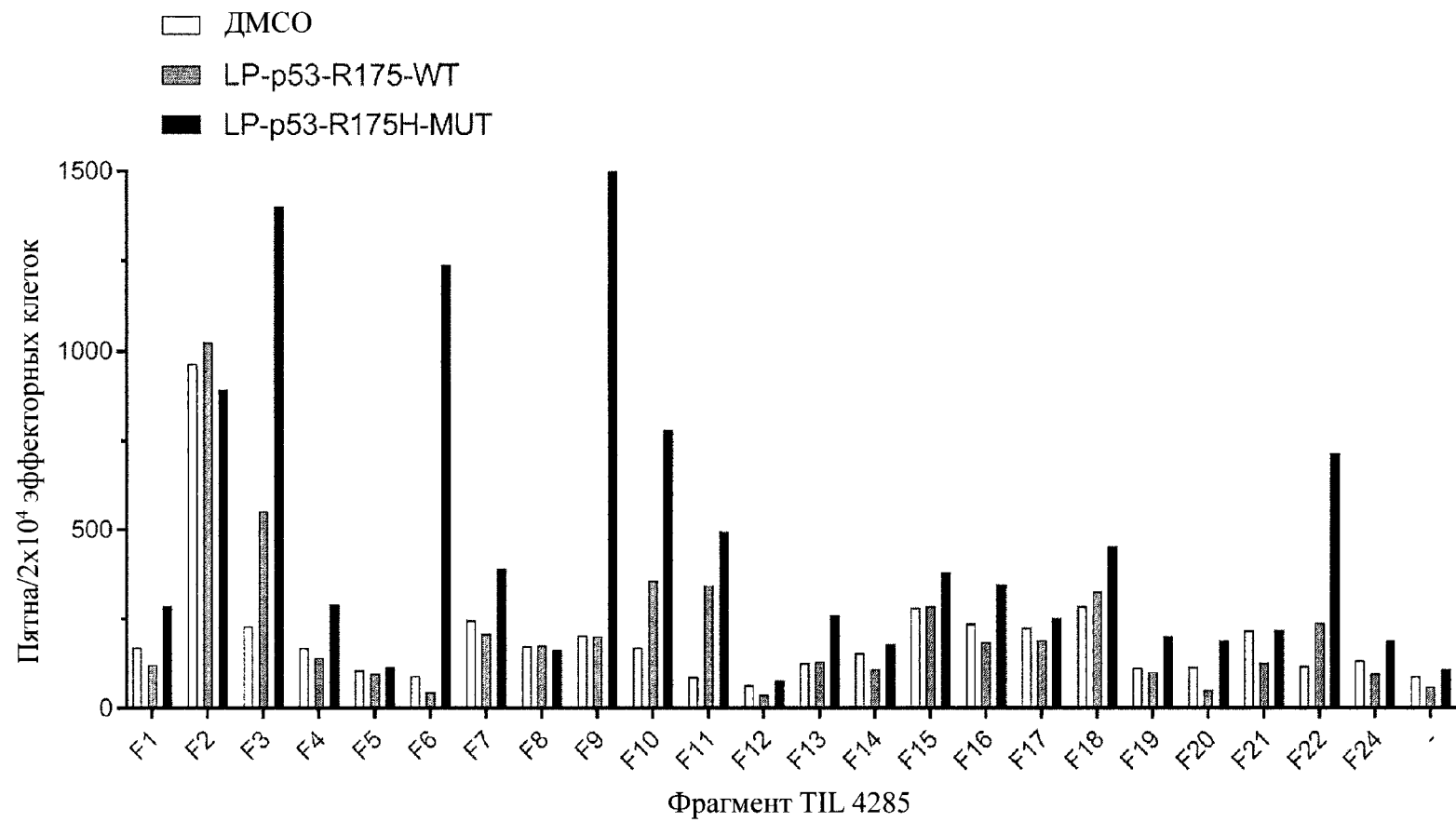
ФИГ. 45



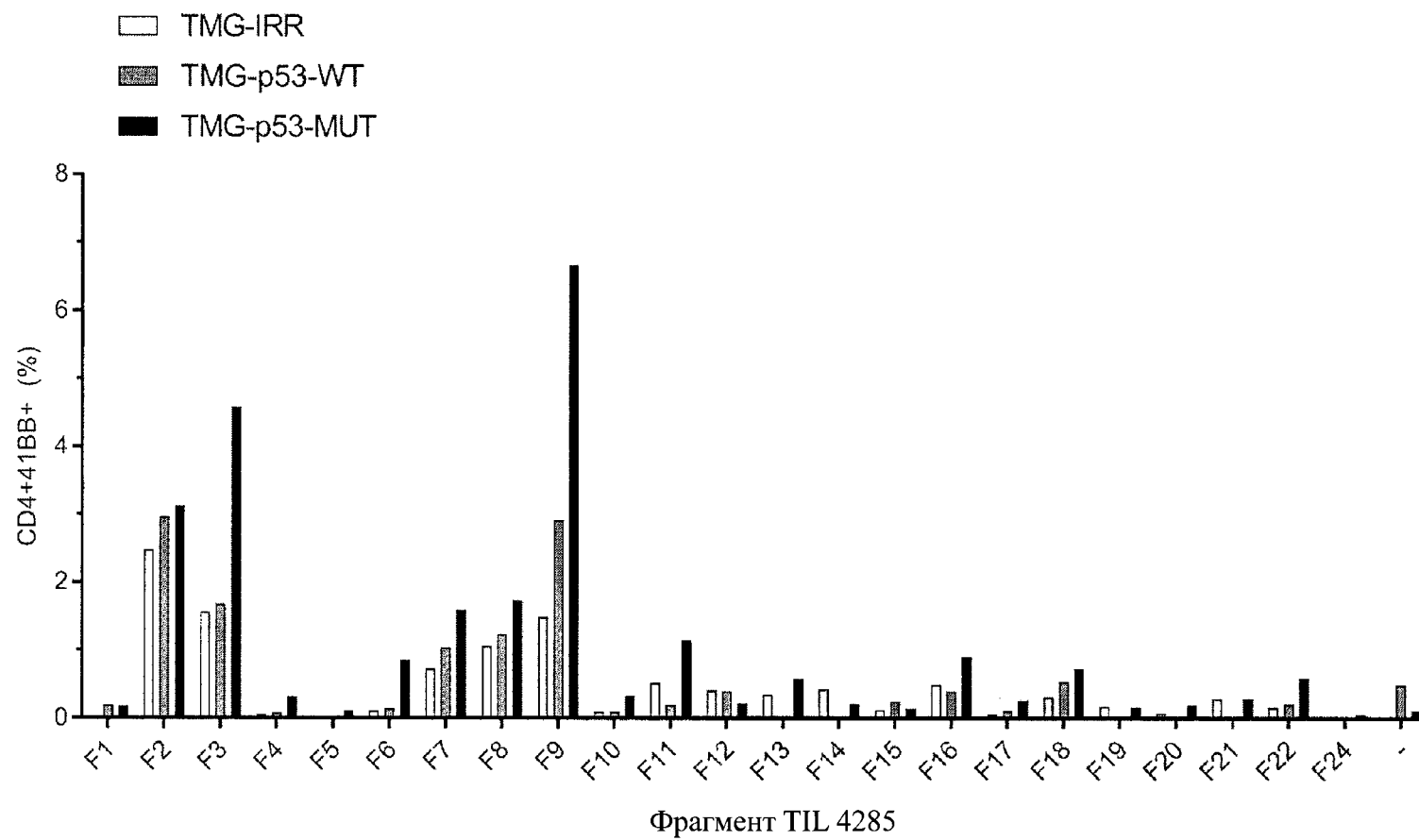
ФИГ. 46



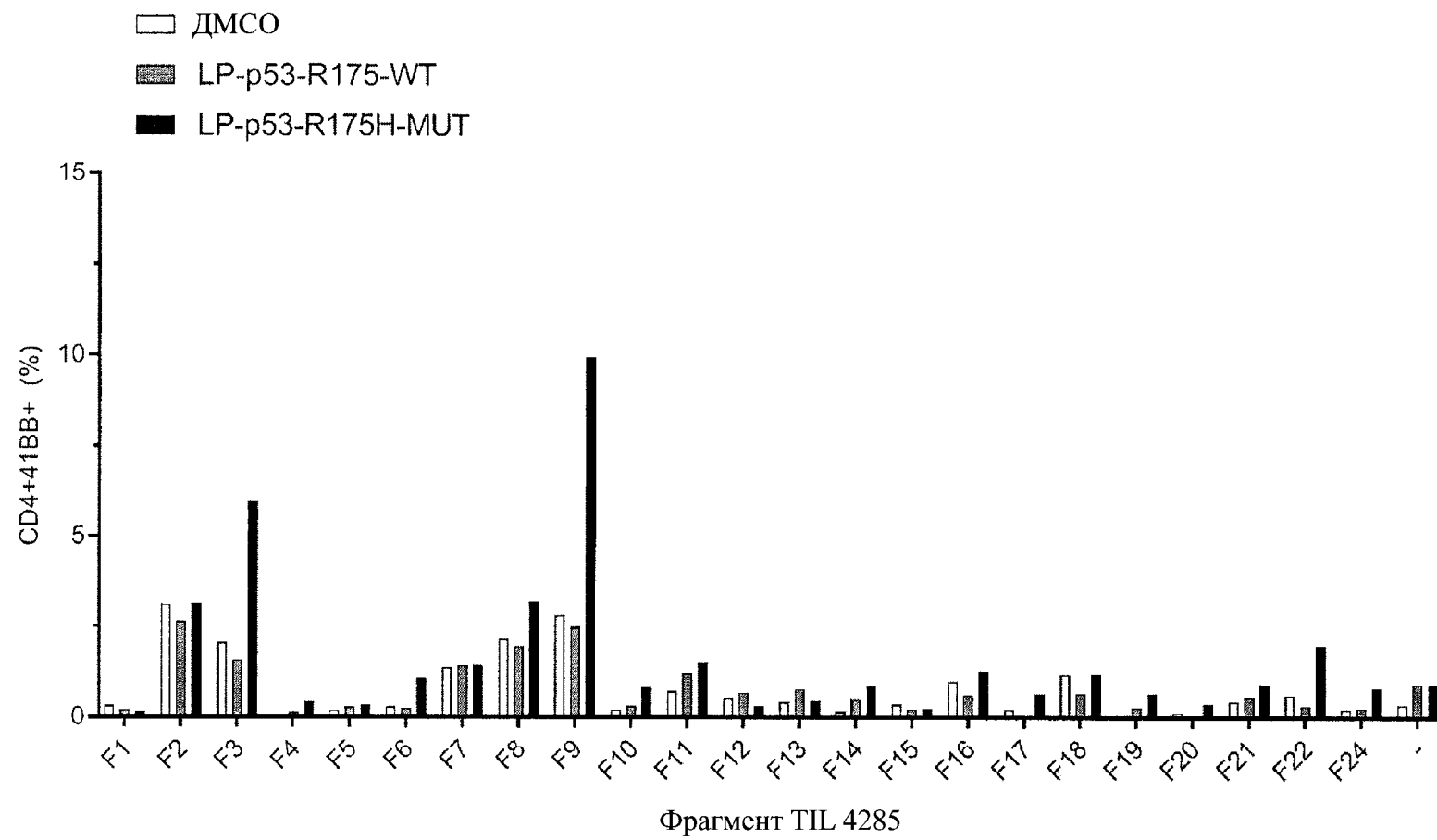
ФИГ. 47



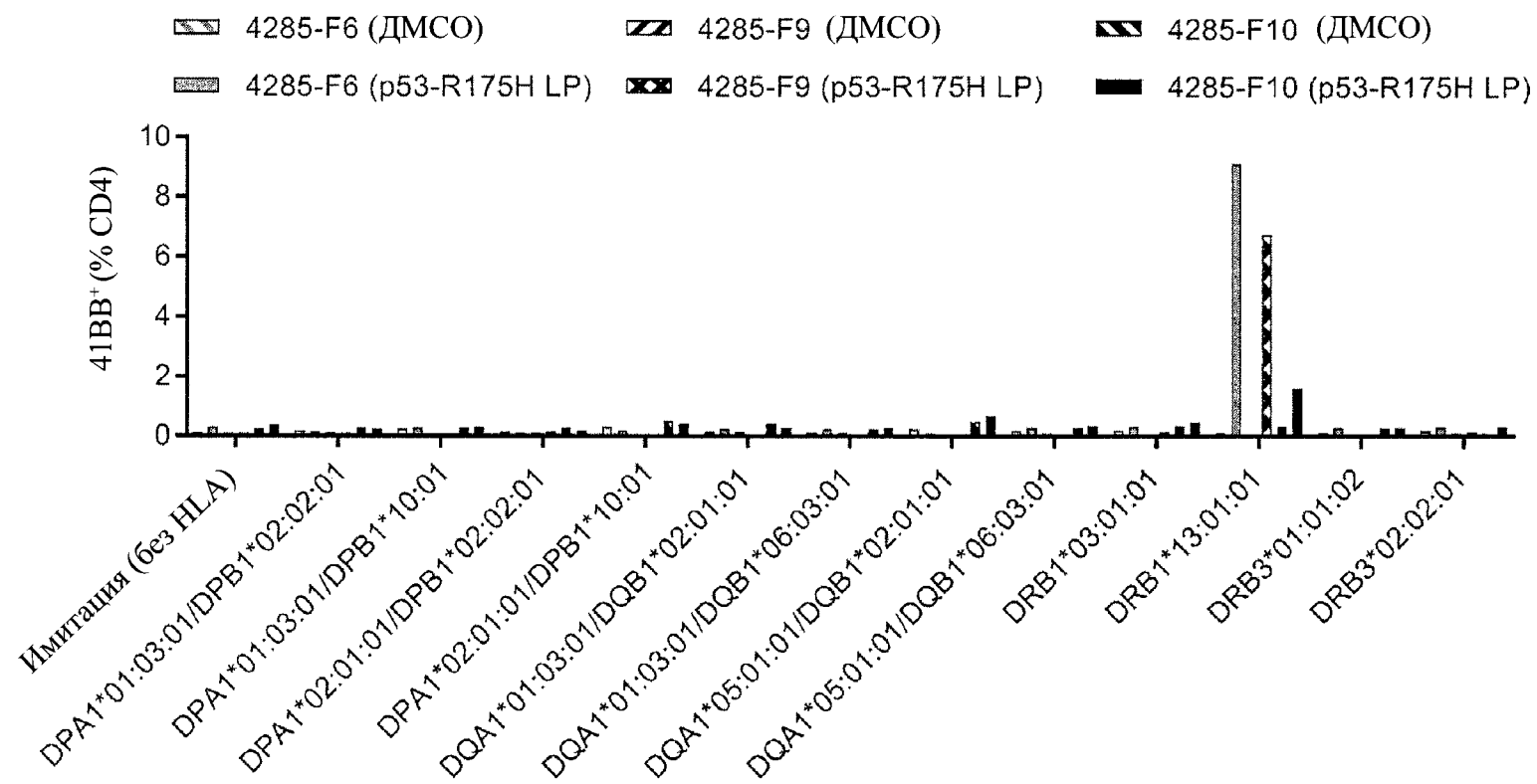
ФИГ. 48



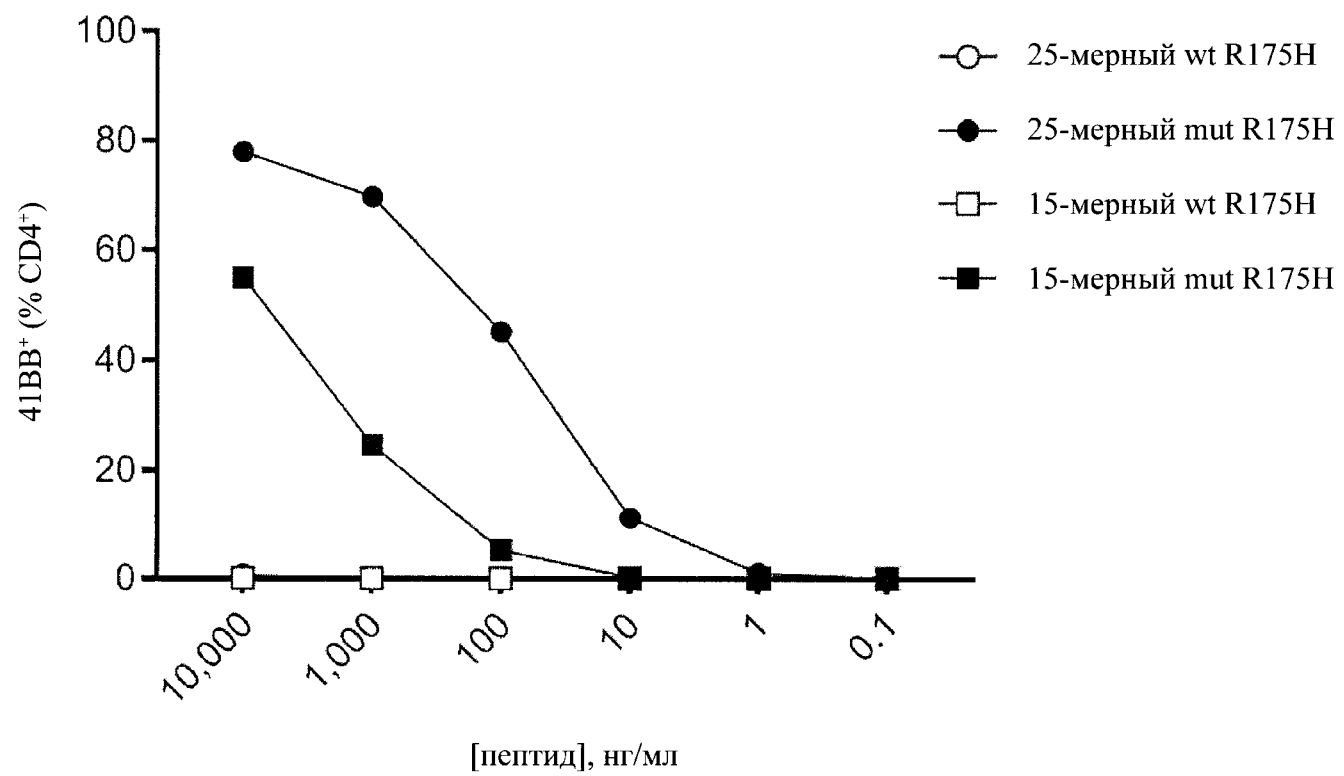
ФИГ. 49



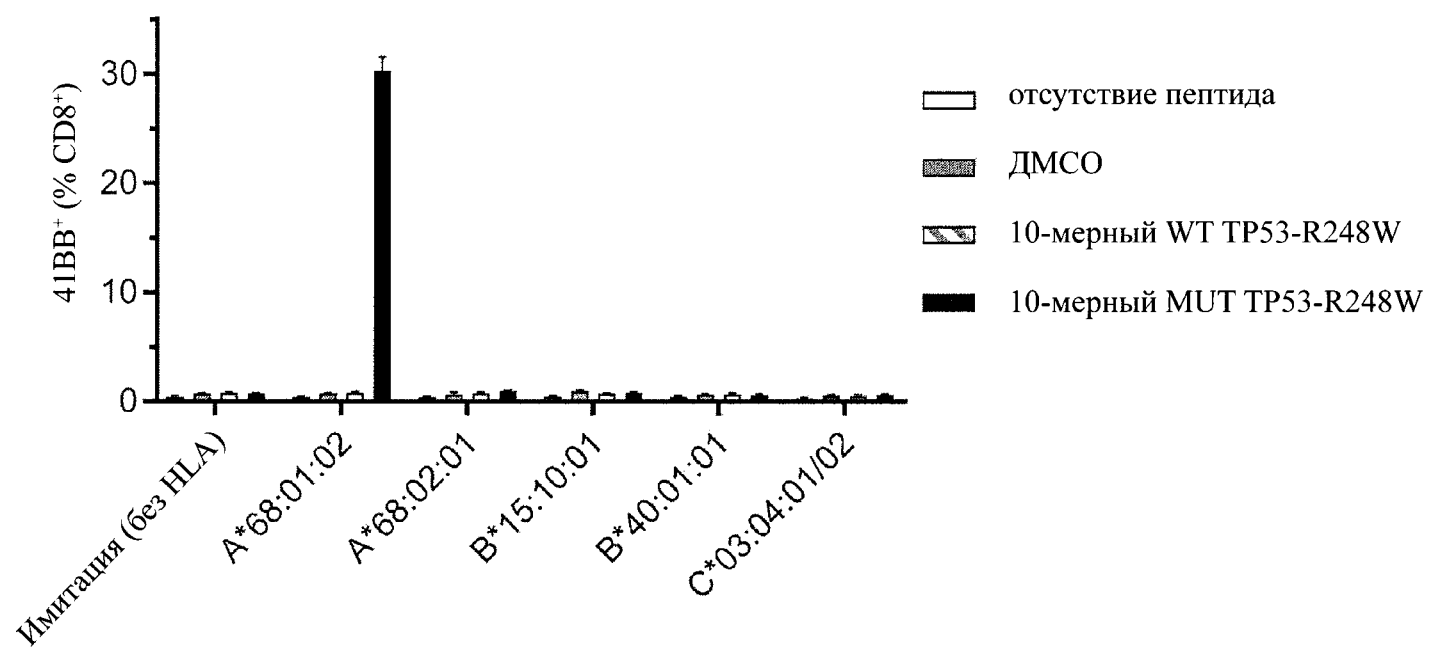
ФИГ. 50



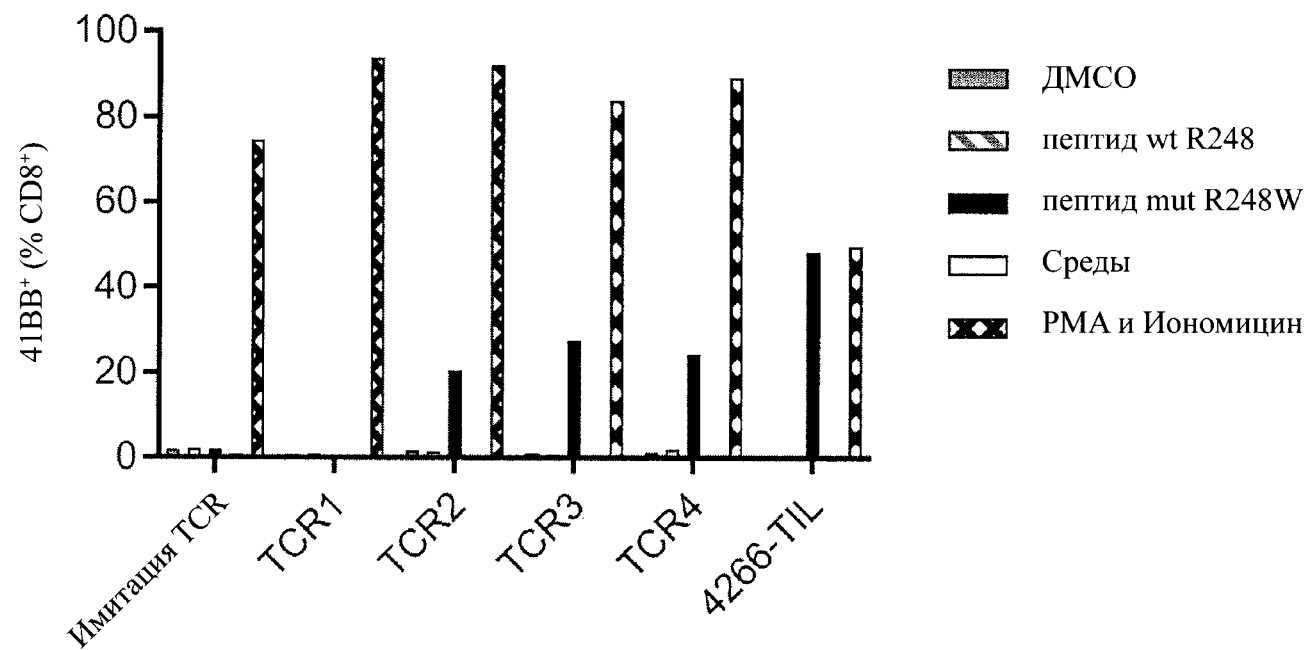
ФИГ. 51



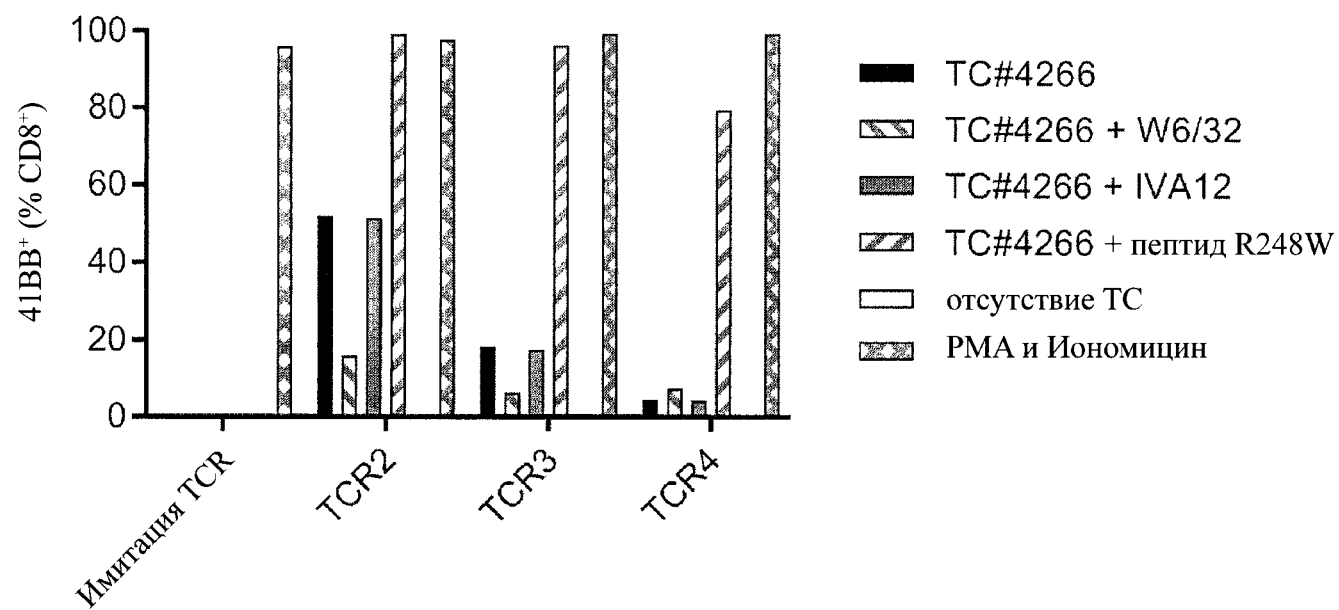
ФИГ. 52



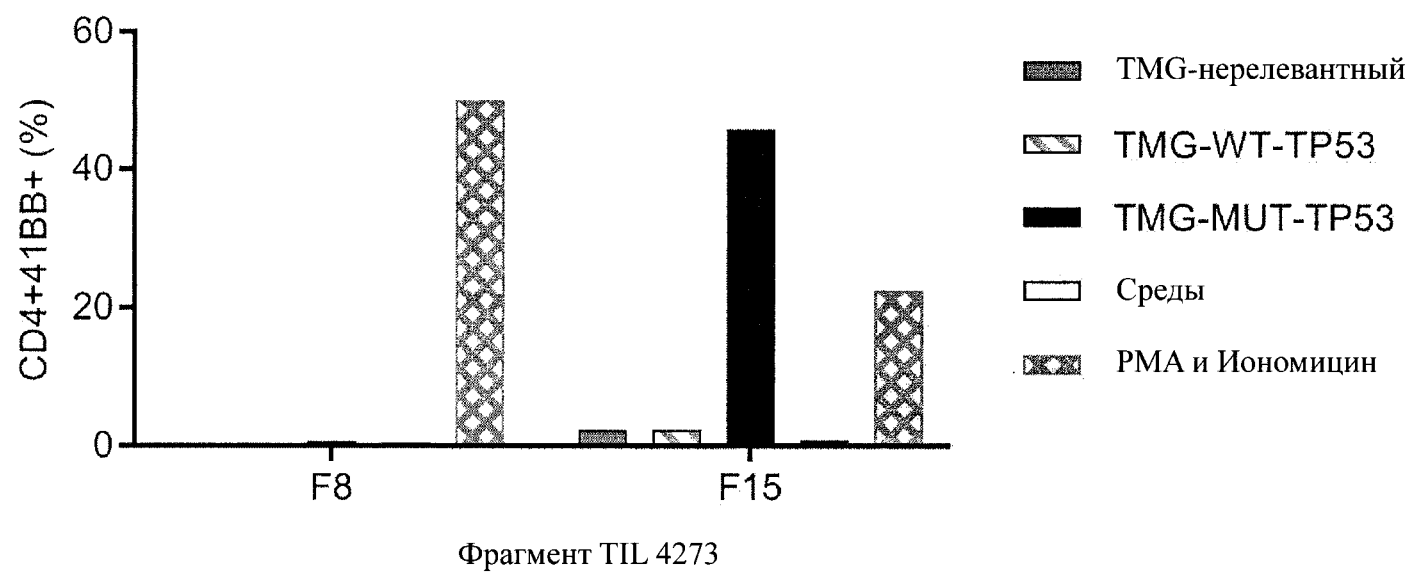
ФИГ. 53



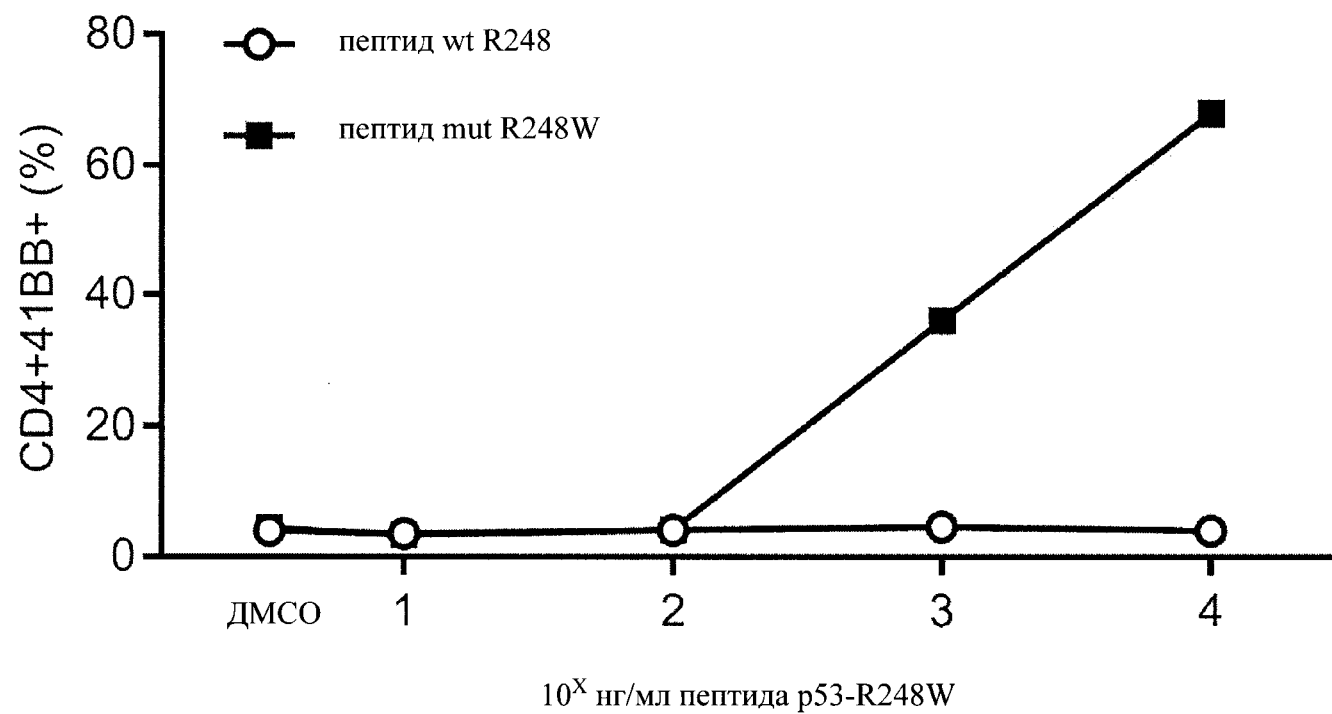
ФИГ. 54



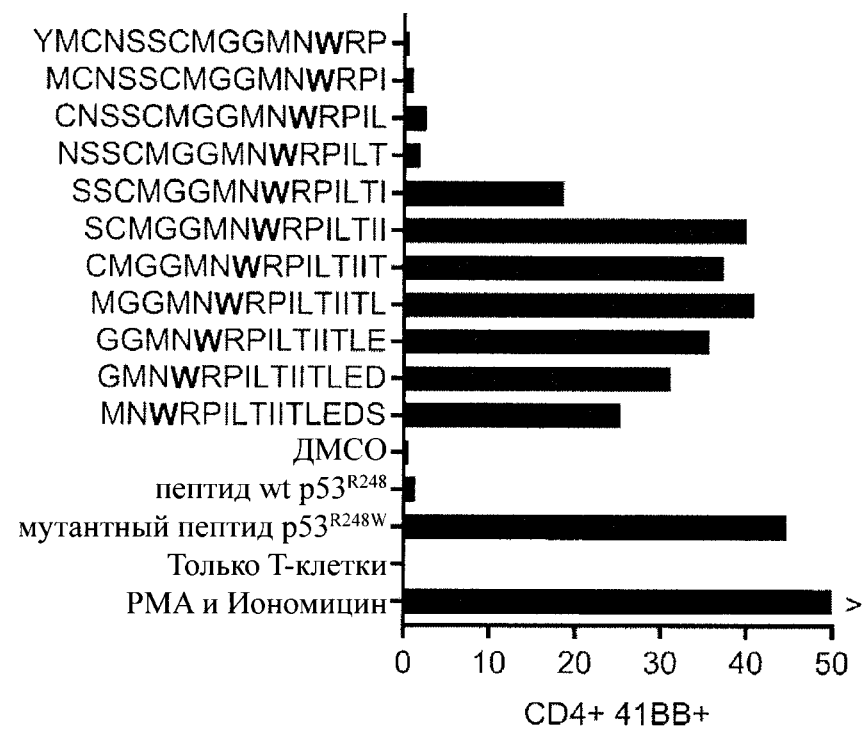
ФИГ. 55



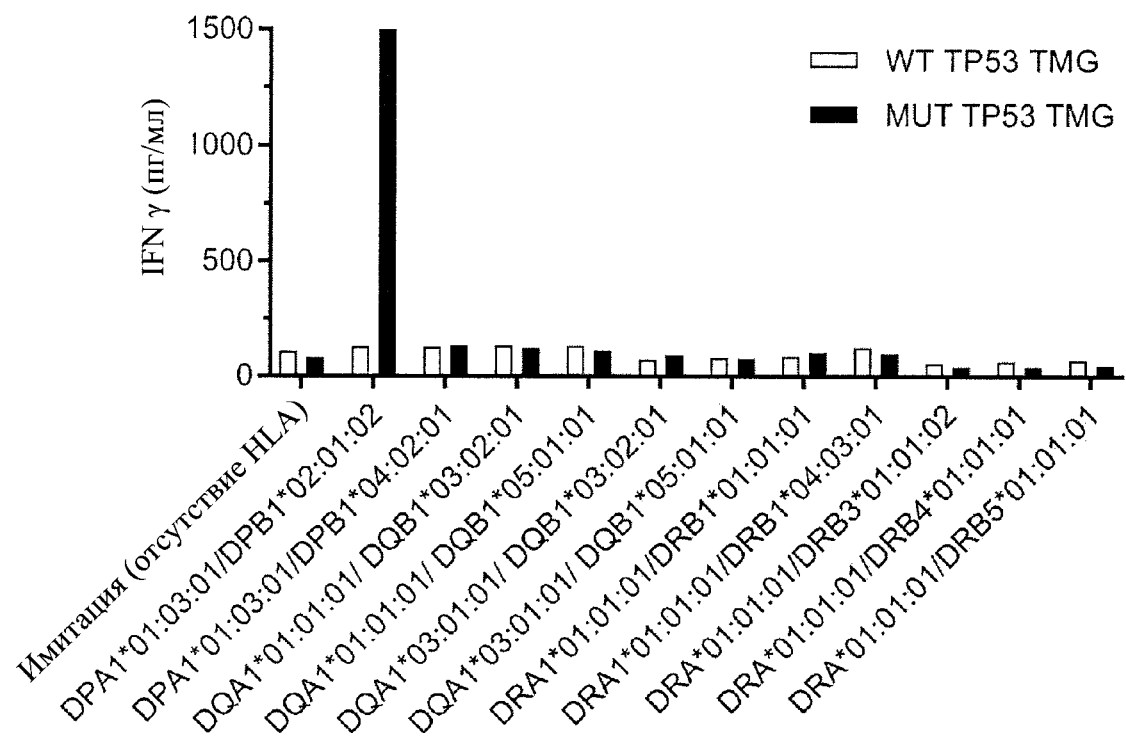
ФИГ. 56



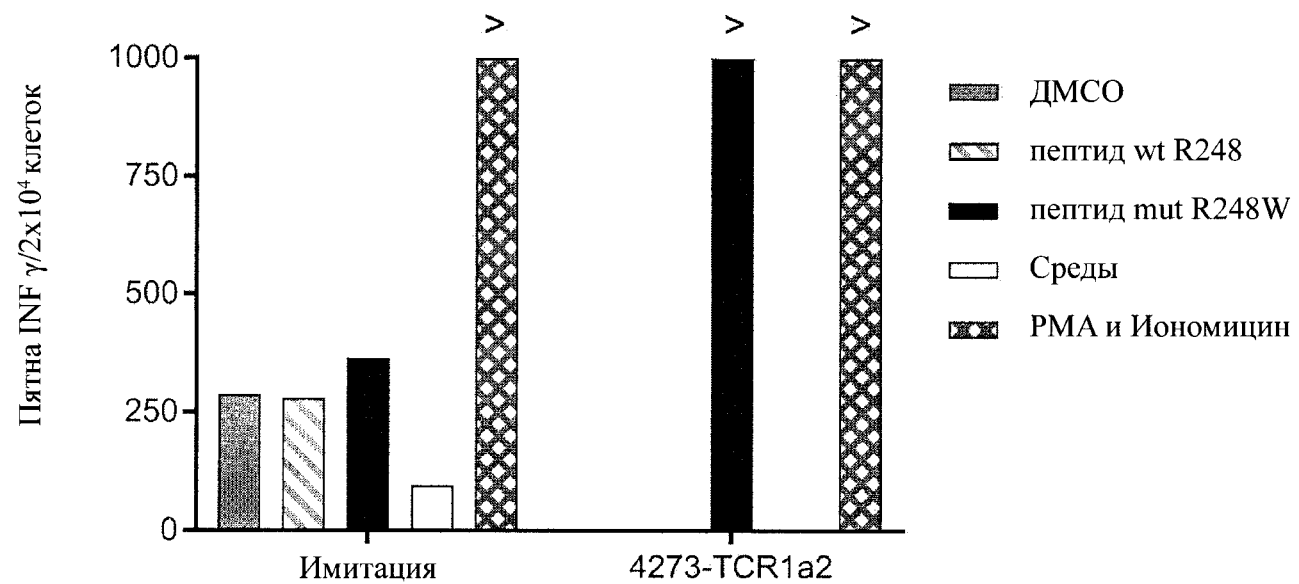
ФИГ. 57



ФИГ. 58



ФИГ. 59



ФИГ. 60