

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045513**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.30

(21) Номер заявки
202091335

(22) Дата подачи заявки
2018.12.03

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(54) ОГРАНИЧЕННЫЕ HLA КЛАССА I Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПРОТИВ МУТАНТНОГО RAS

(31) 62/594,244

(32) 2017.12.04

(33) US

(43) 2020.10.15

(86) PCT/US2018/063581

(87) WO 2019/112941 2019.06.13

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

(72) Изобретатель:
**Йозеф Рами, Лу Йон-Чэнь, Кафри Гал,
Розенберг Стивен А. (US)**

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(56) WO-A1-2016085904

Q.J. WANG ET AL.: "Identification of T-cell Receptors Targeting KRAS-Mutated Human Tumors", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 4, № 3, 1 March 2016 (2016-03-01), pages 204-214, XP055314168, US, ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0188, abstract, page 205, right-hand column, paragraph 1 - page 206, left-hand column, paragraph 4, page 206, left-hand column, last paragraph - page 210, right-hand column, paragraph 2

WO-A1-2017109109

WO-A1-2017112944

WO-A1-2017048593

TRAN ERIC ET AL.: "T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 375, № 23, 8 December 2016 (2016-12-08), pages 2255-2262, XP002780492, page 2258, left-hand column, paragraph 3, page 2260, left-hand column, paragraph 2, page 2261, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2

(57) Раскрыт выделенный или очищенный Т-клеточный рецептор (TCR), где данный TCR обладает антигенной специфичностью в отношении мутантной аминокислотной последовательности RAS, презентруемой молекулой человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I. 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 у млекопитающего рака и способы лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

B1

045513

045513

B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Данная патентная заявка заявляет приоритет по первоначальной патентной заявке США № 62/594244, поданной 4 декабря 2017 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Утверждение относительно исследования и 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 материала, представленного 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 37098 байт ASCII, с названием "741039_ST25.txt", датированный 3 декабря 2018 г.

Предшествующий уровень техники

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

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно одному воплощению изобретения предложен выделенный или очищенный T-клеточный рецептор (TCR - от англ. T-cell receptor), содержащий аминокислотные последовательности

- (i) SEQ ID NO: 1-3;
- (ii) SEQ ID NO: 4-6; или
- (iii) SEQ ID NO: 1-6,

где TCR обладает антигенной специфичностью в отношении мутантной человеческой аминокислотной последовательности RAS, презентуемой молекулой человеческого лейкоцитарного антигена (HLA - от англ. human leukocyte antigen) класса I, и где мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS представляет собой мутантную человеческую аминокислотную последовательность гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (KRAS), мутантную человеческую аминокислотную последовательность гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Харви (HRAS) или мутантную человеческую аминокислотную последовательность гомолога вирусного онкогена RAS нейроblastомы (NRAS).

Согласно другому воплощению изобретения предложен выделенный или очищенный полипептид, содержащий функциональную часть TCR по изобретению, где данная функциональная часть содержит следующие аминокислотные последовательности:

- (a) все из SEQ ID NO: 1-3;
- (b) все из SEQ ID NO: 4-6; или
- (c) все из SEQ ID NO: 1-6.

Согласно еще одному воплощению изобретения предложен выделенный или очищенный белок, содержащий по меньшей мере один из полипептидов по изобретению.

Согласно другим воплощениям изобретения предложены нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы, клетки-хозяева, популяции клеток и фармацевтические композиции, относящиеся к TCR, полипептидам и белкам по изобретению.

Кроме того, согласно воплощениям изобретения предложены способы выявления наличия рака у млекопитающего и способы лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

Краткое описание нескольких видов графических материалов

На фиг. 1A изображены графики, иллюстрирующие экспрессию CD137 CD8⁺ T-клетками периферической крови после совместного культивирования с диметилсульфоксидом (ДМСО) или аутологичными дендритными клетками (DC - от англ. dendritic cell), в которые под действием импульсов вводили 24-мерный пептид KRAS WT (от англ. wild type - дикий тип) или 24-мерный пептид KRAS G12V. Числа в рамках указывают на процентные содержания T-клеток, экспрессирующих CD137 при каждом условии совместного культивирования.

Фиг. 1B представляет собой график, показывающий число пятен IFN- γ (от англ. Interferon gamma - интерферон-гамма) на 2×10^4 клеток после совместного культивирования T-клеток с аутологичными DC, в которые под действием импульсов вводили ДМСО, 24-мерный пептид KRAS WT или 24-мерный пептид KRAS G12V. T-клетки, культивируемые с PMA (от англ. Phorbol-12-myristate-13-acetate - Форбол 12-миристанат 13-ацетат):иономицином, и T-клетки, культивируемые с DC, в которые под действием импульсов вводили ДМСО, служили в качестве контролей.

На фиг. 2 показаны графики, изображающие экспериментальные данные (точечные диаграммы),

иллюстрирующие процентное содержание CD8⁺ клеток периферической крови, которые уже подвергались IVS (от англ. in-vitro sensitization - сенсбилизация in vitro) 24-мерным пептидом KRAS G12V, которые были связаны с KRAS G12V тетрамером-аллофикоцианином (APC - от англ. allophycocyanin) или KRAS G12V тетрамером-фикоэритрином (PE - от англ. phycoerythrin) (правый график). На левом графике показаны Т-клетки, которые были модифицированы для экспрессии TCR, который распознавал 10-мерный KRAS G12D в контексте HLA-A*11:01, которые были связаны с KRAS G12V тетрамером-APC или KRAS G12V тетрамером-PE.

На фиг. 3 изображены графики, показывающие экспрессию TCR на поверхности аллогенных Т-клеток от первого и второго доноров (левая и правая панели соответственно), трансдуцированных TCR примера 2, как измерено посредством окрашивания на экспрессию мышиной константной области цепи бета TCR (mTCR β) посредством проточной цитометрии. Числа в рамках показывают процентные содержания клеток, которые были позитивными в отношении экспрессии mTCR β .

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий продукцию IFN- γ , как измерено посредством анализа ELISPOT (пятна IFN- γ на 2E4 клеток), и экспрессию 4-1BB (% mTCR β +CD137⁺) Т-клетками от двух разных доноров (донор 1 и донор 2), трансдуцированными TCR примера 2 после совместного культивирования в течение ночи с линиями раковых клеток, экспрессирующими разные мутации KRAS^{G12}. Каждая линия раковых клеток-мишеней не была трансдуцирована или была трансдуцирована HLA-A*11:01. ">" показывает больше чем 500 пятен.

Фиг. 5А представляет собой график, показывающий концентрацию (пг/мл) IFN- γ , секретируемого после совместного культивирования Т-клеток, трансдуцированных TCR примера 2, с клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили концентрации (нг/мл) 9-мерного пептида KRAS G12V (закрашенные кружки) или 9-мерного пептида KRAS WT (незакрашенные кружки).

Фиг. 5В представляет собой график, показывающий концентрацию (пг/мл) IFN- γ , секретируемого после совместного культивирования Т-клеток, трансдуцированных TCR примера 2, с клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили указанные концентрации (нг/мл) 10-мерного пептида KRAS G12V (закрашенные кружки) или 10-мерного пептида KRAS WT (незакрашенные кружки).

Подробное описание изобретения

Белки семейства RAS принадлежат к большому семейству малых ГТФаз. Без привязки к какой-либо конкретной теории или механизму полагают, что при мутировании белки RAS могут быть вовлечены в передачу сигнала на ранней стадии онкогенеза многих видов рака человека. Одна единственная аминокислотная замена может активировать белок. Мутантный белковый продукт RAS может активироваться конститутивно. Мутантные белки RAS могут экспрессироваться при любом из множества видов рака человека, таких как, например, рак поджелудочной железы (например, карцинома поджелудочной железы), колоректальный рак, рак легкого (например, аденокарцинома легкого), рак эндометрия, рак яичника (например, эпителиальный рак яичника) и рак предстательной железы. Человеческие белки семейства RAS включают гомолог вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (KRAS), гомолог вирусного онкогена крысиной саркомы Харви (HRAS) или гомолог вирусного онкогена RAS нейробластомы (NRAS).

KRAS также называется ГТФазой KRas, вирусным онкогеном крысиной саркомы Кирстена V-Ki-Ras2 или KRAS2. Существует два варианта транскрипта KRAS: вариант KRAS A и вариант KRAS B. Вариант KRAS A дикого типа (WT) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. Вариант KRAS B дикого типа (WT) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Далее в данном документе ссылки на "KRAS" (мутантный или немутантный (WT)) относятся к обоим вариантам A и B, если особым образом не указано иное. При активации, мутантный KRAS связывается с гуанозин-5'-трифосфатом (ГТФ) и превращает ГТФ в гуанозин 5'-дифосфат (ГДФ).

HRAS представляет собой другой член семейства белков RAS. HRAS также называется вирусным онкобелком крысиной саркомы Харви, гомологом вирусного онкогена крысиной саркомы Харви V-Ha-Ras или белком, связывающим малые ГТФ, семейства Ras H-Ras. WT HRAS имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

NRAS является еще одним членом семейства белков RAS. NRAS также называется СТФазой NRas, RAS-гомологом вирусного онкогена нейробластомы V-Ras или NRAS1. WT NRAS имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Согласно воплощению изобретения предложен выделенный или очищенный TCR, обладающий антигенной специфичностью в отношении мутантной человеческой аминокислотной последовательности RAS (далее в данном документе "мутантный RAS"), презентруемой молекулой человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I, где мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS представляет собой мутантную человеческую аминокислотную последовательность KRAS, мутантную человеческую аминокислотную последовательность HRAS или мутантную человеческую аминокислотную последовательность NRAS. Далее в данном документе ссылки на "TCR" также относятся к функциональным частям и функциональным вариантам TCR, если особым образом не указано иное.

TCR по изобретению может обладать антигенной специфичностью в отношении любой мутантной

человеческой аминокислотной последовательности RAS-белка, полипептида или пептида. В одном воплощении изобретения мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS представляет собой мутантную человеческую аминокислотную последовательность KRAS, мутантную человеческую аминокислотную последовательность HRAS или мутантную человеческую аминокислотную последовательность NRAS. Каждая из аминокислотных последовательностей человеческого белка KRAS, NRAS и HRAS WT имеет длину 188-189 аминокислотных остатков и обладает высокой степенью идентичности друг с другом. Например, аминокислотная последовательность человеческого белка NRAS WT на 86,8% идентична аминокислотной последовательности человеческого белка KRAS WT. Аминокислотные остатки 1-86 человеческого белка NRAS WT и человеческого белка KRAS WT идентичны на 100%. Аминокислотная последовательность человеческого белка HRAS WT на 86,3% идентична аминокислотной последовательности человеческого белка KRAS WT. Аминокислотные остатки 1-94 человеческого белка HRAS WT и человеческого белка KRAS WT идентичны на 100%. Далее в данном документе ссылки на "RAS" (мутантный или немутантный (WT)) в совокупности относятся к KRAS, HRAS и NRAS, если особым образом не указано иное.

В одном воплощении изобретения мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS содержит аминокислотную последовательность RAS WT с заменой глицина в положении 12, где положение 12 определяется ссылкой на белок RAS WT соответственно. Белок RAS WT может представлять собой любой из белка KRAS WT (SEQ ID NO: 9 или 10), белка HRAS WT (SEQ ID NO: 11) или белка NRAS WT (SEQ ID NO: 12), поскольку, как объясняется выше, аминокислотные остатки 1-86 человеческого белка NRAS WT и человеческого белка KRAS WT идентичны на 100%, и аминокислотные остатки 1-94 человеческого белка HRAS WT и человеческого белка KRAS WT идентичны на 100%. Соответственно аминокислотный остаток в положении 12 каждого из белков KRAS WT, HRAS WT и NRAS WT является одним и тем же, а именно глицином.

Глицин в положении 12 аминокислотной последовательности RAS WT может быть замещен любым аминокислотным остатком, отличным от глицина. В одном воплощении изобретения замена представляет собой замену глицина в положении 12 аминокислотной последовательности RAS WT на валин. В связи с этим согласно воплощениям изобретения предложены TCR с антигенной специфичностью в отношении аминокислотной последовательности WT RAS белка, полипептида или пептида с мутацией G12V.

Мутации и замены RAS определены в данном документе посредством ссылки на аминокислотную последовательность белка RAS WT. Таким образом, мутации и замены RAS описаны в данном документе посредством ссылки на аминокислотный остаток, находящийся в конкретном положении в белке RAS WT, с следующим за ним номером положения с следующим за ним аминокислотным остатком, на который тот остаток был замещен при конкретной мутации или обсуждаемой замене. Аминокислотная последовательность RAS (например, пептид RAS) может содержать меньше чем все из аминокислотных остатков полноразмерного белка RAS WT. Соответственно положение 12 определяется в данном документе ссылкой на полноразмерный белок RAS WT (а именно, любую из SEQ ID NO: 9-12), исходя из предположения, что фактическое положение соответствующего остатка в конкретном примере аминокислотной последовательности RAS может быть разным. Когда положения представляют собой такие, как определено любой из SEQ ID NO: 9-12, термин "G12" относится к глицину, обычно находящемуся в положении 12 любой из SEQ ID NO: 9-12, и "G12V" указывает на то, что глицин, обычно находящийся в положении 12 любой из SEQ ID NO: 9-12, замещен валином. Например, когда конкретный пример аминокислотной последовательности RAS представляет собой, например, TEYKLVVVGAGGVGKSAITQLI (SEQ ID NO: 28) (иллюстративный пептид KRAS WT, соответствующий смежным аминокислотным остаткам 2 - 24 SEQ ID NO: 9), "G12V" относится к замене подчеркнутого глицина в SEQ ID NO: 28 валином, даже при том, что фактическим положением подчеркнутого глицина в SEQ ID NO: 28 является 11.

Примеры полноразмерных белков RAS с мутацией G12V изложены ниже в табл. 1.

Таблица 1

Мутантный полноразмерный белок RAS	SEQ ID NO:
Вариант А KRAS G12V	13
Вариант В KRAS G12V	14
HRAS G12V	15
NRAS G12V	16

В одном воплощении изобретения TCR обладают антигенной специфичностью в отношении пептида RAS с мутацией G12V, описанной выше, где мутантный пептид RAS имеет любую длину. В одном воплощении изобретения мутантный пептид RAS имеет любую длину, подходящую для связывания с любой из молекул HLA класса I, описанной в данном документе. Например, TCR может обладать антигенной специфичностью в отношении пептида RAS с мутацией G12V, причем пептид RAS имеет длину от примерно 9 до примерно 10 аминокислотных остатков. Мутантный пептид RAS может содержать любые смежные аминокислотные остатки мутантного белка RAS, которые включают мутацию G12V. В одном воплощении изобретения TCR может обладать антигенной специфичностью в отношении пептида

RAS с мутацией G12V, причем мутантный пептид RAS имеет длину примерно 9 аминокислотных остатков или примерно 10 аминокислотных остатков. Примерами конкретных пептидов, каждый с мутацией G12V, которые могут распознаваться TCR G12V по изобретению, являются 9-мерный пептид WGAVGVGK (SEQ ID NO: 29) и 10-мерный пептид VWGAVGVGK.

В одном воплощении изобретения TCR по изобретению способны распознавать мутантный RAS, презентуемый молекулой HLA класса I. В связи с этим TCR может вызывать иммунный ответ при связывании с мутантным RAS в контексте молекулы HLA класса I. TCR по изобретению могут связываться с молекулой HLA класса I помимо мутантного RAS.

В одном воплощении изобретения молекула HLA класса I представляет собой молекулу HLA-A. Молекула HLA-A представляет собой гетеродимер цепи α и микроглобулина $\beta 2$. Цепь α HLA-A может кодироваться геном HLA-A. Микроглобулин $\beta 2$ нековалентно связывается с доменами альфа 1, альфа 2 и альфа 3 цепи альфа с образованием комплекса HLA-A. Молекула HLA-A может представлять собой любую молекулу HLA-A. В одном воплощении изобретения молекула HLA класса I представляет собой молекулу HLA-A11. Молекула HLA-A11 может представлять собой любую молекулу HLA-A11. Примеры молекул HLA-A11 могут включать HLA-A*11:01, HLA-A*11:02, HLA-A*11:03 или HLA-A*11:04, но не ограничиваются ими. Предпочтительно молекула HLA класса I представляет собой молекулу HLA-A*11:01.

TCR по изобретению могут обеспечивать любое одно или более из множества преимуществ, в том числе при экспрессии клетками, используемыми для адоптивного клеточного переноса. Мутантный RAS экспрессируется раковыми клетками и не экспрессируется нормальными, нераковыми клетками. Без привязки к какой-либо конкретной теории или механизму полагают, что TCR по изобретению преимущественно нацелены на деструкцию раковых клеток при минимизации или исключении деструкции нормальных, нераковых клеток, снижая, таким образом, например, в результате минимизации или исключения, токсичность. Кроме того, TCR по изобретению могут, преимущественно, успешно лечить или предупреждать мутантный RAS-позитивные виды рака, которые не отвечают на другие типы лечения, такие как, например, химиотерапия, хирургическое вмешательство и лучевая терапия. RAS^{G12} мутации находятся среди наиболее распространенных мутаций горячих точек, обнаруженных при многих типах рака. Например, мутация KRAS G12V экспрессируется у примерно 27% и примерно 9% пациентов с раком поджелудочной железы и колоректальным раком соответственно. Кроме того, члены семейства RAS имеют общую мутацию горячей точки G12 при разных типах рака (например, NRAS при меланоме). Кроме того, TCR по изобретению могут обеспечивать высокоавидное распознавание мутантного RAS, которое может обеспечивать способность распознавать неманипулированные опухолевые клетки (например, опухолевые клетки, которые не обрабатывали интерфероном (IFN)- γ , не трансфицировали вектором, кодирующим одно или оба из мутантного RAS и HLA-A*11:01, в которые не вводили под действием импульсов пептид RAS с мутацией G12V, или их комбинацию). Кроме того, аллель HLA-A*11:01 экспрессируется у приблизительно 14% и приблизительно 9% людей европеоидной расы и испанской этнической принадлежности соответственно. Аллель HLA-A*11:01 экспрессируется у вплоть до примерно 45% людей азиатской этнической принадлежности в США. Соответственно TCR по изобретению могут увеличивать число пациентов с раком, допущенных к иммунотерапии, с включением тех пациентов, которые экспрессируют аллель HLA-A*11:01, которые не могут быть допущены к иммунотерапии с использованием TCR, которые распознают RAS, презентуемые другими молекулами MHC (от англ. major histocompatibility complex - главный комплекс гистосовместимости). Кроме того, TCR, полипептиды и белки по изобретению содержат человеческие аминокислотные последовательности, которые могут снижать риск отторжения иммунной системой человека, в сравнении с, например, TCR, полипептидами и белками, содержащими мышьи аминокислотные последовательности.

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

(а) антиген-негативными, молекула HLA класса I-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида RAS (например, от примерно 0,05 нг/мл до примерно 10, 1, 2, 5, 8, 10 нг/мл или диапазон, определяемый любыми двумя из приведенных выше значений); или

(б) антиген-негативными, молекула HLA класса I-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный RAS, таким образом, чтобы клетка-мишень экспрессировала мутантный RAS.

Клетки, экспрессирующие TCR по изобретению, могут также секретировать IFN- γ при совместном культивировании с антиген-негативными, молекула HLA класса I-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили более высокие концентрации мутантного пептида RAS. Молекула HLA класса I может представлять собой любую из молекул HLA класса I, описанных в данном документе (например, молекулу HLA-A*11:01).

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

(a) антиген-негативными, молекула HLA класса I-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида RAS; или

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

Отрицательный контроль может представлять собой, например,

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

(a) антиген-негативными, молекула HLA класса I -позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили такую же концентрацию нерелевантного пептида (например, какого-то другого пептида с последовательностью, отличной от мутантного пептида RAS), или

(b) антиген-негативными, молекула HLA класса I-позитивными клетками-мишенями, в которые вводили нуклеотидную последовательность, кодирующую нерелевантный пептид, таким образом, чтобы клетка-мишень экспрессировала нерелевантный пептид; или

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

(a) антиген-негативными, молекула HLA класса I-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили такую же концентрацию мутантного пептида RAS, или

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

Молекула HLA класса I, экспрессируемая клетками-мишенями отрицательного контроля, будет той же молекулой HLA класса I, экспрессируемой клетками-мишенями, которые совместно культивируют с анализируемыми T-клетками. Молекула HLA класса I может представлять собой любую из молекул HLA класса I, описанных в данном документе (например, молекулу HLA-A*11:01). Секретия 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 RAS, если по меньшей мере в два раза большее число T-клеток, экспрессирующих TCR, секретирует IFN- γ при совместном культивировании с

(a) антиген-негативными, молекула HLA класса I-позитивными клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили низкую концентрацию мутантного пептида RAS; или

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

Молекула HLA класса I, концентрация пептида и отрицательный контроль могут представлять собой такие, 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, ELISPOT (от англ. Enzyme-Linked ImmunoSpot - аналитический метод иммуноферментных пятен).

В качестве альтернативы или дополнительно TCR может считаться обладающим "антигенной специфичностью" в отношении мутантного RAS, если T-клетки, экспрессирующие TCR, осуществляют повышающую регуляцию экспрессии одного или более маркеров активации T-клеток, как измерено, например, посредством проточной цитометрии после симуляции клетками-мишенями, экспрессирующими мутантный RAS. Примеры маркеров активации T-клеток включают 4-1BB, OX40, CD107a, CD69 и цитокины, которые подвергаются повышающей регуляции при антигенной стимуляции (например, фактор некроза опухоли (TNF - от англ. tumor necrosis factor), интерлейкин (IL)-2 и т.д.).

Согласно одному воплощению изобретения предложен TCR, содержащий два полипептида (а именно полипептидные цепи), такие 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 RAS.

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, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (CDR1 цепи α), CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (CDR2 цепи α) и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (CDR3 цепи α), и вторую полипептидную цепь, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (CDR1 цепи β), CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (CDR2 цепи β), и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (CDR3 цепи β). В связи с этим TCR по изобретению может содержать любую одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-6. В одном воплощении изобретения TCR содержит следующие аминокислотные последовательности:

- (a) все из SEQ ID NO: 1-3;
- (b) все из SEQ ID NO: 4-6; или
- (c) все из SEQ ID NO: 1-6.

В особенно предпочтительном воплощении TCR содержит аминокислотные последовательности всех из SEQ ID NO: 1-6.

В одном воплощении изобретения TCR содержит аминокислотную последовательность вариабельной области TCR, содержащей CDR, изложенные выше. TCR может содержать вариабельную область, например человеческую вариабельную область цепи α и человеческую вариабельную область цепи β . В связи с этим TCR может содержать следующую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 7 (вариабельная область цепи α); SEQ ID NO: 8 (вариабельная область цепи β); или обе из SEQ ID NO: 7 и 8. Предпочтительно TCR содержит аминокислотные последовательности обеих SEQ ID NO: 7 и 8.

TCR по изобретению могут дополнительно содержать константную область цепи α и константную область цепи β . Константная область может происходить из любого подходящего вида, такого как, например, человек или мышь. В одном воплощении изобретения TCR дополнительно содержат мышинные константные области цепи α и β или человеческие константные области цепи α и β . В том виде, в котором он используется в данном документе, термин "мышинный" или "человеческий", когда речь идет о TCR или любом компоненте TCR, описанном в данном документе (например, гипервариабельной области (CDR), вариабельной области, константной области, цепи альфа и/или цепи бета), означает TCR (или его компонент), который происходит из мыши или человека соответственно, т.е. TCR (или его компонент), который происходит из мыши или человека соответственно, а именно TCR (или его компонент), который происходит из или одновременно экспрессировался мышинной Т-клеткой или человеческой Т-клеткой соответственно.

Согласно одному воплощению изобретения предложен химерный TCR, содержащий человеческую вариабельную область и мышинную константную область, где TCR обладает антигенной специфичностью в отношении человеческой мутантной аминокислотной последовательности RAS, презентуемой молекулой HLA класса I. Мышиная константная область может обеспечивать одно или более преимуществ. Например, мышинная константная область может сокращать ошибочное спаривание TCR по изобретению с эндогенными TCR клетки-хозяина, в которую введен TCR по изобретению. В качестве альтернативы или дополнительно, мышинная константная область может повышать уровень экспрессии TCR по изобретению, по сравнению с тем же TCR с человеческой константной областью. Химерный TCR может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 (мышинная константная область цепи α дикого типа (WT)), SEQ ID NO: 20 (мышинная константная область цепи β WT) или обе SEQ ID NO: 19 и 20. Предпочтительно TCR по изобретению содержит аминокислотные последовательности и SEQ ID NO: 19 и 20. Химерный TCR может содержать любую из мышинных константных областей, описанных в данном документе, в сочетании с любой из CDR областей, как описано в данном документе в отношении других аспектов изобретения. В этой связи TCR может содержать следующие аминокислотные последовательности:

- (a) все из SEQ ID NO: 1-3 и 19;
- (b) все из SEQ ID NO: 4-6 и 20; или
- (c) все из SEQ ID NO: 1-6 и 19-20.

В другом воплощении изобретения химерный TCR может содержать любую из мышинных константных областей, описанных в комбинации с любой из вариабельных областей, описанных в данном документе в отношении других аспектов изобретения. В связи с этим TCR может содержать следующие аминокислотные последовательности:

- (i) обе из SEQ ID NO: 7 и 19;
- (ii) обе из SEQ ID NO: 8 и 20; или
- (iii) все из SEQ ID NO: 7-8 и 19-20.

В другом воплощении изобретения TCR содержит следующую(ие) аминокислотную(ые) последовательность(и): SEQ ID NO: 23 (цепь α с мышинной константной областью WT), SEQ ID NO: 24 (цепь β с

мышинной константной областью WT) или обе SEQ ID NO: 23-24.

В одном воплощении изобретения TCR содержит замещенную константную область. В связи с этим TCR может содержать аминокислотную последовательность любого из TCR, как описано в данном документе, с одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными заменами в константной области одной или обеих из цепи α и β . Предпочтительно TCR содержит мышиную константную область с одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными заменами в мышинной константной области одной или обеих из цепей α и β . В особенно предпочтительном воплощении TCR содержит мышиную константную область с одной, двумя, тремя или четырьмя аминокислотными заменами в мышинной константной области цепи α и одной аминокислотной заменой в мышинной константной области цепи β . В некоторых воплощениях TCR, содержащие замещенную константную область, преимущественно обеспечивают одно или более из следующего: повышенный уровень распознавания мутантных RAS⁺ мишеней, повышенный уровень экспрессии клеткой-хозяином, сокращенное ошибочное спаривание с эндогенными TCR и усиленная противоопухолевая активность, по сравнению с исходным TCR, содержащим незамещенную (дикий тип) константную область. В общем, замещенные аминокислотные последовательности мышинных константных областей цепей α и β TCR, SEQ ID NO: 17 и 18 соответственно, соответствуют всем или частям незамещенных мышинных аминокислотных последовательностей константных областей SEQ ID NO: 19 и 20 соответственно, причем SEQ ID NO: 17 имеет одну, две, три или четыре аминокислотные замены, по сравнению с SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 18, имеющими одну аминокислотную замену, по сравнению с SEQ ID NO: 20. В связи с этим согласно воплощению изобретения предложен TCR, содержащий следующие аминокислотные последовательности:

(a) SEQ ID NO: 17 (константная область цепи α), где

(i) X в положении 48 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 112 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp,

(iii) X в положении 114 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp, и

(iv) X в положении 115 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;

(b) SEQ ID NO: 18 (константная область цепи β), где X в положении 57 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе SEQ ID NO: 17 и 18.

В одном воплощении изобретения TCR, содержащий SEQ ID NO: 17, не содержит SEQ ID NO: 19 (незамещенная мышинная константная область цепи α). В одном воплощении изобретения TCR, содержащий SEQ ID NO: 18, не содержит SEQ ID NO: 20 (незамещенная мышинная константная область цепи β).

В одном воплощении изобретения TCR содержит цепь α , содержащую вариабельную область и константную область, и цепь β , содержащую вариабельную область и константную область. В этой связи, TCR может содержать

(a) цепь α , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, где

(i) X в положении 185 SEQ ID NO: 21 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 249 SEQ ID NO: 21 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp,

(iii) X в положении 251 SEQ ID NO: 21 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp, и

(iv) X в положении 252 SEQ ID NO: 21 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;

(b) цепь β , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, где X в положении 190 SEQ ID NO: 22 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе (a) и (b).

В одном воплощении изобретения TCR, содержащий SEQ ID NO: 21, не содержит SEQ ID NO: 23 (незамещенная цепь α). В одном воплощении изобретения TCR, содержащий SEQ ID NO: 22, не содержит SEQ ID NO: 24 (незамещенная цепь β).

В одном воплощении изобретения замещенная константная область включает цистеиновые замены в константной области одной или обеих цепей α и β с обеспечением цистеин-замещенного TCR. Противопоставленные цистеины в цепях α и β обеспечивают дисульфидную связь, которая связывает константные области цепей α и β замещенного TCR друг с другом и которая отсутствует в TCR, содержащем незамещенные мышинные константные области. В связи с этим TCR может представлять собой цистеин-замещенный TCR, в котором один или оба из нативного Thr в положении 48 (Thr48) SEQ ID NO: 19 и нативного Ser в положении 57 (Ser57) SEQ ID NO: 20 может(гут) быть замещен(ы) Cys. Предпочтительно и нативный Thr48 SEQ ID NO: 19, и нативный Ser57 SEQ ID NO: 20 замещены Cys. Примеры последовательностей константных областей цистеин-замещенных TCR изложены в табл. 2. В одном воплощении изобретения цистеин-замещенный TCR содержит

(i) SEQ ID NO: 17;

(ii) SEQ ID NO: 18; или

(iii) обе SEQ ID NO: 17 и 18, где обе SEQ ID NO: 17 и 18 представляют собой такие, как определено в табл. 2.

Цистеин-замещенные TCR по изобретению могут включать замещенную константную область помимо любой из CDR или вариабельных областей, описанных в данном документе.

В одном воплощении изобретения цистеин-замещенный, химерный TCR содержит полноразмерную цепь альфа и полноразмерную цепь бета. Примеры последовательностей цепей альфа и цепи бета цистеин-замещенного, химерного TCR изложены в табл. 2. В одном воплощении изобретения TCR содержит

- (i) SEQ ID NO: 21;
- (ii) SEQ ID NO: 22; или
- (iii) обе из SEQ ID NO: 21 и 22, где SEQ ID NO: 21-22 представляют собой такие, как определено в табл. 2.

Таблица 2

SEQ ID NO:	Определения «X»
SEQ ID NO: 17 (константная область цепи α)	X в положении 48 представляет собой Cys, X в положении 112 представляет собой Ser, X в положении 114 представляет собой Met, и X в положении 115 представляет собой Gly.
SEQ ID NO: 18 (константная область цепи β)	X в положении 57 представляет собой Cys
SEQ ID NO: 21 (цепь α)	X в положении 185 представляет собой Cys, X в положении 249 представляет собой Ser, X в положении 251 представляет собой Met, и X в положении 252 представляет собой Gly.
SEQ ID NO: 22 (цепь β)	X в положении 190 представляет собой Cys

В одном воплощении изобретения замещенная аминокислотная последовательность включает замены одной, двух или трех аминокислот в трансмембранном (TM - от англ. transmembrane) домене константной области одной или обеих цепей α и β гидрофобной аминокислотой для обеспечения TCR, замещенного гидрофобной аминокислотой (также называемого в данном документе "LVL-модифицированным TCR"). Замена(ы) гидрофобной аминокислотой в TM домене TCR может(могут) увеличивать гидрофобность TM домена TCR, в сравнении с TCR, который не имеет замены(замен) гидрофобной аминокислотой в TM домене. В связи с этим TCR представляет собой LVL-модифицированный TCR, в котором одна, две или три из нативных Ser112, Met114 и Gly115 SEQ ID NO: 19 может(могут) независимо быть замещена(ы) Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; предпочтительно Leu, Ile или Val. Предпочтительно все три из нативных Ser112, Met114 и Gly115 SEQ ID NO: 19 могут независимо быть замещены Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; предпочтительно Leu, Ile или Val. В одном воплощении изобретения LVL-модифицированный TCR содержит

- (i) SEQ ID NO: 17;
- (ii) SEQ ID NO: 18; или
- (iii) обе SEQ ID NO: 17 и 18, где обе SEQ ID NO: 17 и 18 представляют собой такие, как определено в табл. 3.

LVL-модифицированные TCR по изобретению могут включать замещенные константные области помимо любых из CDR или вариабельных областей, описанных в данном документе.

В одном воплощении изобретения LVL-модифицированный TCR содержит полноразмерную цепь альфа и полноразмерную цепь бета. Примеры последовательностей цепи альфа и цепи бета LVL-модифицированного TCR изложены в табл. 3. В одном воплощении изобретения LVL-модифицированный TCR содержит

- (i) SEQ ID NO: 21;
- (ii) SEQ ID NO: 22; или
- (iii) обе из SEQ ID NO: 21 и 22, где SEQ ID NO: 21-22 представляют собой такие, как определено в табл. 3.

Таблица 3

SEQ ID NO:	Определения «X»
SEQ ID NO: 17 (константная область цепи α)	X в положении 48 представляет собой Thr; X в положении 112 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;

	<p>предпочтительно где X в положении 112 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно где X в положении 112 представляет собой Leu;</p> <p>X в положении 114 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;</p> <p>предпочтительно где X в положении 114 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно где X в положении 114 представляет собой Ile; и</p> <p>X в положении 115 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;</p> <p>предпочтительно где X в положении 115 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно где X в положении 115 представляет собой Val;</p> <p>где SEQ ID NO: 17 не содержит SEQ ID NO: 19 (незамещенная константная область цепи альфа)</p>
SEQ ID NO: 18 (константная область цепи β)	X в положении 57 представляет собой Ser
SEQ ID NO: 21 (цепь α)	<p>X в положении 185 представляет собой Thr;</p> <p>X в положении 249 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;</p> <p>предпочтительно где X в положении 243 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно где X в положении 243 представляет собой Leu;</p> <p>X в положении 251 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;</p> <p>предпочтительно где X в положении 245 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно где X в положении 245 представляет собой Ile; и</p>
	<p>X в положении 252 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;</p> <p>предпочтительно где X в положении 246 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно где X в положении 246 представляет собой Val,</p> <p>где SEQ ID NO: 21 не содержит SEQ ID NO: 23 (незамещенная цепь альфа)</p>
SEQ ID NO: 22 (цепь β)	X в положении 190 представляет собой Ser

В одном воплощении изобретения замещенная аминокислотная последовательность включает цистеиновые замены в константной области одной из или обеих цепей α и β в комбинации с заменой(ами) одной, двух или трех аминокислот в трансмембранном (ТМ) домене константной области одной из или обеих цепей α и β на гидрофобную аминокислоту (также называемый в данном документе "цистеин-замещенным, LVL-модифицированным TCR"). В связи с этим TCR представляет собой цистеин-замещенный, LVL-модифицированный, химерный TCR, в котором нативный аминокислотный остаток Thr48 SEQ ID NO: 19 замещен Cys; один, два или три нативных аминокислотных остатка Ser112, Met114 и Gly115 SEQ ID NO: 19 независимо замещены Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; предпочтительно Leu, Ile или Val; и нативный аминокислотный остаток Ser57 SEQ ID NO: 20 замещен Cys. Предпочтительно все три нативных Ser112, Met114 и Gly115 SEQ ID NO: 19 могут независимо быть замещены Ala,

Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; предпочтительно Leu, Ile или Val. В одном воплощении изобретения цистеин-замещенный LVL-модифицированный TCR содержит

(i) SEQ ID NO: 17;

(ii) SEQ ID NO: 18; или

(iii) обе SEQ ID NO: 17 и 18, где обе SEQ ID NO: 17 и 18 представляют собой такие, как определено в табл. 4.

Цистеин-замещенные, LVL-модифицированные TCR по изобретению могут включать замещенную константную область помимо любой из CDR или переменных областей, описанных в данном документе.

В одном воплощении цистеин-замещенный, LVL-модифицированный TCR содержит полноразмерную цепь альфа и полноразмерную цепь бета. В одном воплощении изобретения цистеин-замещенный, LVL-модифицированный TCR содержит

(i) SEQ ID NO: 21;

(ii) SEQ ID NO: 22; или

(iii) обе из SEQ ID NO: 21 и 22, где SEQ ID NO: 21-22 представляют собой такие, как определено в табл. 4.

Таблица 4

SEQ ID NO:	Определения «X»
SEQ ID NO: 17 (константная область цепи α)	X в положении 48 представляет собой Cys; X в положении 112 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; предпочтительно где X в положении 112 представляет собой Leu, Ile или Val; особенно предпочтительно где X в положении 112 представляет собой Leu; X в положении 114 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp; предпочтительно где X в положении 114 представляет собой Leu, Ile или Val; особенно предпочтительно X в положении 114 представляет собой Ile; и X в положении 115 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; предпочтительно где X в положении 115 представляет собой Leu, Ile или Val; и особенно предпочтительно где X в положении 115 представляет собой Val, где SEQ ID NO: 17 одновременно не содержит все из Ser в положении 112, Met в положении 114 и Gly в положении 115.
SEQ ID NO: 18 (константная область цепи β)	X в положении 57 представляет собой Cys
SEQ ID NO: 21 (цепь α)	X в положении 185 представляет собой Cys; X в положении 249 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp; предпочтительно где X в положении 243 представляет собой Leu, Ile или Val; особенно предпочтительно где X в положении 243

	<p>представляет собой Leu;</p> <p>X в положении 251 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp;</p> <p>предпочтительно где X в положении 245 представляет собой Leu, Ile или Val;</p> <p>особенно предпочтительно где X в положении 245 представляет собой Ile; и</p> <p>X в положении 252 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;</p> <p>предпочтительно где X в положении 246 представляет собой Leu, Ile или Val; и особенно предпочтительно где X в положении 246 представляет собой Val,</p> <p>где SEQ ID NO: 21 одновременно не содержит все из Ser в положении 249, Met в положении 251 и Gly в положении 252.</p>
SEQ ID NO: 22 (цепь β)	X в положении 190 представляет собой Cys

Также согласно воплощению изобретения 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 одной цепи аминокислот, соединенных одной или более пептидными связями.

В отношении полипептидов по изобретению, функциональная часть может представлять собой любую часть, содержащую смежные аминокислоты TCR, частью которого она является, при условии, что функциональная часть специфично связывается с мутантным RAS. Термин "функциональная часть", при использовании в отношении TCR, относится к любой части или фрагменту TCR по изобретению, часть или фрагмент которого сохраняет биологическую активность TCR, частью которого она является (исходный TCR). Функциональные части охватывают, например, те части TCR, которые сохраняют способность к специфичному связыванию с мутантным RAS (например, в контексте молекулы HLA-A*11:01) 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 70%, 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 RAS; 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 вариационной(ых) области(ей) цепи α и/или цепи β TCR по изобретению. В одном воплощении изобретения полипептид может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (CDR1 цепи α), SEQ ID NO: 2 (CDR2 цепи α), SEQ ID NO: 3 (CDR3 цепи α), SEQ ID NO: 4 (CDR1 цепи β), SEQ ID NO: 5 (CDR2 цепи β), SEQ ID NO: 6 (CDR3 цепи β) или их комбинацию.

В связи с этим полипептид по изобретению может содержать любую одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-6. В одном воплощении изобретения TCR содержит следующие аминокислотные последовательности:

- (a) все из SEQ ID NO: 1-3;
- (b) все из SEQ ID NO: 4-6; или
- (c) все из SEQ ID NO: 1-6.

В предпочтительном воплощении полипептид содержит аминокислотные последовательности всех SEQ ID NO: 1-6.

В одном воплощении изобретения полипептид по изобретению может содержать, например, вариационную область TCR по изобретению, содержащую комбинацию CDR областей, изложенных выше. В связи с этим полипептид может содержать аминокислотную последовательность

- (i) SEQ ID NO: 7 (вариационная область цепи α);
- (ii) SEQ ID NO: 8 (вариационная область цепи β); или

(iii) обе SEQ ID NO: 7 и 8.

Предпочтительно полипептид содержит аминокислотные последовательности обеих SEQ ID NO: 7 и 8.

В одном воплощении изобретения полипептид по изобретению может дополнительно содержать константную область TCR по изобретению, изложенную выше. В этом отношении полипептид может дополнительно содержать следующую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 19 (мышинная константная область WT цепи α), SEQ ID NO: 20 (мышинная константная область WT цепи β), SEQ ID NO: 17 (замещенная мышинная константная область цепи α), SEQ ID NO: 18 (замещенная мышинная константная область цепи β), обе SEQ ID NO: 19 и 20 или обе SEQ ID NO: 17 и 18. Предпочтительно полипептид дополнительно содержит аминокислотные последовательности обеих из SEQ ID NO: 19 и 20 или обеих из SEQ ID NO: 17 и 18 в комбинации с любыми из CDR областей или переменных областей, описанных в данном документе, в отношении других аспектов изобретения.

В одном воплощении изобретения полипептид содержит

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, где

(i) X в положении 48 SEQ ID NO: 17 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 112 SEQ ID NO: 17 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp,

(iii) X в положении 114 SEQ ID NO: 17 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp, и

(iv) X в положении 115 SEQ ID NO: 17 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, где X в положении 57 SEQ ID NO: 18 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе (a) и (b).

В одном воплощении изобретения одна или обе из SEQ ID NO: 17 и 18 полипептида представляют собой такие, как определено в любой из табл. 2-4.

В одном воплощении изобретения полипептид по изобретению может содержать полную длину цепи α или β TCR, описанного в данном документе. В связи с этим полипептид по изобретению может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, обе SEQ ID NO: 21 и 22 или обе SEQ ID NO: 23 и 24. Предпочтительно полипептид содержит аминокислотные последовательности обеих из SEQ ID NO: 21 и 22 или обеих из SEQ ID NO: 23 и 24.

В одном воплощении изобретения полипептид содержит

(a) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, где

(i) X в положении 185 SEQ ID NO: 21 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 249 SEQ ID NO: 21 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp,

(iii) X в положении 251 SEQ ID NO: 21 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp, и

(iv) X в положении 252 SEQ ID NO: 21 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, где X в положении 190 SEQ ID NO: 22 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе (a) и (b).

В одном воплощении изобретения любая одна или более из SEQ ID NO: 21-22 полипептида представляют собой такие, как определено в любой из табл. 2-4.

Согласно воплощению изобретения 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 первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-3, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4-6.

В другом воплощении изобретения белок может содержать первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8.

Белок по изобретению может дополнительно содержать любую из константных областей, описанных в данном документе, в отношении других аспектов изобретения. В связи с этим в одном воплощении изобретения первая полипептидная цепь может дополнительно содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и вторая полипептидная цепь может дополнительно содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В одном воплощении изобретения первая полипептидная цепь может дополнительно содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и вторая полипептидная цепь может дополнительно содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В одном воплощении изобретения белок содержит

(a) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, где

(i) X в положении 48 SEQ ID NO: 17 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 112 SEQ ID NO: 17 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp,

(iii) X в положении 114 SEQ ID NO: 17 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp, и

(iv) X в положении 115 SEQ ID NO: 17 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(b) вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, где X в положении 57 SEQ ID NO: 18 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе (a) и (b).

В одном воплощении изобретения одна из или обе SEQ ID NO: 17 и 18 белка представляют собой такие, как определено в любой из табл. 2-4.

В качестве альтернативы или дополнительно белок по воплощению изобретения может содержать

(a) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, где

(i) X в положении 185 SEQ ID NO: 21 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 249 SEQ ID NO: 21 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp,

(iii) X в положении 251 SEQ ID NO: 21 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp, и

(iv) X в положении 252 SEQ ID NO: 21 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;

(b) вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, где X в положении 190 SEQ ID NO: 22 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе (a) и (b).

В одном воплощении изобретения белок может содержать первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В одном воплощении изобретения одна из или обе из SEQ ID NO: 21-22 представляют собой такие, как определено в любой из табл. 2-4.

Белок по изобретению может представлять собой TCR. В качестве альтернативы, если, например, белок содержит одну полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности обеих SEQ ID NO: 21 и 22, обеих SEQ ID NO: 23 и 24, или, 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 связи с этим согласно воплощению изобретения 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 в рамке (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, 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 представлять собой линкер фури-*SGSG-P2A*, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25. 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 цепями α и β .

Белок по изобретению может представлять собой рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее 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, вариабельную или константную область тяжелой или легкой цепи, одноцепочечный вариабельный 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 в рамке (в тандеме) с полипептидом по изобретению. Полипептид антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может представлять собой полипептид

любого антитела или любого фрагмента антитела, включая любые антитела и фрагменты антител, описанные в данном документе.

В объем изобретения включены функциональные варианты TCR, полипептидов или белков по изобретению, описанных 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, вариантом которого он является. Функциональные варианты охватывают, например, те варианты TCR, полипептида или белка, описанных в данном документе (исходный TCR, полипептид или белок), которые сохраняют способность специфично связываться с мутантным RAS, в отношении которого исходный TCR обладает антигенной специфичностью или с которым исходный полипептид или белок специфично связывается, в похожей степени, в той 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%, на примерно 50%, на примерно 75%, на примерно 80%, на примерно 90%, на примерно 95%, на примерно 96%, на примерно 97%, на примерно 98%, на примерно 99% или более идентичен 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 известны в данной области и включают аминокислотные замены, в которых одна аминокислота, имеющая определенные физические и/или химические свойства, заменяется на другую аминокислоту, которая имеет такие же химические или физические свойства. Например, консервативная аминокислотная замена может представлять собой кислотную аминокислоту, замещенную другой кислотной аминокислотой (например, Asp или Glu), аминокислоту с неполярной боковой цепью, замещенную другой аминокислотой с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val и т.д.), основную аминокислоту, замещенную другой основной аминокислотой (Lys, Arg и т.д.), аминокислоту с полярной боковой цепью, замещенную другой аминокислотой с полярной боковой цепью (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tug и т.д.) и т.д.

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

TCR, полипептид или белок может по существу состоять из конкретной 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. В связи с этим TCR, полипептид или белок могут, например, по существу состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, обеих SEQ ID NO: 21-22 или обеих SEQ ID NO: 23-24. Также, например, TCR, полипептиды или белки по изобретению могут по существу состоять из аминокислотной(ых) последовательности(ей)

- (i) SEQ ID NO: 7;
- (ii) SEQ ID NO: 8; или
- (iii) и SEQ ID NO: 7 и 8.

Кроме того, TCR, полипептиды или белки по изобретению могут по существу состоять из следующих аминокислотных последовательностей:

- (a) любая одна или более из SEQ ID NO: 1-6;
- (b) все из SEQ ID NO: 1-3;
- (c) все из SEQ ID NO: 4-6; или
- (d) все из SEQ ID NO: 1-6.

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

TCR, полипептиды и белки по изобретению могут содержать синтетические аминокислоты вместо

одной или более встречающихся в природе аминокислот. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области и включают, например, аминокислоты циклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин, α -амино н-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометил-цистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, β -фенилсерин β -гидроксифенилаланин, фенилглицин, α -нафтилаланин, циклогексилаланил, циклогексилглицин, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминмалоновую кислоту, моноамид аминмалоновой кислоты, N'-бензил-N'-метил-лизин, N',N'-добензил-лизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α -аминоциклопентанкарбоновую кислоту, α -аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α -аминоциклогептанкарбоновую кислоту, α -(2-амино-2-норборнан)-карбоновую кислоту, α,γ -диаминоасляную 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(могут) быть получен(ы) 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.

В объем изобретения включены конъюгаты, например биоконъюгаты, содержащие любые из TCR, полипептидов или белков (включая любые из их функциональных частей или вариантов), нуклеиновых кислот, рекомбинантных экспрессионных векторов, клеток-хозяев, популяций клеток-хозяев или антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. Конъюгаты, а также способы синтеза конъюгатов в общем известны в данной области.

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 фосфоротиоатная связь, вместо фосфодиэфирной связи, обнаруживаемой между нуклеотидами немодифицированного олигонуклеотида. В одном воплощении нуклеиновая кислота включает 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 то, 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-бромуррацил, 5-хлоруррацил, 5-йодуррацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил) урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N⁶-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N⁶-замещенный аденин, 7-метилгуанин,

5-метиламинотимидин, 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, метиловый 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).

Нуклеиновая кислота может содержать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует любые из TCR, полипептидов или белков, описанных в данном документе. В одном воплощении изобретения нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидные последовательности любой из SEQ ID NO: 31-32 (табл. 5). В одном воплощении изобретения нуклеиновая кислота содержит нуклеотидные последовательности обеих из SEQ ID NO: 31-32.

Таблица 5

ID TCR	цепь TCR	Нуклеотидная последовательность
RAS ^{G12V} - HLA- A*11:01	Альфа (TRAV14/D V4*02)	SEQ ID NO: 31 atgcatctgagctccctgctgaaggtggtgacagccagcctgtggctgggaccaggaatc gcacagaagatcacccagacacagcccgcatgtttgtgaggagaaggaggccgtga ccctggattgacactacgacacatctgatccagctacggcctgttctgtgataagcagcctt ctagcggcgagatgatctttctgatctaccaggcagctatgaccagcagaacgccaccg agggcagatactctgaattccagaaggccaggaagagcgccaacctgtgatcagc gctcccagctggcgattccgcatgtattctgtgcatgagaggcgctcacaggcg gctctgagaagctggtgttggcaaggccaccaagctgacagtgaaacctaatattcaga tccc
	Бета (TRBV5- 1*01)	SEQ ID NO: 32 atggcgctccgactgctgtgctgggtcctgctgtgctggggctgggctgcaagct ggcgctcactcagactccagatacctgatcaagaccagggccagcaggtgacactgtct tgacagccaatctccggccaccgctccgtgcttggtagcagaccctggccagggc ctccagttcctgtttgagatattctctgagacacagcggaaacaaggcaattccccggccg tttagcggcagacagtttagcaactccaggtctgagatgaatgtgagcaccctggagctgg gcgactccgacctgactgtgcccagctccctgactctggcgggttgatgagcagttctt tgggcctggcactcggctgaccgtcctg

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

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

Нуклеотидная последовательность, которая гибридизуется в жестких условиях, предпочтительно гибридизуется в условиях высокой жесткости. Под термином "условия высокой жесткости" подразумевается, что нуклеотидная последовательность специфично гибридизуется с целевой последовательностью (нуклеотидная последовательность любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе) в степени, которая заметно сильнее, чем при неспецифичной гибридизации. Условия высокой жесткости включают условия, которые будут отличать 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 совпадали 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 различимыми. Условия относительно высокой жесткости будут включать, например, низкосольевые 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 линкерный пептид.

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 могут являться 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 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 pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), серии pET (Novagen, Madison, WI), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Швеция) и серии pEX (Clontech, Palo Alto, CA). Также можно использовать векторы на основе бактериофагов, такие как λ GT10, λ GT11, λ Zapll (Stratagene), λ EMBL4 и λ NM1149. Примеры экспрессионных векторов растений включают pB101, 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 вирусный вектор, например, ретровирусный вектор. В особенно предпочтительном воплощении рекомбинантный экспрессионный вектор представляет собой вектор MSGV1.

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 или 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/C418, 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. Отбор 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 или вирусный 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 (ТК - от англ. thymidine kinase) вируса простого герпеса (HSV - от англ. herpes simplex virus), цитозиндеаминазы, пуридиннуклеозидфосфорилазы, нитроредуктазы и систему индуцибельных генов каспазы 9.

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, который может содержать рекомбинантный экспрессионный вектор по изобретению. Клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, например, растения, животного, грибов или водорослей, или может представлять собой прокариотическую клетку, например, бактерий или простейших. Клетка-хозяин может представлять собой культивируемую клетку или первичную клетку, т.е. выделенную непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может представлять собой адгезивную клетку или суспензионную клетку, т.е. клетку, которая растет в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в данной области и включают, например, клетки *E. coli* DH5 α , клетки яичника китайского хомяка, клетки VERO мартышки, клетки COS, клетки HEK293 и т.п. В целях амплификации или репликации рекомбинантного экспрессионного вектора клетка-хозяин предпочтительно представляет собой прокариотическую клетку, например, клетку DH5 α . В целях получения рекомбинантного TCR, полипептида или белка, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой клетку млекопитающего. Наиболее предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку человека. В то время как клетка-хозяин может быть клеткой любого типа клетки, может происходить из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой лимфоцит периферической крови (PBL - от англ. peripheral blood lymphocyte) или мононуклеарную клетку периферической крови (PBMC). Более предпочтительно клетка-хозяин представляет собой Т-клетку.

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

Также согласно изобретению предложена популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в данном документе. Популяция клеток может представлять собой гетерогенную популяцию, содержащую клетку-хозяина, содержащую любой из описанных рекомбинантных экспрессионных векторов, помимо по меньшей мере одной другой клетки, например, клетки-хозяина (например, Т-клетки), которая не содержит никакого из рекомбинантных экспрессионных векторов, 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 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%, может составлять больше чем примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95% или может составлять примерно 100%.

TCR, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева (включая их популяции) по изобретению, 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 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd ed., Pharmaceutical Press (2012). Предпочтительно, чтобы фармацевтически приемлемый носитель представлял собой носитель, который не обладает вредными побочными эффектами или токсичностью 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 (или ее популяцию), экспрессирующую TCR по изобретению, фармацевтически приемлемый носитель для клеток для инъекции может включать любой изотонический носитель, такой как, например, нормальный физиологический раствор (примерно 0,90% мас./об. NaCl в воде, примерно 300 мосмоль/л NaCl в воде или примерно 9,0 г NaCl на литр воды), раствор электролита NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL), примерно 5%-ную декстрозу в воде или Рингера-лактат. В одном воплощении фармацевтически приемлемый носитель дополняют человеческим сывороточным альбумином.

В целях изобретения 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 RAS) или выявления, лечения или предупреждения рака за период от примерно 2 ч или больше, например от 12 до 24 или более часов, с момента введения. В конкретных воплощениях период времени мог бы быть даже больше. Доза будет определяться эффективностью конкретного TCR материала по изобретению и состоянием животного (например, человека), а также массой тела данного животного (например, человека), подлежащего лечению.

Многие анализы для определения вводимой дозы известны в данной области. В целях изобретения анализ, который включает сравнение степени, до которой лизируются клетки-мишени или секретируется IFN- γ T-клетками, экспрессирующими TCR, полипептид или белок по изобретению при введении данной дозы таких T-клеток млекопитающему у целого ряда млекопитающих, каждому из которых дается разная доза T-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 или профилактическая эффективность TCR материалов по изобретению увеличивалась 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 сайтами, подходящими для присоединения мостика и/или химиотерапевтического агента, при условии, что мостик и/или химиотерапевтический агент, будучи присоединенным к TCR материалам по изобретению, не препятствует(ют) функции TCR материалов по изобретению, т.е. способности связываться с мутантным RAS 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 RAS, таким образом, что TCR (или родственный полипептид или белок по изобретению), при экспрессии клеткой, способен опосредовать иммунный ответ на клетку-мишень, экспрессирующую мутантный RAS. В этой связи, согласно изобретению предложен способ лечения или предупреждения рака у млекопитающего, включающий введение млекопитающему любой из фармацевтических композиций, TCR, полипептидов или белков, описанных в данном документе, любой нуклеиновой кислоты или рекомбинантного экспрессионного вектора, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из TCR, полипептидов, белков, описанных в данном документе, или любой клетки-хозяина или популяции клеток, содержащих рекомбинантный вектор, который кодирует любой из TCR, полипептидов или белков, описанных в данном документе, в количестве, эффективном для лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

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

Термины "лечить" и "предупреждать", а также слова, происходящие от них, в том виде, в котором они используются в данном документе, не обязательно подразумевают 100%-ное или полное вылечивание или предупреждение. Вернее, существуют варьирующие степени вылечивания 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 предложен способ выявления наличия рака у млекопитающего. Способ включает

(i) приведение образца, содержащего одну или более клеток от млекопитающего, в контакт 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

(ii) 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 рака 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)), фермент (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена) и элементарные частицы (например, частицы золота).

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

В отношении способов по изобретению рак может представлять собой любой рак, включая любой из следующих видов рака: острый лимфоцитарный рак, острый миелоидный лейкоз, альвеолярная рабдомиосаркома, рак кости, рак головного мозга, рак молочной железы, рак ануса и анального канала или прямой кишки, рак глаза, рак внутрипеченочного желчного протока, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, носовой полости или среднего уха, рак ротовой полости, рак влагалища, рак вульвы, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак шейки матки, карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта, глиома, лимфома Ходжкина, рак гортаноглотки, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легкого, злокачественная мезотелиома, меланома, множественная миелома, рак носоглотки, неходжкинская лимфома, рак ротоглотки, рак яичника, рак пениса, рак поджелудочной железы, брюшины, сальника и рак брыжейки тонкой кишки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почки, рак кожи, рак тонкой кишки, рак мягкой ткани, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки, рак мочеочника и рак мочевого пузыря.

Предпочтительным раком является рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легкого, эндометрия, яичника или предстательной железы. Предпочтительно рак легкого представляет собой аденокарциному легкого, рак яичника представляет собой эпителиальный рак яичника и рак поджелудочной железы представляет собой аденокарциному поджелудочной железы. В одном воплощении изобретения при раке экспрессируется мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS, где аминокислотная последовательность мутантного человеческого RAS представляет собой аминокислотную последовательность мутантного человеческого KRAS, мутантного человеческого HRAS или мутантного человеческого NRAS. Мутантный человеческий KRAS, мутантный человеческий HRAS и мутантный человеческий NRAS, экспрессируемые при раке, могут представлять собой такие, как описано в данном документе, в отношении других аспектов изобретения.

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 предпочтитель-

ным млекопитающим является человек.

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

Пример 1.

Данный пример демонстрирует выделение TCR, обладающего антигенной специфичностью в отношении человеческого KRAS с мутацией G12V, где мутантный KRAS презентован молекулой HLA-A*11:01.

TCR идентифицировали и выделяли из периферической крови пациента с раком эндометрия после сенсibilизации *in vitro* (IVS). Раковые клетки пациента, как было обнаружено, экспрессировали мутацию G12V KRAS. Кратко, в аутологичные DC под действием импульсов вводили мутантный пептид (MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLI) (SEQ ID NO: 26) и совместно культивировали в течение 10 суток с CD8 T-клетками, отобранными из периферической крови пациента.

Далее реактивность T-клеток анализировали в отношении аутологичных DC, в которые под действием импульсов вводили 24-мерный пептид, охватывающий мутацию G12V KRAS (MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLI) (SEQ ID NO: 26), или соответствующий пептид WT (MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI) (SEQ ID NO: 27).

Пептиды ресуспендируют в ДМСО. T-клетки, культивируемые с DC, в которые под действием импульсов вводили ДМСО, использовали в качестве отрицательного контроля. Реактивность T-клеток измеряли на основе экспрессии CD137 и продукции IFN- γ , как измерено посредством анализа ELISPOT. Реактивные T-клетки затем сортировали на основе экспрессии CD137, количества отсортированных T-клеток были увеличены, и отсортированные, увеличенные количества клеток еще раз тестировали, как описано в данном примере. Результаты показаны на фиг. 1A и 1B. Как показано на фиг. 1A и 1B, T-клетки осуществляли повышающую регуляцию экспрессии CD137 (фиг. 1A) и увеличивали продукцию IFN- γ (фиг. 1B) только после совместного культивирования с DC, в которые под действием импульсов вводили пептид KRAS G12V.

Поскольку пациент являлся HLA-A*11:01-позитивным, предсказывали, что 9- и 10-мерный пептиды KRAS G12V будут связываться с данной аллелью с высокой аффинностью. Таким образом, технологию окрашивания тетрамером использовали для анализа того, являлись ли T-клетки реактивными в отношении KRAS^{G12V} в контексте HLA-A*11:01. CD8⁺ T-клетки периферической крови, которые подвергались IVS 24-мерным пептидом KRAS G12V, окрашивали тетрамером (9-мерный VVGAVGVGK (SEQ ID NO: 29) или 10-мерный VVVGAVGVGK (SEQ ID NO: 30)). И PE и APC являются флуорофорами. Тетрамер был конъюгирован с одним из данных флуорофоров или других. Окрашивание клеток обоими тетрамерами повышает уверенность специфичности. Результаты показаны на фиг. 2 (правый график). T-клетки, модифицированные для экспрессии TCR, которые распознавали 10 мерный KRAS G12D в контексте HLA-A*11:01, использовали в качестве отрицательного контроля. Результаты для отрицательного контроля показаны на фиг. 2 (левый график). Как показано на фиг. 2, CD8 T-клетки, которые подвергались IVS 24-мерным пептидом KRAS G12V, окрашены тетрамером KRAS^{G12V}-HLA-A*11:01, в то время как T-клетки отрицательного контроля нет.

Секвенирование отсортированных посредством тетрамера клеток с использованием метода секвенирования ДНК одиночной клетки обнаружило одну цепь бета и одну цепь альфа (табл. 6). Нуклеотидные последовательности переменных областей цепей альфа и бета TCR представляли собой SEQ ID NO: 31 и 32 соответственно.

Таблица 6

ID TCR	Цепь TCR	Аминокислотная последовательность (подчеркнуты области, определяющие комплементарность)
KRAS ^{G12V} - HLA- A*11:01	Альфа (TRAV14/D V4*02)	MSLSSLLKVVVTASLWLGPGIAQKITQTQPGMFVQEKEAVT LDCTYDTS <u>SDPSYGLFWYKQPSSGEMIFLIYQGSYDQQNA</u> TEGRYSLNFKARKSANLVISASQLGDSAMYFC <u>AMRGAS</u> <u>QGGSEKLVFGKGTCLTVNP</u> (SEQ ID NO: 7)
	Бета (TRBV5- 1*01)	MGSRLLCWLLCCLLGGAPVKAGVTQTPRYLIKTRGQQVT LSCSPISGHRSVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKGN FPGRFSGRQFSNSRSEMNVSTLELGDSALYL <u>CASSLTSG</u> <u>GFDEQFFGPGTRLTVL</u> (SEQ ID NO: 8)

Пример 2.

Данный пример демонстрирует получение экспрессионной кассеты, кодирующей TCR примера 1 с цистеин-замещенной, LVL-модифицированной мышиной константной областью, и клонирование данной экспрессионной кассеты в ретровирусный вектор.

TCR примера 1 клонировали в MSGV1-ретровирусный вектор. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую выделенный G12V-реактивный TCR примера 1 (содержащий нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32), и включающую цистеин-замещенную, LVL-модифицированную мышиную константную область, клонировали в ретровирусный вектор. Мышиная константная область цепи α содержала аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, где X в положении 48 представляет собой Cys, X в положении 112 представляет собой Leu, X в положении 114 представляет собой Ile, и X в положении 115 представляет собой Val. Константная область цепи β содержала аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, где X в положении 57 представляет собой Cys. Линкер P2A, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 (Wargo et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 58(3):383-94 (2009)), был расположен между константной областью цепи α и вариательной областью цепи β . От 5'-к 3'-концу, ретровирусный вектор включал нуклеотидную последовательность, кодирующую вариательную область цепи β TCR, за которой следовала модифицированная мышинная константная область цепи β , за которой следовала последовательность линкера P2A, за которой следовала вариательная область цепи α TCR с последующей модифицированной мышинной константной областью цепи α .

Пример 3.

Данный пример демонстрирует, что аллогенные Т-клетки периферической крови, трансдуцированные TCR примера 2, специфично распознают человеческий KRAS с мутацией G12V, где мутантный KRAS презентируется молекулой HLA-A*11:01.

Создавали ретровирус, кодирующий TCR примера 2, и использовали для трансдукции аллогенных Т-клеток периферической крови от двух доноров (способы, как описано в Tran et al., *N. Engl. J. Med.*, 375:2255-2262 (2016)). Экспрессию TCR на поверхности клеток измеряли посредством проточной цитометрии. Результаты показаны на фиг. 3. Как показано на фиг. 3, экспрессию мышинной константной области цепи бета TCR (mTCR β) выявляли на поверхности клеток.

Аллогенные клетки, трансдуцированные TCR примера 2, тестировали на реактивность в отношении линий раковых клеток-мишеней, экспрессирующих KRAS G12D, KRAS G12C или KRAS G12V. Линии раковых клеток-мишеней являлись позитивными или негативными в отношении экспрессии HLA-A11, как показано на фиг. 4. Реактивность измеряли по продукции IFN- γ (ELISPOT) и повышающей регуляции CD137 (проточная цитометрия). Результаты показаны на фиг. 4. Как показано на фиг. 4, трансдуцированные клетки, как было обнаружено, являлись специфично реактивными в отношении линий раковых клеток, экспрессирующих KRAS^{G12V} и HLA-A*11:01.

Пример 4.

Данный пример демонстрирует, что TCR примера 2 специфично распознает каждый из 9-мерного пептида KRAS G12V VVGAVGVGK (SEQ ID NO: 29) и 10-мерного пептида KRAS G12V VVGAVGVGK (SEQ ID NO: 30).

Аллогенные Т-клетки трансдуцировали TCR примера 2, как описано в примере 3. В клетки-мишени COS7/A11 под действием импульсов вводили разные концентрации 9-мерного пептида KRAS G12V VVGAVGVGK (SEQ ID NO: 29), 10-мерного пептида KRAS G12V VVGAVGVGK (SEQ ID NO: 30), 9-мерного пептида KRAS WT VVGAGGVGK (SEQ ID NO: 33) или 10-мерного пептида KRAS WT VVGAGGVGK (SEQ ID NO: 34). Трансдуцированные Т-клетки совместно культивировали с клетками-мишенями, в которые под действием импульсов вводили вышеуказанное. Измеряли секрецию IFN- γ . Результаты показаны на фиг. 5A (9-мерные пептиды) и фиг. 5B (10-мерные пептиды). Как показано на фиг. 5A, 5B, TCR специфично распознавал каждый из 9-мерного пептида KRAS G12V и 10-мерного пептида KRAS G12V.

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 изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее и термины в единственном числе и термины во множественном числе, если в данном документе не указано иное или оно явно не противоречит контексту. Применение термина "по меньшей мере один" с последующим перечислением одного или более пунктов (например, "по меньшей мере один из А и В") следует истолковывать как означающее один пункт, выбранный из перечисленных пунктов (А или В), или любую комбинацию двух или более из перечисленных пунктов (А или В), если в данном документе не указано иное или оно явно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует истолковывать как открытые термины (т.е. означающие "включающий, но не ограниченный.."), если не указано иное. Раскрытие диапазонов значений в данном документе предназначено только 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), содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-6, где TCR обладает антигенной специфичностью в отношении мутантной человеческой аминокислотной последовательности RAS, презентируемой молекулой человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I.

2. TCR по п.1, содержащий человеческую вариабельную область.

3. TCR по п.1 или 2, содержащий

(i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

(ii) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; или

(iii) обе из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 и аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

4. TCR по любому из пп.1-3, дополнительно содержащий

(a) константную область цепи α , содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, где

(i) X в положении 48 SEQ ID NO: 17 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 112 SEQ ID NO: 17 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp,

(iii) X в положении 114 SEQ ID NO: 17 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp, и

(iv) X в положении 115 SEQ ID NO: 17 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;

(b) константную область цепи β , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, где X в положении 57 SEQ ID NO: 18 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе (a) и (b).

5. Выделенный или очищенный TCR по любому из пп.1-4, содержащий

(a) цепь α , содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, где

(i) X в положении 185 SEQ ID NO: 21 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 249 SEQ ID NO: 21 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp,

(iii) X в положении 251 SEQ ID NO: 21 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp, и

(iv) X в положении 252 SEQ ID NO: 21 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;

(b) цепь β , содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, где X в положении 190 SEQ ID NO: 22 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе (a) и (b).

6. TCR по любому из пп.1-5, где мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS представляет собой мутантную человеческую аминокислотную последовательность гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (KRAS), мутантную человеческую аминокислотную последовательность гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Харви (HRAS) или мутантную человеческую аминокислотную последовательность гомолога вирусного онкогена RAS нейробластомы (NRAS).

7. TCR по п.6, где аминокислотная последовательность мутантной человеческой аминокислотной последовательности RAS содержит или состоит из SEQ ID NO: 29 или 30.

8. TCR по п.6 или 7, где молекула HLA класса I представляет собой молекулу HLA-A.

9. TCR по любому из пп.6-8, где молекула HLA класса I представляет собой молекулу HLA-A 11.

10. TCR по любому из пп.6-9, где молекула HLA класса I представляет собой молекулу HLA-A*11:01.

11. TCR по любому из пп.6-10, где мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS включает человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа с заменой глицина в положении 12, где положение 12 определяется ссылкой на человеческий белок KRAS дикого типа, человеческий белок HRAS дикого типа или человеческий белок NRAS дикого типа соответственно.

12. TCR по п.11, где замена представляет собой замену глицина в положении 12 на валин.

13. TCR по любому из пп.1-12, где TCR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или обе SEQ ID NO: 7-8.

14. TCR по любому из пп.1-13, где TCR содержит

(a) константную область цепи α , содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, где

(i) X в положении 48 SEQ ID NO: 17 представляет собой Cys,

(ii) X в положении 112 SEQ ID NO: 17 представляет собой Leu,

(iii) X в положении 114 SEQ ID NO: 17 представляет собой Ile, и

(iv) X в положении 115 SEQ ID NO: 17 представляет собой Val;

(b) константную область цепи β , содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, где X в положении 57 SEQ ID NO: 18 представляет собой Cys; или

(c) обе (a) и (b).

15. TCR по любому из пп.1-14, где TCR содержит

(a) цепь α , содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, где

(i) X в положении 185 SEQ ID NO: 21 представляет собой Cys,

(ii) X в положении 249 SEQ ID NO: 21 представляет собой Leu,

(iii) X в положении 251 SEQ ID NO: 21 представляет собой Ile, и

(iv) X в положении 252 SEQ ID NO: 21 представляет собой Val;

(b) цепь β , содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, где X в положении 190 SEQ ID NO: 22 представляет собой Cys; или

(c) обе (a) и (b).

16. Выделенный или очищенный полипептид, содержащий функциональную часть TCR по любому из пп.1-5, где указанная функциональная часть содержит следующие аминокислотные последовательности: все из SEQ ID NO: 1-6, где указанная функциональная часть обладает антигенной специфичностью в отношении мутантной человеческой аминокислотной последовательности RAS, презентруемой молекулой человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I.

17. Выделенный или очищенный полипептид по п.16, в котором функциональная часть содержит

(i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7,

(ii) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или

(iii) обе из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 и аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

18. Выделенный или очищенный полипептид по п.16 или 17, где функциональная часть содержит

(a) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, где

(i) X в положении 48 SEQ ID NO: 17 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 112 SEQ ID NO: 17 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp,

(iii) X в положении 114 SEQ ID NO: 17 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp, и

(iv) X в положении 115 SEQ ID NO: 17 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, где X в положении 57 SEQ ID NO: 18 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе (a) и (b).

19. Выделенный или очищенный полипептид по любому из пп.16-18, содержащий

(a) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, где

(i) X в положении 185 SEQ ID NO: 21 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 249 SEQ ID NO: 21 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp,

(iii) X в положении 251 SEQ ID NO: 21 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp; и

(iv) X в положении 252 SEQ ID NO: 21 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp;

(b) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, где X в положении 190 SEQ ID NO: 22 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе (a) и (b).

20. Выделенный или очищенный полипептид по любому из пп.16-19, в котором функциональная часть содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или обе SEQ ID NO: 7-8.

21. Выделенный или очищенный полипептид по любому из пп.16-20, где полипептид содержит

(a) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, где

(i) X в положении 48 SEQ ID NO: 17 представляет собой Cys,

(ii) X в положении 112 SEQ ID NO: 17 представляет собой Leu,

(iii) X в положении 114 SEQ ID NO: 17 представляет собой Ile, и

(iv) X в положении 115 SEQ ID NO: 17 представляет собой Val;

(b) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, где X в положении 57 SEQ ID NO: 18 представляет собой Cys; или

(c) обе (a) и (b).

22. Выделенный или очищенный полипептид по любому из пп.16-21, где полипептид содержит

(a) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, где

(i) X в положении 185 SEQ ID NO: 21 представляет собой Cys,

(ii) X в положении 249 SEQ ID NO: 21 представляет собой Leu,

(iii) X в положении 251 SEQ ID NO: 21 представляет собой Ile, и

(iv) X в положении 252 SEQ ID NO: 21 представляет собой Val;

(b) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, где X в положении 190 SEQ ID NO: 22 представляет собой Cys; или

(c) обе (a) и (b).

23. Выделенный или очищенный белок, содержащий первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-3, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4-6, где белок обладает антигенной специфичностью в отношении мутантной человеческой аминокислотной последовательности RAS, презентруемой молекулой человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I.

24. Выделенный или очищенный белок по п.23, содержащий первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

25. Выделенный или очищенный белок по любому из пп.23, 24, дополнительно содержащий

(a) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, где

(i) X в положении 48 SEQ ID NO: 17 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 112 SEQ ID NO: 17 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или Trp,

(iii) X в положении 114 SEQ ID NO: 17 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp, и

(iv) X в положении 115 SEQ ID NO: 17 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(b) вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, где X в положении 57 SEQ ID NO: 18 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе (a) и (b).

26. Выделенный или очищенный белок по любому из пп.23-25, содержащий

(a) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, где

(i) X в положении 185 SEQ ID NO: 21 представляет собой Thr или Cys,

(ii) X в положении 249 SEQ ID NO: 21 представляет собой Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp,

(iii) X в положении 251 SEQ ID NO: 21 представляет собой Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe или Trp, и

(iv) X в положении 252 SEQ ID NO: 21 представляет собой Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met или

Trp;

(b) вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, где X в положении 190 SEQ ID NO: 22 представляет собой Ser или Cys; или

(c) обе (a) и (b).

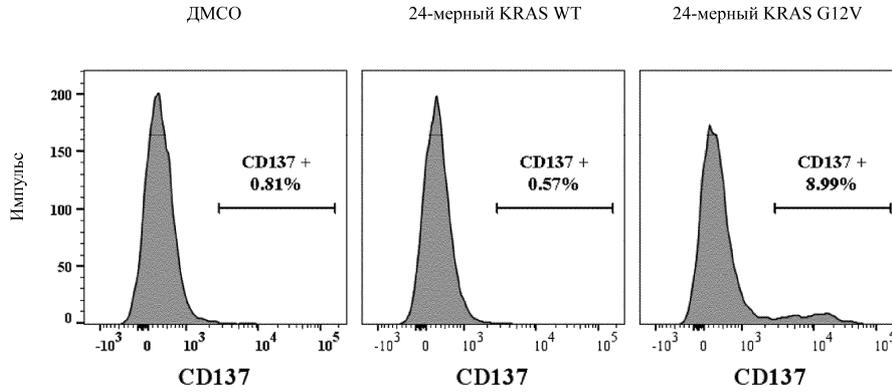
27. Выделенный или очищенный белок по любому из пп.23-26, где белок содержит первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

28. Выделенный или очищенный белок по любому из пп.23-27, где белок содержит
- (a) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную первой полипептидной цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, где
 - (i) X в положении 48 SEQ ID NO: 17 представляет собой Cys,
 - (ii) X в положении 112 SEQ ID NO: 17 представляет собой Leu,
 - (iii) X в положении 114 SEQ ID NO: 17 представляет собой Ile, и
 - (iv) X в положении 115 SEQ ID NO: 17 представляет собой Val;
 - (b) вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, где X в положении 57 SEQ ID NO: 18 представляет собой Cys; или
 - (c) обе (a) и (b).
29. Выделенный или очищенный белок по любому из пп.23-28, где белок содержит
- (a) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную первой полипептидной цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, где
 - (i) X в положении 185 SEQ ID NO: 21 представляет собой Cys,
 - (ii) X в положении 249 SEQ ID NO: 21 представляет собой Leu,
 - (iii) X в положении 251 SEQ ID NO: 21 представляет собой Ile, и
 - (iv) X в положении 252 SEQ ID NO: 21 представляет собой Val;
 - (b) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную второй полипептидной цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, где X в положении 190 SEQ ID NO: 22 представляет собой Cys; или
 - (c) обе (a) и (b).
30. Выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую TCR по любому из пп.1-15, полипептид по любому из пп.16-22 или белок по любому из пп.23-29.
31. Рекombинантный экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.30.
32. Выделенная или очищенная клетка-хозяин, содержащая рекombинантный экспрессионный вектор по п.31.
33. Выделенная или очищенная популяция клеток, содержащая клетку-хозяина по п.32.
34. Фармацевтическая композиция, содержащая
- (a) TCR по любому из пп.1-15, полипептид по любому из пп.16-22, белок по любому из пп.23-29, нуклеиновую кислоту по п.30, рекombинантный экспрессионный вектор по п.31, клетку-хозяина по п.32 или популяцию клеток по п.33; и
 - (b) фармацевтически приемлемый носитель.
35. Способ выявления наличия рака у млекопитающего, включающий
- (a) приведение образца, содержащего раковые клетки, в контакт с TCR по любому из пп.1-15, полипептидом по любому из пп.16-22, белком по любому из пп.23-29, нуклеиновой кислотой по п.30, рекombинантным экспрессионным вектором по п.31, клеткой-хозяином по п.32, популяцией клеток по п.33 или фармацевтической композицией по п.34 с образованием вследствие этого комплекса; и
 - (b) выявление данного комплекса,
- где выявление комплекса свидетельствует о наличии рака у млекопитающего.
36. Применение TCR по любому из пп.1-15, полипептида по любому из пп.16-22, белка по любому из пп.23-29, нуклеиновой кислоты по п.30, рекombинантного экспрессионного вектора по п.31, клетки-хозяина по п.32, популяции клеток по п.33 или фармацевтической композиции по п.34 для производства лекарственного средства для лечения или предупреждения рака у млекопитающего.
37. Применение по п.36, где при раке экспрессируется мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS, где мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS представляет собой мутантную человеческую аминокислотную последовательность KRAS, мутантную человеческую аминокислотную последовательность HRAS или мутантную человеческую аминокислотную последовательность NRAS.
38. Применение по п.37, где мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS включает человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа с заменой глицина в положении 12, где положение 12 определяется ссылкой на человеческую аминокислотную последовательность KRAS дикого типа, человеческую аминокислотную последовательность HRAS дикого типа или человеческую аминокислотную последовательность NRAS дикого типа соответственно.
39. Применение по п.38, где замена представляет собой замену глицина в положении 12 валином.
40. Применение по любому из пп.37-39, где мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS представляет собой мутантную человеческую аминокислотную последовательность гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Кирстена (KRAS).
41. Применение по любому из пп.37-39, где мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS представляет собой мутантную человеческую аминокислотную последовательность го-

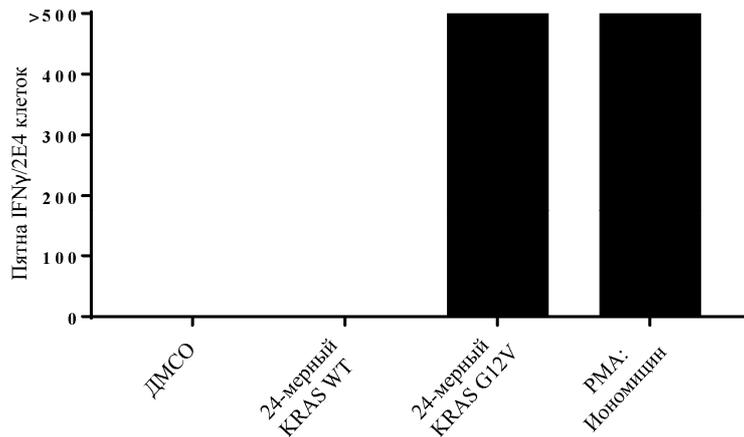
молога вирусного онкогена RAS нейробластомы (NRAS).

42. Применение по любому из пп.37-39, где мутантная человеческая аминокислотная последовательность RAS представляет собой мутантную человеческую аминокислотную последовательность гомолога вирусного онкогена крысиной саркомы Харви (HRAS).

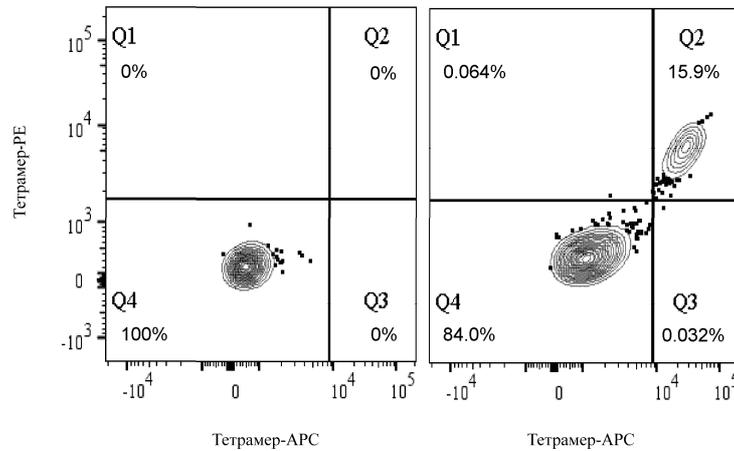
43. Применение по любому из пп.36-42, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легкого, эндометрия, яичника или предстательной железы.



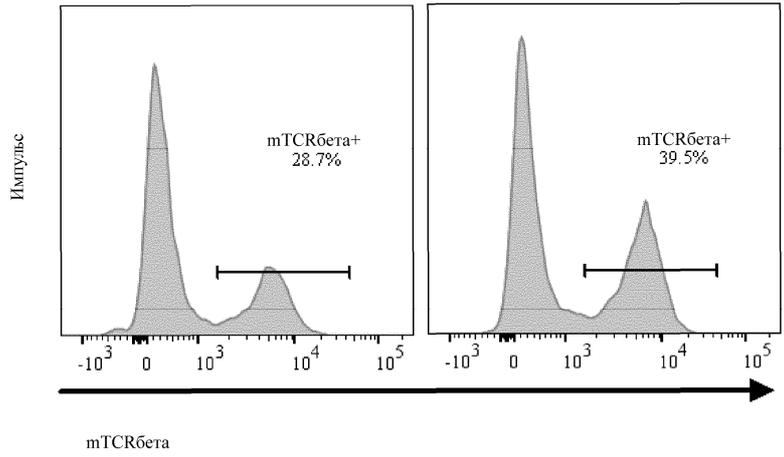
Фиг. 1А



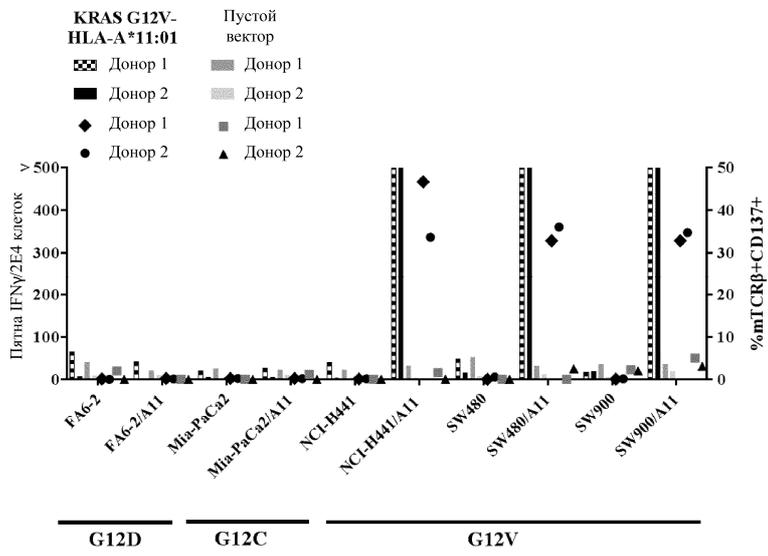
Фиг. 1В



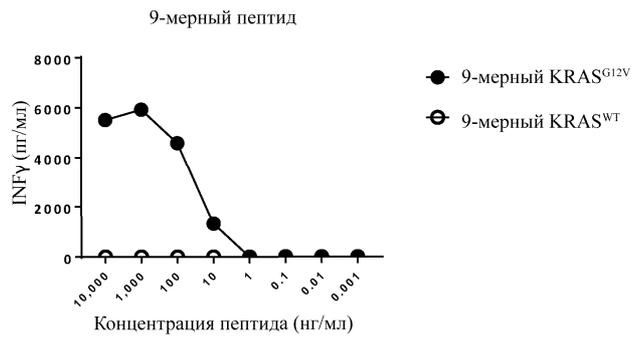
Фиг. 2



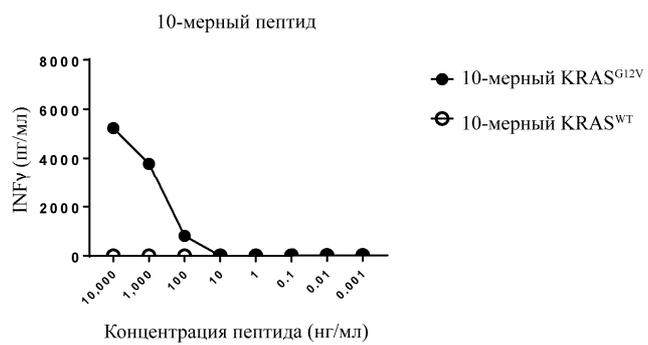
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5A



Фиг. 5В

